

**Isolierung und funktionelle Charakterisierung
von Einzelkomponenten des Gifts
der südamerikanischen Klapperschlange**
Crotalus durissus terrificus

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Physiologie
Fachgruppe Membranphysiologie

vorgelegt von
Stefan Kaltenbach

aus Stuttgart

2017

Fakultät für Naturwissenschaften
Institut für Physiologie
Fachgruppe Membranphysiologie
der Universität Hohenheim

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer

1. berichtende Person: Prof. Dr. Wolfgang R. L. Hanke
2. berichtende Person: Prof. Dr. Andreas Kuhn

Eingereicht am: 12.10.2017
Mündliche Prüfung am: 15.12.2017

Die vorliegende Arbeit wurde am 28.11.2017 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABSTRACT	3
3	EINLEITUNG.....	5
3.1	DIE SÜDAMERIKANISCHE KLAPPERSCHLANGE <i>CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS</i>.....	5
3.2	ZUSAMMENSETZUNG DES GIFTS DER <i>CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS</i>	7
3.3	CROTOXIN	8
3.3.1	WIRKUNGSWEISE VON CROTOXIN	9
3.3.2	STRUKTUR UND ISOFORMEN VON CROTOXIN.....	14
3.4	CROTAMIN.....	18
3.4.1	WIRKUNGSWEISE VON CROTAMIN.....	18
3.4.2	GENSTRUKTUR UND CHROMOSOMALE LOKALISATION	20
3.4.3	STRUKTURELLE UNTERSUCHUNGEN VON CROTAMIN.....	20
3.4.4	ANTIMIKROBIELLE UND ANTIFUNGALE AKTIVITÄT VON CROTAMIN.....	22
3.4.5	ANTITUMORALE AKTIVITÄT VON CROTAMIN.....	24
3.4.6	CROTAMIN - EIN ZELLPENETRIERENDES PEPTID.....	25
3.5	ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE (AMPs)	29
3.6	DIE LIPIDKOMPOSITION VON BIOMEMBRANEN	32
3.7	DER EINFLUSS VON CHOLESTERIN AUF DIE BIOPHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON MEMBRANEN	34
3.8	ZIELSETZUNG	38
4	MATERIAL	39
4.1	ALLGEMEINE CHEMIKALIEN	39
4.2	SUBSTANZEN, PUFFER, LÖSUNGEN UND VERBRAUCHSMATERIAL.....	39
4.3	ZELLINIE UND MEDIEN DER ZELLKULTUR	39
4.4	GERÄTE	40
4.5	SOFTWARE.....	41
4.6	DATENBANKEN	41
5	METHODEN	42
5.1	GEWINNUNG DER EINZELKOMPONENTEN	42
5.2	QUANTIFIZIERUNG DER FRAKTIONEN.....	43
5.2.1	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD	43
5.2.2	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	44
5.2.3	SILBERFÄRBUNG	44
5.2.4	MASSENSPEKTROMETRIE (MS)	45
5.3	KÜNSTLICHE MEMBRANEN	48
5.3.1	UNTERSUCHUNG DES INTEGRATIONSVERHALTENS AN LIPIDMONOLAYERN	48
5.3.2	HERSTELLUNG VON LIPIDVESIKELN.....	54

5.3.3	UNTERSUCHUNG DER MEMBRANFLUIDITÄT VON VESIKELN MITTELS FLUORESZENZPOLARISATION	55
5.3.4	BESTIMMUNG DER VESIKELGRÖÖE UND -HALTBARKEIT MITTELS DYNAMISCHER LICHTSTREUUNG	57
5.4	UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON CROTAMIN AUF NEURONALE ZELLEN.....	58
6	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>61</u>
6.1	ISOLIERUNG DER EINZELKOMPONENTEN	61
6.1.1	AUFTRENNUNG DES GESAMTGIFTS	61
6.1.2	QUALIFIZIERUNG DER FRAKTIONEN	62
6.2	CHARAKTERISIERUNG DES CROTAMINEINBAUS IN LIPIDMONOLAYER	67
6.3	EINFLUSS VON CROTAMIN AUF DIE MEMBRANFLUIDITÄT VON VESIKELN	70
6.4	EINFLUSS VON CROTAMIN AUF DIE VESIKELGRÖÖE	74
6.5	EINFLUSS VON CROTAMIN AUF NEURONALE ZELLEN	75
7	<u>DISKUSSION</u>	<u>77</u>
7.1	ISOLIERUNG VON CROTAMIN.....	77
7.2	BIVALENTE KATIONEN, SOWIE DER LATERALE MEMBRANDRUCK, BEEINFLUSSEN DIE EINBAUGESCHWINDIGKEIT VON CROTAMIN.....	78
7.3	DIE MEMBRANBEEINFLUSSENDEN EIGENSCHAFTEN VON CROTAMIN SIND ABHÄNGIG VON DER LIPIDKOMPOSITION	79
7.4	CROTAMIN BEEINFLUSST DIE KALZIUMHOMÖOSTASE VON NEURONALEN ZELLEN.....	86
7.5	PHARMAKOLOGISCHE ANWENDUNG VON CROTAMIN.....	87
7.6	AUSBLICK	91
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>93</u>
9	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	<u>113</u>
10	<u>DANKSAGUNG.....</u>	<u>116</u>

1 Zusammenfassung

Für das Verständnis der pharmakologischen Aktivität von Proteinen und Peptiden ist es wichtig, den Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und Wirkungsweise zu untersuchen. Schlangengifte setzen sich aus einer Vielzahl von Komponenten zusammen, die in unterschiedlichster Weise den Organismus der Beutetiere beeinflussen und schädigen. Sie stellen daher eine reiche Quelle für Substanzen mit biologischer Wirksamkeit dar. Die Isolierung der einzelnen Komponenten bietet somit eine effektive Möglichkeit, pharmakologisch aktive Proteine und Peptide zu gewinnen.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Isolierung und Charakterisierung von Einzelkomponenten aus dem Gift der südamerikanischen Klapperschlange *Crotalus durissus terrificus*. Es konnten zwei der Hauptbestandteile, Crotamin, sowie eine Mischung an Crotoxin B Isoformen, mittels RP-HPLC isoliert und durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert werden. Im Weiteren lag der Schwerpunkt auf der Charakterisierung der Interaktion von Crotamin mit künstlichen Membranen.

Crotamin ist ein amphiphatisches, hoch basisches Polypeptid mit einer Größe von 4,9 kDa und stark positiver Oberflächenladung. Zunächst als Neurotoxin beschrieben, sind für Crotamin mittlerweile eine Vielzahl weiterer Wirkungen berichtet worden. Zu diesen gehören myotoxische, analgetische, antimikrobielle und antitumorale Effekte. Die Wirkungsweise beruht teilweise auf einer direkten Interaktion mit den Lipiden der Membran. Crotamin werden dabei sowohl membranbeeinflussende Eigenschaften, als auch die Fähigkeit zur Translokation in die Zelle zugeschrieben.

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich den Einfluss der Lipidkomposition von Membranen auf die membranbeeinflussenden Eigenschaften von Crotamin. In Monolayern aus Asolektin führte die Anwesenheit von Cholesterin zu einem langsameren Einbau von Crotamin. Zudem verursachte sowohl die Anwesenheit bivalenter Kationen, als auch die Erhöhung des lateralen Drucks im Monolayer, einen beschleunigten Einbau von Crotamin.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Crotamin die Fluidität von Vesikelmembranen verändert. Bei reinen Asolektinvesikeln führte Crotamin zu festeren, bei DOPC-Vesikeln zu fluideren Membranen. Bei Vesikeln, deren Membran zusätzlich Cholesterin enthielt, führte Crotamin unabhängig von der gewählten Grundsubstanz (Asolektin oder DOPC) zu fluideren Membranen. Das Ausmaß der Fluidisierung war jedoch abhängig von der

jeweiligen Cholesterinkonzentration. Je mehr Cholesterin die Vesikelmembranen enthielten, desto geringer die Wirkung von Crotoxin. Generell war hierbei der Einfluss der Cholesterinkonzentration bei asolektinhaltigen Vesikeln größer als bei DOPC-haltigen.

Demnach wirkte Cholesterin den membranbeeinflussenden Eigenschaften von Crotoxin entgegen. Vermutlich beruhte dies unter anderem auf der geringeren Fluidität von cholesterinhaltigen Membranen. Zudem könnte für die polaren Kopfgruppen der Lipide die Wahrscheinlichkeit zur Interaktion mit kationischen Molekülen wie Crotoxin durch die Anwesenheit von Cholesterin verringert sein. Der stärkere Einfluss von Crotoxin auf die Fluidität von asolektinhaltigen Membranen könnte auf den, in Asolektin enthaltenen, Lipiden mit negativer Ladung beruhen. Diese könnten, auf Grund einer negativeren Oberflächenladung der Membran, zu einer stärkeren Anziehung von Crotoxin führen. Außerdem könnte Crotoxin, durch die Interaktion mit negativ geladenen Lipiden, die Bildung von Domänen verursachen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit lassen somit den Schluss zu, dass sowohl Cholesterin als auch Lipide mit negativer Ladung die Wirkungsweise von Crotoxin auf Membranen verändern. Zudem wird sie durch die Anwesenheit bivalenter Kationen in der umgebenden Lösung und dem lateralen Membrandruck beeinflusst. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Crotoxin die Kalziumhomöostase von neuronalen Zellen beeinflusst. Hierbei verursachte Crotoxin einen konzentrationsabhängigen Anstieg der intrazellulären freien Kalziumkonzentration.

2 Abstract

In order to understand the pharmacological activities of proteins and peptides it is important to study the relation of their molecular structure and their mode of action. Snake venoms contain a large number of biologically active compounds. They influence and damage the organism of prey in various manners. Therefore, venoms are an abundant source of substances with biological activity. The isolation of these substances is an important way to search for new, pharmacologically active proteins and peptides.

The presented work focused on the isolation and characterization of venom compounds from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Two of its main compounds, crotamine and a mixture of Crotoxin B isoforms, were isolated by RP-HPLC and identified by mass spectrometry. Afterwards, the emphasis was laid on how crotamine interacts with artificial membranes.

Crotamine is a small, amphipathic and highly basic polypeptide with a molecular weight of 4.9 kDa and a high positive surface charge. It used to be described as a neurotoxin, but meanwhile many additional properties have been reported. These include myotoxic, analgetic, antimicrobial and antitumor activities. To some extent, these modes of action are based on the interaction of crotamine with the membrane lipids. In this context, the membrane modifying properties of crotamine and its ability to translocate into cells are under discussion.

The presented work clearly demonstrates that the lipid composition of membranes influences the membrane modifying properties of crotamine. In lipid monolayers built from asolectin, cholesterol had the effect, that crotamine is integrated into the membrane more slowly. Furthermore, it is obvious that the presence of bivalent cations as well as an increasing lateral pressure inside the monolayer leads to a faster integration of crotamine.

Moreover, crotamine altered the membrane fluidity of vesicles. In pure asolectin-vesicles crotamine stiffened the membranes (decreased fluidity), whereas it increased the fluidity in DOPC-vesicles. In vesicles containing a mixture of either asolectin or DOPC and cholesterol, crotamine increased the membrane fluidity, whereby its influence was weakened with rising concentrations of cholesterol. However, the impact of cholesterol was stronger in asolectin:cholesterol-vesicles.

Hence, cholesterol reduces the membrane modifying properties of crotamine. It was assumed that this is due to the fact that cholesterol decrease the fluidity of membranes. Also, cholesterol may reduce the possibility of polar lipid head groups interacting with cationic molecules like crotamine. As asolectin contains negatively charged lipids, it was concluded that these lipids could be responsible for the stronger impact crotamine had on the fluidity of membranes. They could lead to a stronger attraction of crotamine, due to the more negatively charged membrane surface. Negatively charged lipids might also increase the possibility of raft building, caused by crotamine.

In conclusion cholesterol as well as negatively charged lipids alter the effect crotamine has on membranes. It is also influenced by bivalent cations in the surrounding solution as well as the lateral pressure of the membrane. In addition, it was shown that crotamine also affects the calcium homeostasis of neuronal cells. By enlarging the amount of crotamine the internal free calcium concentration also showed an increase.

3 Einleitung

3.1 Die südamerikanische Klapperschlange *Crotalus durissus terrificus*

Die Gattung der Klapperschlangen (*Crotalus*) gehört als Teil der Unterfamilie der Grubenottern (*Crotalinae*) der Familie der Vipern (*Viperidae*) an. Innerhalb dieser Gattung ist die südamerikanischen Klapperschlange (*Crotalus durissus*) die in Amerika am südlichsten vorkommende Art der Klapperschlangen. Die südamerikanische Klapperschlange ist außerdem auch unter den Namen Schauer- oder Tropische Klapperschlange bekannt und wird in der Regel in acht Unterarten eingeteilt. Die einzelnen Unterarten sind in verschiedenen Regionen in Teilen von Zentral-, sowie ganz Südamerika, mit Ausnahme von Chile und Ecuador, vorzufinden (Abb. 1). Ihr Habitat erstreckt sich hierbei über ein weites Spektrum von steinig und wüstenartigen Gebieten über Savannen und Graslandschaften bis hin zu trockenen Wäldern und Plantagen. Einzig in großen geschlossenen Waldregionen des Regenwaldes und in Sumpfgebieten, sowie in Höhen über 2000 Metern über dem Meeresspiegel, sind sie normalerweise nicht anzutreffen (Martins *et al.* 2010).

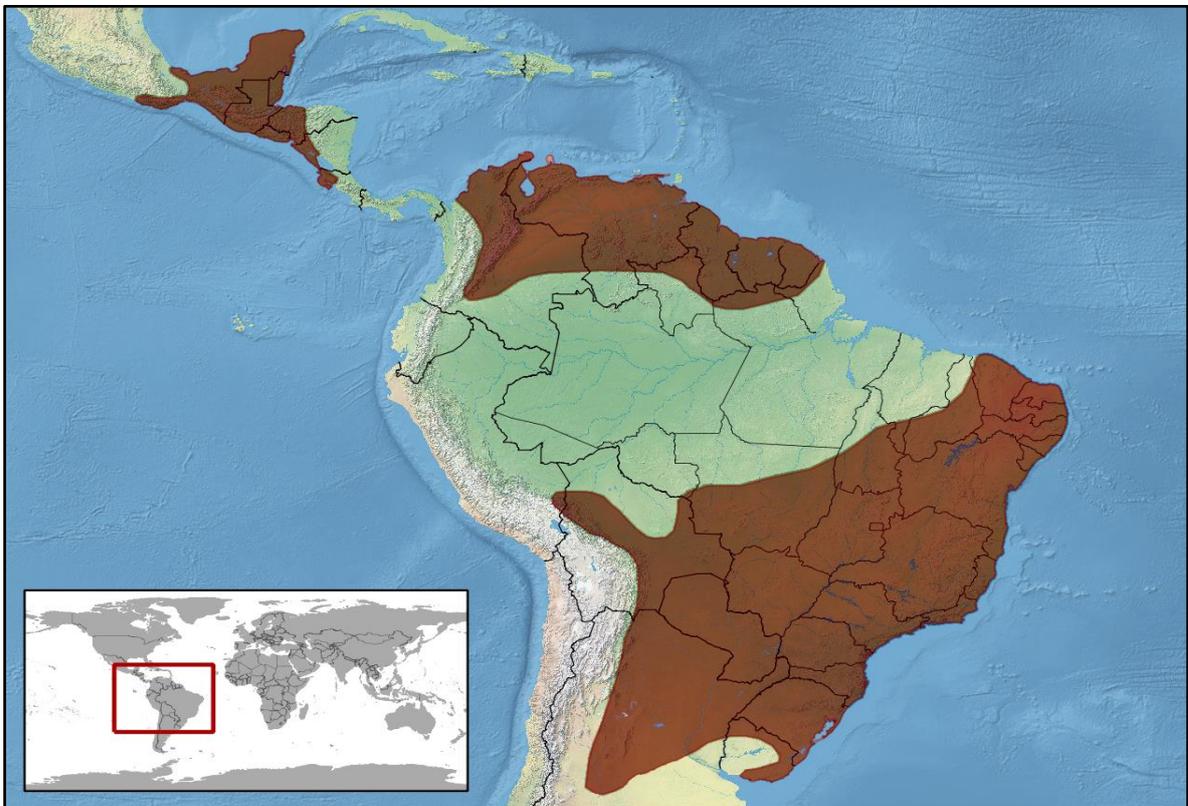


Abb. 1: Übersicht zur Verbreitung der Gattung *Crotalus durissus*. Die Gebiete, in denen die südamerikanischen Klapperschlange vorkommt, sind braun eingefärbt (Rbrausse 2013).

Sie ernähren sich von kleinen Säugetieren, Reptilien und Vögeln und sind in Südamerika nach den *Bothrops*-Arten für die meisten Schlangenbiss-Unfälle verantwortlich.

Eine der Unterarten der südamerikanischen Klapperschlangen ist *Crotalus durissus terrificus* (Abb. 2). Diese wird im Allgemeinen als jene Unterart gesehen, deren Bisse innerhalb der *Crotalus durissus* zu den schwersten Vergiftungen führen, und deren daraus resultierenden Symptome am schwierigsten zu behandeln sind.



Abb. 2: Aufnahme einer *Crotalus durissus terrificus* (da Fonseca 2007).

Ihr Gift besitzt sowohl hämorrhagische als auch neurotoxische Wirkungsweisen, wobei die neurotoxischen meist überwiegt. Generell unterscheidet man bei Giftschlangen auch zwischen dem sogenannten Verteidigungs- und Angriffsbiss. Während für einen Angriffsbiss bis zur maximalen Menge des zur Verfügung stehenden Gifts eingesetzt werden kann, wird für die Verteidigung meist weniger (ca. 10 %) bis kein Gift injiziert. Außerdem kann die Zusammensetzung hinsichtlich der einzelnen Komponenten im Gift von Biss zu Biss variieren.

Kommt es zu einem Biss, so führt dies zunächst lokal, im Bereich der Bissstelle, zur Schwellung und Ödembildung, bis hin zu blutgefüllten Hautblasen. Damit einhergehen starke Schmerzen, die in ihrer Art und Intensität mit den Schmerzen bei Verbrennungen dritten Grades vergleichbar sind. Weitere Symptome sind Übelkeit und teils blutiges Erbrechen, Hautblässe, sowie, verursacht durch die Freisetzung von Myoglobin, die Verfärbung des Urins nach dunkelbraun und Nierenversagen.

Außerdem kann das Blut, auf Grund der blutverdünnenden und gerinnungshemmenden Wirkung des Gifts, aus den Kapillargefäßen diffundieren und so innere Blutungen und weitere großflächige Ödembildungen verursachen. Der daraus resultierende Flüssigkeitsverlust kann wiederum zu einem dramatischen Abfall des Blutdrucks bis hin zum hypovolämischen Schock führen. Auf jeden Fall kommt es zu schweren Zerstörungen des den Biss umgebenden Gewebes (Nekrose). Der betroffene Bereich muss daher meist operativ entfernt werden und teilweise ist sogar eine Amputation erforderlich.

Neben den schon beschriebenen Auswirkungen treten gleichzeitig die systemischen, neurotoxischen Effekte des Gifts auf. So kommt es schon nach kurzer Zeit zur Lähmung der Augenlider, sowie zu Schluck- und Atembeschwerden. Die im Gift enthaltenen Neurotoxine verursachen im Weiteren die Lähmung der Muskulatur; zunächst im lokalen Bereich des Bisses, im weiteren Verlauf jedoch der gesamten Skelettmuskulatur. Letztlich hat dies häufig eine komplette Atemlähmung zur Folge.

3.2 Zusammensetzung des Gifts der *Crotalus durissus terrificus*

Das Gift der *Crotalus durissus terrificus* wird nunmehr seit fast hundert Jahren untersucht und gehört somit zu den am besten untersuchten Giften weltweit. Seine Hauptkomponenten sind die beiden als Neurotoxin definierten Komponenten Crotoxin und Crotamin, das vornehmlich hämorrhagisch wirkende Convulxin, sowie das unter anderem im zentralen Nervensystem wirkende Gyroxin (Tab. 1). Die Eigenschaften und Wirkungsweise von Crotoxin und Crotamin werden in den folgenden Kapiteln (3.3 und 3.4) ausführlich erläutert.

Hauptkomponenten des Gifts von <i>Crotalus durissus terrificus</i>		
Komponente:	Molekulargewicht:	Referenzen:
Crotoxin (~ 60 %)	23 kDa	(Slotta <i>et al.</i> 1938; Chang <i>et al.</i> 1977a; Hawgood <i>et al.</i> 1979)
Crotamin (~ 30 %)	4,9 kDa	(Gonçalves <i>et al.</i> 1947; Laure 1975)
Convulxin	72 kDa	(Lee 1972; Brazil 1972; Lee 1979; Prado-Franceschi <i>et al.</i> 1981; Francischetti <i>et al.</i> 1997)
Gyroxin	26 kDa	(Barrio 1961; Alexander <i>et al.</i> 1988; Lee 1972; Radis-Baptista <i>et al.</i> 1999)

Tab. 1: Molekulargewicht und Referenzen zu den Hauptkomponenten des Gifts von *Crotalus durissus terrificus*.

Convulxin ist ein aus den beiden Untereinheit α und β (13,9 und 12,6 kDa) gebildetes Glykoprotein ($\alpha_4\beta_4$ -Topologie) und wird zu der Familie der C-Typ Lektine gezählt (Prado-Franceschi *et al.* 1981; Marlas *et al.* 1983; Marlas 1985; Leduc *et al.* 1998; Murakami *et al.* 2003). Es handelt sich hierbei um ein nicht-enzymatisches Protein, welches Ca^{2+} -abhängig und Fibrinogen-, Adenosindiphosphat (ADP)- und Cyclooxygenase (COX)-unabhängig zur

selektiven Aktivierung der Plättchen-Aggregation führt (Vargaftig *et al.* 1980; Vargaftig *et al.* 1983; Sano-Martins *et al.* 1992).

Convulxin interagiert hierzu unter anderem mit denselben Rezeptoren wie Kollagen. Dabei induziert es über die Aktivierung einer Phospholipase C (PLC)-gekoppelten Signalkaskade die Freisetzung von Inositoltrisphosphat (IP₃) (Faili *et al.* 1994; Polgar 1997). Zudem konnten bei Kaninchen auch Respirationsstörungen bis hin zur Atemnot und eine Veränderung des Blutdrucks beobachtet werden (Markwardt *et al.* 1966).

Gyroxin ist ein nicht-tödliches Glykoprotein. Es besitzt eine Esterase- bzw. Serinprotease-Aktivität und wird auf Grund seiner gerinnungsfördernden Eigenschaften zu den Proteinen mit Thrombin-ähnlicher Wirkung gezählt. (Barrabin *et al.* 1978; Alexander *et al.* 1988). Außerdem führt eine intravenöse Injektion bei Mäusen zu dem sogenannten Gyroxinsyndrom (Barrio 1961). Der auch als „barrel rotation“-Syndrom bezeichnete Effekt beschreibt das temporär auftretende Verhaltensmuster, bei welchem sich die Mäuse erst strecken und dann beginnen, sich um die eigene laterale Körperachse zu drehen. Auf Grund dessen werden Gyroxin auch neurotoxische Eigenschaften zugeschrieben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Gyroxin die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke erhöht (Alves da Silva *et al.* 2011).

3.3 Crotoxin

Crotoxin gehört zu den am längsten untersuchten, aus einem Schlangengift gewonnen, Einzelkomponenten und ist die Hauptkomponente des Gifts der südamerikanischen Klapperschlange *Crotalus durissus terrificus*. Mit der Isolierung und Kristallisation von Crotoxin gelang es Slotta und Fraenkel-Conrat im Jahre 1938 erstmals, eine Einzelkomponente aus einem Schlangengift zu isolieren. Außerdem erbrachten sie durch diese Arbeit gleichzeitig den Nachweis, dass es sich bei den Wirkstoffen von Schlangengiften um Proteine handelt (Slotta *et al.* 1938).

Für das als β -Neurotoxin eingestufte Crotoxin wurde zunächst angenommen, dass es sich um ein einzelnes Protein handelt. Später konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein heterodimeres Protein handelt. Es besteht aus dem ca. 15 kDa großen Crotoxin B (CB), und aus Crotoxin A (CA, Crotapotin), welches eine Größe von ca. 9 kDa besitzt.

Die getrennte Untersuchung der beiden Komponenten zeigte, dass es sich einerseits um eine basische, schwach toxische Phospholipase A2 (CB) und andererseits um eine nicht- toxische Komponente ohne bekannte enzymatische Wirkung (CA) handelt (Hendon *et al.* 1971). Die neurotoxische Wirkung von Crotoxin ist jedoch bei seinen Einzelkomponenten für CB nur noch schwach und für CA überhaupt nicht zu beobachten. Durch die erneute Dimerisierung von CA mit CB kann diese allerdings wieder hergestellt werden (Hendon *et al.* 1971; Breithaupt 1976).

3.3.1 Wirkungsweise von Crotoxin

Zunächst wurde Crotoxin auf Grund seiner Fähigkeit zur neuromuskulären Blockade als β -Neurotoxin eingestuft. Im Laufe der Zeit konnten jedoch eine Vielzahl von weiteren biologischen Aktivitäten nachgewiesen werden. So zählen zu den klassischen pharmakologischen Wirkungsweisen von Crotoxin mittlerweile auch die Schädigung von Muskel-, Nieren-, und Herzmuskelzellen und es gilt daher auch als Myo-, Nephro- und Cardiotoxin. (Tab. 2).

„Klassische pharmakologische Wirkungsweise“ von Crotoxin	
Wirkweise:	Referenzen:
Neuromuskuläre Blockade	
präsynaptische Aktivität	(Brazil <i>et al.</i> 1971; Hawgood <i>et al.</i> 1977; Chang <i>et al.</i> 1977a; Anadón <i>et al.</i> 1985; Muniz <i>et al.</i> 1989; Kattah <i>et al.</i> 2000; Cardi <i>et al.</i> 1992)
Einfluss auf Neurotransmitterfreisetzung	(Chang <i>et al.</i> 1977a; Chang <i>et al.</i> 1977b; Rodrigues-Simioni <i>et al.</i> 1990; Brazil 1966)
postsynaptische Aktivität	(Brazil 1966; Bon <i>et al.</i> 1979; Brazil <i>et al.</i> 2000)
Myotoxizität	(Breithaupt 1976; Gopalakrishnakone <i>et al.</i> 1984a; Gopalakrishnakone <i>et al.</i> 1984b; Kouyoumdjian <i>et al.</i> 1986; Oshima-Franco <i>et al.</i> 1999; Salvini <i>et al.</i> 2001; Soares <i>et al.</i> 2001; Beghini <i>et al.</i> 2004; Melo <i>et al.</i> 2004; Miyabara <i>et al.</i> 2004a; Miyabara <i>et al.</i> 2004b; Conte <i>et al.</i> 2008; Gutiérrez <i>et al.</i> 2008; Hadler <i>et al.</i> 1966; Monteiro <i>et al.</i> 2001)
Nephrotoxizität	(Hadler <i>et al.</i> 1966; Monteiro <i>et al.</i> 2001; Martins <i>et al.</i> 2002; Amora <i>et al.</i> 2006)
Cardiotoxizität	(Santos <i>et al.</i> 1990; Hernández <i>et al.</i> 2007)

Tab. 2: Referenzen zu den klassischen pharmakologischen Hauptaktivitäten von Crotoxin (Sampaio *et al.* 2010).

Die Wirkung von Crotoxin auf Nerven- und Muskelzellen wurde in zahlreichen Studien untersucht. Die über die zu Grunde liegenden Mechanismen gewonnen Erkenntnisse können hierbei wie folgt zusammengefasst werden (Sampaio *et al.* 2010):

Zunächst bindet Crotoxin sowohl über spezifische Oberflächenrezeptoren als auch über eine direkte Interaktion mit den Phospholipiden an die Zellmembran. Auf Grund seiner Aktivität als Phospholipase A2 (PLA₂) katalysiert es dort die Hydrolyse der Phospholipide. Die daraus resultierende Permeabilisierung der Plasmamembran führt zum Verlust der Ionenselektivität, ermöglicht so zunächst das Eindringen von extrazellulärem Kalzium und im weiteren Verlauf von freiem Crotoxin.

Gleichzeitig, beziehungsweise alternativ, kann Crotoxin auch über Endozytose- und Recycling-Vesikel internalisiert werden und dann auf Grund seiner PLA₂-Aktivität mittels Hydrolyse der Vesikelmembran ins Zytoplasma freigesetzt werden. Dort kann Crotoxin nun mit allen weiteren Membranen des Zellinneren interagieren, was wiederum weitreichende Folgen für die Funktion der Zelle hat.

So werden beispielsweise synaptische Vesikel beschädigt und in Folge dessen Exozytoseprozesse inhibiert. Außerdem führt Crotoxin bei Mitochondrien zum Zusammenbruch des Protonengradienten und somit zur mitochondrialen Entkopplung. Letztlich haben diese Prozesse einen Verlust der Kalzium-Homöostase (Ca²⁺ aus extrazellulärer Lösung und Organellen gelangt ins Zytoplasma) und eine verminderte ATP-Synthese zur Folge.

Der Anstiegs der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration hat unter anderem eine verstärkte Ausschüttung von Neurotransmittern, wie beispielsweise Acetylcholin (ACh), zur Folge und führt hierdurch zur Hyperkontraktion von Muskelfasern.

Gleichzeitig führt der Ca²⁺-Anstieg zur Aktivierung endogener PLAs und Calpainen. In Folge dessen kommt es zur verstärkten Hydrolyse intrazellulärer Phospholipide, sowie zur Degradierung von intrazellulären Proteinen (Myofilamente, Zytoskelett-Proteinen, etc.). Die Aktivierung dieser Pfade führt schlussendlich zur neuromuskulären Blockade, sowie zu Gewebeschäden (Nekrose) (Abb. 3).

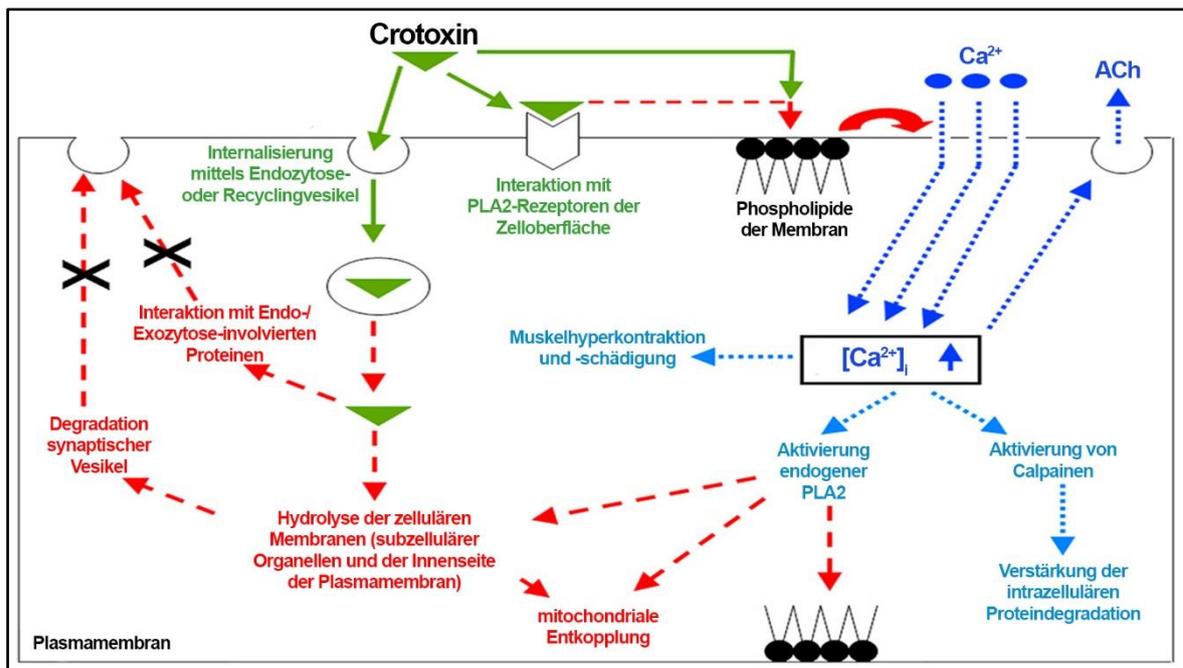


Abb. 3: Wirkungsschema für Crotoxin auf Muskel- und Nervenzellen (Sampaio *et al.* 2010).

Neben den als klassische pharmakologische Aktivitäten definierten Eigenschaften (Neurotoxizität, Myotoxizität, etc.) wurden in den letzten Jahren zahlreiche weitere Wirkungsweisen von Crotoxin, beziehungsweise von dessen Untereinheiten, gefunden (Tab. 3 und Abb. 4).

Hierzu gehört unter anderem die Beeinflussung der Immun- und Entzündungsantwort im Kapillar- und Lymphsystem, sowie im Interstitium. Beispielsweise führt Crotoxin bei Lymphozyten zu deren Proliferation, zur Inhibition der Antikörperproduktion, sowie zur vermehrten Freisetzung von Interleukinen (IL-4 und IL-10). Außerdem verändert es die Verteilung der Lymphozyten in Blut- und Lymphsystem. So verstärkt Crotoxin deren Anhaftung im Endothelium der postkapillären Venolen und erhöht die Anzahl an B- und T-Lymphozyten in den Lymphknoten.

In einigen Arbeiten konnten zudem entzündungshemmende Einflüsse von Crotoxin gezeigt werden. So wurde beispielweise bei Makrophagen die Inhibition der Migration und Phagozytose beobachtet. Außerdem verursachte Crotoxin die verstärkte Freisetzung von Lipoxin A₂ (LXA₂) und Prostaglandin E₂ (PGE₂).

Neben den beschriebenen Wirkweisen wurde zusätzlich von antimikrobiellen (Soares *et al.* 2001), antitumoralen, sowie analgetischen Effekten von Crotoxin berichtet.

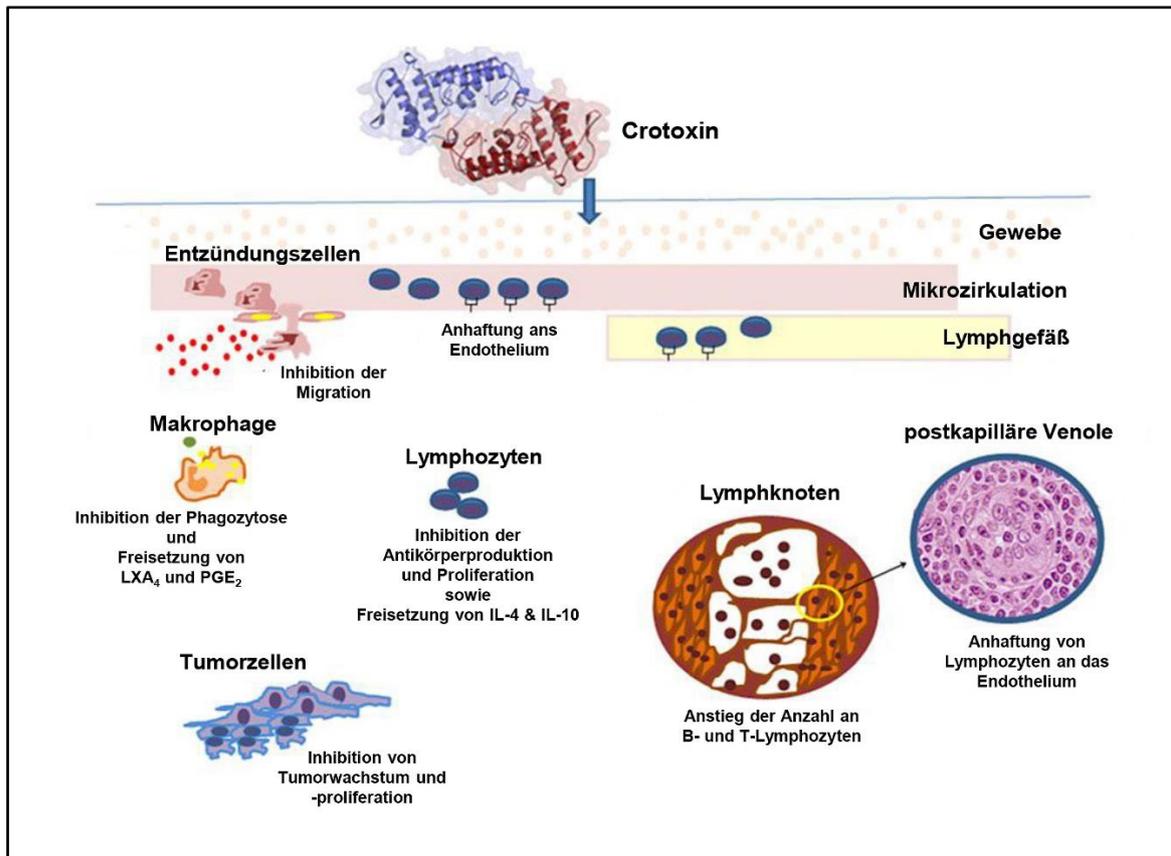


Abb. 4: Wirkungsweise von Crotoxin in Mikrozirkulation, Lymphsystem und Interstitium (Sampaio *et al.* 2010).

In den letzten Jahren ist es zudem gelungen, den Einfluss einzelner Isoformen, sowie den Einfluss einzelner Teilstücke von Crotoxin, auf ihre Wirkungsweise zu untersuchen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es sich bei einigen Bestandteilen des Gifts von *Crotalus durissus terrificus*, die in der Literatur auf Grund ihrer Wirkweise zunächst als komplett neue Moleküle betrachtet wurden, um Isoformen oder Teilstück von Crotoxin handelt.

So ist beispielsweise das analgetisch wirkende, aus 14 Aminosäuren bestehende, Peptid Crotalphin in seiner Sequenz identisch zu der gamma-Kette des nicht toxischen Crotapotin (Konno *et al.* 2008). Demnach beruht die analgetische Wirkung von Crotalphin auf der Aktivierung von Kappa-Opioid-Rezeptoren, und kann somit eine Ursache für den antinozizeptiven Effekt des *Crotalus*-Gifts sein.

Ein weiteres Beispiel ist Intercro, eine neue Isoform der Phospholipase A₂, die ebenfalls aus dem Gift von *Crotalus durissus terrificus* isoliert werden konnte. Obwohl Intercro in seiner Primärstruktur eine hohe Sequenzhomologie zu Crotoxin B aufweist, unterscheidet es sich in seiner biologischen Aktivität (Vieira *et al.* 2013). Es besitzt zwar ebenfalls die klassischen katalytischen Eigenschaften einer PLA, ist im Gegensatz zu Crotoxin B aber kaum

myotoxisch und zeigt keinerlei neurotoxische Aktivität (Vieira *et al.* 2013). Es wird vermutet, dass eine mögliche Ursache für den Verlust der neurotoxischen Aktivität die Unfähigkeit zur Heteromerisierung mit Crotopotin (CA) sein könnte (siehe auch 2.3.2).

„Neue pharmakologische Wirkungsweise“ von Crotoxin, dessen Untereinheiten und Teilstücke	
<u>Wirkweise:</u>	<u>Referenzen:</u>
Immunmodulatorische Aktivität	
Inhibition der humoralen Immunantwort auf klassische Protein-Antigene	(Cardoso <i>et al.</i> 1997)
Inhibition von Con-A Proliferation in Milzzellen und Lymphozyten	(Cardoso <i>et al.</i> 2001; Rangel-Santos <i>et al.</i> 2004; Garcia <i>et al.</i> 2003; Castro <i>et al.</i> 2007)
Inhibition von IL-4 und IL-10 Produktion in kultivierten Milzzellen; erhöhte Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen in der Mikrozirkulation; herabgesetzte Anzahl an Lymphozyten in Blut- und Lymphsystem (Zirkulation)	(Cardoso <i>et al.</i> 2001; Rangel-Santos <i>et al.</i> 2004; Zambelli <i>et al.</i> 2008)
Entzündungshemmende (antiinflammatorische) Aktivität	
Inhibition des Makrophagen-Spreading und deren phagozytotischen Aktivität	(Sampaio <i>et al.</i> 2003; Sampaio <i>et al.</i> 2005)
Verstärkte Polymerisation von F-Aktin und Inhibition der Tyrosin-Phosphorylierung, sowie der Rac und RhoA Aktivität	(Sampaio <i>et al.</i> 2006)
Inhibition von Carrageenin-induzierten Pfoten-Ödemen	(Landucci <i>et al.</i> 1995; Nunes <i>et al.</i> 2010)
Antitumorale Aktivität	
Inhibition von Tumorwachstum	(Newman <i>et al.</i> 1993; Costa <i>et al.</i> 1998; Cura <i>et al.</i> 2002; Baldi <i>et al.</i> 1988; Corin <i>et al.</i> 1993; Rudd <i>et al.</i> 1994; Donato <i>et al.</i> 1996)
Zytotoxisch für Tumorzellen	(Baldi <i>et al.</i> 1988; Corin <i>et al.</i> 1993; Rudd <i>et al.</i> 1994; Donato <i>et al.</i> 1996)
Induktion von Apoptose	(Yan <i>et al.</i> 2006)
Analgetische Aktivität	
Crotoxin	
Inhibition von akutem, phasischem und tonischem Schmerz, sowie der schmerzinduzierten Entladung von Neuronen im Thalamus (Wirkungsmechanismus über serotonerge Rezeptoren)	(Zhang <i>et al.</i> 2006; Zhu <i>et al.</i> 2008)
Inhibition von chronischem, neuropathischem Schmerz (Wirkungsmechanismus über zentrale muskarinische und serotonerge Rezeptoren)	(Nogueira-Neto <i>et al.</i> 2008; Zhu <i>et al.</i> 2008)
Crotalphin	
Inhibition von akutem und chronischem, neuropathischem Schmerz (Wirkung auf periphere Opioid-Rezeptoren)	(Konno <i>et al.</i> 2008; Gutierrez <i>et al.</i> 2008)

Tab. 3: Referenzen zu den neuen pharmakologischen Aktivitäten von Crotoxin, dessen Untereinheiten, sowie von einzelnen Fragmenten (Sampaio *et al.* 2010).

3.3.2 Struktur und Isoformen von Crotoxin

Crotoxin ist ein ca. 23 kDa großer heterodimerer Proteinkomplex (Slotta *et al.* 1938; Lee 1979), der aus den beiden Untereinheiten CA und CB besteht (Rübsamen *et al.* 1971; Hendon *et al.* 1971) (Abb. 5A).

Hierbei handelt es sich bei der sauren Untereinheit (CA) um ein Polypeptid von ca. 9 kDa, welches sich wiederum aus den drei, insgesamt über sieben Disulfidbrücken verbunden, Peptidketten α , β und γ zusammensetzt (α : 39 AS, 4274 Da; β : 35 AS, 3658 Da; γ : 15 AS, 1558 Da) (Breithaupt *et al.* 1974; Faure *et al.* 2011) (Abb. 5B).

Die basische Untereinheit CB ist ein ca. 15 kDa großes, globuläres Protein, das aus 122 Aminosäuren gebildet wird (für CBB nach Faure *et al.* 2011). In seiner Sekundärstruktur besteht CB aus den für PLA₂ der Gruppe IIA typischen Elementen und setzt sich wie folgt zusammen: Einer N-terminalen α -Helix A folgt eine kurze α -Helix B und eine Ca²⁺-Bindetasche. Dieser schließen sich die beiden antiparallelen, und von einem sogenannten β -wing unterbrochenen, langen α -Helices C und D an. Bei dem β -wing handelt es sich um eine Schleife mit antiparallelem, zweisträngigem β -Faltblatt. Den Abschluss bildet die C-terminale Verlängerung, die ihrerseits drei weitere, sehr kurze helikale Windungen enthält (Abb. 5C).

Die einzelnen Strukturen von CB sind ebenfalls über sieben Disulfidbrücken verbunden und bilden so die für PLA₂ IIA typische konische Tertiärstruktur aus (Faure *et al.* 2011). Auf Grund von sowohl hydrophoben als auch (intermolekularen) polaren Wechselwirkungen von CB mit der α - und β -Kette von CA bildet sich der heterodimer Crotoxin-Komplex. Je nach Isoform sind die hierbei wirkenden Kräfte jedoch unterschiedlich stark (Faure *et al.* 2011).

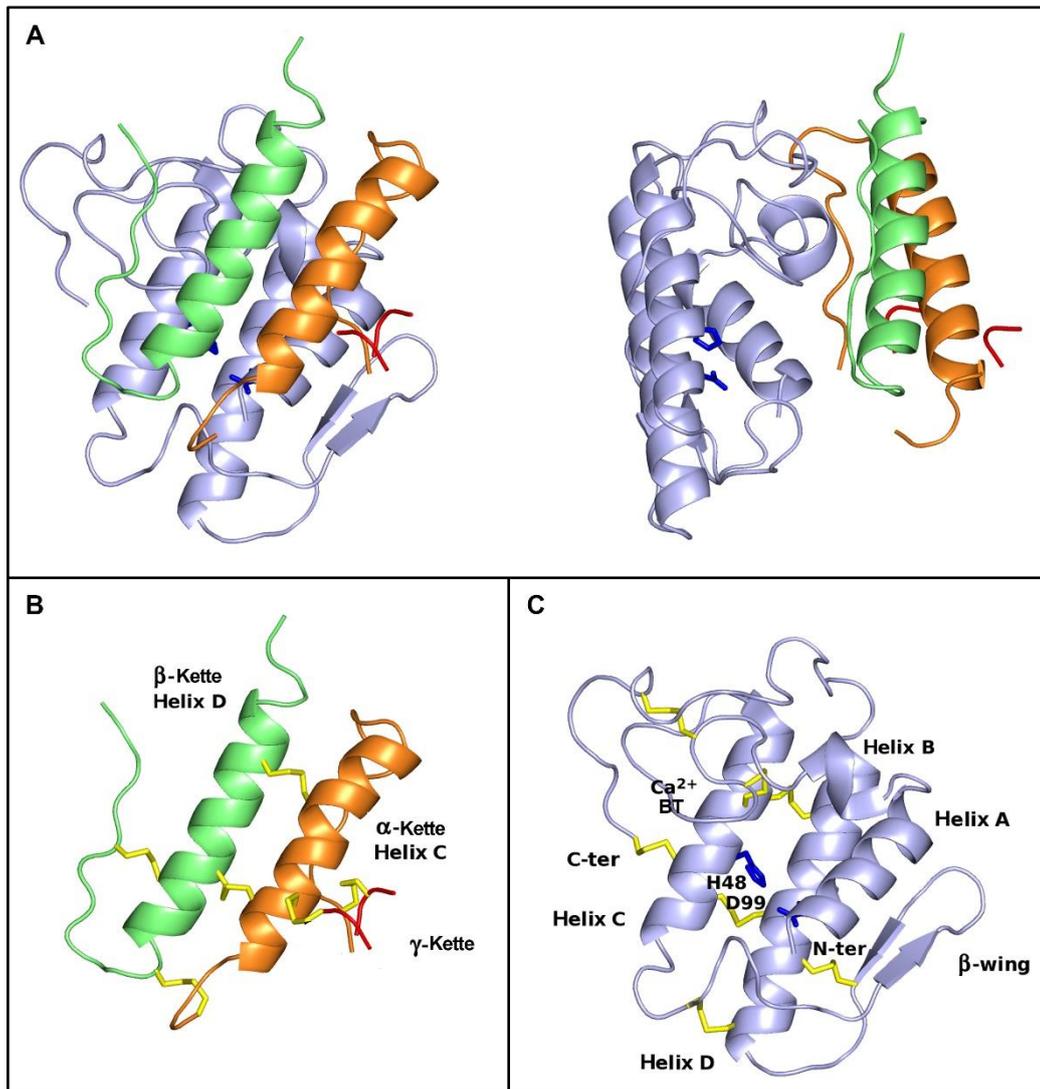


Abb. 5: Kristallstruktur von Crotoxin und seinen Untereinheiten (CA₂ und CBb) (nach Faure *et al.* 2011; am Beispiel des Komplexes aus den Isoformen CA₂ und CBb, PDB ID: 3R0L). Hierbei sind die basische Untereinheit CB in blau und die α -, β -, und γ -Kette der sauren Untereinheit CA in orange, grün und rot dargestellt. Die für das katalytische Zentrum von CB relevanten Aminosäuren sind in dunkelblau hervorgehoben. **(A)** zeigt den heterodimeren Crotoxin-Komplex aus unterschiedlichen Perspektiven (um 90° rotiert). Der Darstellung ist gleichzeitig zu entnehmen, dass das katalytische Zentrum von CB im Komplex durch CA maskiert ist. In **(B und C)** sind die Crotoxin Untereinheiten CA und CB mit ihren einzelnen Strukturen dargestellt. Die Verknüpfungen der einzelnen Strukturen über jeweils sieben Disulfidbrücken sind in Gelb eingezeichnet. **(B)** zeigt CA mit seinen drei Ketten α , β & γ . **(C)** zeigt CB, bestehend aus N-terminaler α -Helix A (1–14), kurzer Helix B (17–22), Ca²⁺-Bindetasche (BT) (28–32), langer α -Helix C (39–54), β -wing (75–84), langer α -Helix D (antiparallel zu C; 89–109) und der C-terminalen Verlängerung (110–133) mit ihren drei sehr kurzen helikalen Windungen (110–113, 114–118, und 121–126).

Für Crotoxin A und B sind bisher jeweils (mindestens) vier Isoformen bekannt (CA₁₋₄ sowie CBa₂, CBb, CBc und CBD), die wiederum durch variable Kombination zu 16 unterschiedlichen Crotoxin-Heteromeren zusammengesetzt werden können (Faure *et al.* 1988; Faure *et al.* 2011). Die so gebildeten Varianten von Crotoxin unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spezifität, Wirkungsweise und –stärke in Abhängigkeit von den jeweils beteiligten Isoformen.

Generell unterscheidet man zwischen den Heterodimeren der Klasse I und II (CA₁₋₄ mit CBb, CBc und CBd bzw. mit CBA₂). Hierbei überwiegt bei den Komplexen der Klasse I die Wirkungsweise der schnellen neuromuskulären Blockade und Toxizität; wohingegen sie eine nur geringe enzymatische Aktivität besitzen. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die Klasse II-Dimere durch ihre vorwiegend enzymatische und antikoagulative Wirkung und eine gleichzeitig geringere Neurotoxizität aus.

Es wird davon ausgegangen, dass CA als eine Art Chaperon die Aktivität und Spezifität von CB beeinflusst. So konnte für einige CA-CB-Heteromere gezeigt werden, dass die Bindungsaffinität von CB an spezifische Rezeptoren der Präsynapse durch CA potenziert wird, beziehungsweise die unspezifische Interaktion mit der Plasmamembran inhibiert wird. CA maskiert hierbei die für die PLA₂-Aktivität relevanten Bereiche der Oberfläche von CB und beeinträchtigt so das Binden an, sowie die Hydrolyse von, Phospholipiden.

Die verminderte unspezifische und direkte Adsorption von CB an Membranen begünstigt wiederum das Binden an Crotoxin-spezifische Rezeptoren (bspw. CAPT und Crocalbin) (Križaj *et al.* 1996; Križaj *et al.* 1997; Hseu *et al.* 1997; Hseu *et al.* 1999; Faure *et al.* 2003). Nach dem Binden des Rezeptors löst sich CA aus dem CA-CB-Rezeptor-Komplex und wird freigesetzt (Delot *et al.* 1992, 1993; Faure *et al.* 2003; Faure *et al.* 2012). Je nach beteiligter Isoformen variiert hierbei die Bindungsstärke von CA zu CB und mit dieser die jeweilige Neurotoxizität (Faure *et al.* 1993).

Auf Grund dieser Eigenschaften wirkt CA im Crotoxin-Komplex als natürlicher Inhibitor der katalytischen und antikoagulativen Aktivität von CB. In seiner Wirkungsweise ähnelt CA somit auch dem „anti-venom protein“ (CNF bzw. CICS), welches im Blut von *Crotalus durissus terrificus* gefunden wurde und ebenfalls die PLA₂-Aktivität von CB inhibiert (Faure *et al.* 2012).

Neben den beschriebenen Crotoxin-Komplexen aus CA und CB konnte die Ausbildung eines, in wässriger Lösung stabilen, Tetramers, welches ausschließlich aus Crotoxin B-Monomeren besteht, nachgewiesen werden (Marchi-Salvador *et al.* 2008). Es setzt sich aus zwei Heterodimeren zusammen, die jeweils aus den beiden Isoformen CB1 und CB2 gebildet werden. CB1 und CB2 unterscheiden sich untereinander in nur acht Aminosäuren und entsprechen den von Faure publizierten Isoformen CBc und CBA₂.

Auf Grund zweier leicht unterschiedlicher Varianten der Assoziation führt deren Heterodimerisierung (CB1 mit CB2) zu zwei bezüglich ihrer Quartärstruktur etwas verschiedenen Dimeren (Abb. 6 – Dimer 1 und Dimer 2). Für beide gilt jedoch, dass sich im Zuge der Dimerisierung die Architektur der Ca^{2+} -Bindetaschen in CB2 leicht verändert hat und deshalb kein Ca^{2+} mehr gebunden werden kann.

Die Neurotoxizität des aus den beiden Dimeren gebildeten Tetramers ist im Vergleich zu den einzelnen CB1-CB2-Dimeren, sowie zu anderen CA-CB-Heteromeren, verstärkt und weist eine geringere enzymatischen Aktivität auf. Diese Wirkungsweise deckt sich mit der strukturellen Beobachtung, bei welcher die, vermutlich für die Neurotoxizität relevanten, Bereiche (N und C-terminale Region, sowie Ca^{2+} -Bindetasche und β -wing) zur Oberfläche des Tetramers hin exponiert und somit zugänglich sind.

Ein mögliches Modell für ein *in vivo*-Vorkommen dieses Tetramers besagt, dass sich dieser nach der Rezeptorbindung von Crotoxin und der anschließenden Freisetzung von CA aus dem Crotoxin-Rezeptor-Komplexes ausbilden könnte (Marchi-Salvador *et al.* 2008).

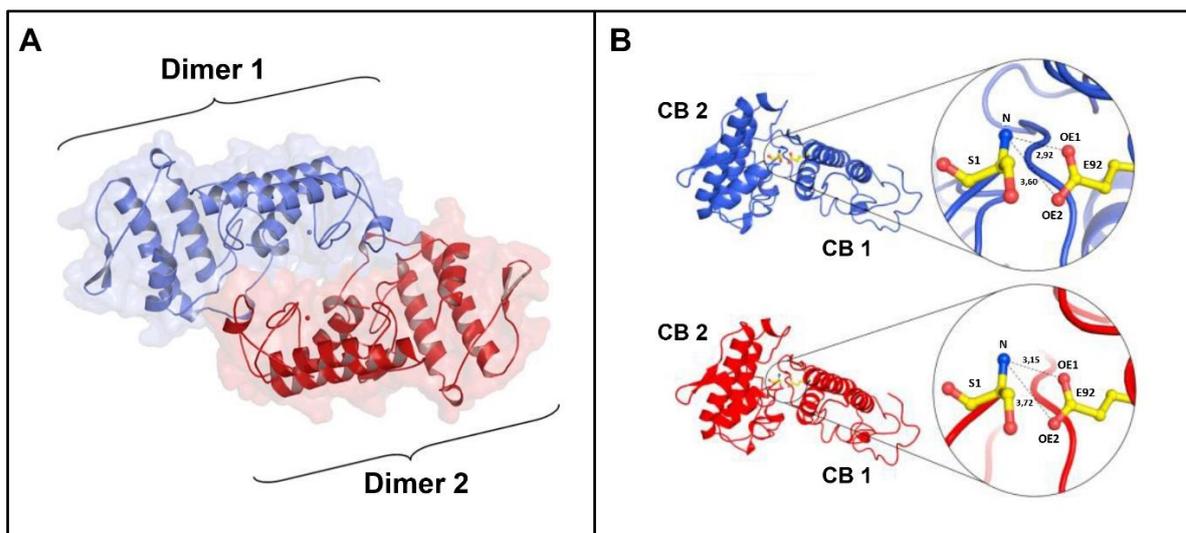


Abb. 6: Kristallographisches Modell der Quartärstruktur des Crotoxin B-Tetramers. **A)** Die Gesamtstruktur des Tetramers besteht aus zwei Heterodimeren, die sich jeweils aus einem Paar der beiden Crotoxin B-Isoformen (CB1 und CB2) zusammensetzen. **B)** Die Größe der Salzbrücken der beiden Dimere, die zwischen Serin 1 (S1, nur in CB2 vorhanden) und Glutamin 92 (E92, nur in CB1 vorkommend) ausgebildet sind, sind verschieden. Die dargestellten Modelle wurden in PyMOL (DeLano 2002) generiert und alle Distanzen sind in Ångström (Å) angegeben (Marchi-Salvador *et al.* 2008).

3.4 Crotamin

Crotamin ist mit ungefähr 4,9 kDa eine weitere Hauptkomponente des Gifts von *Crotalus durissus terrificus* und nunmehr seit 70 Jahren Gegenstand der Forschung (Gonçalves *et al.* 1947). Es handelt sich hierbei um ein kleines amphiphatisches, hoch basisches Polypeptid, welches aus 42 Aminosäuren besteht (Laure 1975).

Trotz seiner geringen Größe wurden für Crotamin eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkweisen berichtet. Hierzu gehören unter anderem myotoxische, neurotoxische, analgetische, antimikrobielle und antitumorale Effekt. Crotamin soll hierbei einerseits auf spezifische Ionenkanäle wirken, und so unter anderem die Leitfähigkeit der Plasmamembran beeinflussen können. Andererseits werden ihm Membran-beeinflussenden Eigenschaften, sowie die Fähigkeit zur Translokation in die Zelle zugeschrieben. Einmal ins Zellinnere gelangt stehen auch dort vielfältige Wirkungsweisen zur Diskussion.

3.4.1 Wirkungsweise von Crotamin

Bezüglich der Wirkungsweise von Crotamin wurden bisher vielfältige Untersuchungen durchgeführt. So wurde es bereits in frühen Studien sowohl als Neurotoxin (Gonçalves 1956), als auch als Myotoxin (Gonçalves *et al.* 1956) bezeichnet. Gonçalves *et al.* berichten in diesen Arbeiten davon, dass Crotamin bei verschiedenen Säugetieren zur spastischen Paralyse der Hinterläufe, sowie zu fortschreitender Muskelnekrose führte.

Mittlerweile wird Crotamin einer Gruppe von kleinen basischen Polypeptiden (SBPMs - „small basic polypeptide myotoxins“) zugeordnet, die in den meisten Giften von Klapperschlangen vorkommen und bezüglich ihrer Sequenz, Struktur und Antigenität sehr ähnlich sind (Bieber *et al.* 1997). Hierzu zählen unter anderem Myotoxin A (aus *Crotalus viridis viridis*), Myotoxin I und II (aus *C. v. concolor*), Peptid C (aus *C. v. helleri*) und CAM-Toxin (aus *C. adamanteus*). Die der Myotoxizität von Crotamin zu Grunde liegen Mechanismen gleichen den bereits für Myotoxin A beschriebenen (Cameron *et al.* 1978; Fletcher *et al.* 1996).

Demnach führt eine erhöhte Membranleitfähigkeit für Natriumionen zu einem geringeren Ruhepotential und somit letztlich zur Depolarisation der Skelettmuskelzellen (Chang *et al.* 1983). Da es sich hierbei um einen TTX-sensitiven Effekt zu handeln scheint, wird vermutet, dass diese Wirkungsweise von Crotamin über entsprechende Natriumkanäle der Plasmamembran vermittelt wird (Filho *et al.* 1978; Tsai *et al.* 1981; Hong *et al.* 1985; Brazil *et al.* 1993).

Außerdem induzieren Crotamin und Myotoxin A in Skelettmuskelzellen die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium und in Folge dessen das Anschwellen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und der Mitochondrien. Letztlich kann dies zur Nekrose der Skelettmuskelzellen führen (Furukawa *et al.* 1994; Ohkura *et al.* 1994; Ohkura *et al.* 1995).

Des Weiteren wurde von anderen Arbeitsgruppen berichtet, dass Crotamin im Rattenhirn zur Freisetzung von Acetylcholin und Dopamin (Camillo *et al.* 2001), sowie in den Inselzellen der Bauchspeicheldrüse zur Sekretion von Insulin (Toyama *et al.* 2000) führt. Hierbei wird angenommen, dass auch diese Wirkweisen von Crotamin auf einer Interaktion mit Natriumkanälen der Plasmamembran beruhen.

Bei Mäusen konnte außerdem eine analgetische Wirkung von Crotamin beobachtet werden. Der Vergleich zu Morphin zeigte, dass hierbei die schmerzlindernde Wirkung von Crotamin teilweise deutlich stärker war. Da der analgetische Effekt wie bei Morphin mit Hilfe des Opioid-Antagonisten Naloxon inhibiert werden kann, wird davon ausgegangen, dass diese Wirkweise ebenfalls über Opioid-Rezeptoren vermittelt wird (Mancin *et al.* 1998).

Neben der Interaktion mit spezifischen Rezeptoren, sowie der direkten Beeinflussung von Ionenkanälen und somit der Leitfähigkeit der Membran, wurden noch weitere Wirkungsmechanismen für Crotamin gefunden. So sind nach Hayashi *et al.* das Zellinnere, und dort die Lysosomen, das primäre Ziel von Crotamin (Hayashi *et al.* 2008). Demnach konnten sie in Zellkulturexperimenten kurze Zeit nach seiner Applikation die Anreicherung von Crotamin in den Lysosomen nachweisen. Die Akkumulation von Crotamin führte wiederum zur Zerstörung lysosomaler Vesikel. In Folge dessen kam es zur Freisetzung von Endoproteasen sowie zu einer erhöhten Caspaseaktivität und somit letztlich zum Zelltod. Der hierbei beschriebene Wirkungsmechanismus beinhaltet nach bisheriger Kenntnis keine Interaktion mit spezifischen Ionenkanälen und ist deshalb unabhängig vom Zelltyp.

Außerdem gelangen in den letzten Jahren zunehmend die antimikrobielle und antitumorale Wirkung von Crotamin, sowie dessen Fähigkeit zur Membranbeeinflussung und Translokation, in den Fokus der Forschung (Kapitel 3.4.4 - 6).

3.4.2 Genstruktur und chromosomale Lokalisation

Die Familie der *Viperidae* hat 36 Chromosomen, wobei der haploide Satz 8 Makro- und 10 Mikrochromosomen umfasst (Kerkis *et al.* 2014). Das Crotamin-Gen befindet sich hierbei auf dem langen Arm von Chromosom 2, wobei sich bei der zur Lokalisierung verwendeten *in situ* Hybridisierung die jeweilige Signalintensität auf den beiden Homologen unterschied (Rádis-Baptista *et al.* 2003). Dies ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Anzahl an Genkopien zurückzuführen und wäre somit gleichzeitig ein Erklärungsansatz für das unterschiedlich starke Vorkommen von Crotamin im Gesamtgift verschiedener Individuen der *Crotalus durissus terrificus* (Rádis-Baptista *et al.* 2003).

Das beschriebene Crotamin-Gen ist ungefähr 1785 bp lang und beinhaltet drei Exons (58, 124 und 13 bp). Diese sind von einem langen „phase 1“- und einem kurzen „phase 2“-Intron (898 und 145 bp) unterbrochen. Exon 1 enthält die 5'-untranslatierte Region und codiert für die ersten 19 AS des Signalpeptids. Exon 2 codiert 42 AS, wobei die ersten drei dem Signalpeptid und die restlichen 39 Crotamin zuzuordnen sind. Exon 3 codiert die letzten drei AS von Crotamin sowie ein terminales Lysin. Die zugehörige mRNA ist zwischen 340 und 360 Nukleotide lang und codiert das sogenannte Prä-Crotamin. Es beinhaltet das Signalpeptid, Crotamin und das endständige Lysin (Radis-Baptista *et al.* 1999).

3.4.3 Strukturelle Untersuchungen von Crotamin

Nachdem die Primärstruktur von Crotamin gefunden wurde (Laure 1975, Abb. 7D), konnte zunächst mittels Laser-Raman Spektroskopie gezeigt werden, dass alle sechs enthaltenen Cysteine an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind (Kawano *et al.* 1982). Im Weiteren konnten dann mit Hilfe von ¹H-NMR-Untersuchungen Erkenntnisse bezüglich der räumlichen Nähe von Aminosäuren gewonnen, und 2003 erstmals eine 3D-Struktur für Crotamin in Form einer $\beta_1\alpha\beta_2\beta_3$ Topologie beschrieben werden (Endo *et al.* 1989; Nicastro *et al.* 2003). Bedingt durch die Fortschritte in der NMR-Technologie und besserer Computermodelle wird mittlerweile allerdings eine $\alpha\beta_1\beta_2$ Topologie angenommen (Fadel *et al.* 2005; Siqueira *et al.* 2002; Coronado *et al.* 2013). Die einzelnen Elemente werden hierbei durch drei Disulfidbrücken (C₄-C₃₆; C₁₁-C₃₀; C₁₈-C₃₇) stabilisiert.

In diesem Modell bilden die Aminosäuren Y₁ bis K₇ (bzw. nach Coronado K₂-K₇) den ersten α -helikalen Teil des Peptides. Dieser flankiert das aus zwei antiparallelen Strängen gebildete β -Faltblatt (G₉-P₁₃ und W₃₄-K₃₈). Die einzelnen β -Stränge sind durch die beiden β -Schleifen aus den Aminosäuren 14-16 und 27-34 verbunden, werden von diesen umgeben und bilden gemeinsam den Kern des Moleküls.

Dieses Motiv aus über Schleifen verbundener und durch Disulfidbrücken stabilisierter β -Stränge wird als „ γ -core“ bezeichnet. Es handelt sich hierbei um eine von der Gruppe der antimikrobiellen Peptiden (AMPs) bekannte Struktur (Yount *et al.* 2004). Nach Coronado *et al.* werden die beiden β -Schleifen von einer zusätzlichen kurzen α -helikalen Schleife unterbrochen (P₂₀-S₂₃); weshalb nach deren Modell auch von einer $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$ - Topologie gesprochen werden kann (Abb. 7A).

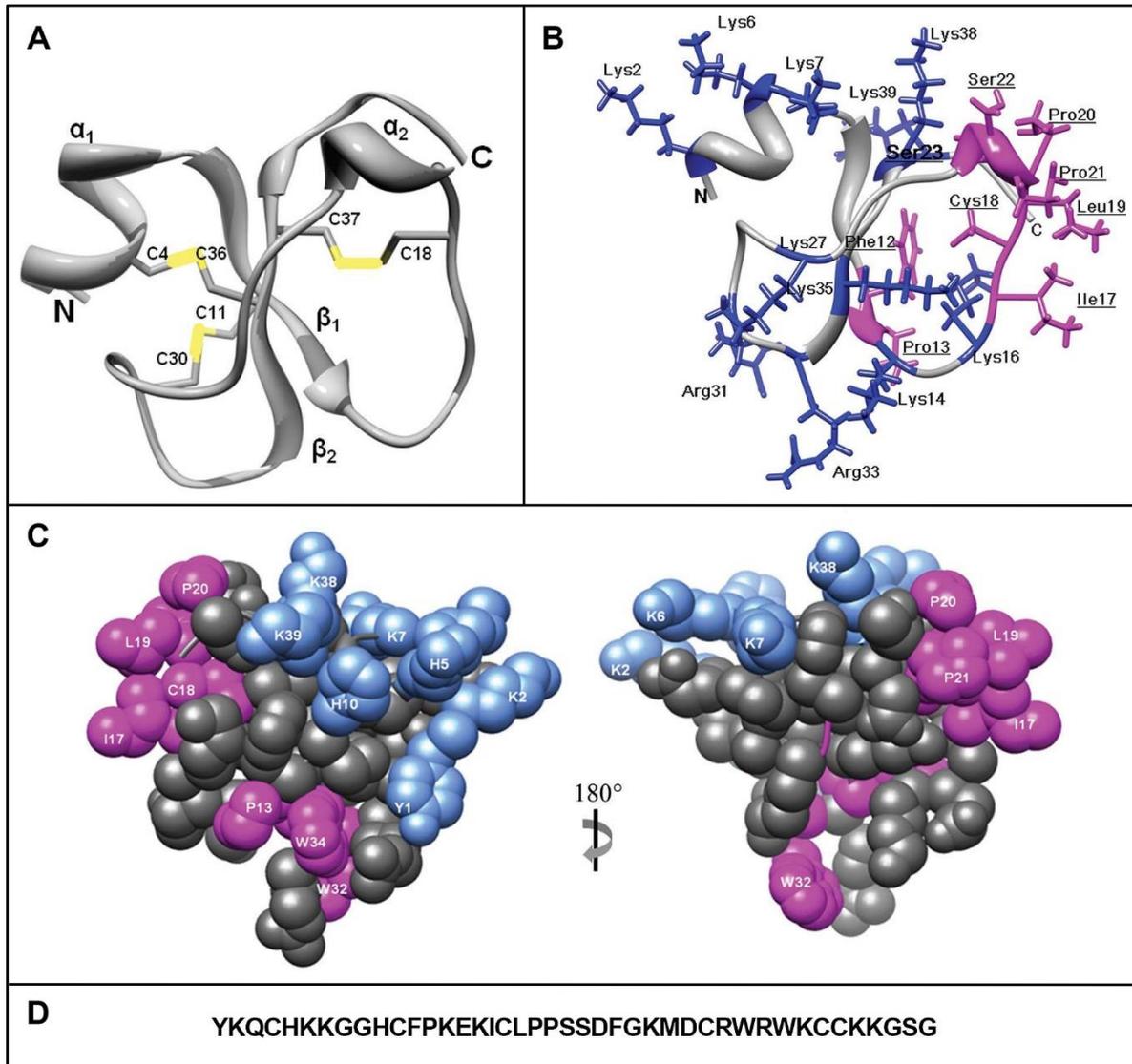


Abb. 7: Übersicht zur Tertiärstruktur und Ladungsverteilung von Crotoxin nach (Coronado *et al.* 2013). (A) Struktur von Crotoxin: Die einzelnen Sekundärstrukturen, das N- und C-terminale Ende des Peptids, sowie die Disulfidbrücken (gelb) sind hervorgehoben. (B) Darstellung der Kristallstruktur, bei welcher zusätzlich die stark hydrophoben Seitenketten (pink) sowie die positiv geladenen Lysine und Arginine (blau) eingezeichnet wurden (K2, 6, 7, 14, 16, 27, 35, 38 und 39 sowie R31 und 33). (C) Raumfüllende Darstellung von Crotoxin aus zwei unterschiedlichen Perspektiven (um 180° rotiert): Die amphipatischen Regionen der Oberflächen sind entsprechend zu (B) farbig hervorgehoben (ebenfalls pink und blau). Die Abbildungen B und C zeigen hierbei deutlich, dass sich die hydrophoben Aminosäuren auf der einen, die geladenen auf der anderen Seite des Moleküls befinden. (D) Primärstruktur von Crotoxin.

Zusätzlich zu den bekannten Disulfidbrücken wird die Position der einzelnen Strukturen durch Wasserstoffbrücken stabilisiert, wobei die β -Stränge sowohl miteinander als auch mit den weiteren Struktureinheiten verbunden sind (β -Stränge über H₁₀-C₃₇ und F₁₂-K₃₅, β_2 mit α_2 über S₂₃-K₃₈ sowie über zwei weitere mit der C-terminalen β -Schleife) (Coronado *et al.* 2013).

Auf Grund seiner basischen Aminosäuren (neun Lysine und zwei Arginine) ist Crotamin stark positiv geladen. Da Crotamin ein relativ kleines Molekül ist, sind zudem alle geladenen und hydrophoben Seitenketten zum Lösungsmittel hin exponiert; ein Umstand, der es außergewöhnlich „klebrig“ macht. Vermutlich sind es die elektrostatischen und hydrophoben Kräfte auf der Oberfläche, sowie seine durch die Disulfidbrücken stabilisierte dreidimensionale Struktur, die es Crotamin und dessen Oligomeren ermöglichen, mit ihren Zielen zu interagieren. Die meisten hydrophoben Reste befinden sich hierbei auf der einen Seite, die positiv geladenen auf der anderen und somit kationischen Seite des Moleküls (Abb. 7B). Hieraus ergibt sich der amphiphile Charakter von Crotamin (Abb. 7C) (Coronado *et al.* 2013).

3.4.4 Antimikrobielle und antifungale Aktivität von Crotamin

Crotamin ist auf Grund seiner strukturellen Eigenschaften ein potentieller Kandidat für die Klasse der antimikrobiellen Peptide (AMPs). Diese Einordnung basierte zunächst auf der Ähnlichkeit des Disulfidbrücken-Musters von Crotamin zu den humanen β -Defensinen (hBD) (Nicastro *et al.* 2003). Defensine sind Teil des angeborenen Immunsystems und besitzen ein breites antimikrobielles Spektrums (Maroti *et al.* 2011). Innerhalb der Defensine besitzt hBD-2 die größte strukturelle Ähnlichkeit zu Crotamin (Abb. 8). In ihrer Tertiärstruktur zeigen dabei beide den für globuläre antimikrobielle Peptide typischen γ -core (Nicastro *et al.* 2003; Yount *et al.* 2004).

Mittlerweile gibt es wegen der großen dreidimensionalen Ähnlichkeit auch die Annahme, Crotamin und Defensine könnten ein gemeinsames Vorgängergen haben (Yount *et al.* 2009). Dem entgegen steht allerdings, dass sie bezüglich ihrer Primärstruktur deutliche Unterschiede aufweisen (Radis-Baptista *et al.* 1999).

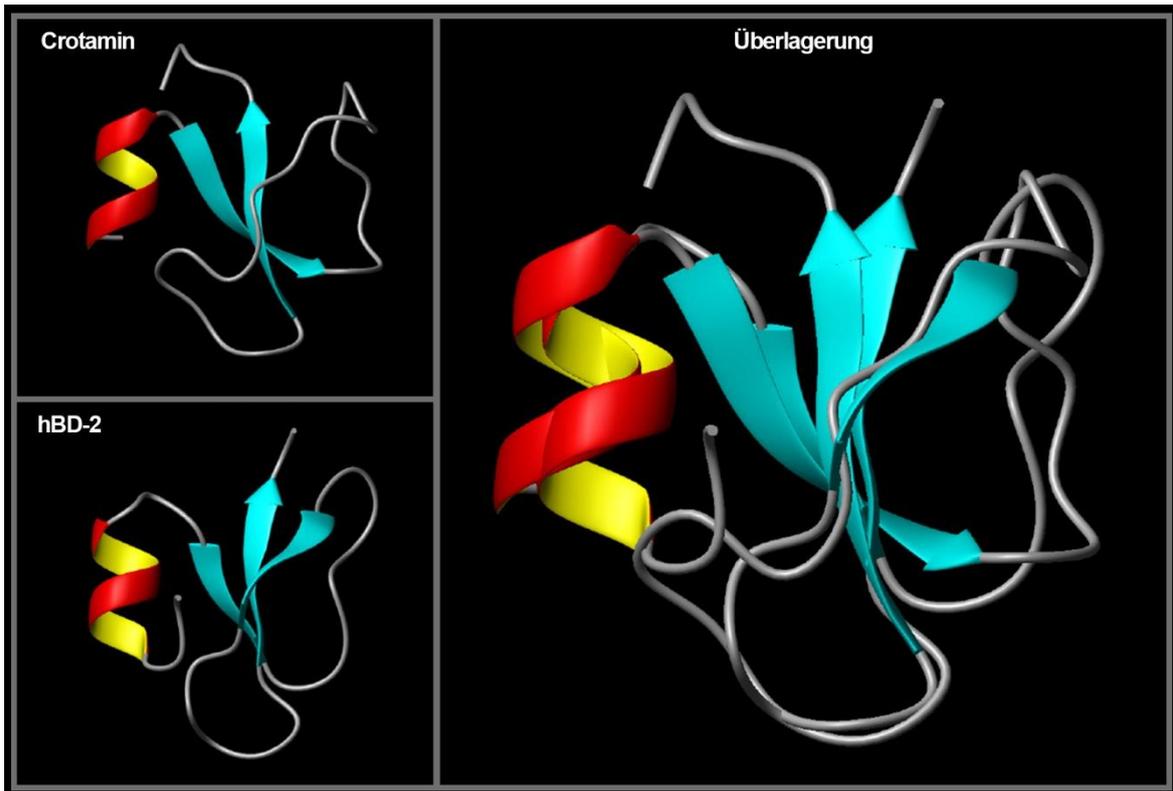


Abb. 8: Struktureller und biophysikalischer Vergleich von Crotamin und hBD-2. (A) 3D-Darstellung von Crotamin und hBD-2 sowie die Überlagerung der beiden. Hierbei sind die jeweiligen Sekundärstruktur wie folgt farblich hervorgehoben: β -Stränge (blau); Schleifen (grau); α -Helices (rot bzw. gelb). Zur Darstellung wurden die Datensätze von 1H5O für Crotamin und 1FD3 für hBD-2 verwendet (PDB ID) (Yount *et al.* 2009)

Zudem wurde das Potential einer antibakteriellen und antifungalen Aktivität von Crotamin an einem breiten Spektrum von Mikroorganismen untersucht, und mit der Aktivität von hBD-2 verglichen (Yount *et al.* 2009; Oguiura *et al.* 2011; Yamane *et al.* 2013). Es zeigte sich, dass Crotamin eine antimikrobielle Wirkung besitzt. Im Vergleich zu hBD-2 ist diese aber nur mäßig, und die Bandbreite gegenüber Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien ist geringer (Oguiura *et al.* 2011).

Die weiteren Untersuchungen von Crotamin und hBD-2 zeigten jedoch, dass beide sowohl zytotoxische als auch antimikrobielle Wirkungen besitzen und sich ihre Wirkungsweisen ähnlich sind. Hinsichtlich ihrer „Spezifität“ verhalten sie sich allerdings reziprok. Crotamin ist eher zytotoxisch und seine Effektivität ist gegenüber eukaryotischen Zellen größer. Dagegen ist hBD-2 eher antimikrobiell und weist eine stärkere Wirkung gegenüber prokaryotischen Zellen auf (Yount *et al.* 2009).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Crotamin eine antifungale Wirkung aufweist. Von einer besonderen Relevanz könnte hierbei seine Wirksamkeit gegen einige Pilze der Familie *Candida spp.*, besonders gegen *Candida albicans*, sein. Zu dieser Familie gehören einige der mittlerweile klinisch resistenten Stämme. In den USA gehört die Familie zu den am meisten verbreiteten Blutstrom-Pathogenen. In Europa rangiert sie auf Platz sieben der krankheitserregenden Stoffe (Calandra *et al.* 2004).

3.4.5 Antitumorale Aktivität von Crotamin

Es ist mittlerweile allgemein bekannt, dass viele antimikrobiellen Peptide zusätzlich eine antitumorale Aktivität aufweisen (Hoskin *et al.* 2008). Der zu Grunde liegende Mechanismus könnte dabei ebenfalls auf den meist kationischen Eigenschaften der Moleküle basieren. (Findlay *et al.* 2010). Es wird angenommen, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Membranbestandteilen und positiv geladenen AMPs die Hauptursache für deren starke Bindung an die Plasmamembran sind, und daher zur selektiven Zerstörung von Krebszellen führen (Papo *et al.* 2005).

Um die Toxizität von Crotamin gegenüber Krebszellen im Allgemeinen, sowie dessen Effektivität im Mausmodell gegen Melanome, zu untersuchen, wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zahlreiche Untersuchungen durchgeführt (Pereira *et al.* 2011; Leon *et al.* 2011; Macedo *et al.* 2015). Hierzu wurden unter anderem die Letalität von Crotamin auf die Tumor-Zelllinien B16-F10 (murines Melanom), SK-Mel-28 (humanes Melanom) und Mia PaCa-2 (humanes Pankreaskarzinom) in einem Konzentrationsbereich von 1-5 µg/ml untersucht. Im Gegensatz zur Kontrolle (3T3, gutartige neoplastische murine Fibroblasten) wirkte Crotamin für alle untersuchten Zelllinien bei einer finalen Konzentration von 5 µg/ml letal (Pereira *et al.* 2011).

Mithilfe von Crotamin, welches mit dem Farbstoff Cyanin 3 fluoreszenzmarkiert wurde (Cy3-Crotamin), konnte außerdem die Aufenthaltsdauer in Krebszellen bestimmt werden. Da die Wirksamkeit von Medikamenten unter anderem durch die zelluläre Aufnahme und Abgabe bestimmt wird, ist die jeweilige zelluläre Verweildauer von Crotamin für die Untersuchungen der antitumoralen Eigenschaften von hoher Bedeutung. In B16-F10-Zellen konnte nach 20 Stunden noch 70 % des Fluoreszenzsignals von Cy3-Crotamin detektiert werden. Dies spricht für eine lange Retentionszeit von Crotamin (Pereira *et al.* 2011).

Außerdem wurde in Mäusen die selektive Penetration von Crotamin in Tumor-Melanom-Zellen demonstriert. Hierbei konnte Crotamin vorwiegend innerhalb der Tumormasse, in der den Tumor umgebenden nekrotischen Region, sowie in den sich schnell teilenden, metastatischen Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte in den umgebenden normalen Zellen kein Crotamin nachgewiesen werden (Pereira *et al.* 2011; Nascimento *et al.* 2012). Der Einsatz von Cy3-Crotamin machte es zudem möglich, die metastatische Invasion von B16-F10 Zellen *in vivo* zu verfolgen. Dies führt zu der Überlegung, Cy3-Crotamin als Marker (bildgebendes Mittel) für Metastasen im lebenden Organismus einzusetzen (Nascimento *et al.* 2012).

Des Weiteren konnte im Mausmodell die Verzögerung des Tumorwachstums nachgewiesen werden. Hierzu wurden Mäusen zunächst subkutan B16-F10-Zellen injiziert („Tumorimplantation“) und über 21 Tage beobachtet. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Crotamin (1µg pro Tier und Tag) konnte eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums bezüglich der Tumormasse beobachtet werden. Außerdem führte die Gabe von Crotamin zu einer Verlängerung der Lebenszeit von B16-F10-Tumor tragenden Mäusen (Nascimento *et al.* 2012). Histologischen Untersuchungen, unter anderem an Leber und Niere, bestätigen, dass Crotamin für normale Zellen in den untersuchten Konzentrationen nicht toxisch ist. Zudem konnte bei diesen Mäusen auch kein, durch die Langzeitgabe von Crotamin induzierter, immunotoxischer Effekt beobachtet werden (Pereira *et al.* 2011; Nascimento *et al.* 2012).

3.4.6 Crotamin - ein zellpenetrierendes Peptid

Zellpenetrierende Peptide (CCPs – „cell penetrating peptides“) bilden eine eigene Klasse bioaktiver Moleküle, die auch als „protein transduction domains“ (PTDs), „membrane translocation sequences“ (MTSs) oder trojanische Peptide bezeichnet werden. Sie sind stark kationische, niedermolekulare Peptide, die sowohl reich an basischen, als auch an hydrophoben Aminosäuren sind (R und K bzw. bspw. P). Es handelt sich hierbei um kurze Peptide, die in der Regel bis zu 40 Aminosäuren lang sind und die Fähigkeit besitzen, in das Innere der meisten Zellen zu gelangen (Kerkis *et al.* 2006; Milletti 2012).

Das Penetrationsvermögen basiert auf der jeweiligen Aminosäuresequenz, der daraus resultierenden Tertiärstruktur und den biophysikalischen Eigenschaften der Peptide. Die Effizienz ist hierbei unter anderem von der Länge des Peptidrückrats abhängig, wobei Strecken von sechs bis acht Argininen-Resten das größte Internalisierungspotential zeigen (Futaki *et al.* 2001; Suzuki *et al.* 2002).

Außerdem unterstützen sogenannte Nucleus-Lokalisierungs-Sequenzen (NLS - „nucleus localization sequence“), welche reich an basischen Aminosäuren sind, die Translokation der CCPs zum Zellkern (Kalderon *et al.* 1984; Ragin *et al.* 2002).

Die zellpenetrierende Aktivität von Crotamin

Die strukturellen Eigenschaften, sowie die Wirkungsweise von Crotamin, führten zu der Annahme, dass es, wie eine Vielzahl anderer als AMP klassifizierter Peptide, eine membranbeeinflussende Aktivität besitzt. Zunächst konnte hierzu für eine Vielzahl von Zelltypen gezeigt werden, dass Crotamin ähnlich wie andere zellpenetrierende Peptide die Fähigkeit zur Translokation ins Zellinnere besitzt (Kerkis *et al.* 2004). Im Gegensatz zu diesen wurde jedoch bei Crotamin eine Präferenz für (bzw. eine deutlich stärkere Anreicherung in) aktiv proliferierende Zellen beobachtet (Kerkis *et al.* 2004). Zudem konnte gezeigt werden, dass Crotamin die lysosomale Membran permeabilisieren kann (Hayashi *et al.* 2008). Die zellpenetrierenden Eigenschaften von Crotamin konnten in weiteren Versuchen auch an Gewebeschnitten von Mäusen bestätigt werden. Hierbei gelang es zunächst, intraperitoneal injiziertes Cy3-Crotamin im Gewebe von Mäusen nachzuweisen (Leber, Skelettmuskeln, Rückenmark, Lunge und Niere) (Boni-Mitake *et al.* 2006; Nascimento *et al.* 2007). Zudem konnte bei Tumorzellen die Translokation von Crotamin ins Zellinnere gezeigt werden (Nascimento *et al.* 2012).

Neben den zellulären Untersuchungen wurde Crotamin mit Hilfe künstlicher Membranen auch auf seine biophysikalischen Eigenschaften untersucht (Sieber *et al.* 2014; Kaltenbach *et al.* 2014). So konnte mit Hilfe einer Filmwaage gezeigt werden, dass Crotamin selbst in der Lage ist, Monolayer auszubilden. Dies entspricht seinem amphiphatischen Charakter und unterstützt die Annahme, es könne direkt mit den ebenfalls amphiphilen Lipiden von Biomembranen interagieren. In weiteren Versuchen konnte zudem der Einbau von Crotamin in Lipidmonolayern nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeiten mit Hilfe von elektrophysiologischen Messungen an künstlichen Bilayern die Fähigkeit von Crotamin zur Porenbildung gezeigt (Abb. 9).

Auf Grund seiner strukturellen Eigenschaften ist Crotamin als Monomer jedoch nicht zur Ausbildung von Poren in der Lage. Da aber bereits in Wasser seine Tendenz zur Bildung von Oligomeren gezeigt werden konnte (Hampe 1989), wird davon ausgegangen, dass sich Crotamin zunächst an die Membran anlagert, dort oligomerisiert und so letztlich Poren ausbildet (Sieber *et al.* 2014).

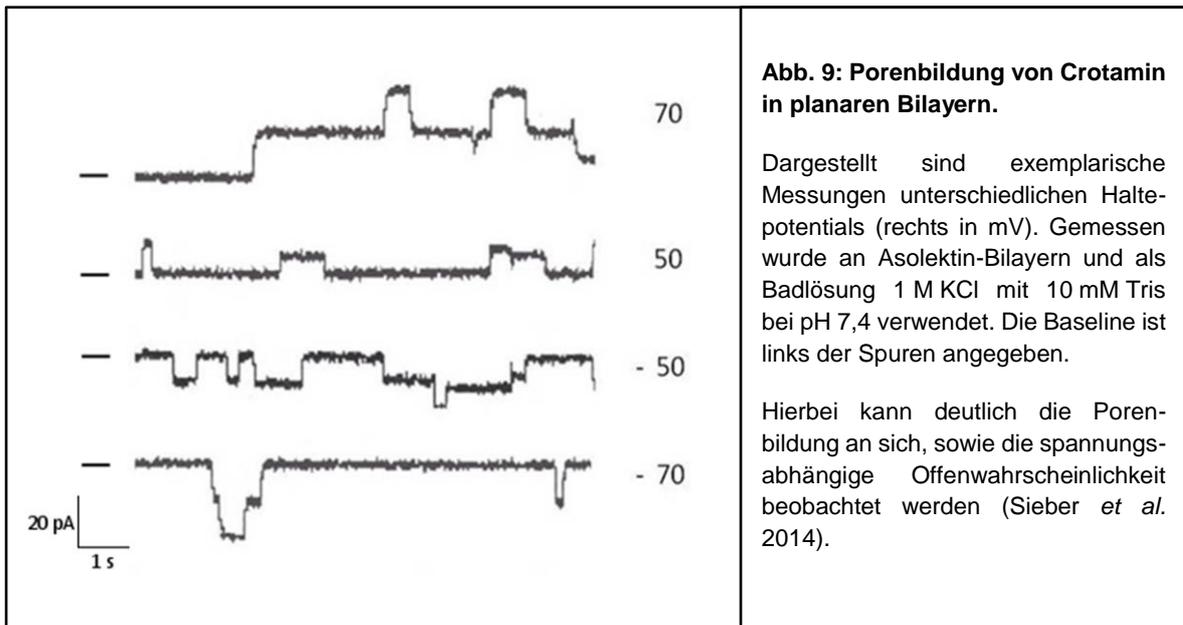


Abb. 9: Porenbildung von Crotamin in planaren Bilayern.

Dargestellt sind exemplarische Messungen unterschiedlichen Haltepotentials (rechts in mV). Gemessen wurde an Asolektin-Bilayern und als Badlösung 1 M KCl mit 10 mM Tris bei pH 7,4 verwendet. Die Baseline ist links der Spuren angegeben.

Hierbei kann deutlich die Porenbildung an sich, sowie die spannungsabhängige Offenwahrscheinlichkeit beobachtet werden (Sieber *et al.* 2014).

In Versuchen an künstlichen Vesikeln konnte außerdem gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Crotamin zur Permeabilisierung von Membranen von der Lipidkomposition, beziehungsweise der Ladung der Membran, abhängig ist (Costa *et al.* 2014). Demnach wird das Potential zur Permeabilisierung durch negativ geladenen Lipide erhöht und ist bei Membranen, die Cholesterin enthalten, herabgesetzt.

Wie auch andere CCPs, konnte Crotamin in einigen Experimenten zudem im Zellkern nachgewiesen werden. Dort bindet es während der Zellteilung an Chromosomen und Centriolen. Seine Bindung beruht vermutlich auf seiner positiven Ladung und den elektrostatischen Wechselwirkungen („non cooperatively“) mit der negativ geladenen DNA. Die hohe negative Ladung der DNA hat hierbei ihren Ursprung in den vielen, negativ geladenen Phosphaten des „Rückgrats“ der Doppelhelix (Rádis-Baptista *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). Diese Eigenschaft wird wiederum genutzt, um Metaphasenchromosomen mit fluoreszenzmarkiertem Crotamin zu färben. Das daraus resultierende spezifische Muster unterscheidet sich von jenen, die beim Einsatz der üblichen DNA-interkalierenden Farbstoffen entstehen (und bspw. zur Giemsa-Bänderung führen) oder bei der Verwendung anderer Fluoreszenzfarbstoffe wie DAPI erzeugt werden (Kerkis *et al.* 2004).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Crotamin in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Hierbei gelang es fluoreszenz-, sowie radioaktiv- markiertes Crotamin im Gehirn von Mäusen nachzuweisen (Boni-Mitake *et al.* 2006 bzw. Blumling III *et al.* 2012). Es wird angenommen, dass für dessen Transzytose der im Folgenden beschriebene dreistufige Prozess abläuft (Blumling III *et al.* 2012; Lange 2012):

Zunächst bindet Crotamin an der luminalen Seite der endothelialen Zellmembran und wird mittels Endozytose internalisiert. Der Bindungsprozess wird hierbei durch die kationischen Eigenschaften von Crotamin, sowie durch die negativ geladenen Moleküle der endothelialen Membran, wie bspw. Chondroitin- (ein Polysaccharid) und Heparansulfat, gefördert. Anschließend erfolgt die Diffusion durch das Zytoplasma und letztlich die Externalisierung aus den Endothelzellen mittels Exozytose. Die Prozesse stimmen hierbei mit dem zuvor beschriebenen Mechanismus für die intrazelluläre Penetration von Crotamin überein (Nascimento *et al.* 2007).

Crotamin als Transportmolekül

Eine weitere bekannte Eigenschaft vieler CCPs ist die Fähigkeit, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* biologisch aktive Moleküle in die Zelle befördern zu können. Die Mehrheit der CPPs zeigt hierbei allerdings keine Zellspezifität (Sarko *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu zeigt Crotamin selbst in seiner Funktion als Transportmolekül eine Spezifität für aktive proliferierende Zellen (Hayashi *et al.* 2008; Nascimento *et al.* 2007). Diese Besonderheit kann zur effizienten und selektiven Transfektion von proliferierenden Zellen, wie bspw. Stammzellen oder Krebszellen, genutzt werden. Crotamin hat zudem nur einen geringen Einfluss auf die Viabilität der Zellen. Die Transfektion mit Hilfe von Crotamin unterscheidet sich daher deutlich von den klassischerweise genutzten Prozeduren, wie beispielsweise der Elektroporation, die bei ca. 90 % der Zellen zum Tod führt (Gehl 2003).

Crotamin ist hierbei nicht nur *in vitro*, sondern auch im lebenden Organismus als Transportmolekül einsetzbar (Nascimento *et al.* 2007). Nascimento *et al.* untersuchten, ob mit Hilfe von Crotamin die Transfektion von Plasmid-DNA möglich ist. Hierfür haben sie zunächst gezeigt, dass Crotamin in wässriger Lösung Komplexe mit Plasmid-DNA bilden kann. Um nun die Möglichkeit der *in vivo* Transfektion zu überprüfen, injizierten sie Mäusen Plasmid-DNA, auf welcher eGFP codiert ist, gemeinsam mit Crotamin in die freie Bauchhöhle. Im Anschluss konnten sie das Fluoreszenzsignal von eGFP unter anderem in den Rückenmarkszellen detektieren, und somit die erfolgreiche Transfektion nachweisen.

Der beobachtete relative Anteil an fluoreszierenden Zellen von 10 bis 20 % entspricht dem in der Literatur beschriebenen Anteil von proliferierenden Zellen im Rückenmark und bestätigt somit die Spezifität von Crotamin (Nascimento *et al.* 2007). Letztlich bestätigen diese Beobachtungen die, zuvor schon *in vitro* beschriebene, Selektivität von Crotamin bezüglich aktiv proliferierender Zellen (Kerkis *et al.* 2004; Hayashi *et al.* 2008).

3.5 Antimikrobielle Peptide (AMPs)

Die Klasse der antimikrobiellen Peptide umfasst ein breites Spektrum an kleinen Peptiden. Sie sind als sogenannte „host defence peptides“ (HDPs) unter anderem für die adaptive Immunantwort relevant und quer durch das evolutionäre Spektrum vorzufinden (Yeaman *et al.* 2003; Yount *et al.* 2006). Hierbei unterscheiden sich AMPs in ihrer Wirkungsweise und spielen in einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine Rolle (Abb. 10).

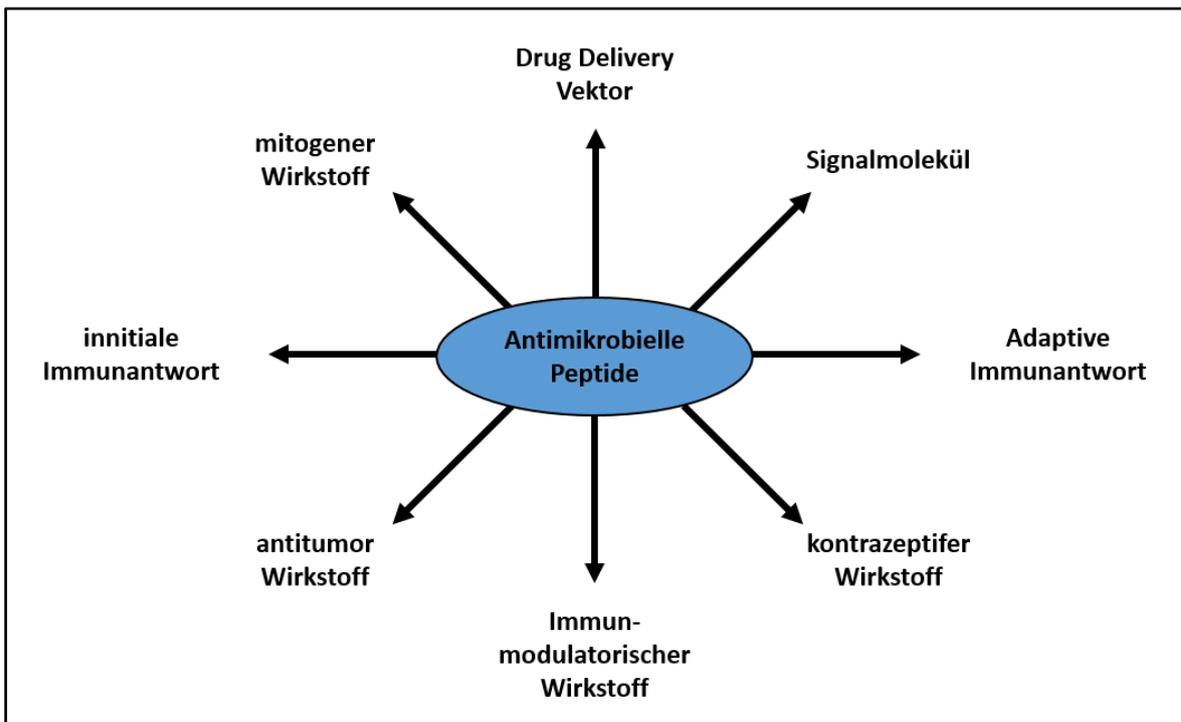


Abb. 10: Schematische Darstellung der vielfältigen Wirkweisen von antimikrobiellen Peptiden (Pushpanathan *et al.* 2013).

Auf Grund ihrer Aminosäure-Komposition und Struktur werden sie in fünf Untergruppen eingeteilt (Brogden 2005):

- a) Anionische Peptide
- b) Lineare kationische α -helikale Peptide
- c) Kationische Peptide, bei welchen bestimmte Aminosäuren überrepräsentiert sind (Prolin-reich, Histidin-reich, etc.)
- d) Anionische und kationische Peptide, die Cysteine enthalten und Disulfidbrücken ausbilden
- e) Anionische und kationische Peptidfragmente aus größeren Proteinen

Die mittlerweile knapp tausend bekannten AMPs variieren stark in ihrer Größe (zwischen 6 und 59 AS) und Sequenz. Hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur unterscheiden sich die AMPs in ihrer Komplexität, wobei in der Regel ihre biologische Aktivität mit Größe und Komplexität der Struktur zunimmt. Die jeweilige Aminosäurekomposition definiert hierbei zunächst die Ladungsverteilung innerhalb des Peptids, sowie das Verhältnis zwischen hydrophoben und geladenen Aminosäuren (Hydrophobizität normalerweise > 50 %). Daraus ergibt sich die Löslichkeit in Wasser, sowie die Fähigkeit, mit Lipiddoppelschichten zu interagieren. Außerdem fällt auf, dass AMPs auf Grund der dreidimensionalen Verteilung der hydrophoben und geladenen Aminosäuren häufig einen amphiphilen Charakter aufweisen (Bulet *et al.* 2004; Brogden 2005).

Hinsichtlich des jeweiligen Wirkungsmechanismus unterscheiden sich die einzelnen Peptide. Das genaue Verständnis für die hierbei stattfindenden Prozesse steht erst am Anfang. Generell ist jedoch die Assoziierung an und die Interaktion mit der Zellmembran die Schlüsselfähigkeit der AMPs. Die Fähigkeit zur Membranpermeabilisierung ist allerdings nicht zwingend notwendig (Brogden 2005).

Der erste Schritt in der Wirkungsweise der AMPs ist jedoch stets die sogenannte Attraktion. Sie beruht zumeist auf der elektrostatischen Anziehung zwischen den Peptiden und der Zellmembran. Im nächsten Schritt wechselwirken die AMPs mit der Zelloberfläche und binden an diese. Die Assoziation an die Zellmembran erfolgt hierbei zunächst in Abhängigkeit von Ladung und Polarität der AMPs, sowie auf Grund von elektrostatischer Anziehung, beziehungsweise elektrochemischer Kräfte wie dem Membranpotential, der Ladung der Kopfgruppen von Membranlipiden, sowie der Zelloberflächenmoleküle (z. B. Membranproteine, Lipopolysaccharide). Zusätzlich sind aber auch spezifischen Wechselwirkungen mit bestimmten Rezeptoren bekannt.

Einmal mit der Plasmamembran in Kontakt, gibt es vielfältige Mechanismen, über welche die AMPs die Zellen beeinflussen können. So kann die Toxizität eines AMPs einerseits ausschließlich auf membranbeeinflussenden Effekten beruhen. Hierzu gehört die Reorganisation (Raftbildung) und Ausdünnung der Lipiddoppelschicht, sowie eine lokale Ladungsänderung bis hin zur Depolarisation der Plasmamembran. Es kann aber auch zur Porenbildung oder Perforation der Zellmembran und somit zum Verlust der Zellhomöostase kommen.

Für die, dieser Wirkungsweise zu Grund liegenden, Mechanismen sind in der Literatur verschiedene Modelle beschrieben. In allen liegen die Peptide bis zum Erreichen einer gewissen Schwellenkonzentration auf der Membran auf und dringen dann selbstständig in diese ein. In Folge dessen kann es zur Perforation der Membran kommen. Hierfür sind unterschiedliche Mechanismen in der Diskussion, wobei man zwischen den folgenden Modellen unterscheidet (Abb. 11, Nguyen *et al.* 2011):

Nach dem Erreichen der Schwellenkonzentration bilden sich beim „barrel stave“-Model Poren, die ausschließlich mit Peptid ausgekleidet sind. Im Gegensatz dazu sind die Poren nach dem „toroidal pore“-Model in unterschiedlich starker Ordnung von Peptid und Lipid ausgekleidet. Im sogenannten „carpet“-Model lösen die Peptide die Membran und bilden gemeinsam mit den Lipiden mizellenartige Strukturen aus. Demnach bilden sich bei diesem Modell keine definierten Poren aus, sondern die Peptide lösen und perforieren die Membran.

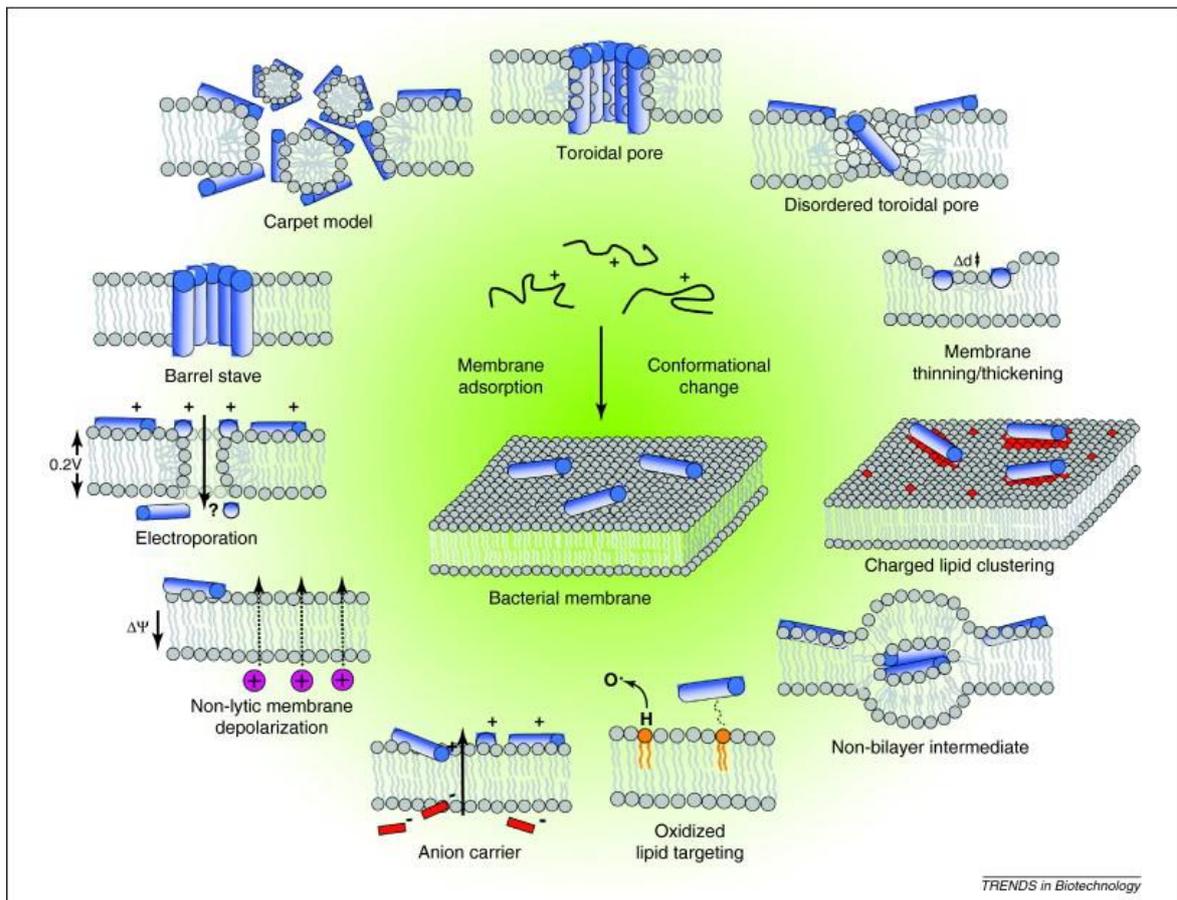


Abb. 11: Mögliche Ereignisse, die dem ersten Kontakt eines AMPs mit der bakteriellen Plasmamembran folgen (wobei die einzelnen Effekte nicht notwendigerweise einzeln auftreten) (Nguyen *et al.* 2011).

Außerdem kann die Anwesenheit der Peptide die Dicke des Bilayers beeinflussen, oder die Lipidverteilung innerhalb der Membran verändern. Dies kann wiederum eine Domänenbildung (Raftbildung) in der Umgebung des Peptids verursachen. In spezifischeren Fällen können sich auch "non-bilayer"-Intermediate bilden. Dabei lagern sich die Peptide in die Membran ein, wobei sie von der Lipiddoppelschicht umschlossen sind. Der Kontakt von AMPs mit der Plasmamembran kann zudem die Oxidation von Phospholipiden fördern, oder durch die Kopplung an kleine Anionen auf der zytosolischen Seite zum Ausfluss der Anionen führen.

Darüber hinaus kann die extrazelluläre Anhäufung von Peptiden die Oberflächenladung und in Folge dessen das Membranpotential beeinflussen. Dies kann einerseits ohne weitere Schäden geschehen (nicht-lytische Depolarisation). Andererseits kann das Membranpotential so weit angehoben werden, dass die Membran vorübergehend für einige Moleküle, einschließlich der Peptide selbst, permeabel wird (Elektroporation).

Die antimikrobielle Wirkung eines Moleküls kann aber auch die Folge zytoplasmatischer Effekte sein. AMPs können hierzu in Folge der Membranpermeabilisierung, oder unabhängig davon mittels Endozytose oder „einfacher“ Penetration, ins Zytoplasma gelangen. Einmal in der Zelle, sind die intrazellulären Wirkungsmechanismen vielseitig und können sowohl einzeln, als auch gleichzeitig oder aufeinander folgend, auftreten. So konnten beispielsweise das Ausfällen intrazellulärer Komponenten, eine gestörte (zytoplasmatische) Septumbildung im Zellzyklus und das Binden an die DNA beobachtet werden. Zudem führen einige AMPs zur Inhibition der Synthese von Nukleinsäuren, Proteinen und Zellwand, sowie von anderen enzymatischen Aktivitäten (Brogden 2005).

3.6 Die Lipidkomposition von Biomembranen

Die Lipidkomposition der Plasmamembran von unterschiedlichen Zelltypen und besonders von Zellen aus den unterschiedlichen Reichen (bspw. Eukaryoten und Prokaryoten, Tiere und Pflanzen) ist verschieden. Den größten Anteil der Membranlipide machen die sogenannten Phospholipide aus. Man unterscheidet dabei zwischen Phosphoglyceriden und Sphingo(-glyko-)lipiden.

Die einzelnen Lipide unterscheiden sich in der Länge, Sättigung und Art der Verknüpfung der Kohlenwasserstoffketten, sowie anhand ihrer unterschiedlichen Kopfgruppen. Die Molekülstruktur bestimmt dabei sowohl die geometrische Form des Lipids, als auch dessen

physikochemischen Eigenschaften. Je nach benötigten Eigenschaften ist daher die Verteilung der Lipide in den verschiedenen Membranen unterschiedlich.

So besteht beispielsweise die extrazelluläre Seite von tierischen Plasmamembranen hauptsächlich aus den cholinhaltigen Lipiden Phosphatidylcholin und Sphingomyelin. Auch Glykolipide sind vorwiegend auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran zu finden. Dagegen befinden sich die meisten Lipide mit negativ geladener Kopfgruppe (bspw. Phosphatidylserin), sowie der größte Anteil an Phosphatidylethanolamin auf der intrazellulären Seite (Jamieson *et al.* 1977; Zachowski 1993).

Ein weiteres Beispiel ist die Plasmamembran von aktiv proliferierenden Zellen wie Stamm- und Krebszellen. Sie ist meist negativer geladen als die Membran von seneszenten Zellen. Dies liegt zum Teil an der Zunahme von negativ geladenen Oberflächenmolekülen (z.B. Heparansulfat), aber auch an einer veränderten Lipidkomposition der Membran (Utsugi *et al.* 1991; Dobrzyńska *et al.* 2005; Echard *et al.* 2014). Während die Außenseite der Plasmamembran normalerweise vorwiegend zwitterionische Lipide wie Sphingomyelin und Phosphatidylcholin beinhaltet, enthält sie bei sich teilenden Zellen einen erhöhten Anteil an Lipiden mit negativ geladener Kopfgruppe.

Des Weiteren unterscheiden sich die Lipidkompositionen von Membranen in ihrer Cholesterinkonzentration. Cholesterin kommt dabei ausschließlich in Membranen tierischer Zellen vor. Die jeweilige Cholesterinkonzentration variiert allerdings stark und kann bis zu 50 % ausmachen. Dagegen sind die Membranen von Pflanzen, niederen Eukaryoten und Bakterien cholesterinfrei (Jamieson *et al.* 1977; Sackmann 1995).

Auch innerhalb einer Zelle unterscheiden sich die Lipidkompositionen der verschiedenen Membranen (Plasmamembran und Membranen der Organellen). Hinsichtlich der Cholesterinkonzentration sind beispielsweise große Unterschiede festzustellen. Die höchste Konzentration herrscht in der Plasmamembran. In dieser befinden sich 40 bis 90 % des Cholesterins einer Zelle. Dagegen haben die Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien nur eine geringe, die Membran des Golgiapparats eine mittlere Cholesterinkonzentration (Jamieson *et al.* 1977; Yeagle 1985; Sackmann 1995; van Meer *et al.* 2008; van Meer *et al.* 2010).

3.7 Der Einfluss von Cholesterin auf die biophysikalische Eigenschaften von Membranen

Cholesterin beeinflusst die biophysikalischen Eigenschaften von Membranen auf unterschiedliche Art und Weise. Sein Einfluss beruht sowohl auf den Wechselwirkungen mit anderen Membranlipiden, als auch auf der Interaktion mit Membranproteinen und dem umgebenden wässrigen Milieu. Einen wesentlichen Anteil haben dabei die Wechselwirkungen zwischen Cholesterin und den Phospholipiden der Membran (Yeagle 1985; Ohvo-Rekilä *et al.* 2002).

Cholesterin ist ein polycyclischer Alkohol, gehört zur Gruppe der Steroide und ist ein relativ starres und planares Molekül. Es besteht aus vier Kohlenwasserstoffringen mit einer Hydroxygruppe am C3-Atom des ersten Rings und einer endständigen Kohlenwasserstoffkette (KW-Kette). Cholesterin ist daher vorwiegend hydrophob, besitzt aber durch seine Hydroxygruppe einen polaren Kopf. Es hat deshalb einen amphiphilen Charakter (Abb. 12B und C).

Phospholipide bestehen im Wesentlichen aus der über ein Phosphat verknüpften Kopfgruppe (bspw. Cholin) und den über ein Glycerin, beziehungsweise Sphingosin, gebundenen Kohlenwasserstoffketten. Die Kopfgruppe kann dabei geladen oder neutral sein. Auf Grund der Ladungsverteilung zwischen Kopf und Phosphat ist sie aber zumindest elektrisch immer als Dipol zu betrachten.

Im Gegensatz zu Cholesterin haben Phospholipide einen relativ großen polaren Teil. Dieser besteht aus Kopfgruppe und Phosphat, sowie bei Phosphoglyceriden aus den Carboxygruppen, beziehungsweise bei Sphingolipiden aus der Carboxy- und der Amidgruppe, über welche die KW-Ketten verknüpft sind. Den unpolaren Teil bilden jeweils die beiden Kohlenwasserstoffketten (Abb. 12A und C).

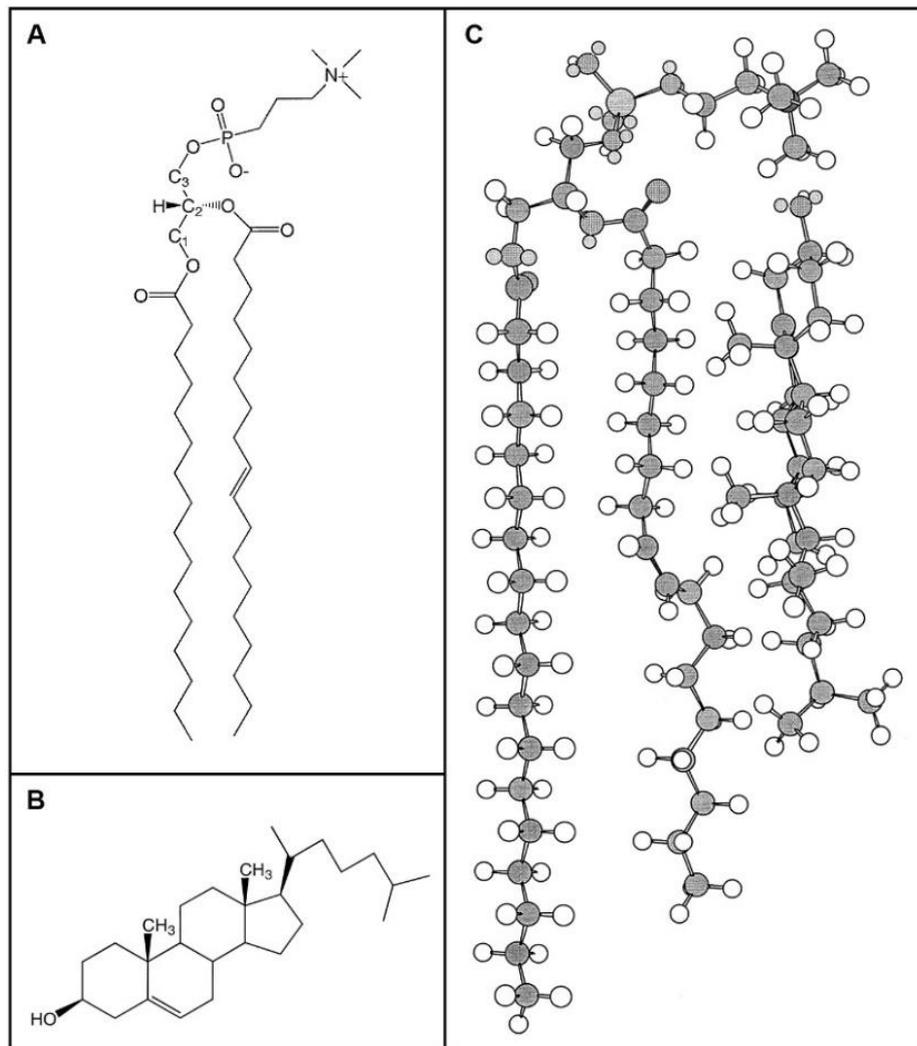


Abb. 12: Molekülstruktur von Cholesterin und Phosphatidylcholin. (A) 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (SOPC) **(B)** Cholesterin (5-cholesten-3 β -ol) **(C)** „ball and stick“-Repräsentation der beiden Moleküle (Ohvo-Rekilä *et al.* 2002).

Lagert sich Cholesterin in die Membran ein, so verändert es durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit den Phospholipiden die Eigenschaften der Membran. Einerseits spielen hierbei hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle. So kann Cholesterin über Van-der-Waals-Kräfte mit den KW-Ketten der Phospholipide interagieren. Auf Grund der starren und planaren Konformation von Cholesterin führt dies zu einer geringeren Wahrscheinlichkeit für eine *trans-gauche*-Isomerisation in den KW-Ketten. Die Folge sind eine verringerte Bewegungsfreiheit der KW-Ketten und eine dadurch insgesamt höhere Ordnung der Lipide innerhalb der Membran (Stockton *et al.* 1976; Yeagle 1985; Davies *et al.* 1990; Mouritsen *et al.* 1994; Ohvo-Rekilä *et al.* 2002). Dies hat zunächst eine geringere Bewegungsfreiheit der Lipide innerhalb der Membran zur Folge und führt deshalb zu weniger fluiden Membranen (Yeagle 1985; Needham *et al.* 1990).

Gleichzeitig nehmen die KW-Ketten der Phospholipide in der *trans*-Konformation weniger Raum ein. Die relative Fläche, welche ein Phospholipid in der Membran einnimmt, wird dadurch kleiner. Demnach sind Membranen, die Cholesterin beinhalten, dichter, beziehungsweise kondensierter (Smondyrev *et al.* 1999; Berkowitz 2009; Daly *et al.* 2011).

Wird die Ordnung der Phospholipide erhöht, so führt dies außerdem zu längeren KW-Ketten (weil *trans*-Konformation) und dadurch zu etwas dickeren Membranen (McIntosh 1978). Cholesterin entspricht in etwa der Länge einer KW-Kette aus 17 Kohlenstoffatomen. Bis zu dieser Kettengröße werden Membranen durch die Insertion von Cholesterin dicker.

Dagegen führt Cholesterin in Membranen, die Phospholipide mit KW-Ketten aus 18 und mehr Kohlenstoffatome enthalten, zu etwas dünneren Membranen. Bei dieser Länge ragen die Enden der KW-Ketten über das Cholesterinmolekül hinaus. Sie können sich daher relativ frei bewegen und über Konformationsänderungen den freien Raum ausfüllen. Dabei werden die KW-Ketten allerdings auch etwas kürzer (McIntosh 1978). In der Natur bestehen die KW-Ketten der meisten Phospholipide aus mindestens 18 Kohlenstoffatomen, weshalb Cholesterin dort vermutlich eher zu dünneren Membranen führt.

Des Weiteren wird durch Cholesterin die Permeabilität einer Membranen herabgesetzt (Yeagle 1985). Einerseits hat die Bewegungsfreiheit der KW-Ketten einen direkten Einfluss auf die Permeabilität einer Membran. Da die *trans-gauche*-Isomerisation der KW-Ketten Rotationsbewegungen verursacht, stört sie die Ordnung der KW-Ketten zueinander. Dadurch bilden sich innerhalb der Membran Phasengrenzen aus. Diese ermöglichen es Molekülen, etwas einfacher in die Membran einzudringen, beziehungsweise diese zu passieren. Da die Bewegungsfreiheit der KW-Ketten in cholesterinhaltigen Membranen herab gesetzt ist, sind diese weniger permeabel.

Andererseits beruht die herabgesetzte Permeabilität auf einer, im Kern der Membran größeren, Hydrophobizität. Cholesterin lagert sich zwischen den Phospholipiden der Membran ein und erhöht dadurch die Ordnung der Lipide. In der Folge ist die Dichte der Lipide im hydrophoben Bereich der Membran größer und somit die Hydrophobizität der Membran insgesamt erhöht. Außerdem wird der hydrophobe Bereich der Membran zusätzlich durch die Hydroxygruppe von Cholesterin abgeschirmt.

Neben den hydrophoben Wechselwirkungen treten aber auch polare Wechselwirkungen zwischen den Phospholipiden und Cholesterin auf. Diese beruhen unter anderem auf der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Hydroxygruppe von Cholesterin und den polaren Gruppen des Phospholipids. Dazu gehören die Carboxy- und Amidgruppen der KW-Ketten, sowie das Phosphat und die anderen polaren Teile der Kopfgruppe (Boggs 1987).

Außerdem kann durch die Insertion von Cholesterin der Abstand zwischen den Kopfgruppen der Phospholipide vergrößert werden. Dadurch werden die Wechselwirkungen zueinander, wie beispielsweise Dipol-Dipol Interaktionen, reduziert. Außerdem ändern sich dadurch deren Bewegungsfreiheit und Orientierung in der Membran (zusammengefasst in Yeagle *et al.* 1977).

Dies beeinflusst wiederum die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen, sowie deren Interaktion mit dem umgebendem Medium und den sich darin befindenden Ionen und Molekülen. So führt die Insertion von Cholesterin beispielsweise dazu, dass Wassermoleküle tiefer in die Membran eindringen können (Jendrasiak *et al.* 1974). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch Cholesterin die Bindung von Natriumionen an die Kopfgruppen der Phospholipide herabgesetzt werden kann. Die Folge ist eine geringere Oberflächenladung der Membran (Magarkar *et al.* 2014).

Die Affinität der unterschiedlichen Phospholipide zu Cholesterin ist verschieden. Die höchste Affinität besitzen Sphingomyeline. Dagegen ist die zu Phosphatidylcholin deutlich geringer und die zu Phosphatidylethanolamin am geringsten (van Dijck 1979; Needham *et al.* 1990). Neben den Kopfgruppen hat die Länge und Sättigung der Kohlenwasserstoffketten Einfluss auf die Affinität der Phospholipide zu Cholesterin. So führen die Doppelbindungen in den KW-Ketten ungesättigter Lipide zu Knicken. Diese verringern die räumliche Nähe der KW-Ketten zu Cholesterin und führen dadurch zu schwächeren hydrophoben Wechselwirkungen (McMullen *et al.* 1993). Die Affinität der Phospholipide zu Cholesterin ist daher umso größer, je höher die Sättigung der KW-Ketten ist (McIntosh 1978; Yeagle 1985; Needham *et al.* 1990; Smaby *et al.* 1994; Silvius 2003).

Bei langen KW-Ketten wird die Affinität zu Cholesterin zudem durch die Bereiche, welche nicht in direktem Kontakt zu Cholesterin stehen, beeinflusst. Diese können die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Cholesterin und Lipid unter anderem durch unterschiedliche Konformationen am Ende der KW-Ketten beeinflussen.

Eine Folge der unterschiedlich starken Affinität von Cholesterin ist die Clusterung von, beziehungsweise Raftbildung aus, bestimmten Lipiden innerhalb der Membran. So führt Cholesterin zum Beispiel in Membranen, die aus Sphingomyelin und Phosphatidylcholin bestehen, zur Bildung von Domänen, welche vorwiegend Sphingomyelin und Cholesterin enthalten. Dagegen ist in anderen Bereichen der Anteil an Phosphatidylcholin deutlich größer und die Cholesterinkonzentration vergleichsweise gering (Snyder *et al.* 1980; Mattjus *et al.* 1996; Simons *et al.* 1997; Brown *et al.* 2000; Crane *et al.* 2004; Marsh 2009; Heberle *et al.* 2011; Ando *et al.* 2015).

3.8 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Einzelkomponenten des Gifts der südamerikanischen Klapperschlange *Crotalus durissus terrificus* zu untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden hierfür zunächst in der Arbeitsgruppe etabliert und im Anschluss für die Isolierung und Charakterisierung einzelner Komponenten verwendet.

Zunächst wurden einzelne Bestandteile des Gifts mit Hilfe einer HPLC-Apparatur isoliert. Im Weiteren wurden die isolierten Komponenten auf Größe und Reinheit überprüft und durch massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert. Anschließend wurden die membran- und zellbeeinflussenden Eigenschaften von ausgewählten Komponenten charakterisiert. Der Fokus lag dabei auf der Wirkungsweise von Crotamin. Hierbei wurde der Einfluss verschiedener Lipidkompositionen auf die membranbeeinflussenden Eigenschaften von Crotamin anhand artifizieller Membranen untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Einfluss der Cholesterinkonzentration von Membranen. Die Wirkungsweise von Crotamin wurde dazu mit Hilfe einer Filmwaage an Monolayern, sowie mittels fluoreszenzoptischer Messungen an künstlichen Vesikeln, beobachtet. Zudem wurde die Wirkung von Crotamin an lebenden Zellen untersucht.

4 MATERIAL

4.1 Allgemeine Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster Reinheit („*pro analysi*“) und wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen bei München), Biochrom (Berlin) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

4.2 Substanzen, Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterial

Name	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Puffer A für RP-HPLC	0,1 % TFA in dH ₂ O
Puffer B für RP-HPLC	0,1 % TFA in Acetonitril
DPBS bzw. DPBS modifiziert (ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gradienten-Gele: „Mini-PROTEAN® Tris-Tricine“ - Fertiggele (10 – 20 %, 30 µl)	Bio-Rad, München
Tris-Tricine SDS-Puffer (10x Konzentrat)	Bio-Rad, München
Probenpuffer: „Tricine Sample Buffer“	Bio-Rad, München
Proteinstandard: „Prestained Proteinmarker Precision Plus Protein™“	Bio-Rad, München
Roti®-Quant (5x Konzentrat)	Carl Roth, Karlsruhe
DOPC	Avanti Polar Lipids, Alabaster (AL, USA)
Asolektin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Cholesterin (Filmwaage)	Avanti Polar Lipids
Cholesterin (Vesikel)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DPH	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fura 2-AM	Sigma Aldrich, Taufkirchen
96-Wellplatten für Vesikel: Microfluor® 1Black – Flat Bottom Microtiter® Plates	Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA, USA)
96-Wellplatten für Zellkultur: SensoPlate™ Plus	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen: TC-Flasche T25 (Stand, Bel. Ka.)	Sarstedt, Nümbrecht
Gift der <i>Crotalus durissus terrificus</i>	über Frau Prof. Vera Maura Fernandes de Lima, von einer Schlangenfarm in Brasilien

4.3 Zelllinie und Medien der Zellkultur

Medium	Zusammensetzung / Bezugsquelle
Krebs-Ringer-Hepes-Puffer (KRH)	5 mM KCl 130 mM NaCl 2 mM CaCl ₂ 1,2 mM MgSO ₄ 1,2 mM KH ₂ PO ₄ 6 mM D-Glukose-Monohydrat 25 mM HEPES → pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)
DMEM/Ham's F12 (Flüssigmedium)	Biochrom, Berlin

Penicillin/Streptomycin (10 ⁴ U/μl / 10 ⁴ μg/μl)	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

Zelllinie	Zelltyp	Bezugsquelle
SH-SY5Y (ACC-209)	Neuroblastom	DSMZ, Braunschweig

4.4 Geräte

Allgemeine Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Varioklav 25T	HP Medizintechnik, Oberschleißheim
Mono-Destillierapparat	2004	GFL, Burgwedel
Pipettensatz	Research und Reference	Eppendorf, Hamburg
Mehrfachpipette	Automatische 8-Kanal 50-1200μl	Sartorius, Göttingen
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen aller Anwendungsgebiete	Z 233 M-2	Hermle, Wehingen
	Minispin	Eppendorf, Hamburg
	Laborfuge Ae	Heraeus, Hanau
	Megafuge 1.0 R	
	Megafuge 3 S-R	
Heizblock für Eppendorfgefäße	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpumpe (für Rotovac bzw. SpeedVac) mit Steuerung	Chemie-Membranpumpe MD 4C	Vacuubrand, Wertheim
	CVC 2	
Reagenzglasschüttler	Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach
Wipptisch	Duomax 1030	Schwabach
Feinwaagen	AG245	Mettler Toledo, Giesen
	AT201	
Plattenleser	PHERASTAR FS	BMG Labtech, Ortenberg

HPLC

Gerätetyp	Produktname	Hersteller
HPLC	Äcta Purifier 10	GE Healthcare
	+ Frac 950	
RP-Säule	Protein & Peptide C18 (Vydac™218TP 5415)	Grace™, Columbia (MD, USA)
SpeedVac	SpeedVac concentrator SVC 100 H	Savant, New York (USA)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gerät	Modell	Hersteller
Laufkammer	Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad, München
Netzteil	PowerSupply 100/500 PowerPac™ HC	Bio-Rad, München
Heizblock für Eppendorfgefäße	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Dokumentationssystem	D90	Nikon, Düsseldorf

Filmwaage

Gerätetyp	Produktname	Hersteller
Filmwaage	KN-3001	Biolin Scientific, Espoo (FIN)
Luftdruck-gedämpfter, schwingungsfreier Tisch	7900085 000	Integrated Dynamics Engineering, Raunheim
Wasserperfusion zur Temperierung	FP50 HC	Julabo, Seelbach
Pumpe	-	Eigenanfertigung

Vesikelherstellung

Gerät	Modell	Hersteller
Temperierbares Ultraschallbad	Transsonic 660H	Elma, Singen
Rotovac	Laborota 4001-efficient	Heidolph Instruments, Schwabach
DLS	W130i	Avid Nano, High Wycombe (GBR)
Präzisionsküvette	105.252-QS	Hellma, Müllheim

Zellkultur

Gerätetyp	Produktname	Hersteller
Sterilbank	HERAguard - HPH 12	Thermo Fischer Scientific, Waltham (MA, USA)
Wasserbad	1002	GFL, Burgwedel
Brutschränke	verschiedene Modelle	Binder, Tuttlingen
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena

4.5 Software

Anwendungsgebiet	Name der Software	Hersteller
Textbearbeitung	Office 2013	Microsoft Corporation
Literaturverwaltung	Citavi 5	Swiss Academic Software
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Incorporated
Proteinsequenzen	Geneious R6	Biomatters
Filmwaage	KSV NIMA LB	Biolin Scientific
DLS	i-Size	Avid Nano
Plattenleser	PHERAstar	BMG Labtech
	MARS PHERAstar Data Analysis	BMG Labtech
HPLC	UNICORN 4.12	GE Healthcare
Darstellung und Auswertung der Messdaten	Exel 2013	Microsoft Corporation
	Prism 5	GraphPad Software
	Origin 9	OriginLab Corporation

4.6 Datenbanken

Name der Datenbank	Adresse
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
ScienceDirect	http://www.sciencedirect.com/
UniProtKB ("universal protein knowledgebase")	http://www.uniprot.org/

5 METHODEN

5.1 Gewinnung der Einzelkomponenten

Für die Isolierung der einzelnen Bestandteile aus dem Gesamtgift von *Crotalus durissus terrificus* wurde das kristallisierte Gift zunächst in Phosphatpuffer (DPBS-) gelöst und anschließend mit Hilfe der „Reversed-Phase-High-Pressure-Liquid-Chromatographie“ (RP-HPLC) in seine Einzelkomponenten fraktioniert.

Bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) handelt es sich um eine Technik der Säulenchromatographie, bei welcher ein Substanzgemisch unter Druck über eine Säule gespült wird. Dabei werden die Komponenten in Abhängigkeit vom Säulenmaterial, sowie dem verwendeten Lösungsmittel, aufgetrennt. Durch die aufeinander folgende Verwendung mehrere Verfahren mit unterschiedlichen Trennkriterien (bspw. zuerst nach Größe mit Hilfe der Gelfiltration und im Anschluss nach Hydrophobizität mittels RP-HPLC) kann die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, die Einzelkomponenten sauber zu isolieren.

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, die untersuchten Einzelkomponenten ausschließlich mittels RP-HPLC in ausreichender Reinheit zu isolieren. Bei diesem Verfahren erfolgte die Trennung der Moleküle in Abhängigkeit der jeweiligen Hydrophobizität und der daraus resultierenden Bindungsstärke zum Säulenmaterial. Das zu trennende Gemisch wurde zunächst mit Hilfe eines hydrophilen Lösungsmittels (Puffer A) auf die Säule gewaschen und an diese gebunden. Im Anschluss wurde der Anteil des hydrophoben Lösungsmittels (Puffer B) langsam erhöht. Je nach Bindungsstärke lösten sich dabei die einzelnen Bestandteile nacheinander wieder von der Säule.

Im verwendeten Trennverfahren wurde das in DPBS- gelöste Gesamtgift zunächst in Puffer A (0,1 % TFA in dH₂O) auf eine C18-Säule gewaschen. Im Anschluss wurde ein Lösungsmittel-Gradient etabliert, bei welchem der Anteil von Puffer B (0,1 % TFA in Acetonitril) schrittweise von 2 auf 50 % erhöht wurde. Innerhalb dieses Gradienten wurde das Mischungsverhältnis von Puffer A zu Puffer B, sowie dessen jeweilige Verwendungsdauer, so angepasst, dass eine möglichst gute Trennung der einzelnen Komponenten möglich wurde. Die Trennung der Komponenten wurde mit Hilfe des integrierten UV-Detektors bei 280 nm beobachtet.

Durch entsprechende Programmierung der Fraktionierung war es möglich, die einzelnen Komponenten getrennt zu sammeln (Abb. 13). Zusätzlich ermöglichte es die Verwendung der RP-HPLC, die einzelnen Substanzen wieder vom Salz des zum Lösen des Gifts verwendeten Phosphatpuffers zu befreien.

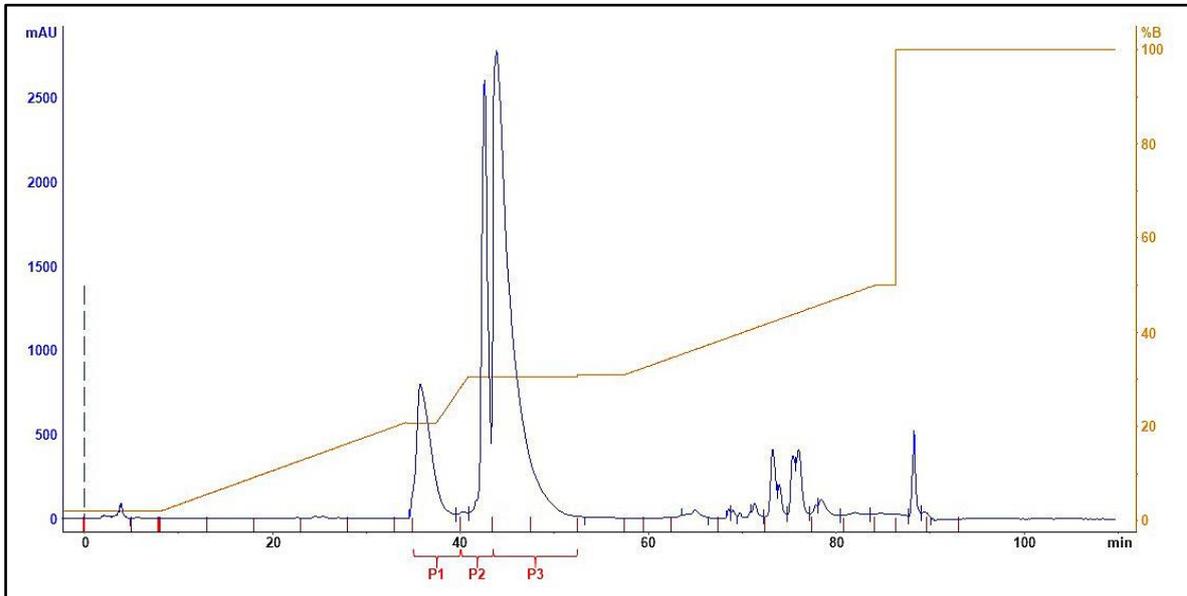


Abb. 13: Chromatogramm eines RP-HPLC-Laufs. Die Absorption des UV-Signals bei 280 nm ist in Milliabsorptionseinheiten (mAU) angegeben und in Blau dargestellt. Der Lösungsmittelgradient ist in Orange (in % Puffer B), der Zeitpunkt der Probeninjektion in Schwarz und der Wechsel der Fraktionsgefäße in Rot gegen die Zeit (in Minuten) aufgetragen. Für diese Arbeit wurden die Fraktionen A10 (Peak 1), A11 (Peak 2) und A12-C12 (Peak 3) gesammelt.

Im Anschluss wurden die einzelnen Fraktionen mittels SpeedVac konzentriert und von dem im Lösungsmittel enthaltenen Acetonitril befreit. Hierzu wurden die Proben unter Vakuum zentrifugiert, wobei zunächst das flüchtige Acetonitril und anschließend Wasser verdampfte. Letztlich erhielt man durch diese Vorgehensweise Fraktionen, in welchen die isolierten Komponenten hoch konzentriert in Wasser vorlagen.

5.2 Quantifizierung der Fraktionen

5.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration der mittels HPLC gewonnen und unter Verwendung des SpeedVacs konzentrierten Fraktionen wurde mit Hilfe des Bradford-Test bestimmt. Dieses Verfahren eignet sich zur quantitativen Bestimmung von Konzentration im Bereich von 0.05-0.5 $\mu\text{g/ml}$. Es basiert auf der Interaktion des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) von Peptiden und Proteinen. CBBG komplexiert mit deren Seitenketten und wird dadurch in seiner blauen Form stabilisiert.

Diese Komplexbildung ändert das Absorptionsspektrum des Farbstoffes und verschiebt dessen Maximum von 470 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption einer Probe bei 595 nm kann daher als Maß für deren Proteinkonzentration verwendet werden. Da die Farbreaktion jedoch stark von der Aminosäurekomposition der jeweiligen Proteine abhängt, ist zur Kalibrierung der Messung das Erstellen einer Eichkurve notwendig.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Erstellen der Eichkurve eine Verdünnungsreihe von bovinem Kälberserum (BSA) mit bekannter Proteinkonzentration (10 mg/ml) verwendet. Als Färbelösung diente Roti-Quant. Mit dieser wurden die Proben jeweils 1:5 gemischt und vor der Messung für fünf Minuten inkubiert.

5.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Isolierung der Einzelkomponenten wurde zunächst mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft. Hierzu wurden die jeweiligen Fraktionen auf ihre Reinheit, sowie die ungefähre Größe der enthaltenen Komponenten untersucht und mit dem Gesamtgift verglichen.

Bei der SDS-PAGE handelt sich um eine Methode zur quantitativen Untersuchung von Proteinen und Peptiden. Die Moleküle werden hierbei denaturiert, ihre Eigenladung mit Hilfe von SDS maskiert und innerhalb eines elektrischen Felds nach ihrer Größe aufgetrennt. Die gleichzeitige Verwendung eines Gemisches von Referenzsubstanzen mit bekannter Größe als Marker ermöglicht im Anschluss eine ungefähre Größenbestimmung der einzelnen Bestandteile.

Die Trennung erfolgte in Tris-Tricine-Fertiggelen. Diese werden für eine bessere Trennschärfe im niedermolekularen Bereich mit einem Gradient von 10-20 % Polyacrylamid gefertigt. Die zu untersuchenden Proben wurden zunächst 1:2 mit Probenpuffer verdünnt und dann bei 95 °C für zwei Minute denaturiert. Während der Durchführung der Elektrophorese wurde zunächst, bis zum Erreichen des Trenngels, eine Spannung von 30 V angelegt. Im Anschluss wurde diese auf 80 V erhöht und bis zum Ende des Laufs aufrechterhalten.

5.2.3 Silberfärbung

Nach erfolgter Trennung der Peptide wurden diese im SDS-Gel mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (nach Simpson 2009). Hierzu wurden die Gele 20 Minuten in 50 % Methanol (v/v) mit 5 % Eisessig (v/v) fixiert und anschließend für je 10 Minuten in 50 % Methanol (v/v) und destilliertem Wasser (dH₂O) gewaschen. Im Anschluss wurden die Gele

für eine Minute in 0,1 % Natriumthiosulfat (w/v) sensibilisiert und erneute zweimal in dH₂O gewaschen (jeweils 1 min).

Für die eigentliche Färbung wurde eine 0,1 prozentige Silbernitrat-Lösung (w/v) verwendet. Die Färbelösung wurde zunächst auf Eis vorgekühlt und die Färbung bei 4 °C im Kühlschrank durchgeführt. Anschließend wurden die Gele zweimal in dH₂O (1 min) gewaschen und bis zur gewünschten Färbeintensität entwickelt. Für diesen Schritt wurde eine Lösung mit 2 % Natriumcarbonat (w/v) und 0,04 % Formaldehyd (v/v) verwendet.

Formaldehyd ist ein starkes Reduktionsmittel und diente der Reduktion der, den Peptiden angelagerten, Silberionen (Ag⁺) zu elementarem Silber (Ag⁰). Dadurch wurden die Peptide schwarz gefärbt und somit sichtbar gemacht. Zuletzt wurde die Reaktion mit Hilfe einer starken pH-Wertverschiebung durch die Verwendung von fünfprozentigem Eisessig (v/v) gestoppt.

Im Anschluss konnten die Gele fotografiert und in einprozentiger Essigsäure gelagert werden.

5.2.4 Massenspektrometrie (MS)

Die massenspektrometrischen Analysen wurden bei der „Core Facility Hohenheim, Modul 1: Mass Spectrometry“ in Auftrag gegeben. Bei diesen Untersuchungen wurde zunächst die Reinheit der HPLC-Fractionen überprüft und das Molekulargewicht der enthaltenen Komponenten bestimmt. Im Weiteren wurden die enthaltenen Komponenten, mittels unterschiedlicher Vorgehensweisen, anhand ihrer Sequenz identifiziert.

MALDI-TOF-MS (/MS)

Für die Überprüfung der Reinheit der Fractionen und zur ungefähren Bestimmung der Masse der enthaltenen Komponenten wurden MALDI-TOF-MS Experimente durchgeführt (Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation–Flugzeit–Massenspektrometer). Die Proben wurden zunächst 1:1 mit der Matrixlösung gemischt (20 mg/ml Gentisinsäure in 50 % Acetonitril mit 0.1 % TFA, v/v). Anschließend wurden sie direkt auf einen Stahlträger aufgetragen. Die Co-Kristallisation erfolgte mittels „Dried-Droplet“-Präparation.

Die Spektren wurden mit Hilfe eines „AutoflexIII“-MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics aufgenommen. Das Geräte wurde dazu im “positive ion mode” betrieben und die Kalibrierung erfolgte extern unter Verwendung des Protein-, beziehungsweise Peptidkalibrierungsstandard der Firma Bruker Daltonics. Die aus den

Untersuchungen gewonnen Daten wurden anschließend mit Hilfe der Programme „Flex Analysis 3.0“ und „Bio-Tools 3.0“ der Firma Bruker Daltonics analysiert.

Bestimmung der Masse mittels MALDI-TOF-MS

Zur Überprüfung der Fraktionen wurden Massenspektren aufgenommen und das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z , im Weiteren als Masse bezeichnet) der enthaltenen Komponenten bestimmt. Das Massenspektrometer wurde dazu im linearen Modus genutzt. Der Laser wurde mit einer Spannung von 20 kV und 1000 Pulsen pro Probe betrieben. Dies gewährleistet ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis.

N-terminale Leitersequenzierung MALDI-TOF-MS/MS

Die Sequenzierung der in den Fraktionen enthaltenen Komponenten erfolgte mittels ISD-Spektren („in source decay“) im Reflektor-Modus. Mit deren Hilfe konnte die Sequenz von Peptidfragmenten ermittelt werden, die bei der Ionisation der Probe entstanden. Um ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurde der Laser bei 20 kV und 3000 Laserpulsen pro Probe betrieben.

Massenbestimmung mittels Nano-HPLC-ESI-MS

Für eine genauere Massenbestimmung der enthaltenen Komponenten wurden Experimente an einem Nano-HPLC-Elektrospray Ionisation (ESI)-Massenspektrometer durchgeführt. Hierzu wurde eine „1290 Infinity“-UHPLC-Anlage (Fa. Agilent) und ein daran gekoppeltes „Q-Exactive Plus“-Massenspektrometer (Fa. Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Die Proben wurden zunächst 1:25 mit 0,1 % Ameisensäure (FA) verdünnt. Anschließend wurden jeweils 10 μl der verdünnten Probe in die UHPLC-Anlage injiziert. Die Trennung erfolgte mittels Fließinjektionsanalyse in 50 % Acetonitril mit 0.1% FA und 50 % Wasser mit 0.1 % FA bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Im Massenspektrometer wurde die Sprühkapillare mit 4.2 kV bei 250 °C betrieben. Die Massenspektren wurden im positiven Ionisierungsmodus für einen Massenbereich von 400 bis 2000 Da (m/z) bei einer Auflösung von 140.000 aufgenommen. Die Kalibrierung erfolgte extern mit Hilfe der „Pierce™ LTQ Velos ESI positive Ion“-Kalibrierlösung (Fa. Thermo Fisher Scientific). Für die Steuerung der Geräte bzw. die Analyse der Daten wurden die Programme „Xcalibur 4.0“ bzw. „Extract“ (Fa. Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Sequenzierung mittels Nano-HPLC-ESI-MS/MS

In-Lösung-Trypsinverdau und Probenvorbereitung

Für die Sequenzierung mittels Nano-LC-ESI-MS/MS wurden zunächst die in den Fraktionen enthaltenen Komponenten mit Hilfe von Trypsin verdaut. Anschließend wurden die entstanden Peptidfragmente mittels „Stagetip-Reinigung“ von Salzen und Pufferkomponenten befreit (nach Rappsilber *et al.*), und einer SpeedVac getrocknet. Zuletzt wurde das Probenmaterial in 25 µl 0,1 % TFA gelöst und für die massenspektrometrische Untersuchung verwendet.

Sequenzierung

Die Sequenz der mittels Trypsinverdau gewonnen Peptidfragmente wurden mit Hilfe eines Nano-LC-ESI-MS/MS Experiments bestimmt. Hierzu wurde ein „EASY-nLC 1200“ System genutzt, welches über eine „EASY-Spray“-Ionenquelle an ein „LTQ-Orbitrap XL“-Hybridmassenspektrometer gekoppelt wurde (Fa. Thermo Fisher Scientific).

Die Proben wurden hierzu direkt auf die verwendete „EASY-Spray“-Säule injiziert (PepMap RSLC C18, 2 µm, 100 Å, 50 µm x 500 mm Säule, Fa. Thermo Fisher Scientific). Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 30-minütigen Gradienten von 5 bis 55 % Puffer B bei 50 °C und 250 nl/min Flussrate (Puffer A: 0,1 % FA, Puffer B: 0,1 % TFA, 80 % Acetonitril in dH₂O).

Hierbei wurden Spektren in einem Bereich von 250 bis 1800 Da (m/z) mit einer maximalen Auflösung von 60.000 (bei m/z = 400) aufgenommen. Die MS/MS-Spektren wurden für die sieben intensivsten Peptidfragmente in der linearen Ionenfalle akquiriert. Für die Steuerung des Massenspektrometers wurde das Programm „XCalibur 2.1“ (Fa. Thermo Fisher Scientific) verwendet und die Kalibrierung erfolgte mittels interner Kalibrierung unter Verwendung sogenannter „lock-mass“ Ionen nach Olsen *et al.*.

Für die Identifikation der Peptide wurde das Programm „Mascot 2.6“ (Fa. Matrix Science) verwendet. Dabei wurden die aufgenommen Spektren mit den für die Giftkomponenten von *Crotalus durissus terrificus* publizierten Sequenzen verglichen. Die hierfür verwendeten Suchparameter waren wie folgt:

- Trypsin als Enzym, inklusive drei erlaubter Fehlschnittstellen, sowie einer Massentoleranz von 5 ppm für die MS-Spektren, beziehungsweise von 0,6 Da für die MS/MS-Spektren
- Carbamidomethylierung von Cystein wurde als fixe Modifikation vorgegeben
- Oxidation von Methionin wurde als variable Modifikation erlaubt

5.3 Künstliche Membranen

Für das Verständnis der Interaktion einer Substanz mit biologischen Membranen stellen künstlich hergestellte Lipidschichten ein gutes Modell zur Untersuchung des reinen Einflusses auf die Membranen von Zellen und deren Organellen dar. Sie ermöglichen eine Betrachtung, die losgelöst von den in biologischen Membranen enthaltenen Proteinen, sowie dem mit der Zellmembran assoziiertem Zytoskelett ist. Außerdem kann hierbei die Lipid-Komposition frei definiert und reproduzierbar hergestellt werden. Des Weiteren können das umgebende Milieu (bspw. die Salzkonzentration), sowie physikalische Größen wie Membrandruck und Temperatur, freier gewählt werden.

Zwei der gängigsten Modellsysteme sind die Untersuchung von „Lipidmonolayer“ mit Hilfe einer Filmwaage, sowie die Herstellung und beispielsweise fluoreszenzoptische Untersuchung von Vesikeln.

5.3.1 Untersuchung des Integrationsverhaltens an Lipidmonolayern

Auf Grund der amphiphilen Eigenschaft von Lipiden ist es möglich, in der Grenzfläche von wässriger Lösung und Luft einschichtige Monolayer herzustellen. Diese stellen das einfachste Modellsystem einer biologischen Membran dar. Neben der Untersuchung der (bio-)physikalischen Eigenschaften des Monolayers ist es in diesem Modell auch möglich, den Einbau von kleinen Molekülen und Peptiden zu beobachten. Hierbei können die Einbaugeschwindigkeit und der von den Molekülen benötigte Platz, sowie die Abhängigkeit des Einbaus vom lateralen Druck und der Lipid- und Lösungsmittelkomposition untersucht werden.

Lipidmonolayern können unter anderem mit Hilfe einer Filmwaage untersucht werden. Bei diesem Messverfahren werden Monolayer anhand der Änderung des vorherrschenden lateralen Drucks beobachtet. Die wesentlichen Funktionselemente einer Filmwaage sind ein Teflon-Trog, zwei darauf aufliegende und bewegliche Barrieren, sowie ein, an einem Kraftmesser befestigtes, hydrophiles Plättchen aus Filterpapier oder Platin. Der Trog wird mit einer wässrigen Lösung befüllt (Subphase) und die für das Monolayer zur Verfügung stehende Fläche durch Barrieren begrenzt (Abb. 14).

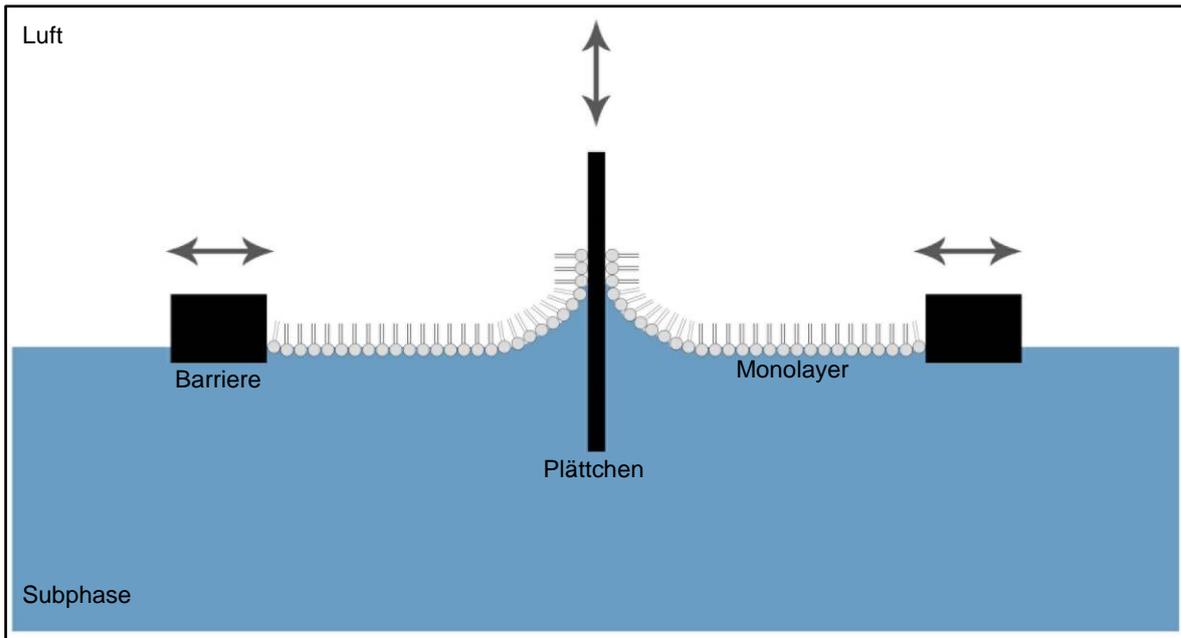


Abb. 14: Schematische Darstellung einer Filmwaage. An der Grenzfläche zwischen Subphase und Luft ordnen sich Lipide zu einem Monolayer an. Die dem Monolayer zur Verfügung stehende Fläche wird durch bewegliche Barrieren begrenzt und der laterale Druck in Form der auf ein Plättchen wirkenden Zugkraft ermittelt.

Vor der Herstellung eines Monolayers wird zunächst das Plättchen in die Subphase getaucht. Im Anschluss wird das, in einem flüchtigen Lösungsmittel gelöste, Lipid tropfenweise zwischen den Barrieren auf die Subphase gegeben. Nach dem Auftropfen verdampft das Lösungsmittel und die Lipide verteilen sich gleichmäßig in der Grenzfläche von Subphase und Luft. Bei diesem als Spreiten bezeichneten Vorgang bildet sich das Monolayer.

Für diesen Versuchsaufbau sind die folgenden Eigenschaften bezüglich der Subphase, dem hydrophilen Plättchen und der Moleküle des Monolayers festzuhalten. Prinzipiell werden hydrophile Materialien - hier das Plättchen - entsprechend der vorherrschenden Oberflächenspannung in eine wässrige Lösung gezogen. Die dabei auf das Material wirkende Zugkraft ist proportional zur Oberflächenspannung und für reines Wasser maximal.

Werden nun Moleküle, wie beispielsweise Lipide, auf die Oberfläche gegeben, senkt dies die Oberflächenspannung und die Zugkraft auf das Plättchen wird geringer. Da die Oberflächenspannung wiederum umgekehrt proportional zum lateralen Druck des Monolayers ist, ergibt sich die Möglichkeit, anhand der Zugkraft auf das Plättchen den jeweiligen lateralen Druck zu bestimmen.

Möchte man nun mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus die Eigenschaften eines Monolayers untersuchen, werden in der Regel zunächst sogenannte Druck-Flächen-Diagramme erstellt. Die so erstellten Kurven werden Isothermen genannt. Die Nomenklatur bezieht sich auf die Eigenschaft von Lipidmonolayern, sich bei Flächenänderungen wie zweidimensionale thermodynamische Systeme zu verhalten. Sie durchlaufen, je nach zur Verfügung stehender Fläche, die Zustandsformen fest, flüssig-kondensiert, flüssig-expandiert und flüssig-gasförmig (Abb. 15). Kommt es zu einem Phasenübergang, so ist dies daran zu erkennen, dass trotz Änderung der Fläche kurzzeitig keine Druckänderung zu beobachten ist.

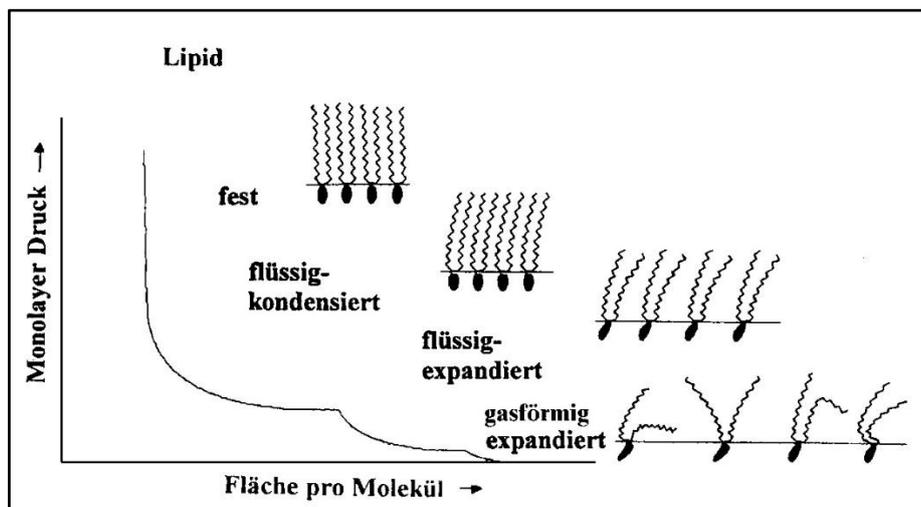


Abb. 15: Schematisiertes Druck-Flächen-Diagramm eines Lipidmonolayers. Verringert man die zur Verfügung stehende Fläche bei isothermen Bedingungen, so erhöht dies den lateralen Druck im Monolayer, wobei die Ordnung der Lipide zunimmt. Hierbei durchläuft der Monolayer die im Text beschriebenen Phasenübergänge (Hanke *et al.* 1997).

Neben der isothermen Beobachtung von Monolayern gibt es in diesem Versuchsaufbau zwei weitere Messmethoden. Sie eignen sich gut zur Untersuchung des Einbauverhaltens einer Substanz. Einerseits kann bei einem konstanten lateralen Druck (isobar) die Änderung der Fläche beobachtet werden. Hierzu werden die Barrierenpositionen während der Messung kontinuierlich angepasst. Alternativ kann aber auch die Änderung des lateralen Drucks bei konstanter Fläche (isochor) gemessen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die isochore Variante des Messens gewählt. Somit konnte das Einbauverhalten von Substanzen in Form der lateralen Druckänderung in zeitlicher Abhängigkeit bestimmt werden.

Für die Monolayermessungen wurde eine Filmwaage der Firma KSV NIMA verwendet (Abb. 16). Die Grundelemente waren ein mittels Wasserperfusion temperierbarer Teflon-Trog, zwei synchron ansteuerbare Delrin-Barrieren sowie ein Kraftmesser, an welchem das in dieser Arbeit verwendete Platinplättchen befestigt wurde.

Der gesamte Aufbau wurde auf einem Druckluft-gedämpften, schwingungsfreien Tisch installiert und so gegen Vibrationen geschützt. Zusätzlich wurde der gesamte Versuchsstand durch einen kastenförmigen Metallaufbau von Luftströmungen abgeschirmt. Zur Steuerung und Messdatenerfassung wurde die zugehörige Software KSV NIMA LB genutzt.

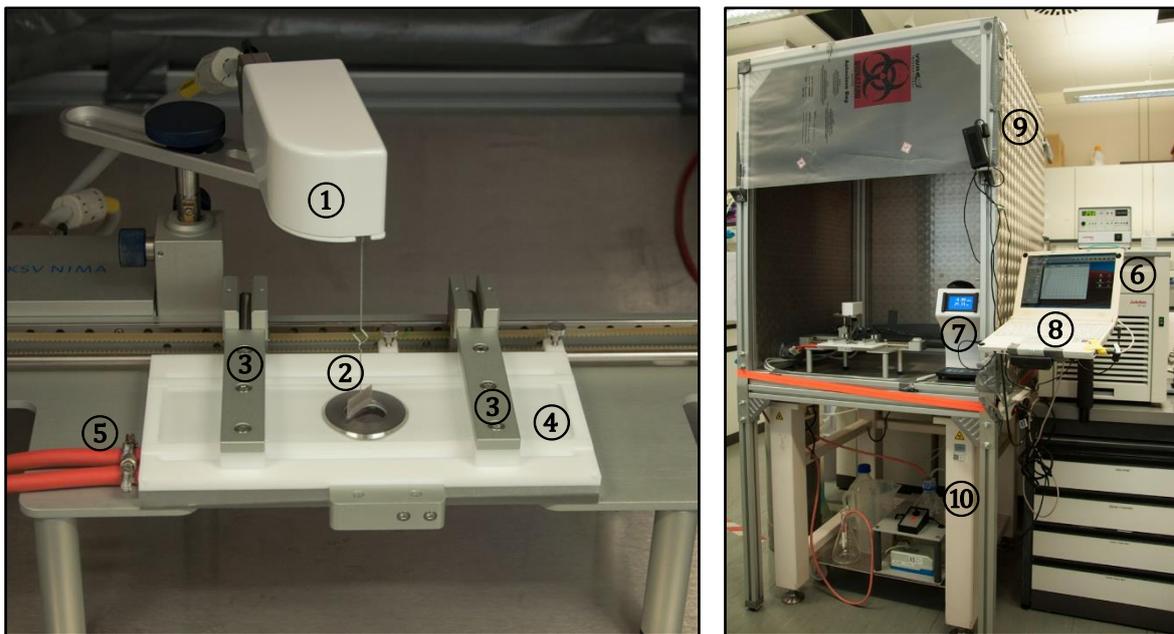


Abb. 16: Versuchsaufbau der verwendeten Filmwaage. links: ① Kraftmesser, ② Platinplättchen, ③ bewegliche Delrin-Barrieren, ④ mit Subphase gefüllter Teflontrog, ⑤ Anschluss an Wasserperfusion; rechts: ⑥ Wasserperfusion, ⑦ manuelle Steuerung, ⑧ Laptop mit Steuersoftware, ⑨ kastenförmiger Aufbau, ⑩ druckluftgedämpfter schwingungsfreier Tisch.

Für die Herstellung der Monolayer wurden zunächst die benötigten Lipidlösungen hergestellt ($0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ in Chloroform). Als Lipid wurden Asolektin, ein Lipidextrakt aus der Sojabohne, sowie Cholesterin verwendet. Diese wurden in Chloroform gelöst und anschließend im gewünschten Verhältnissen gemischt (0 %, 5 % und 10 % Cholesterin). Als Subphase diente der Phosphatpuffer DPBS mit (+), beziehungsweise ohne (-), bivalente Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}). Zur Durchführung einer Messung wurde dann stets wie folgt verfahren (Abb. 17):

Zunächst wurden 50 μl Lipidgemisch (10 μg Lipid) mit einer Hamilton-Spritze in kleinen Tropfen auf die Oberfläche der Subphase gegeben. Um sicherzustellen, dass das Lösungsmittel vollständig verdunstet und der Spreitungsprozess abgeschlossen ist, begann das Messprotokoll mit einer 15-minütigen Pause ①.

Im Anschluss wurde die Fläche zwischen den Barrieren bis zum Erreichen eines lateralen Drucks von 10 mN/m angepasst ②. Darauf folgte eine weitere einstündige Pause, in der die Position der Barrieren nicht verändert wurde. Den Lipidmolekülen im Monolayer wurde dadurch ausreichend Zeit gegeben, sich unter den neuen Druckverhältnissen auszurichten. Da der laterale Druck in dieser Zeit wieder absank ③, wurde anschließend die Barrierenposition erneut bis zum Erreichen von 10,3 mN/m angepasst ④.

Um letztlich für die Messungen einen Monolayer zur Verfügung zu haben, der möglichst gut an die aktuelle Fläche angepasst ist, wurde dieser Druck für ca. 15 Minuten durch stetige Anpassung der Fläche konstant gehalten ⑤. Grund für den etwas höheren Druck - als für die eigentliche Messung gewünscht - war die im Experiment nicht ganz vermeidbare Drift (Druckverlust). Dieser beruht auf dem Verlust von Lipiden im Monolayer. Die Lipide können dabei unter den Barrieren hindurch diffundieren oder in die Subphase verloren gehen. Des Weiteren kann das Verdunsten der Subphase zu einer Änderung des lateralen Drucks führen.

Die eigentliche Messung begann, sobald der gewünschte laterale Druck von 10 mN/m erreicht wurde. Sie wurde mittels Substanzapplikation eingeleitet und isochor durchgeführt ⑥. Die Zugabe erfolgte mit Hilfe von Gelloadertips der Fa. Eppendorf, wobei jeweils 10 μg Substanz zugegeben wurden (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Substanz gelöst in DPBS-). Dazu wurde von außen, unter den Barrieren hindurch, in die vom Monolayer bedeckte Subphase pipettiert.

Alle Messungen wurden außerdem bei möglichst gleichen Temperaturen durchgeführt. Der Trog und mit diesem die Subphase wurden dazu mit Hilfe einer Wasserperfusion auf 25 $^{\circ}\text{C}$ temperiert.

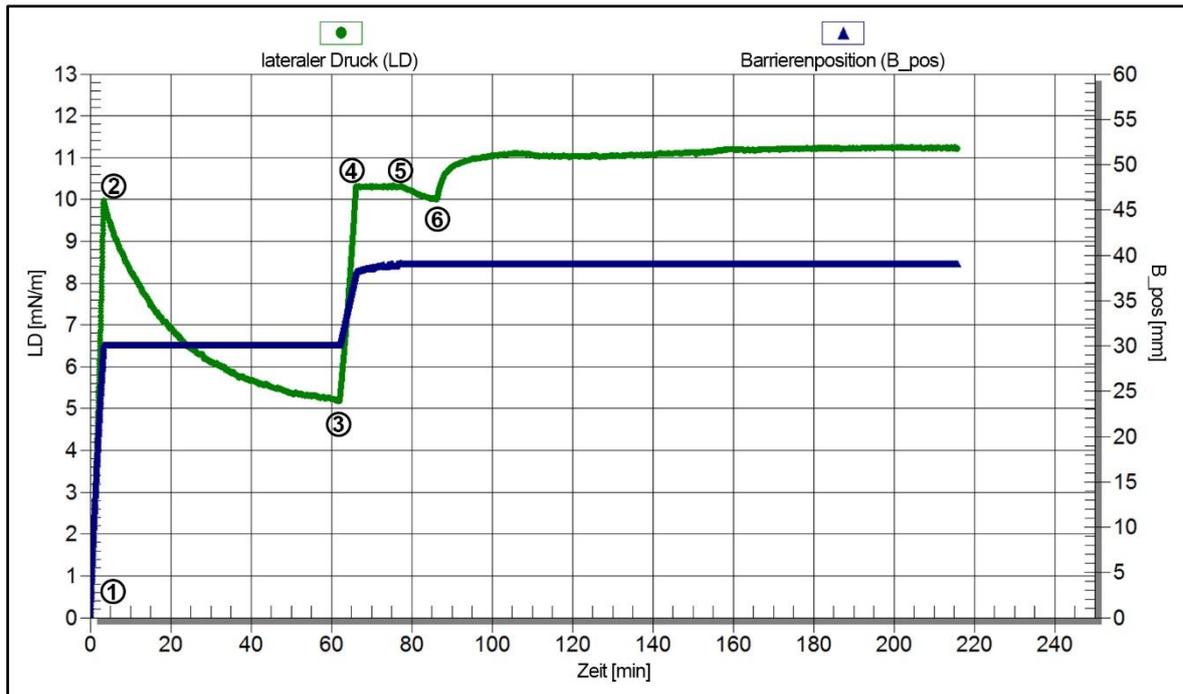


Abb. 17: Exemplarische Darstellung einer Monolayermessung. Hierbei ist die zeitliche Änderung des Drucks (grün) und die der Barrierenposition (blau) dargestellt. Die im Text beschriebenen aufeinanderfolgenden Schritte wurden durchnummeriert. Die eigentliche Messung erfolgte isochor und begann mit der Applikation der zu untersuchenden Substanz ⑥ bei einem Druck von 10 mN/m.

Außerdem sind bei der Nutzung einer Filmwaage sauberes Arbeiten und eine sorgfältige Reinigung besonders wichtig. Kleinste Fettreste, vor allem an den Berührungsflächen der Begrenzung des Troges und den Barrieren, können zum Auslaufen der Subphase und somit zu ungenauen Messungen führen. Eine weitere Problematik stellen kleine Staubpartikel auf der Oberfläche der Subphase dar. Sie dienen den Lipiden als Kondensationsstellen, führen so zur Vesikel-/Mizellen-Bildung, und in Folge dessen zum Verlust von Lipiden im Monolayer.

Aus diesem Grunde wurde nach jeder Messung zunächst die Subphase entfernt und die Filmwaage mehrfach mit reinem Alkohol gespült. Anschließend wurden Trog und Barrieren sorgfältig mit Bürste und Spülmittel gereinigt und danach erneut mehrmals mit reinem Alkohol und destilliertem Wasser gespült. Zusätzlich wurde in regelmäßigen Abständen ein weiterer Reinigungsschritt mit Chloroform durchgeführt. Um eventuelle Staubpartikel zu entfernen, wurde vor Beginn einer jeden Messung die Oberfläche der Subphase mit einer Teflonspitze abgesaugt.

5.3.2 Herstellung von Lipidvesikeln

Monolayer stellen das einfachste Modell von biologischen Membranen dar und ermöglichen es, erste Eindrücke über das Integrationsverhalten von Substanzen zu gewinnen. Im Vergleich zu realen Zellen sind allerdings einige Einschränkungen zu machen. Zunächst kommt eine planare geometrische Anordnung von Lipiden in der Biologie nicht vor. Des Weiteren entspricht die Separation von wässriger Lösung und Luft nicht der physiologischen Bedeutung von Lipidschichten. Außerdem betrachtet man bei Monolayern keine zwei wässrige Kompartimente trennende Lipiddoppelschicht. Somit sind in diesem Modell die tatsächlichen Effekte von membrandurchspannenden Peptiden, wie beispielsweise die Ausbildung von Poren, sowie Prozesse, bei welchen die Membran von, beziehungsweise mit Hilfe eines Peptids passiert wird, nicht zu beobachten.

Eine weitere Näherung an biologische Membranen mit gleichzeitig immer noch freier Wahl der Lipidkomposition und Vernachlässigung der sonstigen Einflüsse (Membranproteine, Zytoskelett, etc.), stellen Lipidvesikel dar. Bei diesen entspricht die dreidimensionale Anordnung der Lipide, sowie die geometrische Form, näherungsweise der von echten Zellen. Zudem stellt das Vesikelinnere ein geschlossenes, von einer Lipiddoppelschicht umhülltes, Kompartiment dar. Es ist somit möglich, Prozesse auf, über und durch die Membran zu beobachten. Außerdem kann an Vesikeln auch der jeweilige Einfluss der Zusammensetzung von extra- und intravesikulären Lösung untersucht werden.

Das einfachste Verfahren um Vesikel herzustellen ist Lipid in einer wässrigen Lösung zunächst quellen zu lassen und anschließend im Wasserbad mit Ultraschall zu behandeln. Auf Grund ihrer amphiphilen Eigenschaft bilden Lipide in wässriger Lösung bevorzugt vesikuläre Strukturen aus. Je nach Beschallungsdauer, Leistung, Salzkonzentration und Lipidkomposition entstehen bei diesem Verfahren Vesikel mit unterschiedlicher Größe.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Herstellung einer Vesikel-Suspension jeweils 5 mg Lipid pro ml Puffer (DPBS+) verwendet. Hierzu wurden Stocklösungen von 100 mg/ml Asolektin, beziehungsweise DOPC, sowie 10 mg/ml Cholesterin in Chloroform, hergestellt. Je nach benötigter Suspensions-Menge und gewünschter Lipidkomposition wurden diese im entsprechenden Verhältnis in einen Rundkolben gegeben und gemischt.

Anschließend wurde das Lösungsmittel mit Hilfe eines Rotovacs bei 350 mbar und 30 °C Wasserbadtemperatur wieder entfernt. Dabei bildete sich am Boden des Kolbens ein dünner Film aus gleichmäßig verteiltem Lipid.

Im Anschluss wurden der Puffer und gegebenenfalls ein Farbstoff hinzugegeben. Im Wasserbad bei 30 °C und unter Ausschluss von Licht folgte nun zunächst ein einstündiges Quellen des Lipids. Anschließend wurde für zwei Stunden mit Ultraschall behandelt, wodurch sich mit Puffer gefüllte Lipid-Vesikel bildeten. Um die durch die Energie der Beschallung entstehende Wärme zu kompensieren, wurde während der Beschallung regelmäßig Eis ins Wasserbad gegeben. Zuletzt wurden eventuelle Verunreinigungen, sowie nicht gelöstes Lipid, von den entstandenen Vesikeln getrennt. Hierzu wurde zweimal bei 2800 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand entsprach der im Weiteren verwendeten Vesikel-Suspension.

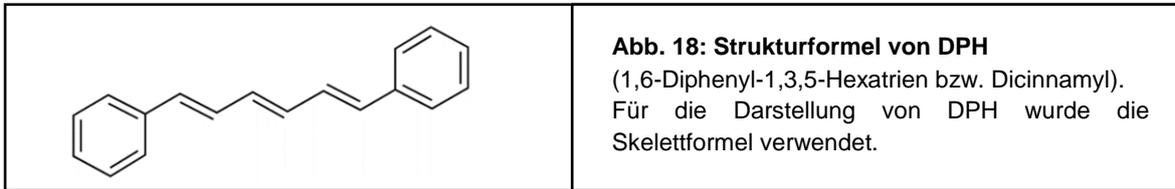
5.3.3 Untersuchung der Membranfluidität von Vesikeln mittels Fluoreszenzpolarisation

Die relative Viskosität einer Lösung, beziehungsweise die Fluidität einer Membran, kann mit Hilfe der sogenannten Fluoreszenzpolarisation bestimmt werden. Bei einer solchen Messung wird die Polarisation der Emission eines mit polarisiertem Licht angeregten Fluoreszenzfarbstoffs ermittelt. Werden innerhalb eines Messprotokolls Größen wie die Eigenschaften des Farbstoffes, Gerätefaktor und Temperatur, sowie Art und Dauer der Anregung konstant gehalten, hängt die Fluoreszenzpolarisation ausschließlich von der Rotationsbeweglichkeit der Fluorophore ab. Je größer die Geschwindigkeit der Rotationsdiffusion, desto geringer ist die Emissionspolarisation.

Diese sogenannte Fluoreszenzdepolarisation wird als Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment ermittelt und als Fluoreszenzpolarisation bezeichnet. Betrachtet man eine mit einem solchen Fluorophor dotierte Membran, dann ist die Rotationsdiffusion des Farbstoffes abhängig von der Fluidität der Lipiddoppelschicht. Somit können Änderungen der Fluidität in Form einer veränderten Fluoreszenzpolarisation detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Croctamin auf die Fluidität der Vesikelmembran ermittelt. Die Vesikel wurden dazu wie beschreiben während deren Herstellung mit DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien) dotiert und mit Hilfe eines Fluoreszenz-Plattenleser in 96-Well-Platten untersucht. Die Färbung der Vesikel erfolgte mit 10 µM DPH pro ml Vesikel-Suspension. Hierzu wurde eine Stocklösung von 10 mM DPH in DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet.

DPH (Abb. 18) ist ein Fluorophor, der sich in den hydrophoben Bereich von Lipiddoppelschichten einlagert. Nimmt die Fluidität der Membran ab, so verringert dies für DPH die Geschwindigkeit der Rotationsdiffusion um die eigene Längsachse und führt so zu einer größeren Fluoreszenzpolarisation. Sie ist somit umgekehrt proportional zur Fluidität, beziehungsweise proportional zum lateralen Druck der Membran.



Für die Experimente am Plattenleser wurde mit polarisiertem Licht bei 350 nm angeregt. Die daraus folgende Emission wurde sowohl parallel als auch senkrecht zur Extinktion bei 460 nm gemessen. Der Quotient dieser Messungen diente dazu, das Ausmaß der Emissionspolarisation zu bestimmen. Das verwendete Messprotokoll beinhaltete 21 Messzyklen à 45 Sekunden, wobei die Substanzapplikation im siebten Zyklus erfolgte.

Die Messungen wurden in jeweils 100 µl Endvolumen durchgeführt, wobei je Well zunächst je 90 µl Vesikelsuspension, beziehungsweise reiner Puffer (DPBS+), vorgelegt wurden (Reihe A-G bzw. H, siehe Abb. 19). Mit Hilfe der Pumpen des Plattenlesers erfolgte dann im siebten Messzyklus die Zugabe von 10 µl Croctaminlösung (X₁ und B), beziehungsweise Puffer als Kontrolle (K). Für eine Endkonzentration von 50 µM Croctamin wurde eine 500 mikromolare Stocklösung (Croctamin in DPBS+) verwendet.

Mit Hilfe der Kontrolle wurde ausgeschlossen, dass ein beobachteter Effekt nicht nur auf Grund der Verdünnung der Vesikelsuspension auftritt. In den späteren Experimenten wurde dann von weiteren Kontrollmessungen abgesehen. Die Reihe H diente der Ermittlung des Blank-Werts (B).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X ₁											
B	X ₁											
C	X ₁											
D	X ₁											
E	X ₁											
F	X ₁											
G	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Abb. 19: Darstellung des Platten-Layouts bei den Messungen zum Einfluss von Croctamin auf Vesikel. Reihe A – G wurden mit je 90 µl Vesikelsuspension bzw. Reihe H mit Puffer befüllt. Im siebten Messzyklus wurden 10µl Croctaminlösung (X₁ und B) bzw. Puffer (K) hinzu pipettiert.

5.3.4 Bestimmung der Vesikelgröße und -haltbarkeit mittels dynamischer Lichtstreuung

Die Größe von Vesikeln kann mit Hilfe der sogenannten Dynamischen Lichtstreuung (DLS) ermittelt werden. Bei einer solchen Messung wird anhand der Streuung eines Lasers der Diffusionskoeffizienten von in einer Suspension enthaltenen Partikel bestimmt. Hierbei gilt, dass innerhalb der Suspension jeder einzelne Partikel als Streuzentrum zu betrachten ist, und das jeweils gestreute Licht miteinander interferiert. Auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung ist der Abstand der Partikel zueinander nicht konstant. Ihre Diffusionsgeschwindigkeit ist abhängig von der jeweiligen Teilchengröße, der Viskosität des Mediums sowie der Temperatur.

Mit der Diffusion der Partikel ändert sich auch der Abstand der Streuzentren zueinander, wodurch es zu kleinen Fluktuationen bezüglich der Streuintensität kommt. Die zeitliche Änderung der gemessenen Streuintensität kann nun mittels Autokorrelation zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten (D) genutzt werden. Werden die Messungen bei bekannter Temperatur ($T = \text{Temperatur in Kelvin}$) und Viskosität des Mediums (η) durchgeführt, so kann unter Verwendung der Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Radius der Partikel (r_h) berechnet werden ($k = \text{Boltzmannkonstante}$).

$$r_h = \frac{k * T}{6 * \pi * \eta * D}$$

Der hydrodynamische Radius ist eine Näherung an den tatsächlichen Radius des Partikels. Mit Hilfe der DLS bietet er aber eine einfache und schnelle Möglichkeit zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten. Er beschreibt den Radius des Partikels inklusive der sogenannten Solvathülle. Sie besteht aus Molekülen des Lösungsmittels, welche auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen an die Partikel gebunden sind. Da sich die Diffusionseigenschaften von Partikel und Solvathülle entsprechen, wird der hydrodynamische Radius üblicherweise zur Beschreibung von Partikelgrößen genutzt. Letztlich bestimmen die Größe der Solvathülle, sowie deren Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel, die Diffusionseigenschaften des Partikels. Je größer dieser ist, desto größer ist seine Solvathülle und desto langsamer die Diffusion.

Für die vorliegende Arbeit wurde für die Messung der Vesikelgröße die Streuung des Lichts, welches von einer Laserdiode bei 660 nm erzeugt wurde, mit Hilfe eine Photodiode detektiert. Für die Bestimmung der Vesikelgrößen wurden zunächst jeweils 50 μl einer 1:50

verdünnten Vesikelsuspension in eine Küvette gegeben. Jedes Endergebnis entspricht dem Mittelwert von fünf Messreihen mit jeweils 20 Einzelmessungen. Letztlich erhielt man mittels softwareinternen Verrechnung eine Aussage über die Größenverteilung, sowie den durchschnittlichen Vesikelradius mit zugehöriger Standardabweichung.

5.4 Untersuchung des Einflusses von Crotamin auf neuronale Zellen

Um den Einfluss von Crotamin unter physiologischen Bedingungen zu beobachten, wurden Untersuchungen an neuronalen Zellen durchgeführt. Hierzu wurde die humane Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y im undifferenzierten Zustand verwendet. Es handelt sich um eine adhärente Zelllinie, die gut untersucht und einfach zu kultivieren ist. Die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoff Fura 2-AM ermöglichte es, den Einfluss von Crotamin auf die Kalziumhomöostase zu untersuchen.

Handhabung der Zellkultur

Die Kultivierung der SH-SY5Y-Zellen erfolgte in T25 Zellkulturflaschen, bei 37 °C und 5,5 % CO₂. Als Kulturmedium (5 ml pro Flasche) diente Flüssigmedium, welches mit 10 % FCS (Fötale Kälber Serum) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung versetzt wurde.

Je nach Wachstum wurde das Kulturmedium ca. alle zwei Tage ausgetauscht und die Zellen ungefähr einmal die Woche passagiert. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt. Im Anschluss wurden die Zellen mit Hilfe einer fünfminütigen Trypsin/EDTA-Behandlung vom Flaschenboden abgelöst (2 ml pro Flasche). Nach dem Ablösen wurde die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt (6 ml pro Flasche).

Die sich nun in Lösung befindenden Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C und 300 g für zehn Minuten zentrifugiert. Danach wurde das entstandene Zellpellet durch Absaugen des Überstands vom Medium und der Trypsin/EDTA-Lösung befreit und in frischem Medium resuspendiert.

Mit der so erstellten Zellsuspension konnten nun neue Kulturen mit gewünschter Zellzahl erstellt werden. Zum Resuspendieren und Erstellen der neuen Kulturen wurde zunächst FCS-freies Medium verwendet. Dessen Verwendung förderte ein schnelles Anwachsen der Zellen am Flaschenboden. Sobald die Zellen fest am Flaschenboden angewachsen waren, wurde das FCS-freie Medium gegen das normale Kulturmedium (mit 10 % FCS) ausgetauscht.

Untersuchung des Einflusses von Crotamin auf die Kalziumhomöostase der Zellen

Für die Untersuchung des Einflusses von Crotamin auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura 2-AM verwendet. Es handelt es sich hierbei um die membrangängige Variante des „Calcium-Imaging“-Farbstoffs Fura 2. Die Bindung des Acetoxymethylester (AM) maskiert den kalziumbindenden, polaren Teil des Moleküls und ermöglicht so die passive Diffusion durch die Zellmembran. In der Zelle setzen endogene Esterasen durch die Abspaltung des Acetoxymethylester Fura 2 frei. Der Farbstoff kann dadurch die Zellmembran nicht mehr passieren und bindet als Ca^{2+} -Chelator an die freien Kalziumionen.

Fura 2-AM ist ein sogenannter ratiometrischer Fluoreszenzfarbstoff. Bei diesen Farbstoffen sind die Exzitationsspektren von gebundenem und freiem Farbstoff zueinander verschoben. Das Exzitationsmaximum von Fura 2 liegt für den freien Farbstoff bei einer Wellenlänge von 380 nm, für den an Kalzium gebundenem bei 340 nm. Die Emissionswellenlänge beträgt in beiden Fällen 510 nm. Die Menge an intrazellulären freigesetztem Kalzium kann daher aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten, die aus der Anregung bei 340 nm und 380 nm resultieren, bestimmt werden. Ein ratiometrischer Farbstoff ermöglicht deshalb eine Beobachtung, die losgelöst von Faktoren wie beispielsweise der Qualität der Färbung, sowie Größe und Anzahl der Zellen, ist.

Der Einfluss von Crotamin auf die Zelllinie SH-SY5Y wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzplattenlesers untersucht. Hierzu wurden die Zellen zunächst auf 96-Well-Platten ausgesät. Um einen optimal bewachsenen Plattenboden zu erhalten, wurden je Well 50 μl einer Zellsuspension mit 10^6 Zellen pro ml Medium (ohne FCS) verwendet. Nach dem Absetzen der Zellen wurde das Medium gegen 150 μl Medium, welches 20 % FCS beinhaltete, ausgetauscht. Im Anschluss wurden die Platten für ca. einen Tag kultiviert und dann für die nachfolgenden Fluoreszenz-Messungen verwendet.

Die Messungen erfolgten im sogenannten Krebs-Ringer-Hepes-Puffer (KRH), einem physiologischen Puffer mit geringer Eigenfluoreszenz. In diesem konnten die Zellen über einige Stunden aufbewahrt werden, ohne Schaden zu nehmen.

Vor Beginn der Messung wurden die Zellen zunächst mit Fura 2-AM gefärbt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit KRH gewaschen (200 μl je Well). Im Anschluss erfolgte bei Raumtemperatur und in Dunkelheit eine 40-minütige Inkubation der Zellen mit 50 μl Färbelösung je Well (2 $\mu\text{g/ml}$ Fura 2-AM in KRH). Danach wurden die

Zellen erneut zweimal mit KRH gewaschen und letztlich das für die Messung benötigte Volumen zugegeben. So vorbereitet wurden die Zellen für weitere 15 Minuten inkubiert. Bei allen Arbeitsschritten wurde stets darauf geachtet, die Zellen nicht durch zu starkes Spülen oder Berührung vom Plattenboden abzulösen.

Die Platten wurden für die Messungen wie folgt vorbereitet (Abb. 20): In den Reihen A-G wurden wie beschrieben Zellen ausgesät. Reihe H wurde zellfrei belassen und diente der Ermittlung des Blank-Werts (B). Außerdem wurde Reihe G keiner Färbung unterzogen und konnte daher zur Überprüfung der Färbequalität genutzt werden (K).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X ₁											
B	X ₁											
C	X ₁											
D	X ₁											
E	X ₁											
F	X ₁											
G	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Abb. 20: Darstellung des Platten-Layouts bei den Messungen zum Einfluss von Crotamin auf Zellen. In Reihe A – G wurden Zellen kultiviert, Reihe H diente der Ermittlung des Blank-Werts (B) und Reihe G zur Kontrolle der Färbung (K).

Die Experimente am Plattenleser wurden bei den beiden Anregungs-Wellenlängen von 340 und 380 nm durchgeführt. Die daraus resultierende Emission wurde jeweils bei 510 nm und je Well direkt hintereinander gemessen. Im verwendeten Messprotokoll wurden 12 Messzyklen à 45 Sekunden durchlaufen, wobei die Substanzapplikation während des fünften Zyklus erfolgte. Die Messungen wurden in jeweils 100 µl Endvolumen durchgeführt. Hierzu wurden die Platten zunächst je Well mit 90 µl KRH vorbereitet. Die Zugabe von Crotamin erfolgte mit Hilfe der Pumpen in entsprechender Konzentration und in jeweils 10 µl KRH.

6 ERGEBNISSE

6.1 Isolierung der Einzelkomponenten

6.1.1 Auftrennung des Gesamtgifts

Mit Hilfe der RP-HPLC konnten die einzelnen Bestandteile des Gifts von *Crotalus durissus terrificus* isoliert werden. Hierfür wurde ein diskontinuierlicher Lösungsmittel-Gradient etabliert, welcher eine möglichst gute Trennung der einzelnen Komponenten ermöglichte.

Für jeden Lauf wurden hierzu 10 mg des Gifts in Phosphatpuffer gelöst und mittels RP-HPLC entsprechend der jeweiligen Hydrophobizität in seine Einzelkomponenten getrennt. Durch entsprechende Programmierung konnten die drei Fraktionen P1 (A10), P2 (A11) und P3 (A12 & C12) gesammelt werden. Die Elution von P1 erfolgte bei 20,8 % Puffer B, die von P2 und P3 nacheinander bei 30,5 % Puffer B (Abb. 21).

Die in diesen Fraktionen enthaltenen Komponenten wurden im Anschluss mittels SpeedVac konzentriert und vom Lösungsmittel Acetonitril befreit. Anschließend wurde die Konzentration der nun in reinem Wasser vorliegenden Proteine und Peptide nach Bradford bestimmt, und bis zum weiteren Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

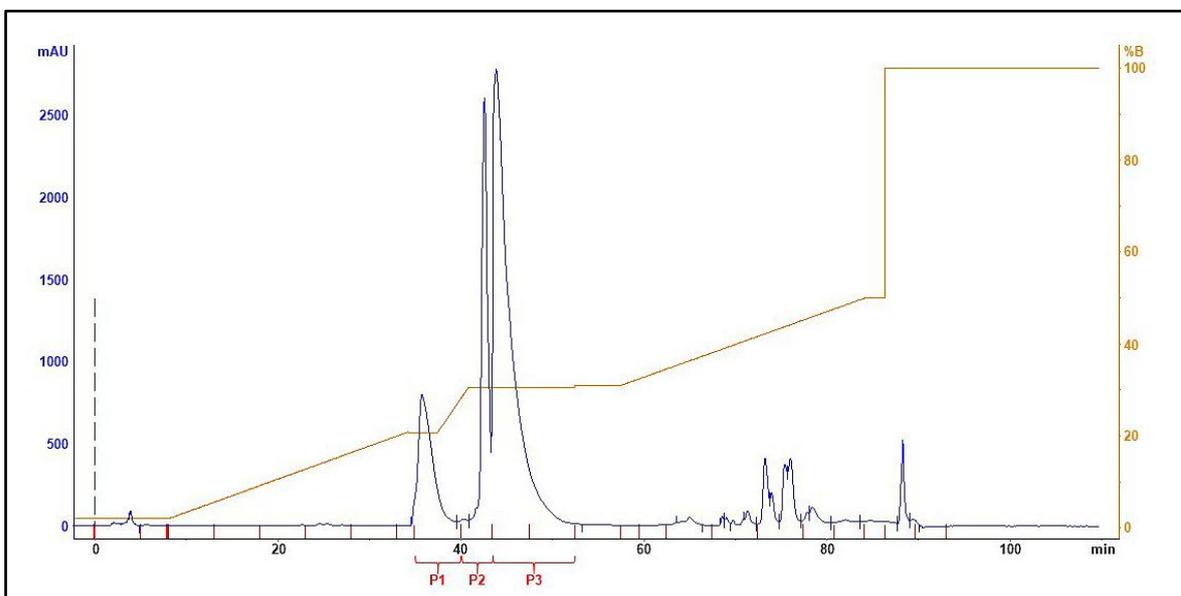


Abb. 21: Chromatogramm eines HPLC-Laufs zur Isolierung der Giftbestandteile. Im Chromatogramm sind die Absorption bei 280 nm blau (in mAU), der Lösungsmittelgradient orange (in % Puffer B), der Zeitpunkt der Probeninjektion schwarz und der Wechsel der Fraktionsgefäße rot gegen die Zeit (in Minuten) aufgetragen. Die Fraktionen A10, A11 und A12 bis C12 entsprechen den im Weiteren als P1, P2 und P3 bezeichneten Fraktionen.

6.1.2 Qualifizierung der Fraktionen

Die Fraktionen P1-P3 wurden mit Hilfe der SDS-PAGE zunächst grob auf Anzahl und molekulare Größe der enthaltenen Substanzen überprüft (Abb. 22). Es zeigte sich, dass P1 eine Komponente mit einer Masse zwischen 5 und 10 kDa enthält. In P2 konnte ebenfalls eine, allerdings nur sehr schwache, Bande im Bereich zwischen 10 und 15 kDa detektiert werden. In P3 zeigten sich zwei Banden im Bereich von 15 kDa.

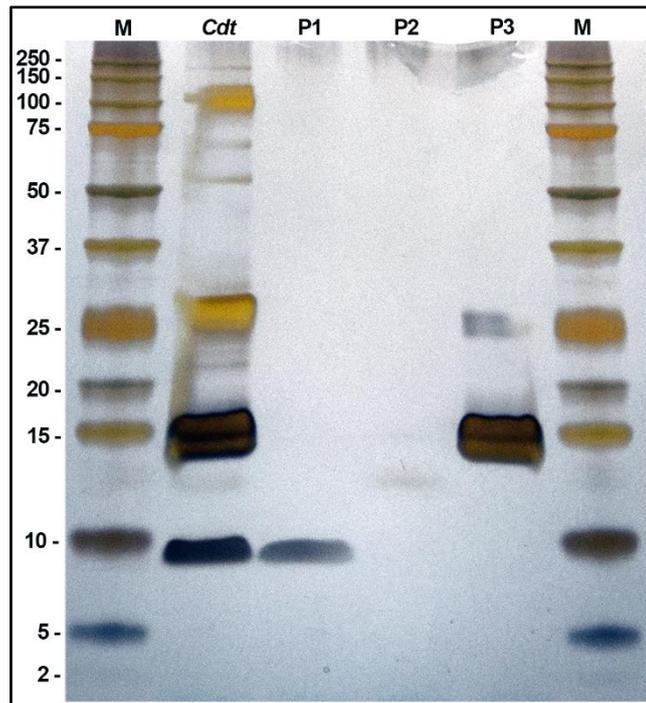


Abb. 22: Gel einer SDS-PAGE zur Überprüfung der Fraktionen P1 und P3 nach der Silberfärbung. Im Gel wurden von links nach rechts das Gesamtgift von *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) mit den Fraktionen P1, P2 und P3 verglichen. Als Marker (M) wurde der „Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards“ verwendet.

Für die weitere Qualifizierung der, in den Fraktionen enthaltenen, Moleküle wurden massenspektroskopische Untersuchungen in Auftrag gegeben. Hierzu wurde zunächst das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z , im Weiteren als Masse bezeichnet) der, in den Fraktionen enthaltenen, Komponenten mittels MALDI-TOF Untersuchung bestimmt (Abb. 23).

Bezüglich der Reinheit der Fraktionen und dem Molekulargewicht der enthaltenen Komponenten konnte für P1 gezeigt werden, dass diese ein einzelnes Peptid mit einer Masse von ca. 4,9 kDa enthält. In der Fraktion P2 wurden drei Moleküle detektiert, die einem Molekulargewicht von ungefähr 4,7, 7,3 und 9,5 kDa entsprechen. In der Fraktion P3 konnte ein Protein mit einer ungefähren Masse von 14,2 kDa nachgewiesen werden. Außerdem enthielt das Spektrum von P3 noch einen weiteren kleinen Peak bei ca. 7,1 kDa.

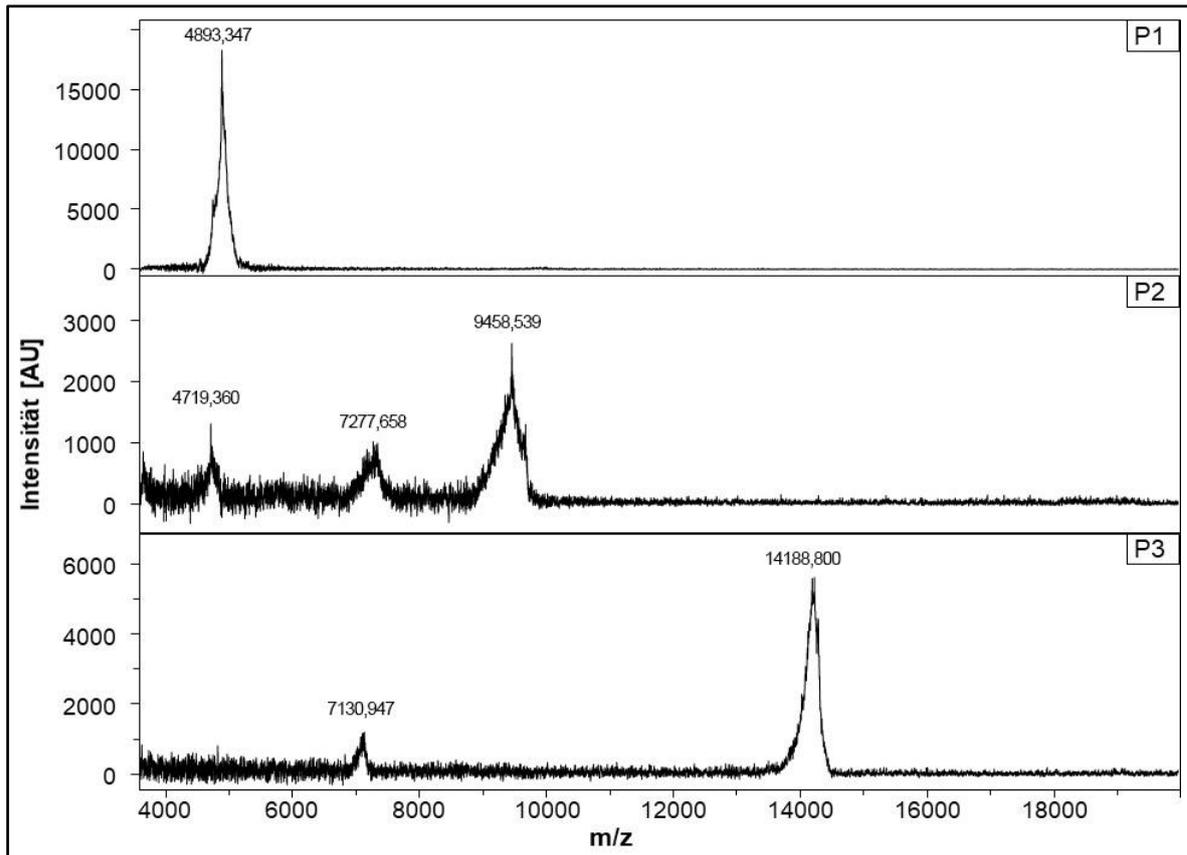


Abb. 23: MS-Spektren der MALDI-TOF-MS Analysen der Fraktionen P1 bis P3.

Laut Literatur besitzt Crotamin eine Masse von ca. 4,9 kDa. Die Masse des in der Fraktion P1 detektierten Peptids deutete daher auf die Isolierung von Crotamin hin. In der Fraktion P2 wurden dagegen mehrere Massen gefunden. Dies deutete darauf hin, dass in dieser Fraktion mehrere Komponenten enthalten sind. Für P3 wurde die These aufgestellt, dass es sich, bei der mit einer Masse von 14,2 kDa detektierten Komponente, um Crotoxin B handelt. Der zweite Massenpeak bei ungefähr 7,1 kDa könnte der zweifach geladenen Variante von CB entsprechen. Die MALDI-TOF-Spektren sprachen daher dafür, dass in den Fraktionen P1 und P3 jeweils eine einzelne Komponente des Gifts isoliert wurde.

Um die in P1 und P3 detektierten Moleküle weiter zu untersuchen wurde zudem eine präzisere Massenbestimmung mittels Nano-HPLC-ESI-MS durchgeführt. Die in P1 detektierte Masse von 4881 Da entspricht dabei dem in der Literatur angegebenen Molekulargewicht von Crotamin. Die übrigen Massen könnten beispielsweise durch Addukte aus dem Puffer, beziehungsweise durch eine teilweise Fragmentierung des Peptids, erklärt werden. Die drei größten Peaks wurden dabei wie folgt interpretiert:

Die Masse von ca. 4737 Da entspricht einem Crotamin-Fragment, welchem die C-terminalen Aminosäuren Serin und Glycin fehlen. Der Peak bei ca. 4897 Da entspricht einer Oxidation. Die Masse von ca. 4979 Da kann durch ein an Crotamin assoziiertes Phosphat erklärt werden. Da das Gift für die Aufreinigung an der HPLC in Phosphatpuffer gelöst wurde, ist diese Modifikation wahrscheinlich (Abb. 24).

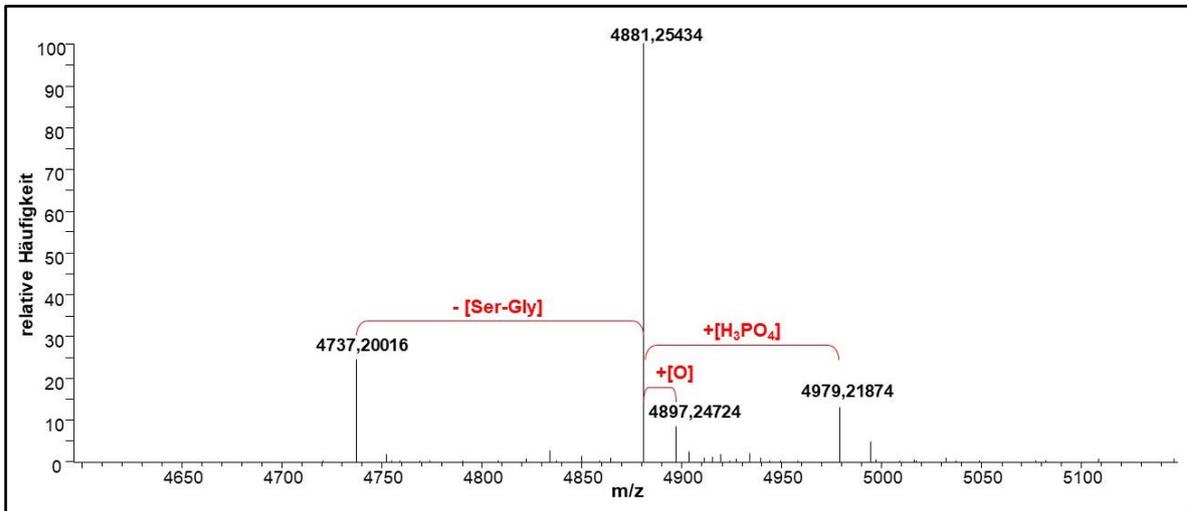


Abb. 24: Dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum zur Bestimmung der Masse von P1. Mögliche Addukte, beziehungsweise Fragmentierungen des Peptids, sind in Rot angegeben.

Das am ESI aufgenommene dekonvolierte MS-Spektrum von P3 bestätigte die Vermutung, dass die, bei der MALDI-TOF Analyse detektierte, Masse von 7,1 kDa der zweifach geladenen Variante des Peptids entspricht. Außerdem zeigte das ESI-MS-Spektrum von P3 im Bereich von 14,2 kDa mehrere Massenpeaks. Der größte Peak entspricht einer Masse von 14237 Da (Abb. 25).

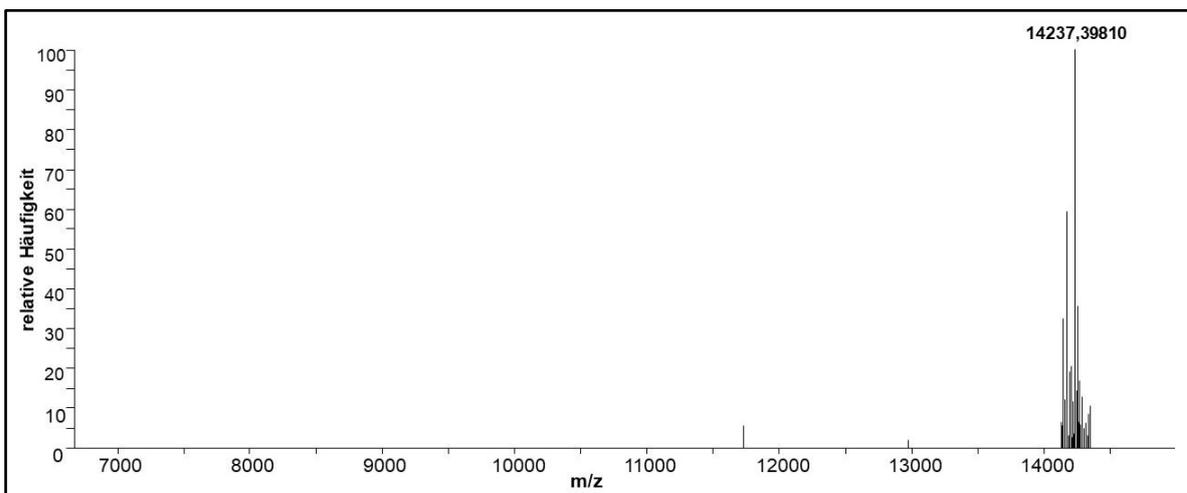


Abb. 25: Dekonvoliertes ESI-MS-Spektrum zur Bestimmung der Masse von P3.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den in P1 und P3 enthaltenen Komponenten um Crotoxin B, beziehungsweise Crotoxin B handelt, wurden zusätzlich ISD-Spektren mittels MALDI-TOF-MS/MS aufgenommen. Es stellte sich jedoch heraus, dass für das in P1 enthaltene Peptid keine für die ISD-Analyse ausreichende Fragmentierung möglich war. Daher wurde die in P1 enthaltene Komponente mit Hilfe von Trypsin verdaut und die Sequenz der erzeugten Peptidfragmente mittels Nano-LC-ESI-MS/MS bestimmt.

Durch den Abgleich der detektierten Massen und ihrer MS/MS-Spektren mit der von Laure publizierte Sequenz konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem in P1 enthaltenen Peptid um Crotoxin B handelt (Tab. 4, Laure 1975). Die Sequenzanalyse deckte die ersten 31 Aminosäuren von Crotoxin B ab (entspricht 73 % der Sequenz). Die Fragmente, welche durch den Verdau von Crotoxin B mit Trypsin aus dem C-terminalen Bereich der letzten 11 Aminosäuren entstehen können, waren zu klein, um sie mit dieser Methode zu detektieren.

Sequenz der detektierten Peptidfragmente bzw. von Crotoxin B	Mascot-Score
YKQCHKK-	25
-KGGHCFPK-	44
-GGHCFPK-	38
-EKICLPPSSD-	29
-EKICLPPSSDFGK-	43
-EKICLPPSSDFGKMDCR-	26
-ICLPPSSDFG-	20
-ICLPPSSDFGK-	66
-ICLPPSSDFGKMDCR-	21
-PPSSDFGK-	29
YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCKKGS	

Tab. 4: Dargestellt sind die Sequenzen der, mittels Trypsinverdau erzeugten und anhand des Nano-LC-ESI-MS/MS Experiments bestimmten, Peptide (**M** entspricht Methionin + Oxidation). In der untersten Zeile ist die von Laure für Crotoxin B publizierte Sequenz angegeben. Der fett gedruckte Abschnitt konnte durch die ESI-MS/MS Analyse bestätigt werden.

Die MALDI-TOF ISD-Analysen von P3 bestätigte die Vermutung, dass diese Fraktion Crotoxin B enthält. Die Interpretation des ISD-Spektrums ermöglichte es, die Sequenz zweier Fragmente zu ermitteln (Abb. 26). Sie entsprechen einem Sequenzabschnitt, in welchem sich vier der publizierten Isoformen gleichen. Da zudem bei massenspektrometrischen Analysen die Unterscheidung von Leucin und Isoleucin nicht möglich ist, könnten insgesamt fünf der, für Crotoxin B gelisteten, Isoformen in P3 enthalten sein (Tab. 5, nach der Datenbank UniProt - „universal protein database“).

Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass bei der verwendeten Strategie zur Isolierung der Giftkomponenten Crotoxin B meist als ein Gemisch seiner Isoformen isoliert wird. Daher, sowie auf Grund der beiden Banden in der Gelelektrophorese und der Anzahl der Signale im ESI-MS-Spektrum (Abb. 25), enthält P3 vermutlich mehrere Isoformen von Crotoxin B.

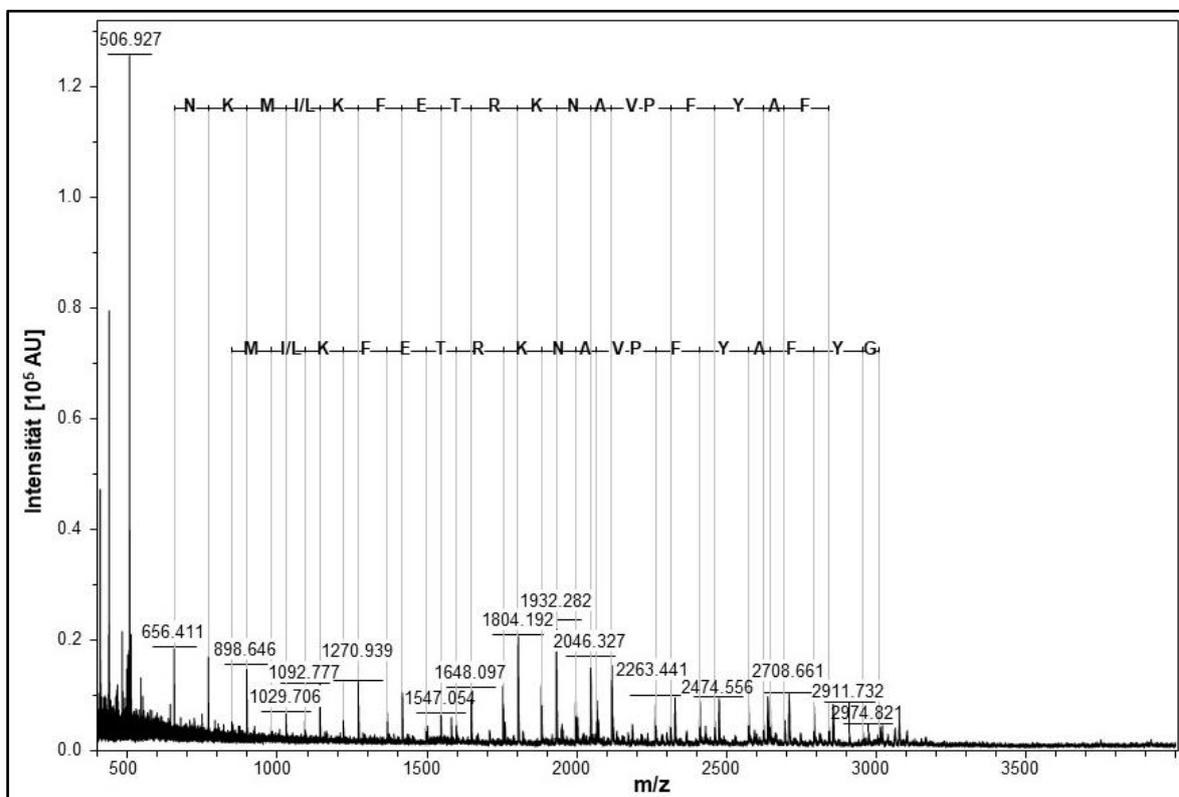


Abb. 26: ISD-Spektrum der MALDI-TOF-MS/MS Analyse von P3. Die Sequenzen der detektierten Peptidfragmente sind über dem Spektrum angegeben.

Sequenzvarianten der Fragmente aus der ISD-Analyse	Crotoxin B-Isoformen der Literatur	
	entsprechende Teilsequenz	UniProt - ID
NKM(I/L)KFETRKNVPPFYAF	NKM(I/L)KFETRKNVPPFYAF-G	P0CAS7(CdtF17)
oder		
M(I/L)KFETRKNVPPFYAFYG	NKM(I/L)KFETRKNVPPFYAFYG	P0CAS5(CdtF15), P0CAS6(CdtF16), P0CG56(CBb), P24207(CBa2, CB2)

Tab. 5: Sequenzen der mittels ISD-Analyse detektierten Fragmente von P3. Sie entsprechen einem Sequenzabschnitt von Crotoxin B, in welchem sich mehrere Isoformen gleichen (nach UniProtKB). Die möglichen Isoformen unterscheiden sich in den grau hinterlegten Aminosäuren (■ = unbestimmte Aminosäure).

Letztlich zeigten die Untersuchungen der mittels RP-HPLC gewonnenen Fraktionen, dass P1 ausschließlich Crotamin, und P3 vermutlich mehrere Isoformen von Crotoxin B enthält. Für die Identifizierung der Bestandteile von P2 wären weitere Untersuchungen notwendig gewesen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde ausschließlich mit P1 als Crotamin gearbeitet. P2 und P3 wurden für eine spätere Verwendung bei -20 °C eingelagert.

6.2 Charakterisierung des Crotamineinbaus in Lipidmonolayer

Das Einbauverhalten von Crotamin wurde mit Hilfe einer Filmwaage untersucht. Hierfür wurden Monolayern aus Asolektin mit unterschiedlichen Cholesterinkonzentrationen genutzt. Zu Beginn eines Experiments wurden jeweils 10 μg Crotamin zugegeben und die Änderung des lateralen Drucks bei konstanter Fläche beobachtet. Um den Einfluss von Subphase, lateralem Druck und Lipidkomposition zu vergleichen, wurde die zeitliche Änderung des Drucks erfasst und als Einbaugeschwindigkeit definiert. Die jeweilige Dauer bis zum Erreichen von 95 % des nach 30 Minuten vorherrschenden maximalen Drucks (P95) diente als Maß der Einbaugeschwindigkeit (Abb. 27). Die statistische Relevanz wurde mit Hilfe eines t-Tests ermittelt und als Überschreitungswahrscheinlichkeit (p -Wert) angegeben.

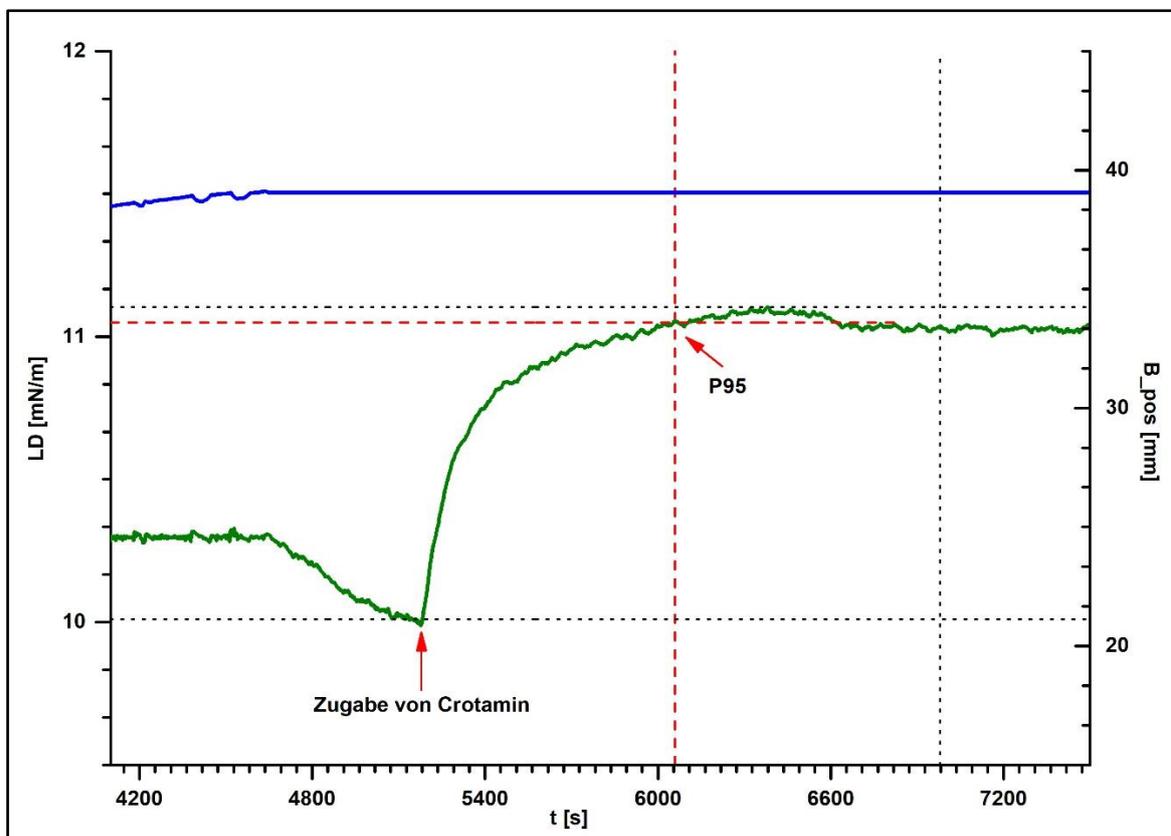


Abb. 27: Vorgehensweise zur Auswertung der Messungen an der Filmwaage. Die Abbildung zeigt die Messung eines reinen Asolektinmonolayers und exemplarisch den Weg zur Ermittlung der Einbaugeschwindigkeit. Hierbei ist der laterale Druck (LD) in grün und die Barrierenposition (B_{pos}) in blau dargestellt. In schwarz sind der minimale und maximale Druck (horizontal) sowie der Zeitpunkt 30 Minuten nach Crotaminzugabe (vertikal) eingezeichnet. P95 ist in rot markiert.

In Vorversuchen wurde zunächst der Einfluss von der Zusammensetzung der Subphase, sowie des vorherrschenden lateralen Drucks auf das Einbauverhalten von Crotamin untersucht. In diesen Versuchen wurden allerdings noch die Fraktionen P1-P3 gemeinsam verwendet.

Um den Einfluss von bivalenten Kationen in der Subphase zu untersuchen wurden Messungen an reinen Asolektinmonolayern durchgeführt. Als Subphase diente DPBS mit, beziehungsweise ohne Kalzium und Magnesium (+ bzw. -). Es zeigte sich, dass bivalente Ionen zu einer höheren Einbaugeschwindigkeit von Crotamin (P1-P3) führen. Diese Beobachtung konnte sowohl bei einem Startdruck von 7 mN/m, als auch von 10 mN/m gemacht werden. Die Geschwindigkeiten unterscheiden sich signifikant (Abb. 28A).

Die Abhängigkeit der Einbaugeschwindigkeit vom lateralen Druck wurde sowohl in reinen, als auch in cholesterinhaltigen, Asolektinmonolayer untersucht. Als Subphase wurde DPBS+ verwendet. Dabei führte die Erhöhung des lateralen Ausgangsdruck von 7 auf 10 mN/m zu einem schnelleren Einbau von Crotamin (P1-P3). Diese Beobachtung wurde sowohl bei reinen Asolektinmonolayer gemacht, als auch bei jenen, die 10 % Cholesterin enthielten. Allerdings konnte nur für cholesterinhaltigen Monolayern eine Abhängigkeit mit statistischer Signifikanz ermittelt werden (Abb. 28B).

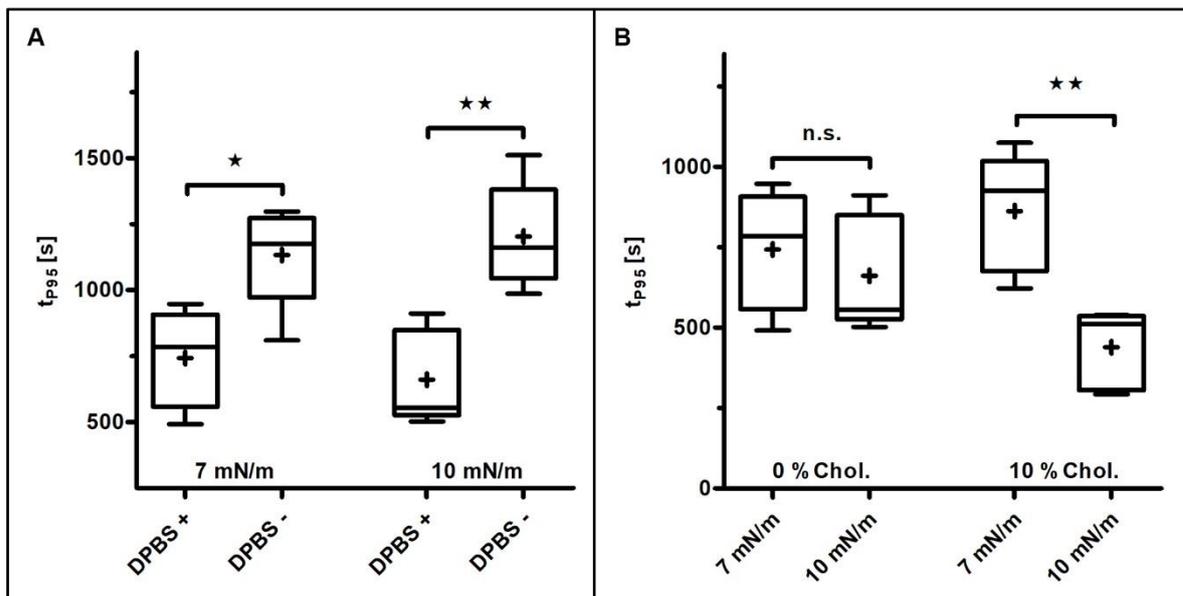


Abb. 28: Abhängigkeit der Einbaugeschwindigkeit vom lateralen Druck und der Subphase. Abbildung (A) zeigt die Abhängigkeit von bivalenten Kationen in der Subphase bei zwei unterschiedlichen lateralen Startdrücken. Abbildung (B) zeigt die Abhängigkeit vom jeweils vorherrschend lateralen Startdruck für Asolektinmonolayer mit und ohne Cholesterin. (A und B) Es wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt. Die Einbaugeschwindigkeit ist in Sekunden (t_{p95}) in Form eines Box-Whiskers-Plot mit Mittelwert (+) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Test bestimmt (p -Wert: (A) 0,0111 [*] bzw. 0,0019 [**]; (B) nicht signifikant [n.s.] bzw. 0,0026 [**]).

Um in den nachfolgenden Untersuchungen bezüglich des Einflusses der vorherrschenden Cholesterinkonzentration einen möglichst starken Effekt beobachten zu können, wurden die Messungen bei einem Ausgangsdruck von 10 mN/m und unter Verwendung von DPBS+ als Subphase durchgeführt.

Der Einfluss von Cholesterin auf das Einbauverhalten von Crotamin wurde an Asolektinmonolayer ohne, beziehungsweise mit Cholesterin (5 und 10 %) untersucht. Es zeigte sich, dass in cholesterinhaltigen Monolayern die Einbaugeschwindigkeit von Crotamin verringert ist. Im Vergleich zu cholesterinfreien Monolayern unterscheiden sich die Geschwindigkeiten statistisch signifikant (Abb. 29).

Der Vergleich von Monolayern mit 5, beziehungsweise 10 % Cholesterin lässt keine weitere Aussage mit statistischer Relevanz zu. Die Einbaugeschwindigkeiten unterscheiden sich nur geringfügig. Bei steigender Cholesterinkonzentration deutet der Vergleich der Mediane auf eine leicht sinkende Einbaugeschwindigkeit hin. Der Vergleich der Mittelwerte steht dieser Aussage aber entgegen.

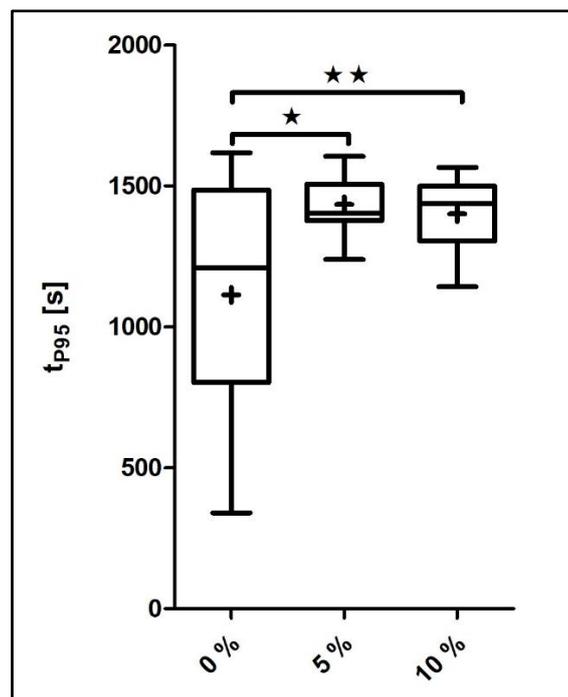


Abb. 29: Abhängigkeit der Einbaugeschwindigkeit von der Cholesterinkonzentration im Monolayer. Die Messungen erfolgten bei einem lateralen Ausgangsdruck von 10 mN/m und unter Verwendung von DPBS+ als Subphase. Die Dauer des Einbaus ist in Sekunden (t_{p95}) in Form eines Box-Whiskers-Plot mit Mittelwert (+) dargestellt, und die jeweilige Cholesterinkonzentration ist in % angegeben. Es wurden 28, 10, bzw. 20 Messungen für die Konzentrationen 0, 5 und 10 % Cholesterin durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ungepaarten t-Test bestimmt (p -Wert = 0,0122 [*] bzw. 0,0031 [**]).

6.3 Einfluss von Croctamin auf die Membranfluidität von Vesikeln

Der Einfluss von Croctamin auf die Fluidität von Membranen wurde in Abhängigkeit von deren Lipidkomposition mit Hilfe eines Plattenlesers untersucht. In der vorgelegten Arbeit wurden Asolektin:Cholesterin-, beziehungsweise DOPC:Cholesterin-Vesikel mit unterschiedlich großem Anteil von Cholesterin (0 bis 10 %) verwendet. Die Änderungen der Fluidität wurden anhand der Fluoreszenzpolarisation von DPH detektiert.

Um die einzelnen Messungen vergleichen zu können, wurden zunächst die Daten einer jeden Messreihe auf den Mittelwert der Zyklen vor der Croctaminzugabe (1-6) normiert. Die auf diesem Weg ermittelte relative Fluoreszenzpolarisation (FP) diente als Maß für die Änderungen der Membranfluidität. Es zeigte sich bei allen untersuchten Lipidkompositionen, dass die Zugabe von Croctamin zu einer Änderung der Membranfluidität führte.

Bei Membranen aus DOPC, beziehungsweise aus DOPC und Cholesterin, verursachte Croctamin eine Fluidisierung der Membran. Hierbei war die Fluidität der Membranen direkt nach der Croctaminzugabe maximal. Im weiteren Verlauf der Messung erreichte sie einen Wert zwischen ursprünglicher und maximaler Fluidität (Abb. 31A).

Bei reinen Asolektin-Vesikeln führte die Zugabe von Croctamin zunächst zu einer geringeren Fluidität der Membran. Gegen Ende der Messungen wurden deren Membranen jedoch deutlich fluidier als vor der Croctaminzugabe (Abb. 30A). Dagegen wurden die Membranen der Asolektin:Cholesterin-Vesikel (0,5 bis 10 %) direkt nach der Croctaminzugabe fluidier. Im weiteren Verlauf der Messung wurden deren Membranen zunächst wieder fester, wobei die Fluidität der Membranen mit 5 und 10 % Cholesterin die Ursprüngliche (vor Croctaminzugabe) unterschritt. Gegen Ende des beobachteten Zeitraums wurden jedoch alle Membranen wieder fluidier (Abb. 30A).

Außerdem zeigte sich schon bei dieser Betrachtungsweise, dass die Wirkung von Croctamin durch die Cholesterinkonzentration der Vesikelmembranen beeinflusst wurde. Dabei wurde der Einfluss von Croctamin auf die Membranfluidität durch die jeweilige Cholesterinkonzentrationen von asolektinhaltigen Vesikeln deutlich stärker verändert als bei DOPC-haltigen Vesikeln (Abb. 30A und 31A).

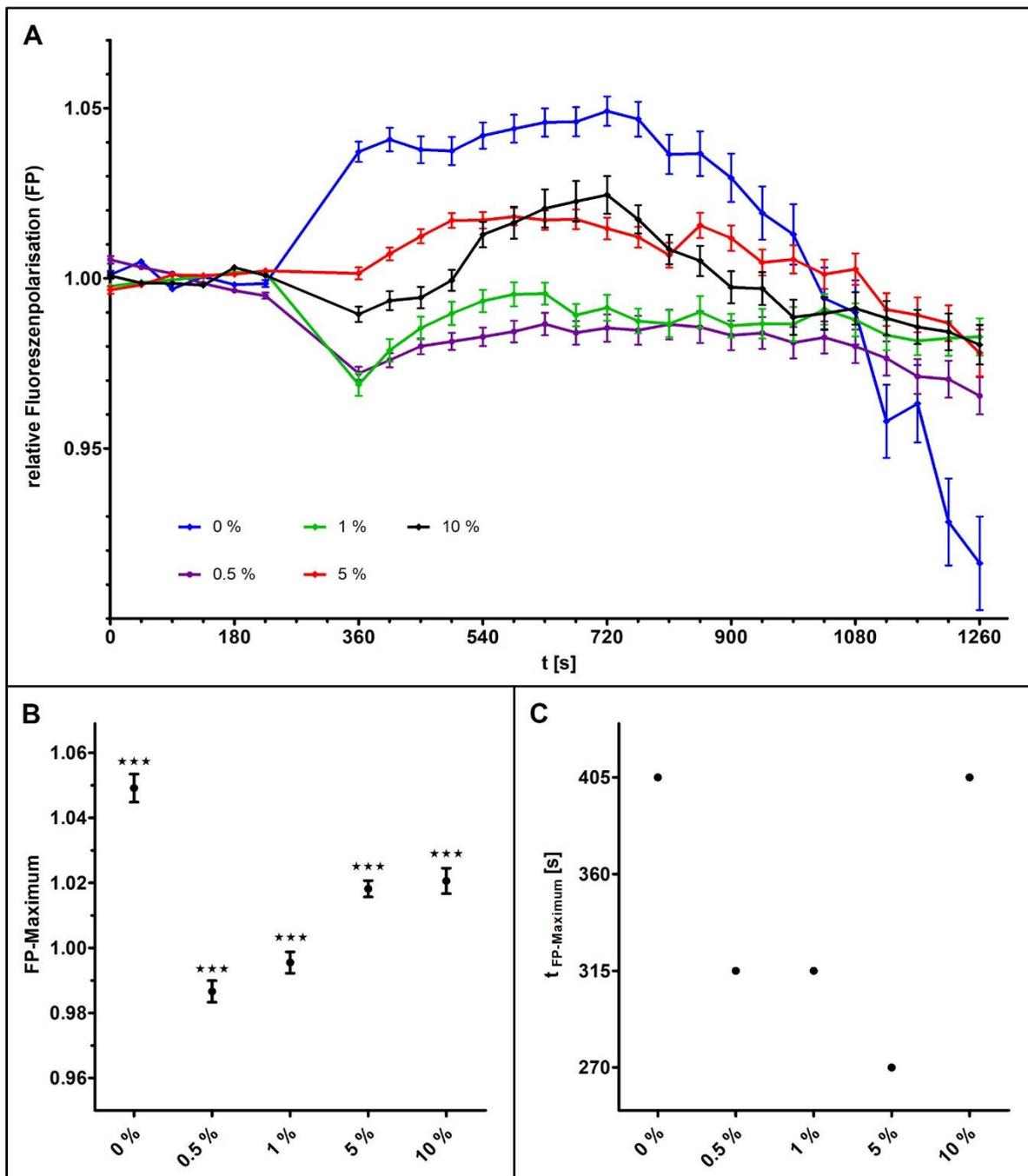


Abb. 30: Einfluss von Crotonin auf die Membranfluidität von Asolektin:Cholesterin-Vesikeln. (A) Die Änderung der Fluidität der Vesikelmembran ist in Form der relativen Fluoreszenzpolarisation von DPH (FP) gegen die Zeit (t) dargestellt. Die Crotoninzugabe erfolgte im siebten Zyklus (t = 315 s). Angegeben sind die, jeweils der auf die Zyklen 1-6 normierten, Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (n = 252, bzw. für 1 % n = 101). Die Werte wurden auf den Mittelwert der Zyklen 1-6 normiert. (B) Vergleich der maximalen relativen Fluoreszenzpolarisation (FP-Maximum), welche nach der Zugabe von Crotonin gemessene wurde. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler. Diese sind nach einfaktorieller Varianzanalyse signifikant verschieden (p -Wert < 0,0001 [***]). (C) Vergleichende Darstellung der jeweiligen Dauer von der Crotoninzugabe bis zum Erreichen der in (B) dargestellten Maxima (t_{FP-Maximum}).

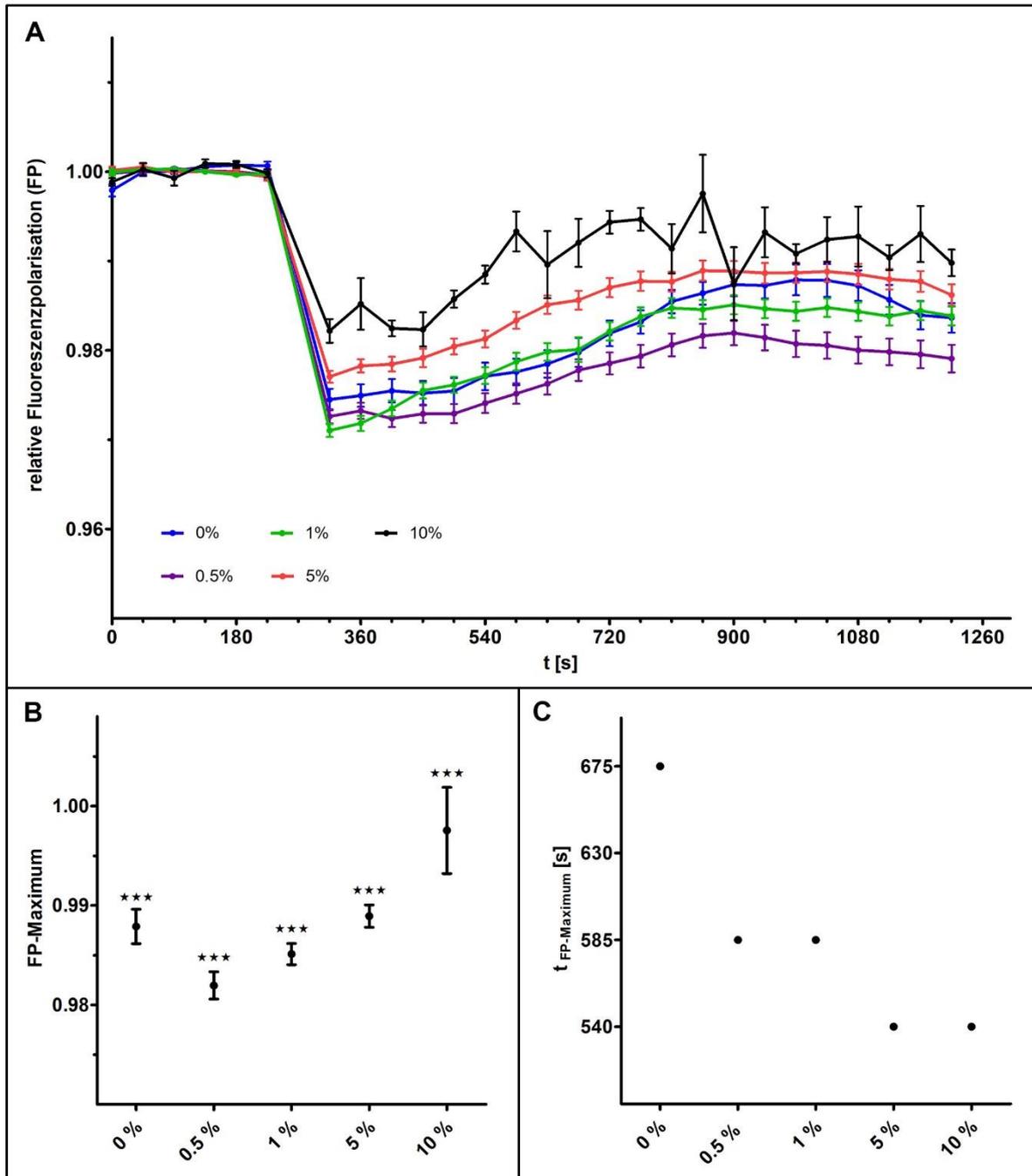


Abb. 31: Einfluss von Crotonin auf die Membranfluidität von DOPC:Cholesterin-Vesikeln. (A) Die Änderung der Fluidität der Vesikelmembran ist in Form der relativen Fluoreszenzpolarisation von DPH (FP) gegen die Zeit (t) dargestellt. Die Crotoninzugabe erfolgte im siebten Zyklus (t = 315 s). Angegeben sind die, jeweils der auf die Zyklen 1-6 normierten, Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (n = 252). (B) Vergleich der maximalen relativen Fluoreszenzpolarisation (FP-Maximum), welche nach der Zugabe von Crotonin gemessene wurde. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler. Diese sind nach einfaktorierter Varianzanalyse signifikant verschieden (p -Wert < 0,0001 [***]). (C) Vergleichende Darstellung der jeweiligen Dauer von der Crotoninzugabe bis zum Erreichen der in (B) dargestellten Maxima ($t_{FP-Maximum}$).

Für den weiteren Vergleich der Messungen wurde das jeweilige Maximum der Fluoreszenzpolarisation nach der Zugabe von Crotonin (FP-Maximum), sowie die Dauer bis zum Erreichen dieses Maximums ($t_{FP-Maximum}$), ermittelt.

Es zeigte sich, dass die Maxima, sowohl bei den Vesikeln mit Asolektin, als auch bei jenen mit DOPC, mit steigender Cholesterinkonzentration größer wurden (0,5 bis 10 %). Demnach wirkte Cholesterin mit steigender Konzentration der von Crostamin verursachten Fluidisierung entgegen. Nach einfaktorieller Varianzanalyse unterscheiden sich die FP-Maxima der asolektinhaltigen, beziehungsweise der DOPC-haltigen, Vesikel signifikant (Abb. 30B und 31B).

Bei asolektinhaltigen Vesikeln war das FP-Maximum der cholesterinfreien Vesikel am größten und größer als vor der Crostaminzugabe. Demnach wurden die reinen Asolektinmembranen in Folge der Zugabe von Crostamin weniger fluide. Bei Vesikeln, die zusätzlich einen Anteil an Cholesterin enthielten, war das Maximum kleiner als bei reinen Asolektin-Vesikeln. Für die Membranen mit 0,5 und 1 % Cholesterin ist dieses kleiner als vor der Crostaminzugabe, für jene mit 5 und 10 % Cholesterin größer (Abb. 30B).

Im Gegensatz dazu waren die FP-Maxima aller DOPC-haltigen Vesikel kleiner als vor der Crostaminzugabe. Demnach wurden deren Membranen durch die Zugabe von Crostamin fluider. Im Vergleich zu reinen DOPC-Membranen war die Fluidisierung bei einem Cholesterinanteil von 0,5 und 1 % stärker, und bei einem Anteil von 5 und 10 % Cholesterin geringer (Abb. 31B).

Neben der Stärke des Einflusses von Crostamin wurde auch die Dauer bis zum Erreichen des Maximums ($t_{\text{FP-Maximum}}$) verglichen. Generell wurde hierbei eine schnellere Wirkung auf asolektinhaltige Membranen beobachtet. Bei den Vesikeln aus Asolektin betrug die Dauer bis zum Erreichen des Maximums zwischen 270 und 400 Sekunden nach der Crostaminzugabe. Bei Vesikeln aus DOPC zwischen 540 und 675 Sekunden. Sowohl bei asolektinhaltigen als auch bei DOPC-haltigen Membranen zeigte sich, dass die jeweiligen Maxima mit steigender Cholesterinkonzentration schneller erreicht wurden. Einzige Ausnahme waren hierbei die asolektinhaltigen Vesikel mit einem Anteil von 10 % Cholesterin (Abb. 30C und 31C).

Außerdem zeigte der Vergleich von asolektinhaltigen und DOPC-haltigen Vesikeln, dass der Einfluss der jeweiligen Cholesterinkonzentration auf die von Crostamin verursachten Fluiditätsänderungen bei asolektinhaltigen Membranen stärker ausfiel. (Abb. 32).

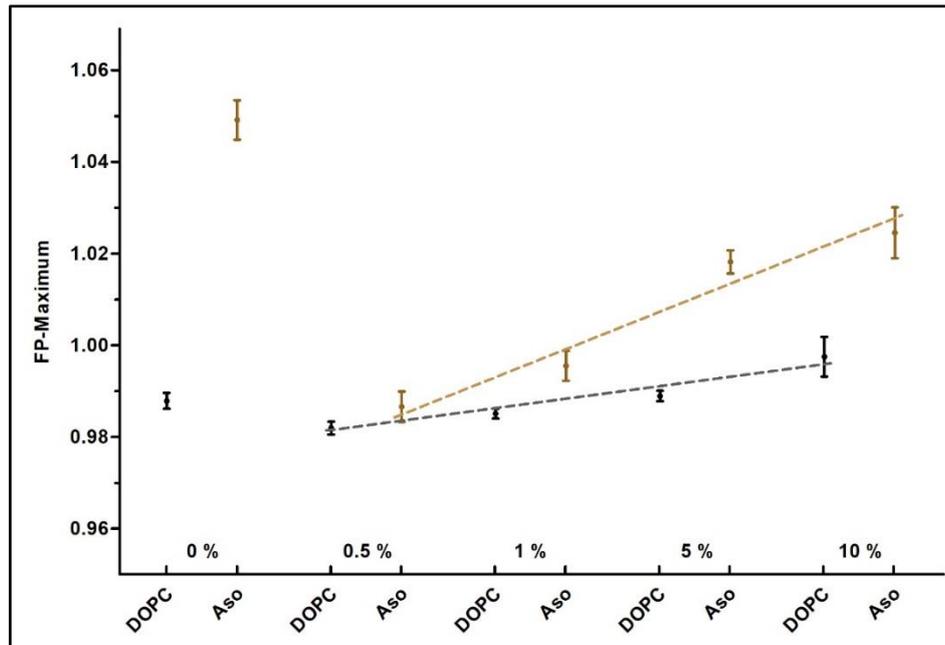


Abb. 32: Einfluss der Lipidkomposition auf die Crotamin-induzierte Fluiditätsänderung von Vesikelmembranen. Die Werte der DOPC:Cholesterin-Vesikel sind in schwarz, die der Asolektin:Cholesterin-Vesikel in braun dargestellt. Angegeben sind die FP-Maxima mit zugehörigem Standardfehler, entsprechend der Abbildungen 30B und 31B. Zusätzlich ist mit Hilfe der gestrichelten Linien der jeweils mit zunehmender Cholesterinkonzentration zu beobachtende Effekt hervorgehoben.

6.4 Einfluss von Crotamin auf die Vesikelgröße

Neben den Untersuchungen zur Membranfluidität wurden die DOPC:Cholesterin-Vesikel mit Hilfe einer DLS-Apparatur auch auf ihre Größe untersucht. In allen verwendeten Vesikelsuspensionen konnte jeweils nur eine Größenpopulation nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte keine Abhängigkeit zwischen Vesikelgröße und Cholesterinkonzentration beobachtet werden (Abb. 33C).

Außerdem wurde der Einfluss von Crotamin auf die Vesikelgröße untersucht. Hierzu wurde zunächst die Größe der Vesikel bestimmt ($t = 0$ Minuten) und anschließend jeweils $50 \mu\text{M}$ Crotamin in die Vesikelsuspension gegeben. Die Änderung der Vesikelgröße wurde alle fünf Minuten gemessen und über einen Zeitraum von 20 Minuten beobachtet (Abb. 33A).

Im Anschluss wurden die Werte einer Messreihe jeweils auf den Zeitpunkt vor der Zugabe von Crotamin normiert (Abb. 33D und E). Die Messungen zeigten, dass die Vesikel unabhängig von der jeweiligen Cholesterinkonzentration auch 20 Minuten nach der Crotaminzugabe eine homogene Größe hatten. Insgesamt nahm jedoch die Größe der Vesikel über die Zeit zu. Für diesen Effekt konnte ebenfalls keine Abhängigkeit von der Cholesterinkonzentration ermittelt werden. Demnach werden die Vesikel unabhängig von deren Zusammensetzung durch den Einfluss von Crotamin größer (Abb. 33B).

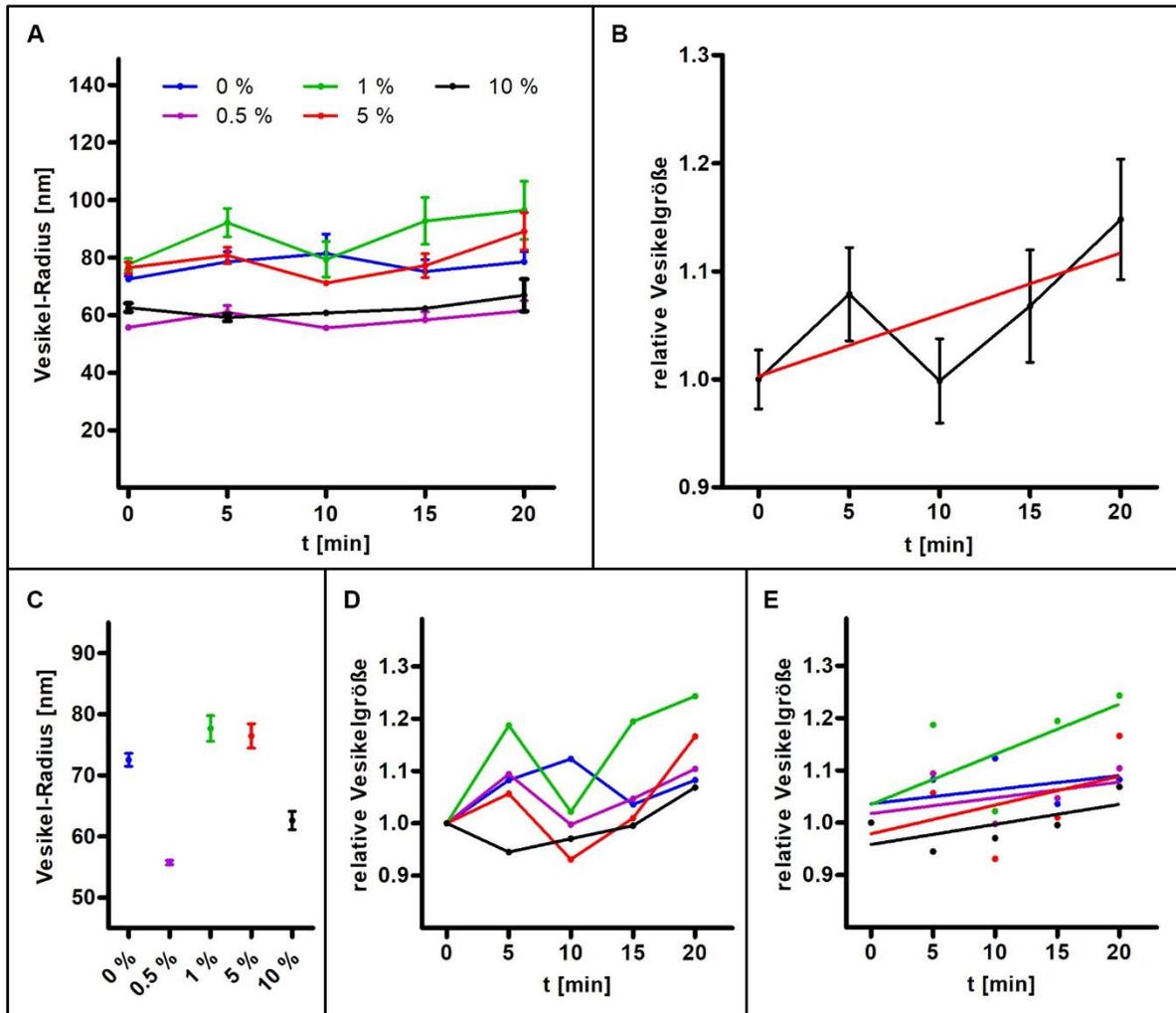


Abb. 33: Einfluss von Crotonin auf die Größe von DOPC:Cholesterin-Vesikeln. In (A) sind die Mittelwerte der Vesikelradien mit zugehörigem Standardfehler, in (D) der Mittelwert der relativen Vesikelgröße gegen die Zeit aufgetragen. (E) zeigt die lineare Regression zu Abbildung (D). In (C) ist die Vesikelgröße vor der Crotoninzugabe in Abhängigkeit zur jeweiligen Cholesterinkonzentration dargestellt. In Abbildung (B) ist die relative Größenänderung der Vesikel aller Lipidkompositionen gemittelt, mit zugehörigem Standardfehler und zugehöriger Regression dargestellt. Die Farbkodierung der Abbildungen (C-E) entsprechen der in (A). (A, C-E) Der Mittelwert ist jeweils aus 5 Messreihen à 20 Einzelmessungen berechnet (siehe Kapitel 5.3.4).

6.5 Einfluss von Crotonin auf neuronale Zellen

Mit Hilfe eines Plattenlesers und des Fluoreszenzfarbstoff Fura 2-AM wurde außerdem die Wirkung von Crotonin auf die neuronale Zelllinie SH-SY5Y untersucht. Das Verhältnis der, aus den beiden Extinktionswellenlängen resultierenden, Emissionen gab dabei Aufschluss über die Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration. Für den Vergleich der Messungen wurden die Werte jeweils auf den Mittelwert aus den Messzyklen vor der Crotoninzugabe (1-4) normiert.

Es zeigte sich, dass Crotamin zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führte. In der vorliegenden Arbeit wurde der Bereich zwischen 1 und 100 μM Crotamin untersucht. Der Vergleich der verwendeten Konzentrationen ermöglichte es, eine Konzentrationsabhängigkeit für den Einfluss von Crotamin auf die Kalziumhomöostase von neuronalen Zellen nachzuweisen (Abb. 34).

Für die Konzentrationen 1 bis 10 μM war der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration gering. Bei einer Konzentration von 50 μM Crotamin war dieser deutlich und bei 100 μM stark. Im Konzentrationsbereich von 1 bis 50 μM konnte der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration über den gesamten Zeitraum beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Applikation von 100 μM Crotamin nach dem Erreichen des Maximums der sofortige und schnelle Rückgang der freien Kalziumkonzentration beobachtet.

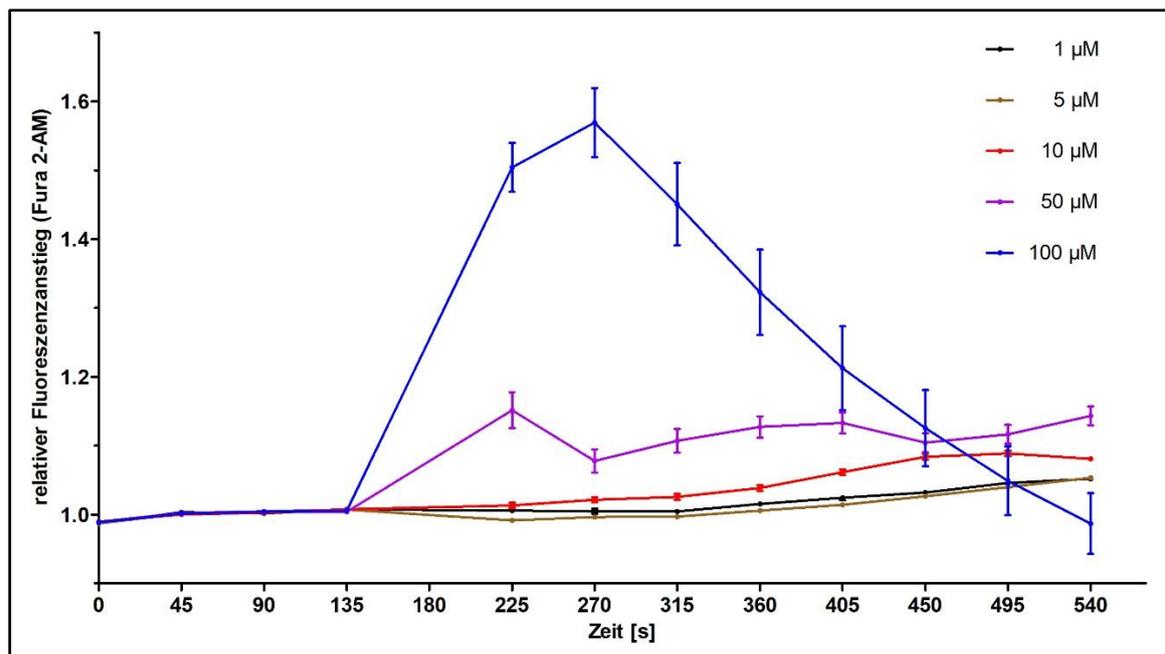


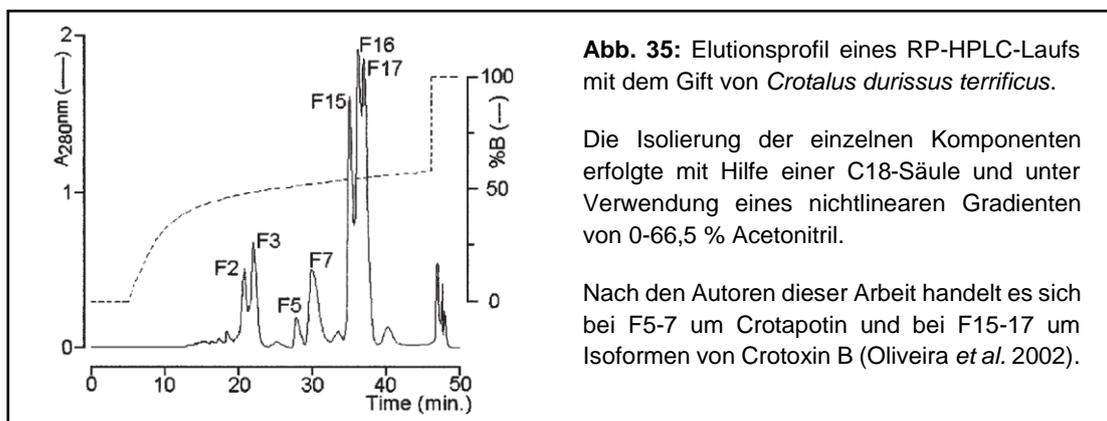
Abb. 34: Einfluss von Crotamin auf die Kalziumhomöostase von neuronalen Zellen. Dargestellt ist die relative Änderung der intrazellulären freien Kalziumkonzentration, in Form der blank korrigierten, relativen Emissionen von Fura 2-AM bei 510 nm (350/380 nm Extinktion). Die Crotaminzugabe erfolgte im fünften Zyklus ($t = 180$ s). Dargestellt ist der jeweils auf die Zyklen 1-4 normierte Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler ($n = 60$).

7 Diskussion

7.1 Isolierung von Crotamin

Unter Verwendung einer RP-HPLC konnten Einzelkomponenten des Gifts von *Crotalus durissus terrificus* erfolgreich isoliert werden. In früheren Arbeiten wurden die als P1 bis P3 bezeichneten Fraktionen noch gemeinsam isoliert. Diese Fraktion (P1 bis P3 gemeinsam) wurde in der vorgelegten Arbeit für die Vorversuche an der Filmwaage verwendet. Durch entsprechende Anpassung von Gradient und Fraktionierung wurden für alle weiteren Versuche P1 bis P3 getrennt gesammelt. Die in den Fraktionen enthaltenen Komponenten konnten durch nachfolgende Untersuchungen mittels SDS-PAGE und Massenspektrometrie, sowie durch Abgleichen mit der Literatur, zugeordnet werden.

Demnach entsprach die Masse der in P1 detektierten Komponente Crotamin und die Fraktion P3 enthielt Isoformen von Crotoxin B. Die Untersuchungen von P2 ließen neben einer Größenbestimmung keine weiteren Aussagen bezüglich der enthaltenen Komponenten zu. Der Vergleich mit Chromatogrammen aus der Literatur, bei welchen die einzelnen Bestandteile des Gifts von *Crotalus durissus terrificus* ebenfalls mit Hilfe einer C18-Säule getrennt wurden, legt aber die Vermutung nahe, dass in P2 Crotoxin A (Crotapotin) enthalten sein könnte (Abb. 35, Oliveira *et al.* 2002).



Obwohl in der zitierten Arbeit mit einem etwas anderen Gradienten gearbeitet wurde, ähnelt das Elutionsprofil dem Chromatogramm der vorliegenden Arbeit. Die Fraktionen F5-F7 wurden nach Oliveira *et al.* Crotoxin A zugeordnet und entsprechen vermutlich P2. In den Fraktionen F15-F17 konnten von Oliveira *et al.* Isoformen von Crotoxin B identifiziert werden. Diese Fraktionen entsprechen voraussichtlich der in dieser Arbeit als P3 bezeichneten Fraktion.

7.2 Bivalente Kationen, sowie der laterale Membrandruck, beeinflussen die Einbaugeschwindigkeit von Crotamin

In der vorgelegten Arbeit wurde zunächst das Einbauverhalten von Crotamin in Asolektin:Cholesterin-Monolayer (0, 5 und 10 %) untersucht. An diesen konnte zunächst gezeigt werden, dass die Anwesenheit von bivalenten Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}), sowie die Erhöhung des lateralen Drucks von 7 auf 10 mN/m zu einem beschleunigten Einbau von Crotamin führen (Abb. 28).

Bei diesen Versuchen wurde allerdings mit einer Giffraktion gearbeitet, welche die in dieser Arbeit als P1 bis P3 bezeichneten Fraktionen gemeinsam enthielt. Es ist daher möglich, dass der beobachtete Effekt nicht ausschließlich auf der Wirkung von Crotamin beruht. Jedoch ist aus der Literatur keine weitere Komponente des Gifts von *Crotalus durissus terrificus* bekannt, welche zellpenetrierende Eigenschaften besitzt. Im Weiteren wurde deshalb davon ausgegangen, dass die gemachten Beobachtungen zumindest vorwiegend auf der Wirkung von Crotamin beruhen.

Für die Herstellung der Monolayer wurde Asolektin, ein Lipidextrakt aus der Sojabohne, verwendet. Da es sich um ein Pflanzenextrakt handelt, ist er cholesterinfrei. Er enthält sowohl neutral geladene Lipide, wie beispielsweise Phosphatidylcholin und -ethanolamin (PC und PE), als auch negativ geladene Lipide (z. B. Phosphatidylinositol, PI). Bivalente Kationen können mit den Kopfgruppen der Phospholipide schon auf Grund ihres Dipolmoments, zum Teil aber auch wegen deren negativer Ladungen interagieren und an diese assoziieren. Dadurch verändert sich zunächst die Oberflächenladung der Membran. Gleichzeitig ändert dies aber auch die Beweglichkeit der Kopfgruppen, sowie deren Fähigkeit zu elektrostatischen Wechselwirkung.

Durch die beschriebenen Effekte könnten die Anziehung und Bindung von Crotamin an die Membran verstärkt, sowie dessen Einbau in die Membran erleichtert werden. Demnach kann der, bei einer Subphase mit bivalenten Kationen beobachtete, schnellere Einbau von Crotamin möglicherweise auf die dabei veränderten Eigenschaften des Monolayers zurückgeführt werden. Außerdem kann durch bivalente Kationen auch die Konformation eines Peptids, sowie dessen Hydrathülle verändert werden. Crotamin ist ein amphiphiles, geladenes und polares Peptid. Es ist daher vorstellbar, dass auch auf diese Weise seine Fähigkeiten zur Assoziation an, sowie zur Integration in, die Membran verändert wurden.

Eine Änderung des lateralen Drucks verändert ebenfalls die biophysikalischen Eigenschaften einer Membran. Auf Grund ihrer thermodynamischen Eigenschaften ändert sich dadurch zunächst die Fluidität der Membran. Dabei führt die Erhöhung des Drucks zu einer geringeren Bewegungsfreiheit der Lipide und in der Folge zu weniger fluiden Membranen. Dieser Effekt hätte vermutlich ein geringeres Integrationsvermögen von Crotamin zur Folge. Allerdings widersprechen dieser These die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen.

Eine Erhöhung des Membrandrucks führt aber auch zur Kondensation der Lipide. Dadurch wird die den Lipiden lateral zur Verfügung stehende Fläche kleiner. In Folge dessen ist es möglich, dass Kopfgruppen weiter aus der Oberfläche eines Monolayers herausragen. Dies könnte wiederum die Wechselwirkungen zwischen Crotamin und der Membran verstärken. Möglicherweise konnte deshalb bei erhöhtem lateralem Druck, trotz der geringeren Membranfluidität, ein beschleunigter Einbau von Crotamin beobachtet werden.

7.3 Die membranbeeinflussenden Eigenschaften von Crotamin sind abhängig von der Lipidkomposition

Für die Funktionsweise von zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) ist deren jeweilige Interaktion mit der Zellmembran von zentraler Bedeutung. Lipide bilden die Grundstruktur einer jeden Zellmembran und haben somit einen großen Anteil an deren biophysikalischen Eigenschaften. Für das Verständnis der Wirkungsweise von CPPs ist es daher notwendig, den Einfluss der jeweiligen Lipidkomposition zu kennen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkungsweise von Crotamin an artifiziellen Membranen in Abhängigkeit von der jeweiligen Lipidkomposition untersucht.

Cholesterin erschwert den Einbau von Crotamin in Membranen

Zunächst wurde an Asolektin:Cholesterin-Monolayern der Einfluss der Cholesterinkonzentration (0, 5 und 10 %) auf die Einbaugeschwindigkeit von Crotamin untersucht. Als Maß für die Einbaugeschwindigkeit diente die Zeitspanne von der Crotaminzugabe bis zum Erreichen von 95 % des maximalen lateralen Drucks. Die Untersuchungen zeigten, dass Cholesterin zu einem signifikant langsameren Einbau von Crotamin führte (Abb. 29).

Im Weiteren wurde der Einfluss von Crotamin auf die Fluidität von Vesikelmembranen untersucht. Dazu wurden Vesikel aus Asolektin, beziehungsweise DOPC, und Cholesterin hergestellt. Die jeweilige Änderung der Fluidität wurde mit Hilfe fluoreszenzoptischer

Messungen erfasst. Die jeweils geringste relative Fluidität nach der Zugabe von Crotamin diente als Maß für den Einfluss von Crotamin.

Dabei zeigte sich bei allen untersuchten Lipidkompositionen, dass Crotamin die Fluidität der Vesikelmembran generell und in Abhängigkeit von der jeweiligen Cholesterinkonzentration verändert. Je größer die Cholesterinkonzentration (0,5 – 10 %), desto geringer die durch Crotamin induzierte Fluidisierung (Abb. 32). Die jeweils geringste Fluidität wurde dabei umso schneller erreicht, je mehr Cholesterin die Membran der Vesikel enthielt. Einzig bei den Asolektin:Cholesterin-Vesikeln mit 10 % Cholesterin konnte der Effekt einer bei steigender Cholesterinkonzentration schnelleren Fluidisierung nicht beobachtet werden (Abb. 30C und 31C).

Vermutlich beruht die durch Crotamin induzierte Fluidisierung der Vesikelmembranen ebenfalls auf dem Einbau von Crotamin. Hierdurch könnte es die Wechselwirkungen zwischen den Lipiden schwächen und in Folge dessen deren Ordnung herabsetzen. Dies würde wiederum die Bewegungsfreiheit der Lipide erhöhen, und hätte eine Fluidisierung der Vesikelmembran zur Folge.

In einer Vesikelmembran ist die den Lipiden lateral zur Verfügung stehende Fläche nicht begrenzt. Daher würde sowohl die Insertion von Crotamin an sich, als auch eine dadurch verursachte geringere Ordnung, beziehungsweise Kondensation der Lipide zu größeren Vesikeln führen. Die Ergebnisse der DLS-Messungen sprechen daher für die Vermutung, dass die Fluidisierung der Vesikelmembran auf der Insertion von Crotamin beruht. Die Untersuchungen zeigten, dass die DOPC-haltigen Vesikel nach der Zugabe von Crotamin unabhängig von der jeweiligen Cholesterinkonzentration etwas größer wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen und bestätigen die von Costa *et al.* berichteten Beobachtungen an GUVs („giant unilamellar vesicles“, Abb. 36). Dabei untersuchten sie das Ausmaß der, durch die Zugabe von Crotamin nach einer Stunde verursachten, Zerstörung von GUVs. Die Zugabe von Crotamin führte bei reinen POPC-GUVs zur Zerstörung von ca. 50 % der Vesikel. Dagegen wurden bei POPC:Cholesterin-GUVs (90:10) nur 40 % der Vesikel zerstört. Demnach reduzierte Cholesterin auch in diesem Versuchsaufbau die Wirkung von Crotamin (Costa *et al.* 2014).

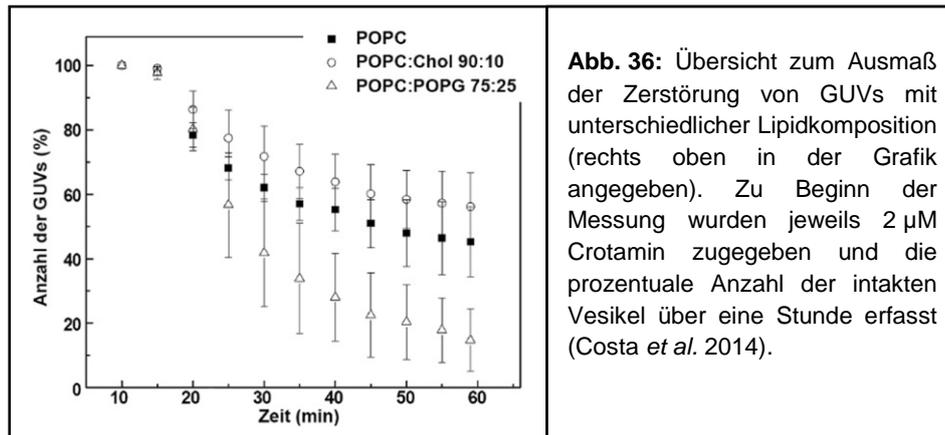


Abb. 36: Übersicht zum Ausmaß der Zerstörung von GUVs mit unterschiedlicher Lipidkomposition (rechts oben in der Grafik angegeben). Zu Beginn der Messung wurden jeweils $2 \mu\text{M}$ Crotamin zugegeben und die prozentuale Anzahl der intakten Vesikel über eine Stunde erfasst (Costa *et al.* 2014).

Gemeinsam bestätigten die Ergebnisse dieser Arbeit und die Beobachtungen von Costa *et al.*, dass Cholesterin den Einbau von Crotamin in Membranen verlangsamt, beziehungsweise die Wirkung von Crotamin verringert wird. Demnach werden Membranen durch Cholesterin vor dem Einfluss von Crotamin geschützt.

Wie in Kapitel 3.7 beschrieben, reduziert Cholesterin in Membranen die Bewegungsfreiheit der Lipide. Dies beruht einerseits auf den stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den KW-Ketten der Phospholipide und den Kohlenstoffringen von Cholesterin. Andererseits bilden sich aber auch Wasserstoffbrücken zwischen der Hydroxygruppe von Cholesterin und den polaren Gruppen der Phospholipide (Phosphat, Carboxy- bzw. Amidgruppe der KW-Ketten).

Auf Grund der beschriebenen Wechselwirkungen erhöht Cholesterin die Ordnung der Lipide in der Membran. Cholesterinhaltige Membranen sind daher stärker kondensiert und besitzen eine geringere Fluidität und Permeabilität. Eine verringerte Membranfluidität, sowie eine größere Dichte an Lipiden pro Fläche, kann wiederum die Integration von Peptiden erschweren. Zudem erschwert die Ausbildung von Wasserstoffbrücken die Interaktion der polaren Gruppen mit den Ionen und Molekülen des Mediums.

Daher könnte auf Grund der Wasserstoffbrücken zwischen Cholesterin und Phospholipiden zunächst die Anziehung von Crotamin an cholesterinhaltigen Membranen reduziert sein. Im Weiteren könnte deren geringere Fluidität und stärkere Kondensation auch die Insertion von Crotamin erschweren. Die beschriebenen Mechanismen könnten somit die an cholesterinhaltigen Monolayern beobachtete, reduzierte Einbaugeschwindigkeit von Crotamin erklären.

Vermutlich beruht die, mit steigender Cholesterinkonzentration bei Vesikeln beobachtete, geringere Fluidisierung ebenfalls auf den durch Cholesterin veränderten biophysikalischen Eigenschaften der Membran. Basiert deren Fluidisierung auf dem Einbau von Crotamin, ist dessen geringerer Einfluss entsprechend der für die Monolayer diskutierten Mechanismen zu erklären.

Die Fluiditätsmessungen zeigten außerdem, dass die zum Vergleich genutzte, geringste Fluidität (FP-Maximum) mit steigender Cholesterinkonzentration schneller erreicht wurde. Diese Beobachtung lässt sich nicht mit den bisher für Cholesterin beschriebenen Einflüssen auf die Eigenschaften einer Membran erklären. Es wäre aber möglich, dass Cholesterin den Einbau nicht nur erschwert, sondern dass auch insgesamt weniger Crotamin in cholesterinhaltige Membranen eingebaut wird. Dies könnte dazu führen, dass der Einbauprozess von Crotamin insgesamt schneller abgeschlossen ist und daher die Beobachtung einer schnelleren Fluidisierung von cholesterinhaltigen Membranen erklären.

Lipide mit negativer Ladung fördern den Einbau von Crotamin in Membranen

Die Untersuchungen der Fluidität von Vesikelmembranen zeigten außerdem, dass bei asolektinhaltigen Membranen der Einfluss von Cholesterin auf die von Crotamin verursachten Fluiditätsänderung stärker ausfiel als bei DOPC-haltigen. Sowohl der jeweilige Unterschied zu cholesterinfreien Membranen, als auch die Unterschiede zwischen den verschiedenen Cholesterinkonzentrationen waren bei Membranen, die Asolektin enthielten, größer. Zudem wurde die jeweilige geringste Fluidität bei asolektinhaltigen Membranen auch schneller erreicht.

Asolektin ist ein Lipidextrakt, der sowohl neutral geladene Lipide, als auch negativ geladene Lipide enthält. Dagegen handelt es sich bei DOPC um ein reines, neutral geladenes Phosphatidylcholin. Es ist daher wahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede zwischen Asolektin- und DOPC-haltigen Vesikelmembranen auf der Ab-, beziehungsweise Anwesenheit, von Lipiden mit negativer Ladung beruhen. Diese These greift die unter anderem von Nascimento *et al.* und Coronado *et al.* berichtete Spezifität von Crotamin für negativ geladene Zellmembranen auf (Nascimento *et al.* 2007; Coronado *et al.* 2013).

Zudem stimmt sie mit den von Costa *et al.* publizierten Daten überein (Abb. 37). In deren Arbeit wurde als neutral geladenes Lipid ein Phosphatidylcholin (POPC) und als Lipid mit negativer Ladung ein Phosphatidylglycerol (POPG) verwendet. Die Untersuchungen an LUVs („large unilamellar vesicles“) zeigten, dass durch Crotamin bei Vesikeln mit neutraler

Membran (100 % POPC) kein Ausfluss des Vesikelinneren induziert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte bei POPC:POPG-LUVs (30 und 50 %) ein von der POPG-Konzentration abhängiger Ausfluss beobachtet werden (Costa *et al.* 2014).

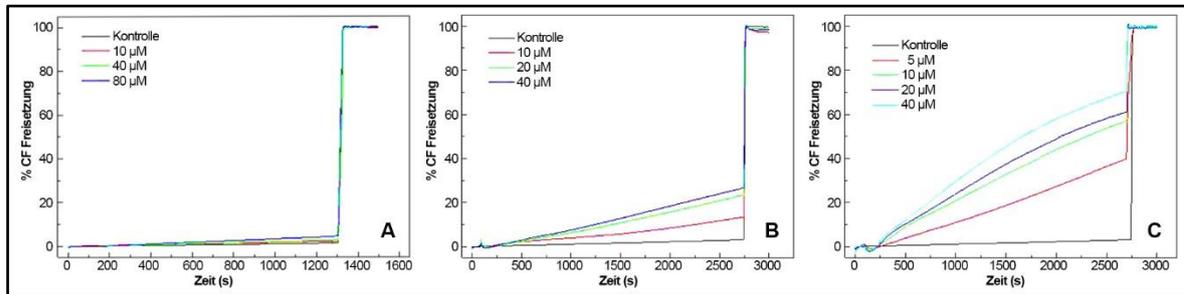


Abb. 37: Dargestellt ist der konzentrationsabhängige Ausfluss des Vesikelinneren von POPC:POPG-LUVs. Es wurden die POPG-Konzentrationen von 0, 30 und 50 % POPG (**A**, **B** und **C**) verwendet. Die jeweiligen Crotoninkonzentrationen sind links oben in den Schaubildern angegeben. Der Ausfluss wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein (CF) detektiert. 100 % CF Freisetzung entspricht der Zerstörung aller Vesikel und wurde mittels Zugabe von 20 µl zehnpromzentiger Triton X-100-Lösung induziert (Costa *et al.* 2014).

Außerdem führte die Zugabe von Crotonin bei POPC:POPG-GUVs (75:25) zu einer deutlich stärkeren Zerstörung der Vesikel. Eine Stunde nach der Crotoninzugabe waren, im Gegensatz zu 50 % intakter Vesikel, bei reinen POPC-Vesikel weniger als 20 % der GUVs intakt (Abb. 36, Costa *et al.* 2014).

Zusammengefasst sind für Membranen, die Lipide mit negativer Ladung enthalten, die folgenden Beobachtungen festzuhalten. Bei den für diese Arbeit genutzten Vesikeln führte die Anwesenheit von negativ geladen Lipiden zu einem größeren und schnelleren Einfluss von Crotonin auf die Membranfluidität. Bei den von Costa *et al.* untersuchten Vesikeln verursachte die Anwesenheit von negativ geladenen Lipiden einen stärkeren Ausfluss des Vesikelinneren (LUVs) und eine deutlich stärkeren Zerstörung (GUVs). Außerdem ist die Wirksamkeit von Crotonin gegenüber Zellen mit negativer Oberflächenladung (Lipide und Oberflächenmoleküle) stärker. Demnach hat Crotonin eine Spezifität gegenüber Membranen mit negativer Oberfläche, wobei unter anderem die Ladung der Membranlipide eine zentrale Bedeutung zu haben scheint.

Crotonin ist ein amphiphiles und hoch basisches Peptid. Auf Grund seiner Tertiärstruktur befinden sich die Seitenketten mit positiver Ladung vorwiegend auf der einen Seite des Moleküls und die hydrophoben Seitenketten auf der anderen. Der kationische Charakter von Crotonin führt einerseits zu dessen Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Andererseits ist er aber auch in die Wirkungsweise von Crotonin auf Membranen involviert.

Da die untersuchten Asolektin:Cholesterin-Vesikel Lipide mit negativer Ladung enthielten, könnten die beschriebenen Mechanismen auch den beobachteten stärkeren Einfluss von Crotamin erklären. In diesem Zusammenhang werden vorwiegend die Mechanismen der Anziehung und Bindung an die Membran diskutiert (Costa *et al.* 2014). Auf Grund seiner positiven Ladung ist davon auszugehen, dass für Crotamin die Anziehung an Membranen mit negativer Oberflächenladung größer und seine Bindung an diese stärker ist (Abb. 38A).

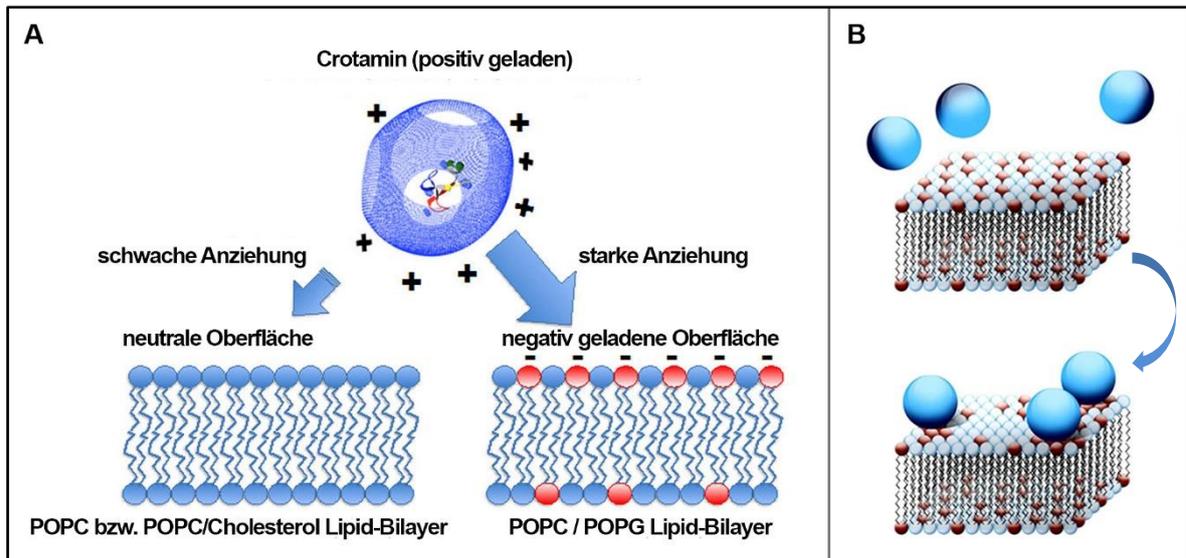


Abb. 38: (A) Interaktion von Crotamin mit neutralen bzw. negativ geladenen Membranen auf Grund der elektrostatischen Wechselwirkungen. (B) Reorganisation der Lipide: Das positiv geladene Crotamin induziert die Clusterung von Lipiden mit negativer Ladung und führt so zur Bildung von Domänen (Costa *et al.* 2014).

Bei der Betrachtung der Crotamin-induzierten Änderung der Membranfluidität fällt außerdem auf, dass die zu beobachtenden Effekte bei Asolektin:Cholesterin-Vesikeln komplexer ausfallen als bei DOPC:Cholesterin-Vesikeln. Bei DOPC-haltigen Membranen wurde unabhängig von der Cholesterinkonzentration direkt nach der Crotaminzugabe eine Fluidisierung der Membran beobachtet. Diese wurde im beobachteten Zeitraum zwar wieder etwas geringer, die Membranen blieben aber immer fluidier als vor der Zugabe von Crotamin (Abb. 30A). Wie zuvor diskutiert, beruhte die Fluidisierung der Vesikelmembran vermutlich auf der Insertion von Crotamin. Bei den Untersuchungen der DOPC:Cholesterin-Vesikeln war dies der einzige zu beobachtende Einfluss von Crotamin.

Im Falle der Asolektin:Cholesterin-Vesikeln ist der Einfluss von Crotamin schwieriger zu beschreiben. In reinen Asolektin-Vesikeln führte Crotamin zunächst zu steiferen Membranen. Erst gegen Ende der Messungen wurden diese wieder fluidier - dann allerdings deutlich fluidier als vor der Crotaminzugabe. Bei Asolektin:Cholesterin-Vesikeln wurde direkt nach der Crotaminzugabe zunächst eine Fluidisierung der Membranen beobachtet.

Darauf folgte eine Phase, in der die Membranen wieder deutlich steifer (weniger fluide) wurden. Im Falle von 5 und 10 % Cholesterin waren sie weniger fluide als vor der Crotaminzugabe. Gegen Ende der Messungen konnte aber bei allen Vesikeln wieder eine Fluidisierung der Membran beobachtet werden (Abb. 31A).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass Crotamin in Membranen, die Lipide mit negativer Ladung enthalten, mehrere Prozesse induziert, die sich gegenseitig beeinflussen. Diese Prozesse, beziehungsweise deren Zusammenspiel, scheinen außerdem von der vorherrschenden Cholesterinkonzentration abhängig zu sein.

Eine mögliche Erklärung für die an reinen Asolektinmembranen beobachtete Wirkungsweise von Crotamin könnte eine, der Fluidisierung der Membranen vorhergehende, Clusterung der Lipide mit negativer Ladung sein. Auf Grund seiner positiven Ladung kann Crotamin mit den negativen Ladungen einer Membran interagieren. Es könnte daher die Bildung von Domänen mit einem erhöhten Anteil an negativ geladenen Lipiden induzieren, beziehungsweise fördern (Abb. 38B). Die Bildung von Domänen führt innerhalb einer Membran zu Bereichen mit unterschiedlicher Fluidität. Gleichzeitig führt sie aber auch zu insgesamt festeren Membranen (Crane *et al.* 2004).

Eine solche Domänenbildung könnte der, durch die Insertion von Crotamin induzierten, Fluidisierung entweder vorhergehen, oder diese zunächst überlagern. Beruht die Abnahme der Fluidität bei asolektinhaltigen Membranen auf einer Domänenbildung, wäre diese zudem bei DOPC-haltigen Membranen nicht zu erwarten. Diese bestanden neben Cholesterin ausschließlich aus DOPC; eine Domänenbildung war daher nicht möglich. Die Zugabe von Crotamin führte bei DOPC-haltigen Membranen direkt zu deren Fluidisierung. Diese Beobachtung stützt daher die These, dass die Ursache der bei Asolektin-Vesikeln zunächst beobachteten Verfestigung der Membran auf der Bildung von Domänen beruhte.

Cholesterin kann ebenfalls die Clusterung von Lipiden mit negativer Ladung induzieren. Daher ist anzunehmen, dass es auch in den Membranen der untersuchten Asolektin:Cholesterin-Vesikel zur Bildung von solchen Domänen kam. Dies hätte einerseits die Kondensation der negativen Ladungen und somit eine stärkere Anziehung für Crotamin zur Folge. Andererseits nähme sie vermutlich die, für reine Asolektinmembranen diskutierte, von Crotamin verursachte Domänenbildung vorweg.

Demnach wäre der Einfluss von Crotamin, durch welchen es die Bildung von Domänen induziert, bei cholesterinhaltigen Asolektinmembranen schwächer als bei cholesterinfreien. Dies hätte zur Folge, dass die bei reinen Asolektinmembranen beobachtete, der Fluidisierung der Membran vorhergehende Verfestigung der Membran bei cholesterinhaltigen Membranen geringer ausfallen müsste. Die Ergebnisse der Fluiditätsmessungen stimmten mit dieser Vorhersage überein und stützten daher diese These. Vermutlich sind alle diskutierten Mechanismen an der Wirkungsweise von Crotamin beteiligt und beeinflussen sich dabei gegenseitig. Eine genauere Zuordnung der einzelnen in dieser Arbeit beobachteten Effekte war im gewählten Versuchsaufbau jedoch nicht möglich.

7.4 Crotamin beeinflusst die Kalziumhomöostase von neuronalen Zellen

Neben dem Einfluss von Crotamin auf artifizielle Membranen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch seine Wirkung auf neuronale Zellen (SH-SY5Y) untersucht. Die Untersuchungen zeigten, dass Crotamin zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der intrazellulären freien Kalziumkonzentration führte. Bis zu einer Konzentration von 10 μM war der Einfluss von Crotamin allerdings nur gering. Ab einer Konzentration von 50 μM konnte dieser dagegen deutlich beobachtet werden (Abb. 34).

Für den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration sind mehrere Funktionsweisen denkbar. Einerseits könnte Crotamin die Leitfähigkeit der Plasmamembran für Kalzium erhöhen. Auch hierfür sind wiederum mehrere Mechanismen vorstellbar. Mit Hilfe elektrophysiologischer Untersuchungen konnte von unserer Fachgruppe gezeigt werden, dass Crotamin in künstlichen Bilayern die Fähigkeit zur Ausbildung von definierten Poren besitzt (Sieber *et al.* 2014).

Im Gegensatz dazu berichteten Costa *et al.*, dass Crotamin bei GUVs die Ausbildung sogenannter Makroporen verursacht (Costa *et al.* 2014). Ob jedoch Crotamin auch in der Membran humaner Zellen die Ausbildung von Poren induziert ist bisher nicht untersucht, aber vorstellbar. Zudem existieren in der Literatur einige Arbeiten, in welchen von einer direkten Beeinflussung bestimmter Natriumkanäle durch Crotamin berichtet wurde (Filho *et al.* 1978; Tsai *et al.* 1981; Hong *et al.* 1985; Brazil *et al.* 1993). Daher wäre eine Änderung der Kalziumleitfähigkeit auch auf Grund der Beeinflussung von Rezeptoren und Ionenkanälen denkbar.

Andererseits könnte der Anstieg der Kalziumkonzentration auch auf einer intrazellulären Wirkung von Crotoxin beruhen. Die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie SH-SY5Y entstammt einem Neuroblastom. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Crotoxin eine Spezifität zur Translokation in aktiv proliferierende Zellen wie Krebs und Stammzellen besitzt (Pereira *et al.* 2011; Leon *et al.* 2011; Nascimento *et al.* 2012; Macedo *et al.* 2015).

In den zitierten Arbeiten konnte zudem die Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern beobachtet werden. Hierfür sind unterschiedliche Mechanismen in der Diskussion. Crotoxin könnte durch die direkte Interaktion mit den Membranen der Organellen, und beispielsweise deren Lyse, die Freisetzung von Kalzium verursachen (Hayashi *et al.* 2008). Es wäre aber auch eine Interaktion mit den Kanälen und Rezeptoren der Membranen möglich.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen es nicht zu, die Ursache für den intrazellulären Kalziumanstieg zu klären. Sie zeigen jedoch, dass Crotoxin einen Einfluss auf die Kalziumhomöostase der untersuchten Zellen besitzt. In einem Konzentrationsbereich von 1 und 100 μM Crotoxin konnte hierfür eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden. Außerdem dienten die Experimente der Auswahl der, für die Vesikeluntersuchungen genutzten, Crotoxin-Konzentration. Die Ergebnisse zeigten, dass die verwendete Konzentration von 50 μM Crotoxin einer für Zellen physiologisch relevanten Konzentration entspricht.

7.5 Pharmakologische Anwendung von Crotoxin

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind ein essentieller Bestandteil der Initialen Immunantwort von höheren Lebewesen (Invertebraten, Vertebraten und Pflanzen) und bilden eine erste Verteidigungslinie gegen invasive Mikroorganismen. Ihre Wirkungsweise basiert vorwiegend auf der Störung von Prozessen an der Zellmembran. Auf Grund ihrer physikochemischen Eigenschaften (kleine Größe, positive Ladung, Amphiphilie und Struktur), sowie der für ihre Wirkungsweise grundlegenden Fähigkeit zur Interaktion mit Lipidmembranen, werden viele der AMPs außerdem zu den zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) gezählt. Zudem konnte für eine Vielzahl der Peptide gezeigt werden, dass sie die Fähigkeit zur Translokation ins Zellinnere und dort zur Beeinflussung verschiedenster Prozesse besitzen.

Unabhängig vom Transzytoseweg stellt jedoch die Interaktion mit der Plasmamembran die Schüsselfähigkeit der Peptide dar. Das Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen ist daher von essentieller Bedeutung. Es ermöglicht einerseits die in der Natur stattfindenden Prozesse besser zu verstehen und ist andererseits Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Strategien in der klinischen Diagnostik und Therapie.

Die Wirkungsweise der gängigen Antibiotika ist meist sehr spezifisch und richtet sich gegen bestimmte Synthesewege der Bakterien für Zellwand, Proteine oder Nukleinsäuren. Dagegen verfolgen AMPs und CPPs mit ihren membranbeeinflussenden Eigenschaften eine völlig andere Funktionsweise. In einer Zeit, in der die Anzahl der multiresistenten Keime steigt und die der noch wirksamen Antibiotika sinkt, stellen daher AMPs einen guten Ansatz zur Entwicklung neuer Medikamente dar (Mor 2000; Mishra *et al.* 2017).

Die Membranen von Bakterien unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lipidkomposition von tierischen Zellen. Im Gegensatz zu diesen enthalten deren Membranen beispielsweise kein Cholesterin. Für antimikrobielle Peptide, deren Wirkung auf der Interaktion mit der Membran beruht, ist es daher wahrscheinlich, dass ihre Spezifität unter anderem auf der Abwesenheit von Cholesterin beruht.

Auf Grund seiner strukturellen Eigenschaften und Wirkungsweise wird Crotamin ebenfalls zu den Peptiden mit antimikrobieller und zellpenetrierender Wirkung gezählt. Es besitzt eine eher schwache Wirkung gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und eine deutlich stärkere Wirkung gegen ein breites Spektrum an Pilzen (schwach antibakteriell und stark antifugal; Yamane *et al.* 2013). Seine Wirkungsweise beruht auf dem Einbau in Membranen, der Translokation in die Zelle, sowie den darauf folgenden Veränderungen im Zellinneren. Die Fähigkeit zur Interaktion mit der Plasmamembran ist jedoch die initiale Eigenschaft von Crotamin. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es die Fähigkeit zur Insertion, der Membrandestabilisierung, der Bildung von spezifischen Poren, bis hin zur Lyse der Membran besitzt (Sieber *et al.* 2014; Costa *et al.* 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit, sowie durch die Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen, konnte gezeigt werden, dass Crotamin eine stärkere Wirkung gegenüber cholesterinfreien Membranen besitzt (siehe Kapitel 7.3). Im Gegensatz dazu waren Membranen, die Cholesterin beinhalten, vor dem Einfluss von Crotamin geschützt. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die antibakterielle Wirkung von Crotamin auf seiner Präferenz zur Interaktion mit cholesterinfreien Membranen beruht.

Ähnliche Befunde konnten auch für eine Reihe anderer AMPs und CPPs getroffen werden. So inhibiert Cholesterin beispielweise auch die Inkorporation von Alamethicin, einem Peptidantibiotika aus dem Pilz *Trichoderma viride* (Stankowski *et al.* 1989). Für das Verständnis der Funktionsweise von AMPs ist es daher wichtig, den protektiven Einfluss von Cholesterin, beziehungsweise die molekularen Ursachen für deren Spezifität gegenüber cholesterinfreien Membranen weiter zu untersuchen.

Eine weitere Eigenschaft von Crotamin ist dessen Spezifität gegenüber aktiv proliferierender Zellen (APZs), wie Krebs- und Stammzellen. Hierfür scheint die Oberflächenladung der Plasmamembran von zentraler Bedeutung zu sein. Für deren Ladung sind einerseits Oberflächenmoleküle wie beispielsweise Heparansulfat verantwortlich. So konnte beispielweise gezeigt werden, dass die Reduktion dieser Oberflächenmoleküle zu einer verminderten Wirksamkeit von Crotamin führt (Findlay *et al.* 2010).

Andererseits ist aber auch der Anteil an Lipiden mit negativer Ladung in der Plasmamembran von APZs größer als in seneszenten Zellen (Dobrzyńska *et al.* 2005). Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit, sowie die Ergebnisse anderer Gruppen, zeigten, dass Crotamin eine Präferenz gegenüber Membranen besitzt, die Lipide mit negativer Ladung enthalten (siehe Kapitel 7.3). Vermutlich beruht die Spezifität von Crotamin gegenüber APZs daher auch auf dem, in deren Plasmamembran erhöhten, Anteil an Lipiden mit negativer Ladung.

Auf Grund der Spezifität von Crotamin gegenüber APZs werden mittlerweile seine Einsatzmöglichkeiten in der Onkologie untersucht. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Crotamin war es beispielweise möglich, Tumorgewebe zu detektieren und die Bildung von Metastasen zu beobachten. Des Weiteren konnte durch Crotamin das Wachstum von Tumoren inhibiert werden, ohne dabei gesunde Zellen zu schädigen. Im Mausmodell konnte so die Lebenszeit von tumortragenden Tieren deutlich verlängert werden (Pereira *et al.* 2011; Nascimento *et al.* 2012).

Zudem könnte Crotamin auf Grund seiner zellpenetrierenden Eigenschaften für den selektiven Transport antitumoraler Wirkstoffe genutzt werden. So gelang beispielweise mittels an Crotamin gekoppelter Plasmid-DNA die selektive Transfektion von APZs (Nascimento *et al.* 2007). Crotamin ist daher ein aussichtsreicher Kandidat für die Entwicklung neuer Strategien in der Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen.

Letztlich zeigten die Untersuchungen von Crotamin, dass seine Spezifität und Wirkungsweise unter anderem von der vorherrschenden Lipidkomposition abhängig ist. Weitere Forschung könnte es in diesem Zusammenhang beispielsweise ermöglichen, die hierfür relevanten elektrostatischen Wechselwirkungen näher zu beschreiben.

Gelingt es diese bestimmten Strukturmotiven von Crotamin zuzuordnen, würde es zunächst das Verständnis der Wirkungsweise von Crotamin, beziehungsweise von AMPs im Allgemeinen verbessern. Darauf basierend kann die Suche nach ähnlichen Molekülen verfeinert werden. So könnten artifizielle Membranen mit negativer Oberflächenladung für die Suche nach CCPs mit antitumorale Wirksamkeit, sowie cholesterinhaltig Membranen für die Suche nach AMPs verwendet werden (Papo *et al.* 2003). Außerdem können die gewonnen Erkenntnisse für das Design neuer Medikamente eingesetzt werden.

Ein Fokus der aktuellen Forschung liegt dabei auf der Synthese kurzer, von AMPs und CPPs abgeleiteter Peptidfragmente, welche weiterhin eine bestimmte Wirksamkeit zeigen. Sie dienen beispielsweise der Entwicklung neuer antibakterieller oder antitumorale Therapeutika (Powers *et al.* 2003; Hancock *et al.* 2006). So wurden von Crotamin unter anderem die beiden Fragmente C1 und C2 (AS 2-18 bzw. 27-39) synthetisiert. Sie besitzen weiterhin die antimikrobielle Wirkung von Crotamin, wobei ihre Wirksamkeit sogar stärker ist als die von nativem Crotamin (Dal Mas *et al.* 2017).

Ein weiteres Beispiel ist die Synthese von sogenannten NrTPs („Nucleolar-Targeting Peptides“). Als NrTPs wird eine Gruppe von Crotamin abgeleiteter Peptiden bezeichnet, welche weiterhin eine sogenannte NLS („nucleus localization sequence“) besitzen. Wie Crotamin besitzen sie die Fähigkeit zur selektiven Translokation in APZs. Auf Grund der NLS ist es daher möglich, an die NrTPs gekoppelte Moleküle in Richtung des Zellkerns zu transportieren (Rodrigues *et al.* 2012; Rádis-Baptista *et al.* 2012; Rodrigues *et al.* 2015).

7.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Monolayern aus Asolektin gearbeitet. Um den Einfluss einzelner Lipide zu untersuchen, könnten in weiteren Versuchen Monolayer mit definierter Lipidkompositionen verwendet werden. Hierdurch könnte zunächst der Einfluss von Lipiden mit negativer Ladung auf die Einbaugeschwindigkeit von Crotamin untersucht werden. Ergänzend könnte das, im Boden des Trogs vorhandene Fenster, durch die Erweiterung der verwendeten Filmwaage um ein Mikroskop zur Beobachtung des Monolayers genutzt werden. Durch die Fluoreszenzmarkierung einzelner Lipide könnte beispielsweise geklärt werden, ob Crotamin die Bildung bestimmter Domänen induziert.

Auch bei der Untersuchungen der Membranfluidität von Vesikeln würde die Verwendung weiterer Lipidkompositionen ermöglichen, den Einfluss von Crotamin genauer zu untersuchen. Zudem wäre, neben der Dotierung der Vesikelmembran mit DPH, eine zusätzliche Befüllung des Vesikelinneren mit Carboxyfluorescein (CF) sinnvoll. Dies würde es ermöglichen, die Fluidität, sowie die Integrität, der Membran parallel zu untersuchen.

Des Weiteren wäre es mit Hilfe einer „Nanoparticle Tracking“-Analyse möglich, die Größe und Anzahl der Vesikel gleichzeitig zu beobachten. Da bei dieser Methode die Bewegung der Vesikel einzeln analysiert wird, kann durch deren Anzahl eine mögliche Zerstörung, sowie aufgrund ihrer Beweglichkeit eine eventuelle Größenänderung, zeitgleich erfasst werden.

Zudem wäre es naheliegend, die durchgeführten Experimente mit pharmakologisch wirksamen Peptidfragmenten von Crotamin (bspw. C1 und C2, siehe 7.6) zu wiederholen. Eventuell ließen sich dadurch für die Wirkungsweise von Crotamin Rückschlüsse bezüglich der Funktion einzelner Struktur motive machen. Die verwendeten Methoden könnten außerdem für die Suche nach weiteren Peptiden mit ähnlicher Wirkung genutzt werden. Hierzu könnten beispielsweise zunächst Peptide auf Grund ihrer Struktur als Kandidaten gewählt, und anschließend deren Wirksamkeit gegenüber Membranen untersucht werden.

Auch den Einfluss der Cholesterinkonzentration von zellulären Membranen auf die antimikrobielle Wirkung von Crotamin gilt es weiter zu untersuchen. Hierfür könnte zum Beispiel, mit Hilfe von Methyl- β -Cyclodextrin, die Cholesterinkonzentration der Membran

gesenkt werden. Dies würde den Vergleich unterschiedlicher Cholesterinkonzentration innerhalb eines Zelltyps zulassen.

Zudem könnte mit Hilfe von Patch Clamp Experimenten untersucht werden, ob Crotamin die Leitfähigkeit der Zellmembran für bestimmte Ionen verändert. So könnte beispielsweise untersucht werden, ob der intrazelluläre Kalziumanstieg aus einem Kalziumeinstrom, oder auf der Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern resultiert. Durch die Verwendung spezifischer Antagonisten könnte dabei außerdem geklärt werden, ob eine eventuell veränderte Leitfähigkeit der Membran auf der Porenbildung von Crotamin, oder auf der Änderung der Offenwahrscheinlichkeit bestimmter Ionenkanälen beruht.

8 Literaturverzeichnis

- Alexander, G.; Grothusen, J.; Zepeda, H.; Schwartzman, R. J. (1988): Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 26 (10), S. 953–960.
- Alves da Silva, J. A.; Oliveira, K. C.; Camillo, M. A. P. (2011): Gyroxin increases blood-brain barrier permeability to Evans blue dye in mice. In: *Toxicon* 57 (1), S. 162–167. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.06.027.
- Amora, Daniela N.; Sousa, Ticiania M.; Martins, Alice M.C.; Barbosa, Paulo S.F.; Magalhães, Marta R.; Toyama, Marcus H. et al. (2006): Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. In: *Toxicon* 47 (3), S. 260–264. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.10.007.
- Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M. R. (1985): Effects of crotoxin on autonomic neuromuscular transmission in the guinea-pig myenteric plexus and vas deferens. In: *Toxicon* 23 (6), S. 963–972. DOI: 10.1016/0041-0101(85)90389-7.
- Ando, Jun; Kinoshita, Masanao; Cui, Jin; Yamakoshi, Hiroyuki; Dodo, Kosuke; Fujita, Katsumasa et al. (2015): Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (15), S. 4558–4563. DOI: 10.1073/pnas.1418088112.
- Baldi, A.; Mordoh, J.; Medrano, E. E.; Bonaparte, Y. P. de; Lustig, E. S. de; Rumi, L. (1988): Studies to determine the possible antitumoral properties of Cobra venom and of Crotoxin Complex A and B. In: *Medicina* 48 (4), S. 337–344.
- Barrabin, H.; Martiarena, J. L.; Vidal, J. C.; Barrio, A. (1978): Isolation and characterization of gyroxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Toxins - Animal, Plant and Microbial*, S. 113–133. DOI: 10.1016/B978-0-08-022640-8.50017-2.
- Barrio, A. (1961): Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Acta Physiologica Latinoamericana* (11), S. 224.
- Beghini, Daniela G.; Rodrigues-Simioni, Léa; Toyama, M.H; Novello, J.C; da Cruz-Höfling, Maria Alice; Marangoni, S. (2004): Neurotoxic and myotoxic actions of crotoxin-like and *Crotalus durissus cascavella* whole venom in the chick biventer cervicis preparation. In: *Toxicon* 43 (3), S. 255–261. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.12.001.
- Berkowitz, Max L. (2009): Detailed molecular dynamics simulations of model biological membranes containing cholesterol. In: *Biochimica et biophysica acta* 1788 (1), S. 86–96. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.09.009.

- Bieber, A. L.; Nedelkov, D. (1997): Structural, Biological and Biochemical Studies of Myotoxin a And Homologous Myotoxins. In: *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* 16 (1-2), S. 33–52. DOI: 10.3109/15569549709064092.
- Blumling III, James P.; Silva, Gabriel A. (2012): Targeting the brain: advances in drug delivery. In: *Current pharmaceutical biotechnology* 13 (12), S. 2417–2426.
- Boggs, J. M. (1987): Lipid intermolecular hydrogen bonding. Influence on structural organization and membrane function. In: *BBA - Reviews on Biomembranes* 906 (3), S. 353–404. DOI: 10.1016/0304-4157(87)90017-7.
- Bon, Cassian; Changeux, Jean-Pierre; Jeng, Tzzy-Wen; Fraenkel-Conrat, Heinz (1979): Postsynaptic Effects of Crotoxin and of Its Isolated Subunits. In: *European Journal of Biochemistry* 99 (3), S. 471–482. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13278.x.
- Boni-Mitake, M.; Costa, H.; Vassilieff, V. S.; Rogero, J. R. (2006): Distribution of (125)I-labeled crotoxin in mice tissues. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 48 (5), S. 550–555. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.07.005.
- Brazil, O. V. (1966): Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. In: *Memorias do Instituto Butantan* 33 (3), S. 981–992.
- Brazil, O. V. (1972): Neurotoxins from the South American rattle snake venom. In: *Taiwan yi xue hui za zhi. Journal of the Formosan Medical Association* 71 (6), S. 394–400.
- Brazil, O. V.; Excell, B. J. (1971): Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. In: *The Journal of physiology* 212 (2), 34P-35P.
- Brazil, O. V.; Fontana, M. D. (1993): Toxins as tools in the study of sodium channel distribution in the muscle fibre membrane. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 31 (9), S. 1085–1098.
- Brazil, O. V.; Fontana, M. D.; Heluany, N. F. (2000): Nature of the postsynaptic action of crotoxin at guinea-pig diaphragm end-plates. In: *Journal of natural toxins* 9 (1), S. 33–42.
- Breithaupt, H. (1976): Neurotoxic and myotoxic effects of crotalus phospholipase A and its complex with crotapotin. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 292 (3), S. 271–278. DOI: 10.1007/BF00517389.
- Breithaupt, Henning; Rübsamen, Klaus; Habermann, Ernst (1974): Biochemistry and Pharmacology of the Crotoxin Complex. In: *European Journal of Biochemistry* 49 (2), S. 333–345. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03838.x.
- Brogden, Kim A. (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? In: *Nature reviews. Microbiology* 3 (3), S. 238–250. DOI: 10.1038/nrmicro1098.

- Brown, D. A.; London, E. (2000): Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (23), S. 17221–17224. DOI: 10.1074/jbc.R000005200.
- Bulet, Philippe; Stocklin, Reto; Menin, Laure (2004): Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. In: *Immunological reviews* 198, S. 169–184.
- Calandra, Thierry; Marchetti, Oscar (2004): Clinical trials of antifungal prophylaxis among patients undergoing surgery. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39 Suppl 4, S185-92. DOI: 10.1086/421955.
- Cameron, D. L.; Tu, A. T. (1978): Chemical and functional homology of myotoxin a from prairie rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake venom. In: *Biochimica et biophysica acta* 532 (1), S. 147–154.
- Camillo, M. A.; Arruda Paes, P. C.; Troncone, L. R.; Rogero, J. R. (2001): Gyroxin fails to modify in vitro release of labelled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 39 (6), S. 843–853.
- Cardi, B. A.; Nascimento, N.; Rogero, J. R.; Andrade Júnior, H. F. (1992): Immunochemical detection of purified crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom in the motor end plate of striated muscle in CBA/J mice. In: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25 (9), S. 905–908.
- Cardoso, D. F.; Lopes-Ferreira, M.; Faquim-Mauro, E. L.; Macedo, M. S.; Farsky, S. H. (2001): Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. In: *Mediators of Inflammation* 10 (3), S. 125–133.
- Cardoso, D. F.; Mota, I. (1997): Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. In: *Toxicon* 35 (4), S. 607–612. DOI: 10.1016/S0041-0101(96)00134-1.
- Castro, Fabiano R.; Farias, Alessandro S.; Proença, Patricia L.F.; La Hoz, Cristiane de; Langone, Francesco; Oliveira, Elaine C. et al. (2007): The effect of treatment with crotapotin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. In: *Toxicon* 49 (3), S. 299–305. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.09.028.
- Chang, C. C.; Hong, S. J.; Su, M. J. (1983): A study on the membrane depolarization of skeletal muscles caused by a scorpion toxin, sea anemone toxin II and crotamine and the interaction between toxins. In: *British journal of pharmacology* 79 (3), S. 673–680.
- Chang, C. Chiung; Lee, J. Dong (1977a): Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like β -bungarotoxin. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 296 (2), S. 159–168. DOI: 10.1007/BF00508469.

- Chang, C. Chiung; Su, M. Jai; Lee, J. Don; Eaker, David (1977b): Effects of Sr²⁺ and Mg²⁺ on the phospholipase A and the presynaptic neuromuscular blocking actions of β -bungarotoxin, crotoxin and taipoxin. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 299 (2), S. 155–161. DOI: 10.1007/BF00498557.
- Chen, Pei-Chun; Hayashi, Mirian A. F.; Oliveira, Eduardo Brandt; Karpel, Richard L. (2012): DNA-interactive properties of crotamine, a cell-penetrating polypeptide and a potential drug carrier. In: *PloS one* 7 (11), e48913. DOI: 10.1371/journal.pone.0048913.
- Conte, T. C.; Franco, D. V.; Baptista, I. L.; Bueno Jr., C. R.; Selistre-de-Araújo, H. S.; Brum, P. C. et al. (2008): Radicol improves regeneration of skeletal muscle previously damaged by crotoxin in mice. In: *Toxicon* 52 (1), S. 146–155. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.04.177.
- Corin, R. E.; Viskatis, L. J.; Vidal, J. C.; Etcheverry, M. A. (1993): Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro. In: *Investigational New Drugs* 11 (1), S. 11–15. DOI: 10.1007/BF00873905.
- Coronado, Monika A.; Gabdulkhakov, Azat; Georgieva, Dessislava; Sankaran, Banumathi; Murakami, Mario T.; Arni, Raghuvir K.; Betzel, Christian (2013): Structure of the polypeptide crotamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 69 (Pt 10), S. 1958–1964. DOI: 10.1107/S0907444913018003.
- Costa, Bruno A.; Sanches, Leonardo; Gomide, Andreza Barbosa; Bizerra, Fernando; Dal Mas, Caroline; Oliveira, Eduardo B. et al. (2014): Interaction of the rattlesnake toxin crotamine with model membranes. In: *The journal of physical chemistry. B* 118 (20), S. 5471–5479. DOI: 10.1021/jp411886u.
- Costa, Luis A.; Miles, Horacio; Araujo, Carlos E.; Gonzalez, Salvador; Villarrubia, Vicente G. (1998): Tumor Regression of Advanced Carcinomas Following Intra- and/or Peri-Tumoral Inoculation with VRCTC-310 in Humans: Preliminary Report of Two Cases. In: *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 20 (1), S. 15–25. DOI: 10.3109/08923979809034806.
- Crane, Jonathan M.; Tamm, Lukas K. (2004): Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes. In: *Biophysical Journal* 86 (5), S. 2965–2979. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74347-7.
- Cura, J. E.; Blanzaco, D. P.; Brisson, C.; Cura, M. A.; Cabrol, R.; Larrateguy, L. et al. (2002): Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in patients with advanced cancer. In: *Clinical Cancer Research* 8 (4), S. 1033–1041.
- da Fonseca, José Reynaldo (2007): *Crotalus durissus terrificus*. Cobra cascavel 280707- 23 04 40s - 49 06 55w REFON (4)a.jpg. Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/wiki/Schauer->

Klapperschlange#/media/File:Cobra_cascavel_280707-_23_04_40s_-_49_06_55w_REFON_(4)a.jpg.

Dal Mas, C.; Pinheiro, D. A.; Campeiro, J. D.; Mattei, B.; Oliveira, V.; Oliveira, E. B. et al. (2017): Biophysical and biological properties of small linear peptides derived from crostamine, a cationic antimicrobial/antitumoral toxin with cell penetrating and cargo delivery abilities. In: *Biochimica et biophysica acta*. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.09.006.

Daly, Trevor; Wang, Minghui; Regen, Steven L. (2011): The Origin of Cholesterol's Condensing Effect. In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 27 (6), S. 2159–2161. DOI: 10.1021/la105039q.

Davies, M. A.; Schuster, H. F.; Brauner, J. W.; Mendelsohn, Richard (1990): Effects of cholesterol on conformational disorder in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. A quantitative IR study of the depth dependence. In: *Biochemistry* 29 (18), S. 4368–4373. DOI: 10.1021/bi00470a016.

Delot, E.; Bon, C. (1992): Differential effects of presynaptic phospholipase A2 neurotoxins on Torpedo synaptosomes. In: *Journal of neurochemistry* 58 (1), S. 311–319.

Delot, E.; Bon, C. (1993): Model for the interaction of crostoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes. In: *Biochemistry* 32 (40), S. 10708–10713.

Dobrzyńska, Izabela; Szachowicz-Petelska, Barbara; Sulkowski, Stanisław; Figaszewski, Zbigniew (2005): Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 276 (1), S. 113–119. DOI: 10.1007/s11010-005-3557-3.

Donato, Nicholas J.; Martin, Christopher A.; Perez, Margot; Newman, Robert A.; Vidal, Juan C.; Etcheverry, Martin (1996): Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crostoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin. In: *Biochemical Pharmacology* 51 (11), S. 1535–1543. DOI: 10.1016/0006-2952(96)00097-4.

Echard, Arnaud; Burgess, David (2014): The changing lipidome during cell division. In: *Cell* 156 (3), S. 394–395. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.018.

Endo, T.; Oya, M.; Ozawa, H.; Kawano, Y.; Giglio, J. R.; Miyazawa, T. (1989): A proton nuclear magnetic resonance study on the solution structure of crostamine. In: *Journal of protein chemistry* 8 (6), S. 807–815.

Fadel, Valmir; Bettendorff, Pascal; Herrmann, Torsten; Azevedo, Walter F. de; Oliveira, Eduardo B.; Yamane, Tetsuo; Wüthrich, Kurt (2005): Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crostamine from *Crotalus durissus terrificus*. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 46 (7), S. 759–767. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.07.018.

Faili, A.; Randon, J.; Francischetti, I. M.; Vargaftig, B. B.; Hatmi, M. (1994): Convulxin-induced platelet aggregation is accompanied by a powerful activation of the phospholipase C pathway. In: *Biochem. J.* 298 (1), S. 87–91. DOI: 10.1042/bj2980087.

Faure, Grazyna; Bon, Cassian (1988): Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. In: *Biochemistry* 27 (2), S. 730–738. DOI: 10.1021/bi00402a036.

Faure, Grazyna; Čopič, Alenka; Le Porrier, Sabine; Gubenšek, Franc; Bon, Cassian; Križaj, Igor (2003): Crotoxin acceptor protein isolated from Torpedo electric organ. Binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. In: *Proceedings of the Fifth Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins* 41 (4), S. 509–517. DOI: 10.1016/S0041-0101(02)00394-X.

Faure, Grazyna; HARVEY, Alan L.; THOMSON, Elisabeth; Saliou, Bernard; RADVANYI, François; Bon, Cassian (1993): Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. In: *European Journal of Biochemistry* 214 (2), S. 491–496. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17946.x.

Faure, Grazyna; Saul, Frederick (2012): Crystallographic characterization of functional sites of crotoxin and ammodytoxin, potent β -neurotoxins from Viperidae venom. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 60 (4), S. 531–538. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.05.009.

Faure, Grazyna; Xu, Haijin; Saul, Frederick A. (2011): Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric beta-neurotoxin. In: *Journal of molecular biology* 412 (2), S. 176–191. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.07.027.

Filho, A. Pellegrini; Brazil, O. Vital; Fontana, M. Dias; Laure, C. J. (1978): The action of crotamine on skeletal muscle: An electrophysiological study (*Toxins - Animal, Plant and Microbial*), S. 375–382. DOI: 10.1016/B978-0-08-022640-8.50036-6.

Findlay, Brandon; Zhanel, George G.; Schweizer, Frank (2010): Cationic amphiphiles, a new generation of antimicrobials inspired by the natural antimicrobial peptide scaffold. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (10), S. 4049–4058. DOI: 10.1128/AAC.00530-10.

Fletcher, Jeffrey E.; Hubert, Marcy; Wieland, Steven J.; Gong, Qi-Hua; Jiang, Ming-Shi (1996): Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. In: *Proceedings of the Fifth Pan American Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins* 34 (11), S. 1301–1311. DOI: 10.1016/S0041-0101(96)00105-5.

- Francischetti, Ivo M.B.; Saliou, Bernard; Leduc, Mireille; R. Carlini, Celia; Hatmi, Mohamed; Randon, Jacques et al. (1997): CONvulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom, specifically binds to platelets. In: *Toxicon* 35 (8), S. 1217–1228. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00021-4.
- Furukawa, K.-I.; Funayama, K.; Ohkura, M.; Oshima, Y.; Tu, A. T.; Ohizumi, Y. (1994): Ca²⁺ release induced by myotoxin a, a radio-labellable probe having novel Ca²⁺ release properties in sarcoplasmic reticulum. In: *British journal of pharmacology* 113 (1), S. 233–239. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb16199.x.
- Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. (2001): Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (8), S. 5836–5840. DOI: 10.1074/jbc.M007540200.
- Garcia, Flavia; Toyama, Marcos H.; Castro, Fabiano R.; Proença, Patrícia L.; Marangoni, Sergio; Santos, Leonilda M.B. (2003): Crota-potin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE₂ synthesis. In: *Toxicon* 42 (4), S. 433–437. DOI: 10.1016/S0041-0101(03)00198-3.
- Gehl, J. (2003): Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. In: *Acta physiologica Scandinavica* 177 (4), S. 437–447. DOI: 10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x.
- Gonçalves, J. M. (1956): Purification and properties of crota-mine. In: *In Venoms*, eds. E. E. Buckley and N. Porges (44), S. 261–273.
- Gonçalves, J. M.; Arantes, E. G. (1956): Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. III—Determinação quantitativa de crota-mina no veneno de cascavel brasileira. In: *An. Acad. Bras. Cienc* 28, S. 369–371.
- Gonçalves, J. M.; Polson, A. (1947): The electrophoretic analysis of snake venoms. In: *Archives of biochemistry* 13 (2), S. 253–259.
- Gopalakrishnakone, P.; Dempster, D. W.; Hawgood, Barbara J.; Elder, H. Y. (1984a): Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. In: *Toxicon* 22 (1), S. 85–98. DOI: 10.1016/0041-0101(84)90141-7.
- Gopalakrishnakone, P.; Hawgood, Barbara J. (1984b): Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. In: *Toxicon* 22 (5), S. 791–804. DOI: 10.1016/0041-0101(84)90162-4.
- Gutierrez, Vanessa Pacciari; Konno, Katsuhiko; Chacur, Marucia; Sampaio, Sandra Coccuzzo; Picolo, Gisele; Brigatte, Patricia et al. (2008): Crota-lyphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. In: *European journal of pharmacology* 594 (1–3), S. 84–92. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.07.053.

- Gutiérrez, José María; Alberto Ponce-Soto, Luis; Marangoni, Sergio; Lomonte, Bruno (2008): Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A2: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA2 homologue. In: *Toxicon* 51 (1), S. 80–92. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.08.007.
- Hadler, W. A.; Brazil, O. V. (1966): Pharmacology of crystalline crotoxin. IV. Nephrotoxicity. In: *Memorias do Instituto Butantan* 33 (3), S. 1001–1008.
- Hampe, O. G. (1989): Model studies of crotamine self-association. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 22 (1), S. 17–24.
- Hancock, Robert E. W.; Sahl, Hans-Georg (2006): Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. In: *Nature biotechnology* 24 (12), S. 1551–1557. DOI: 10.1038/nbt1267.
- Hanke, Wolfgang; Hanke, Rainer (1997): Methoden der Membranphysiologie. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Labor im Fokus).
- Hawgood, Barbara J.; Sa, Sonia Santana de (1979): Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. In: *Neuroscience* 4 (2), S. 293–303. DOI: 10.1016/0306-4522(79)90090-3.
- Hawgood, Barbara J.; Smith, J. W. (1977): The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crotapotin complex isolated from venom of the south american rattlesnake. In: *British journal of pharmacology* 61 (4), S. 597–606. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1977.tb07553.x.
- Hayashi, Mirian A. F.; Nascimento, Fábio D.; Kerkis, Alexandre; Oliveira, Vitor; Oliveira, Eduardo B.; Pereira, Alexandre et al. (2008): Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 52 (3), S. 508–517. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.06.029.
- Heberle, Frederick A.; Feigenson, Gerald W. (2011): Phase separation in lipid membranes. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (4). DOI: 10.1101/cshperspect.a004630.
- Hendon, R. A.; Fraenkel-Conrat, H. (1971): Biological roles of the two components of crotoxin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (7), S. 1560–1563.
- Hernández, Miguelina; Scannone, Héctor; Finol, Héctor J.; Pineda, Maria E.; Fernández, Irma; Vargas, Alba M. et al. (2007): Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. In: *Experimental and Toxicologic Pathology* 59 (2), S. 129–137. DOI: 10.1016/j.etp.2007.04.002.

- Hong, S. J.; Chang, C. C. (1985): Electrophysiological studies of myotoxin a, isolated from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom, on murine skeletal muscles. In: *Toxicon* 23 (6), S. 927–937. DOI: 10.1016/0041-0101(85)90385-X.
- Hoskin, David W.; Ramamoorthy, Ayyalusamy (2008): Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (2), S. 357–375. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.11.008.
- Hseu, M. J.; Yen, C.-Y.; Tseng, C.-C.; Tzeng, M.-C. (1997): Purification and partial amino acid sequence of a novel protein of the reticulocalbin family. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239 (1), S. 18–22. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7416.
- Hseu, Ming-Jhy; Yen, Chon-Ho; Tzeng, Mu-Chin (1999): Crocalbin. A new calcium-binding protein that is also a binding protein for crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2. In: *FEBS letters* 445 (2-3), S. 440–444. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)00177-5.
- Jamieson, G. A.; Robinson, D. M. (1977): Mammalian Cell Membranes. Volume 2: The Diversity of Membranes. Burlington: Elsevier Science. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780408707237>.
- Jendrasiak, Gordon L.; Hasty, James H. (1974): The hydration of phospholipids. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 337 (1), S. 79–91. DOI: 10.1016/0005-2760(74)90042-3.
- Kalderon, D.; Roberts, B. L.; Richardson, W. D.; Smith, A. E. (1984): A short amino acid sequence able to specify nuclear location. In: *Cell* 39 (3 Pt 2), S. 499–509.
- Kaltenbach, Stefan; Bosch, Bettina; Sieber, Michaela (2014): Crotoxin, a small peptide toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. Purification and characterization of its membrane-modifying properties. Annual Meeting of the German Biophysical Society (DGfB). DGfB. Lübeck, 14.09.2014.
- Kattah, L. S.; Santoro, M. M.; Diniz, C. R.; Lima, M. E. de (2000): Crotoxin, the major toxin from the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, inhibits 3H-choline uptake in guinea pig ileum. In: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 (9), S. 1093–1097.
- Kawano, Yoshio; Laure, Carlos J.; Giglio, José R. (1982): Laser raman study on crotoxin. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 705 (1), S. 20–25. DOI: 10.1016/0167-4838(82)90330-2.
- Kerkis, Alexandre; Hayashi, Mirian A. F.; Yamane, Tetsuo; Kerkis, Irina (2006): Properties of cell penetrating peptides (CPPs). In: *IUBMB life* 58 (1), S. 7–13. DOI: 10.1080/15216540500494508.
- Kerkis, Alexandre; Kerkis, Irina; Rádis-Baptista, Gandhi; Oliveira, Eduardo B.; Vianna-Morgante, Angela M.; Pereira, Lygia V.; Yamane, Tetsuo (2004):

- Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (12), S. 1407–1409. DOI: 10.1096/fj.03-1459fje.
- Kerkis, Irina; Hayashi, Mirian A. F.; Prieto da Silva, Alvaro R B; Pereira, Alexandre; De Sá Júnior, Paulo Luiz; Zaharenko, Andre J. et al. (2014): State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. In: *BioMed research international* 2014, S. 675985. DOI: 10.1155/2014/675985.
- Konno, Katsuhiko; Picolo, Gisele; Gutierrez, Vanessa P.; Brigatte, Patrícia; Zambelli, Vanessa O.; Camargo, Antonio C.M.; Cury, Yara (2008): Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. In: *Peptides* 29 (8), S. 1293–1304. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.04.003.
- Kouyoumdjian, J. A.; Harris, J. B.; Johnson, M. A. (1986): Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. In: *Toxicon* 24 (6), S. 575–583. DOI: 10.1016/0041-0101(86)90178-9.
- Križaj, I.; Faure, G.; Gubenšek, F.; Bon, C. (1996): Re-examination of crotoxin-membrane interactions. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 34 (9), S. 1003–1009. DOI: 10.1016/0041-0101(96)00064-5.
- Križaj, Igor; Faure, Grazyna; Gubenšek, Franc; Bon, Cassian (1997): Neurotoxic Phospholipases A2 Ammodytoxin and Crotoxin Bind to Distinct High-Affinity Protein Acceptors in *Torpedo marmorata* Electric Organ. In: *Biochemistry* 36 (10), S. 2779–2787. DOI: 10.1021/bi9612374.
- Landucci, E. C.; Antunes, E.; Donato, J. L.; Faro, R.; Hyslop, S.; Marangoni, S. et al. (1995): Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. In: *British journal of pharmacology* 114 (3), S. 578–583.
- Lange, Elizabeth C. M. de (2012): The physiological characteristics and transcytosis mechanisms of the blood-brain barrier (BBB). In: *Current pharmaceutical biotechnology* 13 (12), S. 2319–2327.
- Laure, C. J. (1975): The primary structure of crotamine (author's transl). In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 356 (2), S. 213–215.
- Leduc, Mireille; Bon, Cassian (1998): Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Biochem. J.* 333 (2), S. 389. DOI: 10.1042/bj3330389.
- Lee, C. Y. (1972): Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. In: *Annual review of pharmacology* 12, S. 265–286.
- Lee, Chen-Yuan (Hg.) (1979): Snake Venoms. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Handbook of Experimental Pharmacology, 52).

- Leon, Guillermo; Sanchez, Laura; Hernandez, Andres; Villalta, Mauren; Herrera, Maria; Segura, Alvaro et al. (2011): Immune response towards snake venoms. In: *Inflammation & allergy drug targets* 10 (5), S. 381–398.
- Macedo, Sharon Rose A.; Barros, Neuza B. de; Ferreira, Amália S.; Moreira-Dill, Leandro S.; Calderon, Leonardo A.; Soares, Andreimar M.; Nicolete, Roberto (2015): Biodegradable microparticles containing crostamine isolated from *Crotalus durissus terrificus* display antileishmanial activity in vitro. In: *Pharmacology* 95 (1-2), S. 78–86. DOI: 10.1159/000371391.
- Magarkar, Aniket; Dhawan, Vivek; Kallinteri, Paraskevi; Viitala, Tapani; Elmowafy, Mohammed; Róg, Tomasz; Bunker, Alex (2014): Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in saline solution. In: *Scientific reports* 4, S. 5005. DOI: 10.1038/srep05005.
- Mancin, Adriana C.; Soares, Andreimar M.; Andrião-Escarso, Silvia H.; Faça, Vitor M.; Greene, Lewis J.; Zuccolotto, Sérgio et al. (1998): The analgesic activity of crostamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. A biochemical and pharmacological study. In: *Toxicon* 36 (12), S. 1927–1937. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00117-2.
- Marchi-Salvador, D. P.; Correa, L. C.; Magro, A. J.; Oliveira, C. Z.; Am Soares; Fontes (2008): Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crostoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A2 formed by two isoforms of crostoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Proteins* 72 (3), S. 883–891. DOI: 10.1002/prot.21980.
- Marlas, G. (1985): Isolation and characterization of the alpha and beta subunits of the platelet-activating glycoprotein from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. In: *Biochimie* 67 (12), S. 1231–1239.
- Marlas, G.; Joseph, D.; Huet, C. (1983): Subunit structure of a potent platelet-activating glycoprotein isolated from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. In: *Biochimie* 65 (11-12), S. 619–628.
- Maroti, Gergely; Kereszt, Attila; Kondorosi, Eva; Mergaert, Peter (2011): Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. In: *Research in microbiology* 162 (4), S. 363–374. DOI: 10.1016/j.resmic.2011.02.005.
- Marsh, Derek (2009): Cholesterol-induced fluid membrane domains. A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788 (10), S. 2114–2123. DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.08.004.
- Martins, Alice M.C; Toyama, Marcos H.; Havt, Alexandre; Novello, José Camillo; Marangoni, Sergio; Fonteles, Manassés C.; Monteiro, Helena S.A (2002): Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. In: *Toxicon* 40 (8), S. 1165–1171. DOI: 10.1016/S0041-0101(02)00119-8.

- Martins, M; Lamar, W. W. (2010): *Crotalus durissus*. Hg. v. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T178477A7554740. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T178477A7554740.en>.
- Mattjus, Peter; Slotte, J.Peter (1996): Does cholesterol discriminate between sphingomyelin and phosphatidylcholine in mixed monolayers containing both phospholipids? In: *Chemistry and Physics of Lipids* 81 (1), S. 69–80. DOI: 10.1016/0009-3084(96)02535-2.
- McIntosh, Thomas J. (1978): The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 513 (1), S. 43–58. DOI: 10.1016/0005-2736(78)90110-4.
- McMullen, Todd P. W.; Lewis, Ruthven N. A. H.; McElhaney, Ronald N. (1993): Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. In: *Biochemistry* 32 (2), S. 516–522. DOI: 10.1021/bi00053a016.
- Melo, Paulo A.; Burns, Craig F.; Blankemeyer, James T.; Ownby, Charlotte L. (2004): Membrane depolarization is the initial action of crotoxin on isolated murine skeletal muscle. In: *Toxicon* 43 (2), S. 111–119. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.10.029.
- Milletti, Francesca (2012): Cell-penetrating peptides. Classes, origin, and current landscape. In: *Drug discovery today* 17 (15-16), S. 850–860. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.03.002.
- Mishra, Biswajit; Reiling, Scott; Zarena, D.; Wang, Guangshun (2017): Host defense antimicrobial peptides as antibiotics. Design and application strategies. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 38 (Supplement C), S. 87–96. DOI: 10.1016/j.cbpa.2017.03.014.
- Miyabara, E.H; Tostes, R.C; Selistre de Araújo, H.S; Aoki, M.S; Salvini, T.F; Moriscot, A.S (2004a): Cyclosporin A attenuates skeletal muscle damage induced by crotoxin in rats. In: *Toxicon* 43 (1), S. 35–42. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.10.014.
- Miyabara, E.H; Tostes, R.C; Selistre-de-Araújo, H.S; Aoki, M.S; Moriscot, A.S (2004b): Role of nitric oxide in myotoxic activity induced by crotoxin in vivo. In: *Toxicon* 43 (4), S. 425–432. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.02.012.
- Monteiro, H. S.; da Silva, I. M.; Martins, A. M.; Fonteles, M. C. (2001): Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 34 (10), S. 1347–1352.
- Mor, Amram (2000): Peptide-based antibiotics. A potential answer to raging antimicrobial resistance. In: *Drug Dev. Res.* 50 (3-4), S. 440–447. DOI: 10.1002/1098-2299(200007/08)50:3/4<440::AID-DDR27>3.0.CO;2-4.

- Mouritsen, O. G.; Jørgensen, K. (1994): Dynamical order and disorder in lipid bilayers. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 73 (1-2), S. 3–25. DOI: 10.1016/0009-3084(94)90171-6.
- Muniz, Zilda M.; Diniz, C. R. (1989): The effect of crotoxin on the longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the guinea pig ileum. In: *Neuropharmacology* 28 (7), S. 741–747. DOI: 10.1016/0028-3908(89)90160-3.
- Murakami, M. T.; Zela, S. P.; Gava, L. M.; Michelin-Duarte, S.; Cintra, A.C.O.; Arni, R. K. (2003): Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked $\alpha 4\beta 4$ cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310 (2), S. 478–482. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.09.032.
- Nascimento, Fabio D.; Sancey, Lucie; Pereira, Alexandre; Rome, Claire; Oliveira, Vitor; Oliveira, Eduardo B. et al. (2012): The natural cell-penetrating peptide crotamine targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. In: *Molecular pharmaceutics* 9 (2), S. 211–221. DOI: 10.1021/mp2000605.
- Nascimento, Fábio Dupart; Hayashi, Mirian A. F.; Kerkis, Alexandre; Oliveira, Vitor; Oliveira, Eduardo B.; Rádis-Baptista, Gandhi et al. (2007): Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (29), S. 21349–21360. DOI: 10.1074/jbc.M604876200.
- Needham, D.; Nunn, R. S. (1990): Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. In: *Biophysical Journal* 58 (4), S. 997–1009. DOI: 10.1016/S0006-3495(90)82444-9.
- Newman, Robert A.; Vidal, Juan C.; Viskatis, Luis J.; Johnson, Jill; Etcheverry, Martin A. (1993): VRCTC-310 — A novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. In: *Investigational New Drugs* 11 (2), S. 151–159. DOI: 10.1007/BF00874149.
- Nguyen, Leonard T.; Haney, Evan F.; Vogel, Hans J. (2011): The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. In: *Trends in Biotechnology* 29 (9), S. 464–472. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001.
- Nicastro, Giuseppe; Franzoni, Lorella; Chiara, Cesira de; Mancin, Adriana C.; Giglio, Jose R.; Spisni, Alberto (2003): Solution structure of crotamine, a Na⁺ channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Eur J Biochem* 270 (9), S. 1969–1979. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2003.03563.x.
- Nogueira-Neto, Francisco de Sousa; Amorim, Renée L.; Brigatte, Patrícia; Picolo, Gisele; Ferreira Jr., Wilson A.; Gutierrez, Vanessa P. et al. (2008): The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 91 (2), S. 252–260. DOI: 10.1016/j.pbb.2008.08.016.

- Nunes, F.P.B.; Zychar, B. C.; Della-Casa, M. S.; Sampaio, S. C.; Gonçalves, L.R.C.; Cirillo, M. C. (2010): Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. In: *Toxicon* 55 (6), S. 1100–1106. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.12.011.
- Oguiura, Nancy; Boni-Mitake, Malvina; Affonso, Regina; Zhang, Guolong (2011): In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. In: *The Journal of antibiotics* 64 (4), S. 327–331. DOI: 10.1038/ja.2011.10.
- Ohkura, M.; Furukawa, K.-I.; Oikawa, K.; Ohizumi, Y. (1995): The properties of specific binding site of ¹²⁵I-radioiodinated myotoxin α , a novel Ca^{++} releasing agent, in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 273 (2), S. 934–939.
- Ohkura, Masamichi; Furukawa, Ken-Ichi; Tu, Anthony T.; Ohizumi, Yasushi (1994): Calsequestrin is a major binding protein of myotoxin α and an endogenous Ca^{2+} releaser in sarcoplasmic reticulum. In: *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 268 (1), R1-R2. DOI: 10.1016/0922-4106(94)90126-0.
- Ohvo-Rekilä, Henna; Ramstedt, Bodil; Leppimäki, Petra; Peter Slotte, J. (2002): Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. In: *Progress in Lipid Research* 41 (1), S. 66–97. DOI: 10.1016/S0163-7827(01)00020-0.
- Oliveira, D. G.; Toyama, M. H.; Novello, J. C.; Beriam, L. O. S.; Marangoni, S. (2002): Structural and Functional Characterization of Basic PLA2 Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Venom. In: *The Protein Journal* 21 (3), S. 161–168. DOI: 10.1023/A:1015320616206.
- Olsen, Jesper V.; Godoy, Lyris M. F. de; Li, Guoqing; Macek, Boris; Mortensen, Peter; Pesch, Reinhold et al. (2005): Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 4 (12), S. 2010–2021. DOI: 10.1074/mcp.T500030-MCP200.
- Oshima-Franco, Y.; Hyslop, S.; Prado-Franceschi, J.; Cruz-Höfling, M. A.; Rodrigues-Simioni, L. (1999): Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. In: *Toxicon* 37 (10), S. 1341–1357. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00246-3.
- Papo, N.; Shai, Y. (2005): Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (7-8), S. 784–790. DOI: 10.1007/s00018-005-4560-2.
- Papo, Niv; Shai, Yechiel (2003): Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? In: *Peptides* 24 (11), S. 1693–1703. DOI: 10.1016/j.peptides.2003.09.013.

Pereira, Alexandre; Kerkis, Alexandre; Hayashi, Mirian A. F.; Pereira, Aparecida S. P.; Silva, Fernando S.; Oliveira, Eduardo B. et al. (2011): Crotonamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma. In: *Expert opinion on investigational drugs* 20 (9), S. 1189–1200. DOI: 10.1517/13543784.2011.602064.

Polgar, J. (1997): Platelet Activation and Signal Transduction by Convulxin, a C-type Lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) Venom via the p62/GPVI Collagen Receptor. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (21), S. 13576–13583. DOI: 10.1074/jbc.272.21.13576.

Powers, Jon-Paul S; Hancock, Robert E.W (2003): The relationship between peptide structure and antibacterial activity. In: *Peptides* 24 (11), S. 1681–1691. DOI: 10.1016/j.peptides.2003.08.023.

Prado-Franceschi, J.; Vital Brazil, O. (1981): Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. In: *Toxicon* 19 (6), S. 875–887. DOI: 10.1016/0041-0101(81)90085-4.

Pushpanathan, Muthuirulan; Gunasekaran, Paramasamy; Rajendhran, Jeyaprakash (2013): Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. In: *International Journal of Peptides* 2013, S. 675391. DOI: 10.1155/2013/675391.

Radis-Baptista, G.; Oguiura, N.; Hayashi, M. A.; Camargo, M. E.; Grego, K. F.; Oliveira, E. B.; Yamane, T. (1999): Nucleotide sequence of crotonamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 37 (7), S. 973–984.

Rádis-Baptista, Gandhi; de la Torre, Beatriz G; Andreu, David (2012): Insights into the uptake mechanism of NrTP, a cell-penetrating peptide preferentially targeting the nucleolus of tumour cells. In: *Chemical biology & drug design* 79 (6), S. 907–915. DOI: 10.1111/j.1747-0285.2012.01377.x.

Rádis-Baptista, Gandhi; Kerkis, Irina (2011): Crotonamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. In: *Current pharmaceutical design* 17 (38), S. 4351–4361.

Rádis-Baptista, Gandhi; Kubo, Tai; Oguiura, Nancy; Svartman, Marta; Almeida, Therezinha M.B; Batistic, Radenka F. et al. (2003): Structure and chromosomal localization of the gene for crotonamine, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. In: *Toxicon* 42 (7), S. 747–752. DOI: 10.1016/j.toxicon.2003.10.019.

Ragin, Angela D.; Morgan, Rashida A.; Chmielewski, Jean (2002): Cellular Import Mediated by Nuclear Localization Signal Peptide Sequences. In: *Chemistry & Biology* 9 (8), S. 943–948. DOI: 10.1016/S1074-5521(02)00189-8.

Rangel-Santos, A.; Lima, C.; Lopes-Ferreira, M.; Cardoso, D. F. (2004): Immunosuppressive role of principal toxin (crotonin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Toxicon* 44 (6), S. 609–616. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.07.004.

- Rappsilber, Juri; Ishihama, Yasushi; Mann, Matthias (2003): Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. In: *Analytical chemistry* 75 (3), S. 663–670.
- Rbrausse (2013): *Crotalus durissus* distribution.png. nach Martins, M. & Lamar, W.W., 2010 <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=178477>. Hg. v. Wikipedia. Online verfügbar unter https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Crotalus_durissus_distribution.png, zuletzt geprüft am 22.05.2017.
- Rodrigues, Margarida; Andreu, David; Santos, Nuno C. (2015): Uptake and cellular distribution of nucleolar targeting peptides (NrTPs) in different cell types. In: *Biopolymers* 104 (2), S. 101–109. DOI: 10.1002/bip.22610.
- Rodrigues, Margarida; Santos, Andrea; de la Torre, Beatriz G; Rádis-Baptista, Gandhi; Andreu, David; Santos, Nuno C. (2012): Molecular characterization of the interaction of crotoamine-derived nucleolar targeting peptides with lipid membranes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1818 (11), S. 2707–2717. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.06.014.
- Rodrigues-Simioni, Lea; Hawgood, Barbara J.; Smith, I.Christopher H. (1990): Properties of the early phases of crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. In: *Toxicon* 28 (12), S. 1479–1489. DOI: 10.1016/0041-0101(90)90161-Y.
- Rübsamen, K.; Breithaupt, H.; Habermann, B. (1971): Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 270 (3), S. 274–288. DOI: 10.1007/BF00997027.
- Rudd, C. J.; Viskatis, L. J.; Vidal, J. C.; Etcheverry, M. A. (1994): In vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. In: *Investigational New Drugs* 12 (3), S. 183–184. DOI: 10.1007/BF00873958.
- Sackmann, E. (1995): Biological Membranes Architecture and Function. In: *Handbook of Biological Physics* 1, S. 1–63. DOI: 10.1016/S1383-8121(06)80018-7.
- Salvini, T.F; Amaral, A.C; Miyabara, E.H; Turri, J.A.O; Danella, P.M; Selistre de Araújo, H.S (2001): Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. In: *Toxicon* 39 (8), S. 1141–1149. DOI: 10.1016/S0041-0101(00)00245-2.
- Sampaio, S. C.; Alba-Loureiro, T. C.; Brigatte, P.; Landgraf, R. G.; Santos, E. dosC.; Curi, R.; Cury, Y. (2006): Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. In: *Toxicon* 47 (3), S. 313–321. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.11.008.

- Sampaio, S. C.; Hyslop, S.; Fontes; Prado-Franceschi, J.; Zambelli, V. O.; Magro, A. J. et al. (2010): Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 55 (6), S. 1045–1060. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.01.011.
- Sampaio, S. C.; Rangel-Santos, A. C.; Peres, C. M.; Curi, R.; Cury, Y. (2005): Inhibitory effect of phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. In: *Toxicon* 45 (5), S. 671–676. DOI: 10.1016/j.toxicon.2005.01.009.
- Sampaio, S.C; Brigatte, P.; Sousa-e-Silva, M.C.C; dos-Santos, E.C; Rangel-Santos, A.C; Curi, R.; Cury, Y. (2003): Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. In: *Toxicon* 41 (7), S. 899–907. DOI: 10.1016/S0041-0101(03)00069-2.
- Sano-Martins, I. S.; Daimon, T. (1992): Electron microscopic cytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Toxicon* 30 (2), S. 141–150.
- Santos, P.E.B.; Souza, S. D.; Freire-Maia, L.; Almeida, A. P. (1990): Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. In: *Toxicon* 28 (2), S. 215–224. DOI: 10.1016/0041-0101(90)90415-4.
- Sarko, Dikran; Beijer, Barbro; Garcia Boy, Regine; Nothelfer, Eva-Maria; Leotta, Karin; Eisenhut, Michael et al. (2010): The pharmacokinetics of cell-penetrating peptides. In: *Molecular pharmaceutics* 7 (6), S. 2224–2231. DOI: 10.1021/mp100223d.
- Sieber, Michaela; Bosch, Bettina; Hanke, Wolfgang; de Lima, Vera Maura (2014): Membrane-modifying properties of crotamine, a small peptide-toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840 (3), S. 945–950. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.10.031.
- Silvius, John R. (2003): Role of cholesterol in lipid raft formation. Lessons from lipid model systems. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1610 (2), S. 174–183. DOI: 10.1016/S0005-2736(03)00016-6.
- Simons, K.; Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. In: *Nature* 387 (6633), S. 569–572. DOI: 10.1038/42408.
- Simpson, Richard J. (Hg.) (2009): Basic methods in protein purification and analysis. A laboratory manual. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Siqueira, A.M; Martins, N.F; De Lima, M.E; Diniz, C.R; Cartier, A; Brown, D; Maignret, B (2002): A proposed 3D structure for crotamine based on homology building, molecular simulations and circular dichroism. In: *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 20 (5), S. 389–398. DOI: 10.1016/S1093-3263(01)00139-5.

- Slotta, Karl Heinrich; Fraenkel-Conrat, Heinz Ludwig (1938): Schlangengifte, III. Mitteil.: Reinigung und Krystallisation des Klapperschlangen-Giftes. In: *Ber. dtsh. Chem. Ges. A/B* 71 (5), S. 1076–1081. DOI: 10.1002/cber.19380710527.
- Smaby, J. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E. (1994): Cholesterol's Interfacial Interactions with Sphingomyelins and Phosphatidylcholines. Hydrocarbon Chain Structure Determines the Magnitude of Condensation. In: *Biochemistry* 33 (31), S. 9135–9142. DOI: 10.1021/bi00197a016.
- Smondjrev, A. M.; Berkowitz, M. L. (1999): Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations. Molecular dynamics simulation. In: *Biophysical Journal* 77 (4), S. 2075–2089. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77049-9.
- Snyder, B.; Freire, E. (1980): Compositional domain structure in phosphatidylcholine--cholesterol and sphingomyelin--cholesterol bilayers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77 (7), S. 4055–4059.
- Soares, Andreimar M.; Mancin, Adriana C.; Cecchini, Alessandra L.; Arantes, Eliane C.; França, Suzelei C.; Gutiérrez, José M.; Giglio, José R. (2001): Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33 (9), S. 877–888. DOI: 10.1016/S1357-2725(01)00065-6.
- Stankowski, S.; Schwarz, G. (1989): Lipid dependence of peptide-membrane interactions. Bilayer affinity and aggregation of the peptide alamethicin. In: *FEBS letters* 250 (2), S. 556–560.
- Stockton, G. W.; Smith, I. C. (1976): A deuterium nuclear magnetic resonance study of the condensing effect of cholesterol on egg phosphatidylcholine bilayer membranes. I. Perdeuterated fatty acid probes. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 17 (2-3 SPEC NO), S. 251–263.
- Suzuki, Tomoki; Futaki, Shiroh; Niwa, Miki; Tanaka, Seigo; Ueda, Kunihiro; Sugiura, Yukio (2002): Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (4), S. 2437–2443. DOI: 10.1074/jbc.M110017200.
- Toyama, M. H.; Carneiro, E. M.; Marangoni, S.; Barbosa, R. L.; Corso, G.; Boschero, A. C. (2000): Biochemical characterization of two crotoxin isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. In: *Biochimica et biophysica acta* 1474 (1), S. 56–60.
- Tsai, M. C.; Peng, I. S.; Chang, C. C. (1981): Electrophysiological studies of crotoxin of the rat skeletal muscle membrane. In: *Proc. natn. Sci. Counc. B.* (5), S. 307–313.

- Utsugi, Teruhiro; Schroit, Alan J.; Connor, Jerome; Bucana, Corazon D.; Fidler, Isaiah J. (1991): Elevated Expression of Phosphatidylserine in the Outer Membrane Leaflet of Human Tumor Cells and Recognition by Activated Human Blood Monocytes. In: *Cancer Research* 51 (11), S. 3062.
- van Dijck, P. W. (1979): Negatively charged phospholipids and their position in the cholesterol affinity sequence. In: *Biochimica et biophysica acta* 555 (1), S. 89–101.
- van Meer, Gerrit; Kroon, Anton I. P. M. de (2010): Lipid map of the mammalian cell. In: *Journal of Cell Science* 124 (1), S. 5. DOI: 10.1242/jcs.071233.
- van Meer, Gerrit; Voelker, Dennis R.; Feigenson, Gerald W. (2008): Membrane lipids: where they are and how they behave. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (2), S. 112–124. DOI: 10.1038/nrm2330.
- Vargaftig, B. B.; Joseph, D.; Wal, F.; Marlas, G.; Chignard, M.; Chevance, L. G. (1983): Convulxin-induced activation of intact and of thrombin-degranulated rabbit platelets. Specific crossed desensitisation with collagen. In: *European journal of pharmacology* 92 (1-2), S. 57–68.
- Vargaftig, B. B.; Prado-Franceschi, J.; Chignard, M.; Lefort, J.; Marlas, G. (1980): Activation of guinea-pig platelets induced by convulxin, a substance extracted from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. In: *European journal of pharmacology* 68 (4), S. 451–464.
- Vieira, L. F.; Magro, A. J.; Fernandes, C. A.; Souza, B. M. de; Cavalcante, W. L.; Palma, M. S. et al. (2013): Biochemical, functional, structural and phylogenetic studies on Intercro, a new isoform phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. In: *Biochimie* 95 (12), S. 2365–2375. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.08.028.
- Yamane, Erica S.; Bizerra, Fernando C.; Oliveira, Eduardo B.; Moreira, Jéssica T.; Rajabi, Mohsen; Nunes, Gabriel L. C. et al. (2013): Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crodamine. In: *Biochimie* 95 (2), S. 231–240. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.09.019.
- Yan, Ci-Hui; Liang, Zhong-Qin; Gu, Zhen-Lun; Yang, Ya-Ping; Reid, Paul; Qin, Zheng-Hong (2006): Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. In: *Toxicon* 47 (5), S. 521–530. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.01.010.
- Yeagle, P. L. (1985): Cholesterol and the cell membrane. In: *BBA - Reviews on Biomembranes* 822 (3-4), S. 267–287. DOI: 10.1016/0304-4157(85)90011-5.
- Yeagle, Philip L.; Hutton, William C.; Huang, Ching-Hsien; Martin, R. Bruce (1977): Phospholipid head-group conformations; intermolecular interactions and cholesterol effects. In: *Biochemistry* 16 (20), S. 4344–4349. DOI: 10.1021/bi00639a003.

Yeaman, Michael R.; Yount, Nannette Y. (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. In: *Pharmacological reviews* 55 (1), S. 27–55. DOI: 10.1124/pr.55.1.2.

Yount, Nannette Y.; Kupferwasser, Deborah; Spisni, Alberto; Dutz, Stephen M.; Ramjan, Zachary H.; Sharma, Shantanu et al. (2009): Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (35), S. 14972–14977. DOI: 10.1073/pnas.0904465106.

Yount, Nannette Y.; Yeaman, Michael R. (2004): Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (19), S. 7363–7368. DOI: 10.1073/pnas.0401567101.

Yount, Nannette Y.; Yeaman, Michael R. (2006): Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (9), S. 1373–1386. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.03.027.

Zachowski, A. (1993): Phospholipids in animal eukaryotic membranes. Transverse asymmetry and movement. In: *Biochem. J.* 294 (Pt 1), S. 1–14.

Zambelli, Vanessa O.; Sampaio, Sandra C.; Sudo-Hayashi, Lia S.; Greco, Karin; Britto, Luiz R.G.; Alves, Adilson S. et al. (2008): Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. In: *Toxicon* 51 (8), S. 1357–1367. DOI: 10.1016/j.toxicon.2008.03.004.

Zhang, H. L.; Han, R.; Chen, Z. X.; Chen, B. W.; Gu, Z. L.; Reid, P. F. et al. (2006): Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. In: *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 48 (2), S. 175–182. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.04.008.

Zhu, Qi; Wu, Dian-Chen; Zhou, Xi-Ping; Gong, Shan; Cheng, Bo-Chao; Qin, Zheng-Hong et al. (2008): Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats. In: *Toxicon* 51 (1), S. 102–111. DOI: 10.1016/j.toxicon.2007.08.009.

9 Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
A	Ampère
A	Alanin (Ala)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ag ⁺ / Ag ⁰	Silber (ionisch/elementar)
AMP	„antimicrobial peptide“ - antimikrobielles Peptid
APZ	Aktiv proliferierende Zellen
AS	Aminosäure
AU	„absorbance units“ - Absorptionseinheiten
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar - Einheit für Druck (=100 hPa [Hektopascal])
bp	Basenpaare
BSA	„Bovine serum albumin“ - Rinderserumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein (Cys)
Ca ²⁺	Calciumion
ca.	circa
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
cDNA	copy-DNA
CF	Carboxyfluorescein
Chol	Cholesterin bzw. Cholesterol
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPP	„Cell penetrating peptide“ - Zellpenetrierende Peptide
Cy3	Cyanin 3
D	Asparaginsäure (Asp)
DAG	Diacylglycerol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DOPG	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]
DPBS	„Dulbecco's phosphate-buffered saline“ – PBS nach Dulbecco
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien bzw. Dicinnamyl
E	Glutaminsäure (Glu)
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisation
F	Phenylalanin (Phe)
Fa.	Firma
FA	Ameisensäure
FCS	„fetal calf serum“ - fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin (Gly)
GUV	„giant unilamellar vesicles“
h	Stunde
H	Histidin (His)

hBD	humanes β -Defensin
HDP	„host defence peptide“ Wirtsabwehrpeptide
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	„high performance liquid chromatography“ Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I	Isoleucin (Ile)
IP ₃	Inositol-Trisphosphat
ISD	„in source decay“ - in der Ionenquelle ablaufende Fragmentierung
K	Lysin (Lys)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KRH	Krebs-Ringer-Hepes-Puffer
KW	Kohlenwasserstoff
l	Liter
L	Leucin (Leu)
Lsg.	Lösung
LUV	„large unilamellar vesicles“
m	Meter
m ...	milli ...
M	molar
M	Methionin (Met)
MALDI	“matrix-assisted laser desorption/ionization” - Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation
min	Minute
Mg ²⁺	Magnesiumion
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladung
n	nano
N	Asparagin (Asn)
p	“p-value” – p-Wert
P	Prolin (Pro)
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PDB ID	Protein Daten Bank ID (Identifikationsnummer)
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PIP ₂	Phosphatidyl-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
POPG	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]
PS	Phosphatidylserin
Q	Glutamin (Gln)
R	Arginin (Arg)
RNA	Ribonukleinsäure
RP	„reversed phase“ - Umkehrphase
rpm	„rounds per minute“ - Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Serin (Ser)
SDS	„sodium dodecyl sulfate“ - Natriumdodecylsulfat
SEM	“standard error of the mean” - Standardfehler des Mittelwerts

T	Threonin (Thr)
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	“time of flight” – Flugzeit
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
UHPLC	Ultra-HPLC
UV	ultraviolett
V	Valin (Val)
V	Volt
W	Tryptophan (Trp)
Y	Tyrosin (Tyr)
z. B.	zum Beispiel
μ	mikro
λ	Wellenlänge
&	und
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent bezogen auf das Volumen

10 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Wolfgang R. L. Hanke für die Betreuung meiner Arbeit. Angefangen hat alles mit einem Seminarkurs in der zwölften Klasse. Seit dem durfte ich mir stets deines Rats, deiner Unterstützung, Förderung und Hilfe gewiss sein. Danke für dein Vertrauen und die Einführung in spannende Themengebiete, wie Forschung unter Schwerelosigkeit und das Arbeiten mit Schlangengiften. Herzlichen Dank für die wunderschöne, besondere und prägende Zeit in deiner Arbeitsgruppe. Ich werde sie nie vergessen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Andreas Kuhn für die Übernahme des Zweitgutachtens und bei Prof. Dr. Armin Huber für die Teilnahme an der Prüfung.

Mein Dank gilt auch all den tollen Kollegen und Studenten, mit welchen ich in den vergangenen Jahren den Arbeitsalltag bestreiten durfte. Danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre, tolle Kampagnen, Hilfe im Labor und viele gute Gespräche – einfach für eine schöne Zeit. Besonders möchte ich mich bei Dr. Michaela H. Sieber und Dr. Florian P. M. Kohn bedanken. Ohne euch hätte ich es sicher nicht geschafft. Ich durfte mich stets an euch wenden - konnte mich immer auf einen freundschaftlichen Rat und eure Unterstützung verlassen. Danke auch an Corinne Piront, Melanie Reith, Melanie Günther und Pia Wieland, es war schön mit euch zu arbeiten. Danke Claudia, Meike, Klaus und vielen mehr - dank euch allen habe ich mich in unserer Gruppe so wohl gefühlt und kann nach nunmehr fünfzehn Jahren sagen: Ihr seid auch ein wenig Heimat geworden.

Des Weiteren danke ich Dr. Jens Pfannstiel, Iris Klaiber und Berit Würtz für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen und ihre Unterstützung.

Ich danke PD Dr. Sebastian Leptihn und dem Institut für Mikrobiologie für die Einführung ins DLS und die Erlaubnis zur Nutzung des Geräts.

Und natürlich danke ich all den vielen lieben Menschen die mich durch meinen Leben begleitet, mit mir Freud und Leid geteilt haben - die immer für mich da waren. Danke für eure Freundschaft, die lieben und aufmunternden Worte, Hilfe und Verständnis in allen Lebenslagen und so vieles mehr. Vielen Dank Max, Arne, Basi und Jürgen - Danke all meinen Freunden und meiner Gemeinde.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern. Ihr habt mich zu dem gemacht was ich heute bin und seid einfach die tollste Familie die man sich nur wünschen kann. Danke für eure Liebe und bedingungslos Unterstützung. Ihr seid die Besten und ich bin froh zu euch zu gehören.