

**Simultane Isolierung verschiedener biologisch aktiver Polypeptide aus der
Seeanemone *Anemonia sulcata* und anschließende Bestimmung ihrer
Gerinnungswirkungen auf menschliches Blut**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Imke Bodendiek

Kiel
2004

Referent: Prof. Dr. W. Blaschek.....
Korreferent: Prof. Dr. H. D. Bruhn.....
Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2004.....
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 14. Juli 2004.....

Kurzfassung

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zur simultanen Isolierung biologisch aktiver Inhaltsstoffe aus der Seeanemone *Anemonia sulcata* entwickelt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Neurotoxine mit Wirkung auf spannungsabhängige Natriumkanäle, Kaliumkanalblocker mit blutdrucksenkender Wirkung und polyvalente Proteinaseinhibitoren. Die parallele Isolierung kann durch Anwendung von chromatographischen Standardprinzipien wie Ionenaustausch, Gelfiltration und Adsorption erzielt werden. Daher kann diese Methode in jedem Labor, welches auf die Peptidisolierung spezialisiert ist, durchgeführt werden. Darüber hinaus ist der Geräteaufwand moderat, wodurch diese Methode sich für die Anwendung im industriellen Maßstab anbietet.

Bezüglich der Blutgerinnungsanalysen im Rahmen der biologischen Aktivitätstests zeigten sich interessante Aspekte der Wirkung von Substanzen aus der Seeanemone *Anemonia sulcata* auf das menschliche Blutgerinnungssystem. Ein Großteil dieser Effekte kann den polyvalenten Proteinaseinhibitoren aus *Anemonia sulcata* zugeordnet werden, welche eine Hemmung der Gerinnungsfaktoren IX, XI, XII und des Kallikreins bewirken. Daraus ergibt sich eine stark verlängerte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT). Gleichzeitig kann eine verminderte Fibrinolyserate beobachtet werden. Genauere Untersuchungen führen zur folgenden Interpretation des zugrundeliegenden Mechanismus: Die Proteinase Plasmin und Gewebefibrinogenaktivator (t-PA) werden durch die Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* gehemmt. Zusätzlich steigt die Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI) an. PAI an sich ist keine Proteinase, aber er wird durch verschiedene Proteinase, z. B. Protein C, in seine inaktive Form überführt. Laut der vorliegenden Daten wird das Protein C durch die Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* gehemmt. Somit steigt die PAI-Aktivität an, woraus letztlich eine reduzierte Fibrinolyse resultiert.

Weiterhin muß angemerkt werden, daß die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation durch Substanzen aus der *Anemonia sulcata* gemindert wurde. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Proteinaseinhibitoren zurückzuführen.

Abschließend konnten Einflüsse auf das menschliche Blutgerinnungssystem festgestellt werden, die nicht mit den Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* in Verbindung gebracht werden können, beispielsweise die Hemmung des Gerinnungsfaktors VIII. Dieser Aspekt könnte einen Beitrag zur Verlängerung der aPPT leisten. Interessanterweise verstärkten einige Fraktionen der *Anemonia sulcata* sogar die t-PA-Aktivität, was der Wirkung der Proteinaseinhibitoren aus *Anemonia sulcata* entgegengerichtet ist.

Abstract

In this thesis a new method is developed which allows the simultaneous isolation of substances with a distinct biological activity from the sea anemone *anemonia sulcata*. To be more precise, these substances comprise neurotoxins acting on voltage-dependent sodium channels, potassium channel blockers and polyvalent proteinase inhibitors. The isolation can be achieved by applying standard chromatographic principles as ion exchange, gel filtration and adsorption. Hence, this method can be performed in any laboratory designed for isolation of peptides. What is more, the instrumental requirements are moderate, making this method appealing for industrial application.

Focussing on the blood clotting analysis, the biological activity tests revealed interesting aspects of how the human blood coagulation is affected by the substances isolated from *anemonia sulcata*. Most of these effects can be attributed to the polyvalent proteinase inhibitors of *anemonia sulcata* which cause the inhibition of the coagulation factors IX, XI, XII and of kallikrein. This strongly prolongs the activated partial thromboplastin time (aPPT). At the same time a decreased fibrinolysis rate can be observed. A detailed analysis leads to the following interpretation of the underlying mechanism: The proteinases plasmin and tissue plasminogen activator (t-PA) are inhibited by the proteinase inhibitors of *anemonia sulcata*. Additionally, the activity of the plasminogen activator inhibitor (PAI) increases. PAI itself is no proteinase, but it is transferred to its inactive form by different proteinases such as protein C. According to the present data, protein C is inhibited by the proteinase inhibitors of *anemonia sulcata*. Thus the PAI activity rises which ultimately results in a reduced fibrinolysis.

Furthermore, it has to be noticed that the collagen-induced aggregation of platelets was hindered by substances of *anemonia sulcata*. This effect can probably be ascribed to the proteinase inhibitors.

Finally, impacts on the human blood coagulation are stated which cannot be related to the proteinase inhibitors of *anemonia sulcata*, e. g. the inhibition of coagulation factor VIII. This aspect might contribute to the prolongation of the aPTT. Intriguingly, some fractions of *anemonia sulcata* even support the t-PA activity which is contrary to the effects of the proteinase inhibitors of *anemonia sulcata*.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	S. 21-24
---------------------------	----------

2 Material und Methoden

2.1 Gesamtauflistung des benötigten Materials

2.1.1 Seeanemonenmaterial	S. 25
2.1.2 Laborbedarf (Glasgeräte etc.)	S. 25
2.1.3 Chemikalien	
2.1.3.1 Isolationsmethode.....	S. 25
2.1.3.2 Gerinnungsuntersuchungen.....	S. 25-26
2.1.4 elektrische Geräte	S. 26-27

2.2 Chromatographische Verfahren zur Isolierung von Fraktionen aus Anemonia sulcata

2.2.1 Gewinnung eines Rohextraktes	S. 28
2.2.2 Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2	S. 29-30
2.2.3 Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G-50	S. 30-33
2.2.4 Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25	S. 33-34
2.2.5 Größenausschlußchromatographie zur Entsalzung an Sephadex G-50	34-35
2.2.6 Größenausschlußchromatographie zur Entsalzung an Sephadex G-25	S. 35-36
2.2.7 Weitere Aufreinigung der gerinnungsaktiven Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b	
2.2.7.1 Allgemeines	S. 38-40
2.2.7.2 ASI GP 2	S. 40-41
2.2.7.2 a) Ionenaustauschchromatographie an Bio Rad Macro-Prep® High S Support	
2.2.7.2 b) Entsalzung der Folgefraktionen an Sephadex G-25	
2.2.7.3 ASI GP 3	S. 41-42
2.2.7.3 a) Ionenaustauschchromatographie an Bio Rad Macro-Prep® High S Support	
2.2.7.3 b) Entsalzung der Folgefraktionen an Sephadex G-25	
2.2.7.4 ASI GP 9	S. 42-43
2.2.7.4 a) Ionenaustauschchromatographie an Bio Rad Macro-Prep® High S Support	
2.2.7.4 b) Entsalzung der Folgefraktionen an Sephadex G-25	
2.2.7.5 ASI GP 10	S. 43-44

2.2.7.5 a) Ionenaustauschchromatographie an Bio Rad Macro-Prep® High S Support	
2.2.7.5 b) Entsalzung der Folgefraktionen an Sephadex G-25	
2.2.7.6 ASI GP 11	S. 45-46
2.2.7.6 a) Ionenaustauschchromatographie an Bio Rad Macro-Prep® High S Support	
2.2.7.6 b) Entsalzung der Folgefraktionen an Sephadex G-25	
2.2.8 Weitere Aufreinigung der Fraktionen mit Toxinwirkung: Folgefraktionen der XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a	
2.2.8.1 01 AS 948	S. 47-48
2.2.8.1 a) Ionenaustauschchromatographie an Fractogel® EMD SO ₃ ⁻	
2.2.8.1 b) Entsalzung an Sephadex G-25	
2.2.8.2 02 AS 193	S. 48-49
2.2.8.2 a) Ionenaustauschchromatographie an Fractogel® EMD SO ₃ ⁻	
2.2.8.2 b) Entsalzung an Sephadex G-25	
2.2.9 Weitere Aufreinigung der Fraktionen mit Toxinwirkung: Folgefraktionen der XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b	
2.2.9.1 Entsalzung der Fraktion 01 AS 604 auf Sephadex G-25	S. 50-51
2.2.9.2 01 AS 597	S. 51-52
2.2.9.2 a) Ionenaustauschchromatographie an Fractogel® EMD SO ₃ ⁻	
2.2.9.2 b) Entsalzung an Sephadex G-25	
2.2.9.3 01 AS 602	S. 52-53
2.2.9.3 a) Ionenaustauschchromatographie an Fractogel® EMD SO ₃ ⁻	
2.2.9.3 b) Entsalzung an Sephadex G-25	
2.2.9.4 01 AS 605	S. 53-54
2.2.9.4 a) Ionenaustauschchromatographie an Fractogel® EMD SO ₃ ⁻	
2.2.9.4 b) Entsalzung an Sephadex G-25	
2.2.10 Ausblick	S. 54-55
 2.3 Analytische HPLC zur Abschätzung des Reinheitsgrades	
2.3.1 Prinzip	S. 56
2.3.2 Material	S. 56
2.3.3 Aufbau einer HPLC-Anlage	S. 56-57
2.3.4 Durchführung	S. 57-58
 2.4 Gerinnungsanalysen	
2.4.1 Theoretische Grundlagen der Blutungsstillung	S. 59-63
2.4.2 Auswahl der zu prüfenden Fraktionen	S. 64-67
2.4.3 Gewinnung eines Plasmapools	S. 67-68
2.4.4 Herstellung der Probenverdünnungen	S. 68

2.4.5 BCS (Behring Coagulation System)	S. 68-70
2.4.6 Kugelkoagulometer KC 10 nach Amelung	S. 70
2.4.7 ELISA-Reader MRX	S. 70
2.4.8 Thromboplastinzeit (Quickwert)	S. 71-72
2.4.9 aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	S. 72-73
2.4.10 Einzelfaktoranalyse	S. 73-76
2.4.11 Thrombinzeit	S. 76-77
2.4.12 Fibrinogen-Bestimmung	S. 77-78
2.4.13 Protein-C-Bestimmung	S. 78-79
2.4.14 Aktiviertes-Protein-C-Resistenz-Bestimmung (APC-Resistenz)	S. 80-81
2.4.15 Plasminogen-Bestimmung	S. 81-82
2.4.16 Tissue-Plasminogenaktivator-Bestimmung	S. 83-84
2.4.17 Plasminogenaktivator-Inhibitor-Bestimmung	S. 85-86
2.4.18 Präkallikrein-Bestimmung	S. 86-87
2.4.19 Bestimmung des Einflusses ausgewählter Seeanemonenfraktionen auf die Plättchenaggregation	S. 87-89

2.5 Toxizitätsuntersuchungen an der Strandkrabbe

2.5.1 Allgemeines	S. 90
2.5.2 Material	S. 90
2.5.3 Durchführung	S. 90

2.6 Massenspektrometrie

2.6.1 Prinzip	S. 91-92
2.6.2 Material und Geräte	S. 92
2.6.3 Aufbau	S. 92
2.6.4 Durchführung	S. 92-93

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Isolierungschromatographien

3.1.1 Ergebnisse der Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2	S. 94-95
3.1.2 Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G-50	S. 95-98

3.1.3 Serdolit AD-2 Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b3.1.3.1 Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie an **SP Sephadex C-25**.....S. 99-1003.1.3.2 Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie an **Sephadex G-50**.....S. 100-1023.1.3.3 Ergebnisse der **weiteren Aufreinigung** der gerinnungsaktiven Fraktionen
mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationschromatographie..S.103-106**3.1.4 Serdolit AD-2 Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a**3.1.4.1 Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie an **SP Sephadex C-25**.....S. 1073.1.4.2 Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie an **Sephadex G-50**.....S. 108-1103.1.4.3 Ergebnisse der **weiteren Aufreinigung** der Fraktionen mit Toxinwirkung
mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationschromatographie.S. 110-112**3.1.5 Serdolit AD-2 Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b**3.1.5.1 Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie an **SP Sephadex C-25**.....S. 112-1133.1.5.2 Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie an **Sephadex G-50**.....S. 113-1173.1.5.3 Ergebnisse der **weiteren Aufreinigung** der Fraktionen mit Toxinwirkung
mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltrationschromatographie.S. 117-120**3.2 Ergebnisse der analytischen HPLC****3.2.1 Fraktionen mit hohem Reinheitsgrad ohne weitere Aufreinigungsschritte**a) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b.....S. 126b) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a.....S. 126-127c) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b.....S. 127-128**3.2.2 Fraktionen mit geringen Reinheitsgrad für die weitere Aufreinigung**a) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b.....S. 129-130b) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a.....S. 130c) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b.....S. 131-132**3.2.3 Fraktionen mit sehr hohem Reinheitsgrad nach weiterer Aufreinigung**a) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b.....S. 132b) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a.....S. 133c) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b.....S. 133**3.2.4 Fraktionen mit geringem Reinheitsgrad trotz weiterer Aufreinigungsschritte**a) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b.....S. 134b) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a.....S. 135c) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b.....S. 136**3.3 Ergebnisse der Gerinnungsanalysen**

3.3.1 Statistische Betrachtungen der Gerinnungsanalysen.....S. 137

3.3.2 Ergebnisse der Globaltests (Quick-Test und aPTT-Bestimmung).....S. 137-143

3.3.3 Ergebnisse der Thrombinzeit-Bestimmung.....S. 143-144

3.3.4 Ergebnisse der Fibrinogen-Bestimmung.....S. 144-145

3.3.5 Ergebnisse der Protein-C-Bestimmung	S. 145-146
3.3.6 Ergebnisse der APC-Resistenz-Bestimmung	S. 146-148
3.3.7 Ergebnisse der Plasminogen-Bestimmung	S. 148-149
3.3.8 Ergebnisse der t-PA-Bestimmung	S. 149-150
3.3.9 Ergebnisse der PAI-Bestimmung	S. 150-152
3.3.10 Ergebnisse der Präkallikrein-Bestimmung	S. 152-153
3.3.11 Ergebnisse der Plättchenfunktions-Bestimmung	
3.3.11.1 Leerwertbestimmung mit ADP.....	S. 153
3.3.11.2 Leerwertbestimmung mit Kollagen.....	S. 154
3.3.11.3 Bestimmung der Fraktion ASI 4c mit ADP und Kollagen.....	S. 154
3.3.11.4 Bestimmung der Fraktionen ASI 4d und 4e mit ADP und Kollagen.....	S. 155-156
3.4 Ergebnisse der Toxizitätsuntersuchungen an der Strandkrabbe	
3.4.1 Ergebnisse der Toxizitätstest mit den XAD₂-Folgefraktionen	S. 157-158
3.4.2 Ergebnisse der Toxizitätstest mit den Folgefraktionen der XAD₂-Fraktion 5	
a) XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a (entspr. ASI 5d).....	S. 159
b) XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b (entspr. ASI 5e).....	S. 160-161
3.5 Ergebnisse der Massenspektrometrie	S. 162-176
3.5.1 statistische Betrachtung der massenspektrometrischen Untersuchungen	S. 162
3.5.2 allgemeine Aspekte der Auswertung	S. 162
3.5.3 theoretische Berechnung des mittleren Molekulargewichts der untersuchten Proben	S. 162-163
3.5.4 Berechnungsbeispiel anhand der Probe MS 2 (02 AS 205)	S. 164-165
3.5.5 Massenspektren der untersuchten Proben	S. 166-176
3.5.6 ermittelte Molekulargewichte der untersuchten Proben	S. 176
4. Diskussion	S. 177-185
5. Zusammenfassung	S. 186-188
Referenzen	S. 189-193
Anhang	S. 194-202

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	aktiviertes Protein C
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AS	Anemonia sulcata
ATX	Toxin der Anemonia sulcata
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
B	magnetische Feldstärke
BDS	Blutdruck-senkende Substanz
BCS	Behring Coagulation System
Bio Rad	Bio Rad Macro-Prep® High S Support
bzw.	beziehungsweise
C-18	aus 18 Kohlenstoffatomen bestehend
Cm	Zentimeter
d.	der
Da	Dalton
ECS	European Society of Cardiology
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sandwich Assay
EMD	Eddie Merck, Darmstadt
ESI	electro spray ionisation (Elektrospray-Ionisation)
ESTEEM	E fficacy and S afety of the oral T hrombin inhibitor ximelagatran in combination with aspirine in patients with recent myocardial damage
E	Extinktion
F.	Faktor
Fr.	Fraktion
Fractogel	Fractogel® EMD SO ₃ ⁻
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IE	Internationale Einheiten
INR	International Normalized Ratio
ISI	Internationale Sensitivitäts-Indices
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	molar

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mmol	Millimol
MS	Massenspektrometrie
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PC	Personal Computer
PR	Prothrombin Ratio
r	Radius
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunde
Seph.	Sephadex
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
t-PA	Tissue Plasminogen Activator (Gewebsplasminogen-Aktivator)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units (Einheiten)
U/ml	Einheiten pro Milliliter
untersch.	unterschiedlich
v	Geschwindigkeit
V	Volt
XAD ₂	Serdolit AD-2
z	Ladungszahl
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Anemonia sulcata
- Abb. 2: Schematisches Chromatogramm einer typischen Gelfiltrationschromatographie
- Abb. 3: Übersichtsschema über bisherigen Isolierungsverlauf
- Abb. 4: Übersicht über den Ablauf des plasmatischen Gerinnungssystems
- Abb. 5: Rackstation des BCS-Gerätes der Firma Dade Behring (Marburg)
- Abb. 6: Küvettenrotor des BCS-Gerätes der Firma Dade Behring (Marburg)
- Abb. 7: Chromatographie des Rohextraktes aus 2,6 kg Anemonia sulcata an Serdolit-AD-2-Chromatographie mit einem Wasser-Essigsäurestufengradienten (0 %, 12,5 %, 50 % und 80 % Essigsäure)
- Abb. 8: Chromatographie von XAD₂-Fr. 3 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 9: Chromatographie von XAD₂-Fr. 4 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 10: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 11: Chromatographie von XAD₂-Fr. 6/1 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 12: Chromatographie von XAD₂-Fr. 6/2 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 13: Chromatographie von XAD₂-Fr. 6/3 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 14: Chromatographie von XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b an SP Sephadex C-25 mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 15: Chromatographie von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. Fr.10 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 16: Chromatographie von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 17: Chromatographie von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Sephadex C-25 Fr.17 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 18: Chromatographie von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 19 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 19: Chromatographie von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 20 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 20: Chromatographie von ASI GP 2 an Bio Rad Macro-Prep High S Support mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 21: Chromatographie von ASI GP 3 an Bio Rad Macro-Prep High S Support mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 22: Chromatographie von ASI GP 9 an Bio Rad Macro-Prep High S Support mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

- Abb. 23: Chromatographie von ASI GP 10 an Bio Rad Macro-Prep High S Support mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 24: Chromatographie von ASI GP 11 an Bio Rad Macro-Prep High S Support mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 25: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a an SP Sephadex C-25 mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 26: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fraktion 6 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 27: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 12 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 28: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 14 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 29: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 16 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 30: Chromatographie von 01AS948 an Fractogel EMD SO₃⁻ mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 31: Chromatographie von 02AS193 an Fractogel EMD SO₃⁻ mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 32: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b an SP Sephadex C-25 mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 33: Chromatographie von XAD₂-Fr.5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 6 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 34: Chromatographie von XAD₂-Fr.5 / Seph. G-50 Fraktion 4b / SP Seph. C-25 Fraktion 6 / Seph. G-50 Fraktion 4 an Sephadex G-25 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 35: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 36: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 3 an Sephadex G-25 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 37: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 4 an Sephadex G-25 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 38: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 39: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 40: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 3 an Sephadex G-25 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 41: Chromatographie von 01AS604 an Sephadex G-25 mit 0,3-molarer Essigsäure
- Abb. 42: Chromatographie von 01AS597 an Fractogel® EMD SO₃⁻ mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 43: Chromatographie von 01AS602 an Fractogel EMD SO₃⁻ mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

- Abb. 44: Chromatographie von 01AS605 an Fractogel® EMD SO_3^- mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4
- Abb. 45: Übersichtsschema über die Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2 und die anschließende Größenausschlußchromatographie
- Abb. 46: Übersichtsschema über die Ionenaustauschchromatographie an XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b an SP Sephadex C-25
- Abb. 47/48: Übersichtsschema über die Ionenaustauschchromatographie an XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a an SP Sephadex C-25, Teil 1+2
- Abb. 49/50: Übersichtsschema über die Ionenaustauschchromatographie an XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b an SP Sephadex C-25, Teil 1+2
- Abb. 51: Übersichtsschema über die weitere Aufreinigung der gerinnungsaktiven Fraktionen mittels Ionenaustauschchromatographie und Entsalzung
- Abb. 52: Übersichtsschema über die weitere Aufreinigung der Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a mit Toxinwirkung mittels Ionenaustauschchromatographie und Entsalzung
- Abb. 53: Übersichtsschema über die weitere Aufreinigung der Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b mit Toxinwirkung mittels Ionenaustauschchromatographie und Entsalzung
- Abb. 54: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 952** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 8 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 55: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 199** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 15 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 56: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 205** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 21 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 57: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 600** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 8 / Seph- G-50 Fr.1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 58: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 607** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr.2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 59: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 608** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 13 / Seph- G-50 Fr.1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 60: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 609** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 15 / Seph- G-50 Fr.2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 61: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 610** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 17 / Seph- G-50 Fr.1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

- Abb. 62: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 2** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 63: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 3** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 64: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 9** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 65: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 10** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 3) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 66: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 11** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 67: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 948** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph- G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 68: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 193** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 69: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 597** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph- G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 70: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 602** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph- G-50 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 71: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 604** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph- G-50 Fr. 5) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 72: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 605** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph- G-50 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 73: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 505**: (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr. 2 / Bio Rad Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 74: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 509** (ASI GP 9 // XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 2 // SP Seph. C-25 Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 75: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 479** (01 AS 604 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 5 // Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

- Abb. 76: Chromatogramm der HPLC von **02AS480** (01 AS 604 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 5 // Seph. G-25 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 77: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 497** (ASI GP 2 // XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1 // Bio Rad Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 78: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 498** (ASI GP 2 // XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1 // Bio Rad Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 79: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 499** (ASI GP 2 // XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1 // Bio Rad Fr. 2b / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 80: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 490** (02 AS 193 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr. 2 // Fractogel Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 81: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 491** (02 AS 193 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr. 2 // Fractogel Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 82: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 492** (02 AS 193 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr. 2 // Fractogel Fr. 3 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 83: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 495** (01 AS 605 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph- G-50 Fr. 1 // Fractogel Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 84: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 496** (01 AS 605 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph- G-50 Fr. 1 // Fractogel Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten
- Abb. 85: Verlängerung der aPTT durch bestimmte Seeanemonenfraktionen; aufgetragen ist die aPTT in Prozent der Norm bezogen auf den Leerwert mit physiologischer Natriumchloridlösung
- Abb. 86: Verlängerung der aPTT durch bestimmte Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b; aufgetragen ist die aPTT in Prozent der Norm bezogen auf den Leerwert mit physiologischer Natriumchloridlösung
- Abb. 87: Erhöhung der PAI-Aktivität durch einige Seeanemonenfraktionen; aufgetragen ist die PAI-Aktivität in Prozent der Norm bezogen auf den Leerwert mit physiologischer Natriumchloridlösung

- Abb. 88: Plättchenfunktionsbestimmung des Leerwertansatzes mit 0,2 μ molarer ADP-Lösung als induzierendes Agens; die Bestimmung erfolgt mittels Extinktionsmessung
- Abb. 89: Plättchenfunktionsbestimmung des Leerwertansatzes mit Kollagenlösung (1,9 mg/ml) als induzierendes Agens die Bestimmung erfolgt mittels Extinktionsmessung
- Abb. 90: Plättchenfunktionsbestimmung der Fraktion ASI 4c mit 0,2 μ molarer ADP-Lösung und mit Kollagenlösung (1,9 mg/ml) als induzierendes Agens; die Bestimmung erfolgt mittels Extinktionsmessung
- Abb. 91: Plättchenfunktionsbestimmung der Fraktion ASI 4d und ASI 4e mit 0,2 μ molarer ADP-Lösung und mit Kollagenlösung (1,9 mg/ml) als induzierendes Agens; die Bestimmung erfolgt mittels Extinktionsmessung
- Abb. 92: Massenspektrum der Probe **02AS205**; 0,1 μ g Probe - gelöst in je 100 μ l Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 μ l Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 μ l/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 93: Massenspektrum der Probe **02AS479**; 0,1 μ g Probe - gelöst in je 100 μ l Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 μ l Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 μ l/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 94: Massenspektrum der Probe **02AS480**; 0,1 μ g Probe - gelöst in je 100 μ l Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 μ l Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 μ l/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 95: Massenspektrum der Probe **01AS607**; 0,1 μ g Probe - gelöst in je 100 μ l Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 μ l Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 μ l/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 96: Massenspektrum der Probe **01AS600**; 0,1 μ g Probe - gelöst in je 100 μ l Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 μ l Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 μ l/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 97: Massenspektrum der Probe **02AS199**; 0,1 μ g Probe - gelöst in je 100 μ l Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 μ l Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 μ l/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 98: Massenspektrum der Probe **01AS952** 0,1 μ g Probe - gelöst in je 100 μ l Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 μ l Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 μ l/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

- Abb. 99: Massenspektrum der Probe **01AS610** 0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 100: Massenspektrum der Probe **01AS608**; 0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 101: Massenspektrum der Probe **01AS609**; 0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 102: Massenspektrum der Probe **02AS505**; 0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen
- Abb. 103: Massenspektrum der Probe **02AS509**; 0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Fraktionen mit interessanter Wirkung in der Blutgerinnung, die weiter aufgereinigt werden sollen
- Tab. 2: Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a mit Toxinwirkung, die einer weiteren Aufreinigung unterzogen werden sollen
- Tab. 3: Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b mit Toxinwirkung, die einer weiteren Aufreinigung unterzogen werden sollen
- Tab. 4: Fraktionen nach der Serdolit AD-2-Chromatographie und anschließender Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50
- Tab. 5: Folgefraktionen der XAD₂- / Seph- G-50-Fraktion 3+3b
- Tab. 6: gerinnungsaktive Proben für die weitere Aufreinigung
- Tab. 7: Fraktionen mit Toxinwirkung für die weitere Aufreinigung (Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a
- Tab. 8: Fraktionen mit Toxinwirkung für die weitere Aufreinigung (Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b
- Tab. 9: Ergebnisse der Leerwertbestimmung der globalen Gerinnungstests
- Tab. 10: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fr. 3 / Seph. G-50 Fr. 1, 2, 3, 4
- Tab. 11: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 1a, 1b, 2, 3a, 3+3b
- Tab. 12: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 1, 2, 3, 4a, 4b, 5
- Tab. 13: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fr. 6/1 / Seph. G-50 Fr. 1, 2, 3, 3-4, 4, 4b
- Tab. 14: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fr. 6/2 / Seph. G-50 Fr. 1, 2, 3, 4, 4b
- Tab. 15: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fr. 6/3 / Seph. G-50 Fr. 1
- Tab. 16: Ergebnisse der Einzelfaktorenbestimmung von Fraktionen, die eine besonders starke aPTT-Verlängerung bewirken
- Tab. 17: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der Folgefraktionen der XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b
- Tab. 18: Ergebnisse der Einzelfaktorenbestimmung der Folgefraktionen der XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b
- Tab. 19: Ergebnisse der Thrombinzeitbestimmung
- Tab. 20: Ergebnisse der Fibrinogenbestimmung
- Tab. 21: Ergebnisse der Protein-C-Bestimmung
- Tab. 22: Ergebnisse der Protein-S-Bestimmung
- Tab. 23: Ergebnisse der APC-Resistenz-Bestimmung
- Tab. 24: APC-Resistenz-Untersuchungen mit ausgewählten Seeanemonenfraktionen an pathologischem Patientenplasma
- Tab. 25: Ergebnisse der Plasminogen-Bestimmung

- Tab. 26: Ergebnisse der t-PA-Bestimmung
- Tab. 27: Ergebnisse der PAI-Bestimmung
- Tab. 28: Ergebnisse der Präkallikrein-Bestimmung
- Tab. 29: Ergebnisse der ADP-induzierten Plättchenfunktions-Bestimmung
- Tab. 30: Ergebnisse der Kollagen-induzierten Plättchenfunktions-Bestimmung
- Tab. 31: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fractionen von XAD₂-Fr. 3
- Tab. 32: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fractionen von XAD₂-Fr. 4
- Tab. 33: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fractionen von XAD₂-Fr. 5
- Tab. 34: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fractionen von XAD₂-Fr. 6/1
- Tab. 35: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fractionen von XAD₂-Fr. 6/2
- Tab. 36: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fractionen von XAD₂-Fr. 6/3
- Tab. 37: Toxizitätstestergebnisse der Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50-Fr. 4a
- Tab. 38: Toxizitätstestergebnisse der Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50-Fr. 4b
- Tab. 39: Ergebnisse der massenspektrometrischen Molekulargewichtsbestimmung

1 Einleitung

Die Seeanemone *Anemonia sulcata* (siehe Abb. 1) steht seit Jahrzehnten im Mittelpunkt des Interesses von marinen Naturstoffforschern. Sie ist die meistverbreitete Seeanemone im Mittelmeerraum und in den südatlantischen Regionen und lebt, an Felsen festhaftend, in Meerestiefen von 0,5 bis 15 Metern. Sie besitzt mit Nesselzellen dichtbesetzte Tentakel. Besagte Nesselzellen sind mikroskopisch kleine Waffen, die sehr potente Gifte enthalten. Um diese Giftwirkung wußte bereits Aristoteles (Storer, 1943). Auch den Mittelmeervölkern ist die unangenehme Nesselwirkung der *Anemonia sulcata* seit Jahrhunderten bekannt. Trotzdem begannen wissenschaftliche Untersuchungen dieser Toxine erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts (Richtet, 1903). Damals wollte Charles Richtet durch Verabreichung subletaler Dosen eines Giftextraktes aus *Anemonia sulcata* eine Immunisierung an Hunden erreichen. Dies gelang ihm zwar nicht, statt dessen aber beobachtete er das Phänomen der Anaphylaxie, einer speziellen Form der allergischen Reaktion. Für die Beschreibung dieser Reaktion erhielt er 1915 den Nobelpreis. (Angemerkt sei allerdings, daß die Wirkung der Anemonentoxine auf die erregbaren Membranen und die Erzeugung eines anaphylaktischen Schocks völlig unabhängig voneinander sind und auf unterschiedlichen physiologischen Mechanismen basieren.)



Abb. 1: *Anemonia sulcata* (Photo: L. Béress)

Mehrere Forscher haben daraufhin vergeblich versucht, die giftigen, muskelkrampfauslösenden Substanzen aus *Anemonia sulcata* zu isolieren und zu charakterisieren (R. Sonderhoff, 1936; D. Ackermann, 1953). Erstmals gelangen die

Isolierung und die Erkennung dieser Toxine als Polypeptide mit einem Molekulargewicht von etwa 5000 Dalton im Jahre 1971 (L. Béress und R. Béress, 1971). Die Verfeinerung der Methode ermöglichte schließlich die Reindarstellung dieser Toxine (Béress et al., 1975). Kurz darauf folgte die Sequenzierung dieser Polypeptide (Wunderer et al., 1976; Wunderer und Eulitz, 1978; Béress et al., 1978).

In diesen Zeitraum fällt auch die Entdeckung der hochspezifischen Wirkung auf die spannungsabhängigen Natriumkanäle des Toxins II (ATX II) aus *Anemonia sulcata* (Bergmann et al., 1976; Romey et al., 1976) und die Entdeckung der positiv inotropen Wirkung von ATX II auf das Warmblüterherz (Alsen, 1975; Alsen et al., 1976; Ravens, 1976). Diese Eigenschaften machten das Toxin zu einem sehr wertvollen Werkzeug in der elektrophysiologischen und pharmakologischen Forschung. Die gewonnenen Erkenntnisse ebneten zudem den Weg zur Erforschung weiterer Polypeptide aus *Anemonia sulcata* und anderen Seeanemonenarten (siehe Reviews: Béress, 1988; Norton, 1991).

Mittels stets verbesserter Arbeitsmethoden wurden in der Folgezeit weitere biologisch aktive Polypeptide aus *Anemonia sulcata* isoliert und charakterisiert, zum Beispiel Serinproteinaseinhibitoren (Fritz et al., 1972) und blutdrucksenkende antivirale Substanzen (Béress et al., 1985). Später stellte sich heraus, daß die Serinproteinaseinhibitoren auch eine Wirkung auf die Kv1-6-Kaliumkanäle besitzen (Schweitz et al., 1995), während den blutdrucksenkenden Substanzen eine hochspezifische Wirkung auf die Kv3-4-Kaliumkanäle nachgewiesen werden konnte (Diochot, 1997).

Für diese Dissertation von besonderem Interesse sind die Untersuchungen von H. D. Bruhn und L. Béress über die Wirkung von oben erwähnten Proteinaseinhibitoren auf die Blutgerinnung. Dabei wurde eine Wirkung auf das intrinsische Blutgerinnungssystem gefunden (Bruhn und Béress, 1978).

Im Hinblick auf den Einsatz in der Forschung und in der Therapie ist eine Reingewinnung der obig aufgezählten Substanzen zwingend erforderlich. Bei etlichen Polypeptiden ist diese zwar bereits gelungen, allerdings oftmals unter Anwendung sehr zeit- und kostenaufwendiger Methoden. Zudem lag das Hauptaugenmerk hierbei oftmals nur auf der Gewinnung eines einzelnen Inhaltsstoffes aus *Anemonia sulcata*. Die übrigen sehr potenten Substanzen wurden dabei verworfen. Daher erscheint es wünschenswert, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, die verschiedenen biologisch aktiven Substanzen in parallelen Arbeitsschritten schnell und effizient in reiner Form zu gewinnen. Genau dieses Ziel verfolgt die vorliegende Arbeit.

Hierzu wurde eine von der Arbeitsgruppe Béress 1996 veröffentlichte Methode speziell zur Isolierung von Toxinen der *Anemonia sulcata* aufgegriffen (J. Sanchez-Rodriguez et al., 1995). Durch Erweiterung des dort beschriebenen Arbeitsschemas konnte im Rahmen dieser Dissertation eine simultane Isolierung der Toxine und blutgerinnungsbeeinflussenden Polypeptide der *Anemonia sulcata* erzielt werden.

Noch sind die Einsatzbereiche der Seeanemonenpolypeptide längst nicht ausgeschöpft. Ihre mannigfaltigen Wirkungen an den verschiedensten Wirkorten bergen möglicherweise noch etliche therapeutische Einsatzmöglichkeiten in sich, weswegen es lohnenswert erscheint, die Wirkprinzipien aus *Anemonia sulcata* verstärkt auch in den Focus der pharmazeutischen Forschung zu rücken. Besonders lohnenswert erscheint dabei die weitere Erforschung der oben erwähnten Wirkung der Proteinaseinhibitoren auf die Blutgerinnung:

Das Blutgerinnungssystem spielt in physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Ohne eine gut austarierte Gerinnung würde es in unserem Körper ständig zu lebensbedrohlichen Blutungen bzw. Gerinnselbildungen kommen. Wie dramatisch ein

Ungleichgewicht innerhalb dieses Systems sich bemerkbar machen kann, zeigen eine Reihe von angeborenen Gerinnungsstörungen. Stellvertretend genannt sei an dieser Stelle das Beispiel der Bluterkrankheit (Hämophilie A und B), der ein Mangel an den Gerinnungsfaktoren VIII bzw. IX zugrunde liegt. Dieser Mangel führt dazu, daß die Betroffenen bereits bei kleinsten Verletzungen Gefahr laufen zu verbluten.

Umgekehrt führt ein übermäßig aktiviertes Gerinnungssystem zu Thrombenbildung an den falschen Orten. Falls sich diese Thromben lösen, kann es zu einer Lungenembolie, einem Schlaganfall oder einem Herzinfarkt mit tödlichem Ausgang kommen. Ein genetisch bedingtes Thrombenbildungsrisiko liegt bei dem Faktor-V-Leiden, der sogenannten APC-Resistenz, vor. Hierbei ist der aktivierte Faktor V des Gerinnungssystems aufgrund einer Genmutation resistent gegen das aktivierte Protein C, welches als Gerinnungshemmkörper einen Schutz vor einer erhöhten Gerinnungsneigung bildet. Daraus resultiert eine erhöhte Thromboseneigung, die unterschiedlich stark ausgeprägt ist, je nachdem, ob es sich bei Betroffenen um einen hetero- oder homozygoten Träger des mutierten Gens handelt. Besonders dramatisch macht sich die Mutation bei Frauen bemerkbar, die gleichzeitig mit der Antibabypille verhüten. Bei ihnen ist das Thromboserisiko um das Dreißigfache (heterozygote Erbanlage) bzw. um das Hundertfache (homozygote Erbanlage) erhöht.

Desweiteren sollen hier arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßwand genannt werden, an die sich Thrombocyten bevorzugt anlagern, was wiederum eine Gerinnungsbildung in Gang setzen kann.

Dies seien nur einige Beispiele, die verdeutlichen sollen, daß Gerinnungsstörungen ein breites Spektrum an medizinischen Komplikationen hervorzurufen in der Lage sind. Substanzen, die in derartige Gerinnungsstörungen regulierend einzugreifen vermögen, verdienen folglich besonderes Augenmerk. Aus diesem Grund soll bei der Untersuchung der biologischen Aktivitäten ein Schwerpunkt auf die Blutgerinnungsaktivität gelegt werden.

Es sind gegenwärtig bereits einige Substanzen bekannt, die erfolgreich bei Hämostasestörungen eingesetzt werden. So gibt es Substanzen, welche die Gerinnbarkeit des Blutes herabsetzen. Diese werden z. B. zur Herzinfarktprophylaxe eingesetzt. Zum einen sind dies die Thrombozytenaggregationshemmer wie Ticlopidin, Abciximab und Acetylsalicylsäure, zum anderen die Cumarine, welche als Vitamin-K-Antagonisten fungieren. Weitere gerinnungshemmende Wirkstoffe sind das Heparin und das Hirudin sowie die Hirudin-Derivate, die aus der Thromboseprophylaxe und -therapie heute nicht mehr wegzudenken sind. Kurz vor der Zulassung steht derzeit das Melagatran, ein neuer direkter Thrombininhibitor, dessen Prodrug - das Ximelagatran (Exanta®) – sogar oral verfügbar ist. Dies stellt im Gegensatz zu den häufig eingesetzten Heparinen, welche subcutan verabreicht werden müssen, einen erheblichen Vorteil dar. Zudem bestätigt die im September dieses Jahres von der European Society of Cardiology (ESC) veröffentlichte ESTEEM-Studie (Efficacy and Safety of the oral Thrombin inhibitor ximelagatran in combination with aspirin in patients with recent myocardial damage) die Wirksamkeit von Ximelagatran zur Prävention erneuter arteriothrombotischer Ereignisse bei Patienten mit einem Herzinfarkt. Bei dieser Studie wies das Ximelagatran sogar gewisse Vorteile gegenüber dem Standardtherapeutikum Acetylsalicylsäure auf.

Selbst wenn sich schon ein Gerinnsel gebildet hat, stehen der modernen Medizin Wirkstoffe zur Verfügung, die eine Gerinnselauflösung bewirken können, als da wären Urokinase und Streptokinase. Im Zusammenhang mit dieser Dissertation erscheinen vor allem Ancrod und Batroxobin erwähnenswert, da es sich hierbei um Wirkstoffe biologischen Ursprungs handelt. Beides sind Verbindungen, die aus Schlangengiften isoliert wurden.

Alle diese Wirkstoffe weisen neben ihren erwünschten Wirkungen auch Nebenwirkungen auf, die bisweilen eine Therapiesteuerung erschweren. Eine dieser unerwünschten Wirkungen ist

das Auftreten der heparininduzierten Thrombocytopenie Typ II, welche eine lebensbedrohliche Komplikation der Heparintherapie darstellt. Bekannt sind zudem die Schwierigkeiten, die sich bei einer oralen Cumarintherapie (z. B. Marcumar®) ergeben. Genannt seien hierbei die erhöhte Blutungsneigung, die eine ständige Kontrolle des Quickwertes nötig macht, sowie zahlreiche Interaktionen mit anderen Arzneimitteln und Nahrungsbestandteilen.

Deshalb erscheint es durchaus erstrebenswert, auf diesem Gebiet verstärkt weiterzuforschen, um eventuell neue Substanzen zu entdecken, die unter gegebenen Umständen besser steuerbar sind als die bisher eingesetzten Wirkstoffe.

Diese Dissertation soll – neben ausführlichen Peptidisolationsstudien - einen Anstoß für die Entwicklung neuer Wirksubstanzen für die Hämostasiologie liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Gesamtauflistung des benötigten Materials

2.1.1 Seeanemonenmaterial

Die Seeanemone *Anemonia sulcata* wurde im Golf von Neapel gesammelt und bis zur Verwendung bei -20 °C tiefgefroren aufbewahrt.

2.1.2 Laborbedarf (Glasgeräte etc.)

- Wasserstrahlpumpe
- Saugflaschen
- Nutschen
- Bechergläser, Erlenmeyerkolben (Schott Glas, Mainz)
- Glassäulen verschiedener Ausmaße
- Gradientenmischer aus Glas (Sonderauftragungen eines Glasbläfers)
- Gummischläuche verschiedener Größe
- Schnappdeckelgläschen
- Reagenzgläser (zum Auffangen der Fraktionen in den Fraktionssammlern)
- Einmal-Injektionskanülen Sterican® (Braun Melsungen AG Melsungen)
- Einmalspritzen Braun Injekt, 2ml (Braun Melsungen AG Melsungen)
- Standardreaktionsgefäße, 1,5 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg)
- Glassäulen versch. Ausmaße mit Kunststoffschläuchen
- Eppendorfgefäße (1 ml)
- Eppendorfpipetten (1000, 500 und 200 µl) + Eppendorfspitzen (blau und gelb)

2.1.3 Chemikalien und andere Gebrauchsmaterialien

2.1.3.1 Isolationsmethode

- Seitz K 1000- Filter (Seitz-Filter-Werke, Bad Kreuznach, Deutschland)
- Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech, Schweden)
- Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, Schweden)
- SP Sephadex C-25 (Pharmacia Biotech, Schweden)
- Serdolit® AD-2 (Serva, Heidelberg)
- Fractogel® EMD SO₃⁻ (Merck, Darmstadt)
- Bio Rad Macro-Prep® High S Support (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA)
- MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule für HPLC (Machery & Nagel)
- destilliertes Wasser und Aqua bidest (aus eigener Herstellung)
- Aceton, Essigsäure, Ethanol, Ammoniumacetat, Trifluoressigsäure. (Alle diese Chemikalien sind von Merck (Darmstadt) in p. a.-Qualität)

2.1.3.2 Gerinnungsuntersuchungen

- Sarstedt-Monovettensystem® :5 ml–Monovetten gefüllt mit 0,5 ml Citratlösung (0,106 mol/l), 0,8 x 33 mm Kanülen (Sarstedt)
- Thromborel® S (Dade-Behring, Marburg)
- Pathromtin®SL (s. o.)
- Mangelplasmen (s. o.)

- Test-Thrombin-Reagenz (s. o.)
- HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4) (s. o.)
- Multifibren® U
- READS® Protein S Antigen Test Kit (Corgenix, Westminster, Colorado)
- Coatest APC Resistanz V (Chromogenix)
- Berichrom® Plasminogen-Testkit (Dade-Behring, Marburg)
- Berichrom® Protein C-Testkit (Dade Behring, Marburg):
 - Protein C-Aktivator: Extrakt aus dem Gift Agkistrodon contortrix
 - Substrat-Reagenz: pyro-Glutaminsäure-Prolin-Arginin-methoxy-notroanilid
 - HEPES-Puffer (25 mmol/l, pH 8,25)
- Asserachrom® t-PA-Testkit (Roche)
- Berichrom® PAI Testkit (Dade-Behring, Marburg)
- Unitest™ Prekallikrein Testkit (Unicorn Diagnostics, London)
- Kollagen in einer Endkonzentration von 1,9 µg/ml (Mölab, Hilden)
- ADP in einer Endkonzentration von 0,2 µmol/Ansatz (Mölab, Hilden)
- Calciumchlorid-Lösung 25 mmol/l (Dade Behring, Marburg)
- Imidazol-Pufferlösung pH 7,6 (Dade Behring, Marburg)
- entspr. Mangelplasmen (Dade Behring, Marburg)
- HEPES-Pufferlösung (25 mmol/l) pH 7,4, (Dade Behring, Marburg)
- isotonische Kochsalzlösung (Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen)

2.1.4 elektrische Geräte

- Küchenmixer (Sarmix, Cenco Warring Blendor)
- Zentrifuge (Biofuge A, Heraeus Christ)
- Büchi-Rotationsverdampfer
- Sartorius Mikrowaage
- Sartorius Makrowaage
- Magnetrührer (Rührmotoren)
- LKB 2138 Uvicord S – Detektor (Pharmacia, Schweden)
- LF 521 – Leitfähigkeitsmeßgerät (WTW, Deutschland)
- Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
- LKB 2065-Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
- LKB Ultrac 700 – Fraktionssammler (Pharmacia LKB)
- Peristaltische Pumpen (LKB 2115 Multiperplex)
- Eppendorfmixer 5432
- Eppendorf Centrifuge 5414S
- Waters HPLC-Anlage:
 - Waters Data Model 730
 - Automatischer Gradientenmischer Mod. 640
 - Wasserspumpen Mod. 600-A und 501
 - Autosampler (GBC, Mod. LC 1610) und EZ Chrome Software
 - Probenhalter (Rotationsscheibe) für Autosampler mit entsprechenden Probengefäßen
 - LC Spektrophotometer (Water, Lamda-Max, Mod. 481)
- Gefriertrockner (Virtis Company)
- Massenspektrometer Esquire-LC (Bruker, Bremen) mit Bruker Daltonics Data Analysis-Software
- ELISA-Reader MRX (Dynex)
- Behring Coagulation System, BCS (Dade Behring, Marburg)

- Aggregometer PAP 4 (Firma Mölab, Hilden) + entsprechende Küvetten

2.2 Chromatographische Verfahren zur Isolierung von Fraktionen aus *Anemonia sulcata*

Bei der Fraktionsgewinnung wurde sich einer von der Arbeitsgruppe Béress bereits in groben Zügen publizierten Methode bedient (J. Sanchez, T. Bruhn, A. Aneiros, E. Wachter und L. Béress, 1995). Diese wurde modifiziert und erweitert auf 2,6 kg nasses Seeanemonenmaterial angewendet. Bei der zuvor erwähnten Veröffentlichung wurde lediglich die Isolierung der Anemontoxine verfolgt. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich mittels des Trennungsschemas der publizierten Methode die Toxine und die blutgerinnungswirksamen Inhaltsstoffe der *Anemonia sulcata* simultan erfaßt und voneinander trennen lassen.

2.2.1 Gewinnung eines Rohextraktes

Material

- Küchenmixer (Sarmix, Cenco Warring Blendor)
- Zentrifuge (Biofuge A, Heraeus Christ)
- Büchi-Rotationsverdampfer
- Nutsche (Durchmesser = 20 cm)
- Seitz-Filter K1000
- Eisessig
- Ethanol, 50 %ig
- Aceton

Durchführung

2,6 Kilogramm feuchtes Anemonenmaterial werden mit 2,6 Litern vergälltem Ethanol versetzt. Pro Kilogramm Substanz werden dem Alkohol 10 Milliliter Eisessig hinzugefügt (entspricht folglich 26 ml Eisessig). Anschließend wird mittels eines Mixers (Sarmix, Cenco Warring Blendor) homogenisiert, der Ansatz auf 70°C erwärmt und wieder abgekühlt. Dann wird zentrifugiert (3000 g, fünf Minuten). Der Überstand wird aufbewahrt, mit dem Rückstand wird eine erneute Extraktion vorgenommen, wobei diesmal zwei Liter 50-prozentiger Ethanol zum Einsatz kommen. Dieser Ansatz wird erneut homogenisiert und zentrifugiert. Die beiden Überstände werden daraufhin vereinigt und im Büchi-Rotationsverdampfer im Wasserstrahlpumpen-Vakuum auf 500 Milliliter eingeengt. In dieser Lösung liegen die verschiedensten wasser- und ethanollöslichen Substanzen nebeneinander vor.

Bei den meisten bekannten wirksamen Verbindungen aus *Anemonia sulcata* handelt es sich um Polypeptide. Um diese von den übrigen Verbindungen abzutrennen, besteht der nächste Arbeitsgang in einer Proteinfällung mit Aceton. Dazu wird das eingeengte viskose Konzentrat bei Raumtemperatur mit etwa der zehnfachen Menge Aceton (entspricht 5000 Millilitern) versetzt und später für circa zwölf Stunden bei -20 °C zur vollständigen Präzipitation aufbewahrt. Auf diese Weise präzipitieren die Proteine, Polypeptide, Polysaccharide und Salze quantitativ, während die Lipide und lipidähnlichen Substanzen in Lösung bleiben und somit von dem Präzipitat abgetrennt werden. Im Anschluß wird das Aceton abdekantiert, der Rückstand mit zwei Litern destilliertem Wasser aufgenommen und die so entstandene trübe Lösung mit Hilfe eines Seitzfilters K1000 bei Unterdruck über eine Nutsche filtriert. Der Filterdurchmesser beträgt 20 Centimeter. Dabei erhält man eine braune Rohtoxinlösung, die direkt für den ersten Chromatographieschritt verwendet werden kann.

2.2.2 Adsorptionsschromatographie an Serdolit AD-2

Prinzip der Trennung

Das Auftrennungsprinzip bei dieser Chromatographie basiert auf den unterschiedlichen Bindungseigenschaften verschieden polarer Substanzen an das Säulenmaterial. Das Säulenmaterial bei dieser Chromatographie ist Serdolit® AD-2 von der Firma SERVA, Heidelberg. Hierbei handelt es sich um ein Adsorberharz aus Polystyrol. Die einzelnen Peptide enthalten eine unterschiedliche Anzahl an aromatischen Aminosäuren, deren Aromaten eine hohe Adsorptionsneigung an das Harz besitzen. Folglich werden sie durch ihre Aromaten unterschiedlich stark festgehalten. Stark polare Substanzen wie Salze oder Polysaccharide werden nicht an das Säulenmaterial gebunden und verlassen die Säule auf schnellstem Wege wieder. Auf diese Weise werden die Peptide von den nicht an das Säulenmaterial bindenden Substanzen getrennt.

Zu diesem Zwecke trägt man den Rohtoxinextrakt auf eine Serdolit® AD-2-Säule der Ausmaße 4 x 50 Centimeter auf und spült mit circa 1000 Millilitern 1-molarem Ammoniumacetatpuffer. Die hohe Pufferkonzentration bewirkt eine stärkere Wechselwirkung der Polypeptide und Proteine mit dem Säulenmaterial. Substanzen, die sich nicht an das Säulenmaterial binden, werden mit dem Puffer durch die Säule gespült.

Nun gilt es, die Peptide bzw. Proteine, die an das Polystyrolharz gebunden vorliegen, aufgrund ihrer verschiedenen physiko-chemischen Eigenschaften voneinander zu trennen. Hierzu bedient man sich eines Wasser-Essigsäuregradienten mit steigender Konzentration an Essigsäure von null auf 80 Prozent. Bei dem Gradienten handelt es sich um einen Stufengradienten. Begonnen wird mit reinem Wasser, dann folgen 12,5-, 50- und 80-prozentige Essigsäure. Bei dem Spülvorgang mit einem Liter destillierten Wasser werden die stark polaren Peptide bzw. Proteine, die sich lediglich schwach an das Säulenmaterial gebunden haben, von der Säule gespült. Mit 12,5 prozentiger Essigsäure werden dann die weniger polaren und damit etwas fester gebundenen Peptide eluiert, während die schwach polaren und somit stärker gebundenen Peptide bzw. Proteine erst bei höheren Essigsäurekonzentrationen von der Säule kommen. Durch diesen Chromatographieschritt gelingt eine Vortrennung der Peptide bzw. Proteine mit gleichzeitigem Entsalzungseffekt und Abtrennung anderer organischer Moleküle (Polysaccharide etc.).

An den Fraktionssammler sind ein Photometer und ein Leitfähigkeitsmeßgerät angeschlossen. Der Fließmittelstrom passiert nach dem Verlassen der Säule beide Einrichtungen. Die daraus resultierenden Meßergebnisse werden durch einen XY-Schreiber aufgezeichnet. Das Photometer mißt bei einer Wellenlänge von 280 Nanometern. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren der betreffenden Polypeptide und werden auf diese Weise detektiert. Diese Tatsache ermöglicht es, durch Auswertung des Spektrums mehrere Fraktionen, die laut Chromatogramm einheitliche Peptide enthalten, zu vereinigen, am Rotationsverdampfer einzuengen und schließlich mittels Gefriertrocknung zu lyophilisieren. Dieses Detektionsprinzip kommt im übrigen bei allen durchgeführten Chromatographieschritten zum Einsatz.

Material und Geräte

Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)

Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperpex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	4,5 x 40 cm
Säulenmaterial	Serdolit® AD-2 (research-grade/ 0,05-0,1 mm)
Flußrate	14 ml/min
Fraktionsgröße	28 ml/2 min
Auftragsmedium	destilliertes Wasser
Elution	Stufengradient mit Essigsäure-Wassergemisch
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer pH 5,4 (1-molar) destilliertes Wasser 12,5 % Essigsäure 50 % Essigsäure 80 % Essigsäure

Durchführung der Chromatographie

Die Säule wird mit dem Serdolit® AD-2 gefüllt und mit Wasser equilibriert. Anschließend wird der Rohextrakt aufgebracht und mit Ammoniumacetatpuffer (1-molar, pH 5,4) gespült. Daraufhin wird die Säule mit destilliertem Wasser gespült, bevor man den Stufengradienten von 12, 5-prozentiger über 50-prozentige bis hin zu 80-prozentiger Essigsäure startet. Das Fließmittel wird während der gesamten Chromatographie mittels einer Pumpe auf die Säule gebracht.

Die Elution wird folgendermaßen durchgeführt:

1. Auftragen des Rohextraktes (2 Liter)
2. Spülen mit 1-molarem Ammoniumacetatpuffer pH 5,4 (ca. 1 Liter)
3. Spülen mit destilliertem Wasser (ca. 1 Liter)
4. 12,5 %ige Essigsäure (4,5 Liter)
5. 50 %ige Essigsäure (4 Liter)
6. 80 %ige Essigsäure (1,2 Liter)

Das Säuleneluat wird in Fraktionen à 28 Milliliter pro zwei Minuten aufgefangen. Mittels des erhaltenen Chromatogramms werden anschließend einheitliche Fraktionen zu größeren Fraktionen vereinigt; diese werden mit Hilfe der Büchi-Rotationsverdampfer im Wasserstrahlvakuum auf je etwa 50 Milliliter eingengt.

2.2.3 Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G-50

Nach der Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2 liegen die acht gewonnenen Fraktionen nach der Polarität der jeweils enthaltenen Polypeptide getrennt vor. Allerdings sind diese Fraktionen bezüglich ihres Molekulargewichts keineswegs einheitlich, sondern stellen vielmehr ein Gemisch von Polypeptiden verschiedenster Molekülgröße dar. Um nun Fraktionen mit einheitlicherer Molekulargewichtsverteilung zu erhalten, bietet sich die Gelfiltrationschromatographie (oder auch Größenausschlußchromatographie genannt) an.

Prinzip der Trennung

Das Trennungsprinzip bei dieser Chromatographie besteht in einer Trennung nach Molekülgröße. Als Säulenfüllung dient ein Gel, welches je nach Beschaffenheit verschieden große Poren hat. Die Trennung unterschiedlich großer Moleküle kommt nun dadurch zustande, daß kleinere Moleküle oftmals in der Lage sind, in diese Poren einzudringen. Innerhalb dieser - mit Lösungsmittel gefüllten - Poren diffundieren die Moleküle nur noch mit entsprechender Diffusionsgeschwindigkeit in dem Lösungsmittel, bis sie an einer anderen Stelle die Pore wieder verlassen. Sie sind also nach Poreneintritt für einige Zeit dem Elutionsstrom entzogen. Größeren Molekülen hingegen gelingt es aufgrund ihrer Größe nicht, in diese Poren einzudringen. Sie durchlaufen das Gel folglich, von dem Elutionsmittel getrieben, ohne Aufenthalt in den Poren. Dies ist der Grund dafür, daß große Moleküle am schnellsten durch das Gel gelangen, während die kleinen Moleküle eine längere Säulenverweilzeit aufweisen. In je mehr Poren ein Molekül einzudringen vermag, desto länger wird dessen Elutionszeit. Aus diesen Tatsachen ergibt sich, daß das Chromatogramm einer Größenausschlußchromatographie sich prinzipiell wie folgt darstellen wird:

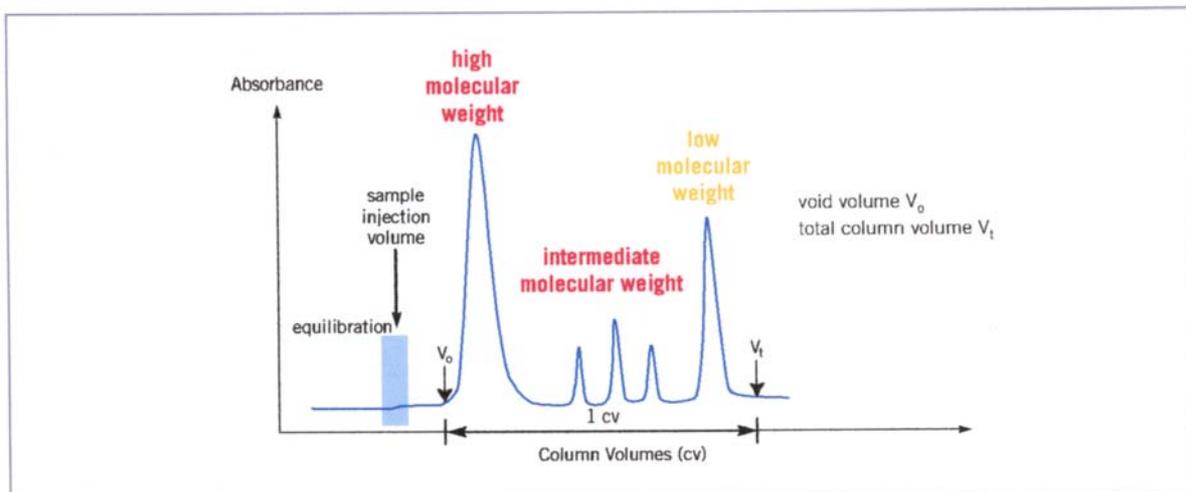


Abb. 2: Schematisches Chromatogramm einer typischen Gelfiltrationschromatographie (aus: „Gelfiltration: Principles and Methods“; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, 2003)

Als Säulenmaterialien kommen verschiedene Gelbildner in Frage. In diesem Falle wird Sephadex G-50 eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein quervernetztes Dextranderivat. Dextrane sind bakterielle Produkte, die aus Glucoseeinheiten aufgebaut sind, welche in 1,6-Verknüpfung vorliegen. Die Quervernetzung wird durch Epichlorhydrin vorgenommen. Das Gel quillt in wässrigen Lösungen, Dimethylsulfoxid und Formamid. Das Quellvermögen in organischen Lösungsmitteln ist nicht so hoch wie in wässrigen. Es gibt Gelmaterialien, die für Arbeiten mit organischem Lösungsmittel besser geeignet sind. Da in dieser Arbeit ausschließlich mit wässrigen Lösungen gearbeitet wird, sind Dextrangele gut geeignet für die entsprechenden Chromatographien. Die verschiedenen G-Typen von Sephadexgelen variieren in ihrem Grad an Quervernetzung und damit in ihrem Quellvermögen. Zudem gibt es drei verschiedene Partikelgrößenbereiche, in denen die G-Typen erhältlich sind: superfein, medium und grob (coarse). Die superfeinen Materialien eignen sich am besten für Dünnschichtchromatographien, während sich die anderen beiden Partikelgrößen für Säulenchromatographien im präparativen Maßstab anbieten. In dieser Arbeit kommen Materialien mit dem Partikelgrößenbereich „medium“ zum Einsatz.

Bei dem für diese Chromatographie verwendeten Säulenmaterial (Sephadex G-50) liegt der Ausschlußbereich der aufzutrennenden Moleküle zwischen 1500 und 30000 Da („Gelfiltration:

Principles and Methods“, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden, 2003). Dies bedeutet, daß Moleküle mit einem Molekulargewicht > 30000 Da in keine Poren einzudringen vermögen und somit die Säule auf direktem Wege mit dem Fließmittel wieder verlassen. Bei Molekülen mit einem Molekulargewicht < 1500 Da hingegen kann keine weitere Auftrennung mittels Sephadex G-50 erlangt werden, da sie allesamt in jegliche Poren eindringen können und somit in etwa die gleiche Retentionszeit besitzen.

Von den beiden relevanten Substanzklassen (Proteinaseinhibitoren mit Gerinnungswirkung und natriumkanalwirksame Toxine) ist bekannt, daß ihr Molekulargewicht im mittelmolekularen Bereich anzusiedeln ist. So liegen die Proteinaseinhibitoren in einem Molekulargewichtsbereich von etwa 6000 bis 6500 Da, während die Toxine ein Molekulargewicht von ca. 3000 bis 5000 Da aufweisen. Es läßt sich folglich voraussagen, daß beide Substanzklassen in den mittleren Fraktionen der Chromatographie zu finden sein werden.

Als Fließmittel bei dieser Chromatographie dient 0,3-molare Essigsäure. Die Säure sorgt dafür, daß saure Aminosäuren in protonierter Form vorliegen und somit keine negative Ladung aufweisen. Somit werden elektrostatische Wechselwirkungen mit basischen, und damit unter den gegebenen Umständen positiv geladenen Aminosäuren unterbunden. Diese Wechselwirkungen könnten nämlich dazu führen, daß beispielsweise kleine Polypeptide mit positiver Nettoladung durch große Polypeptide mit negativer Nettoladung elektrostatisch angezogen werden, wodurch sie die Fähigkeit einbüßen, in die Poren zu diffundieren und somit die Säule schneller verlassen, als es ihrem Molekulargewicht und ihrer Größe entsprechen würde.

Material und Ausrüstung

Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280$ nm
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	7 x 110 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-50, medium (Pharmacia)
Flußrate	7 ml/min (XAD ₂ -Fraktionen 1 bis 6/1, 6/3) 6 ml/min (XAD ₂ -Fraktion 6/2)
Fraktionsgröße	28 ml / 4 min (XAD ₂ -Fraktionen 1 bis 6/1, 6/3) 30 ml / 5 min (XAD ₂ -Fraktion 6/2)
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung der Chromatographie

Die bei dem vorangegangenen Chromatographieschritt gewonnenen Fraktionen, die unter Umständen noch Salz aus dem Meerwasser enthalten, werden nun nacheinander einzeln auf die mit Sephadex G-50 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3-molarer Essigsäure eluiert. Die Chromatographie ist beendet, wenn kein Salz mehr von der Säule kommt. Diesen Zeitpunkt kann man anhand der Leitfähigkeitsmessung ersehen. Zu diesem Zeitpunkt sollte kein Polypeptid mehr von der Säule kommen. Kontrollierbar ist dies mittels der photometrischen Absorptionsmessung.

Die auf diese Weise gewonnenen Fraktionen mittleren Molekulargewichts werden am Rotationsverdampfer eingeengt, gefriergetrocknet und anschließend einer *Ionenaustauschchromatographie* an dem Kationenaustauscher SP Sephadex C-25 unterzogen.

2.2.4 Ionenaustauschchromatographie an dem Kationenaustauscher SP Sephadex C-25

Prinzip der Trennung

Die Ionenaustauschchromatographie ist ebenfalls eine wichtige Methode zur Proteinauftrennung. Sie nutzt die Unterschiede in Vorzeichen und Größe der Nettoladungen der Peptide und Proteine bei vorgegebenem pH-Wert. Diese Unterschiede liegen in der Aminosäurezusammensetzung, die für jedes Peptid charakteristisch ist, begründet. So weisen verschiedene Aminosäuren unterschiedliche pKs-Werte auf. Die Säulenfüllung besteht aus einem Harz, welches geladene Gruppen enthält, und zwar beim Kationenaustauscher negativ und beim Anionenaustauscher positiv geladene Gruppen. Die Bindung der Substanzen (Proteine) erfolgt aufgrund der elektrostatischen Anziehung zwischen entgegengesetzten Ladungen. Je nach vorherrschendem pH-Wert sind die Proteine unterschiedlich stark geladen. Sie konkurrieren miteinander um die Bindung an das Austauscherharz. Die Trennung kann durch Anwendung eines pH- oder eines Salzgradienten erfolgen. In diesem Fall wird ein Salzgradient verwendet.

Das Säulenmaterial bei dieser Ionenaustauschchromatographie ist SP Sephadex C-25. Dabei handelt es sich um ein quervernetztes Dextranderivat, welches durch stabile Etherbindungen an den Glucosemolekülen funktionelle Gruppen enthält, die für den Ionenaustausch verantwortlich sind. Bei diesem Derivat liegen als funktionelle Gruppen Sulphonylreste vor, wodurch ein stark saurer Kationenaustauscher entsteht. Die Kennzahl 25 weist darauf hin, daß die Verbindung von Sephadex G-25 abgeleitet ist. Sephadex G-25 ist im Vergleich zu Sephadex G-50 stärker quervernetzt und besitzt somit kleinere Poren. Der Kennbuchstabe „C“ charakterisiert die Substanz als Kationenaustauscher (engl. „cation“).

Fließmittel bei diesem Chromatographieschritt ist ein Ammoniumacetatpuffer vom pH-Wert 5,4, der mit einem linearen Gradienten von 0,01 bis 1 Mol pro Liter unter Mithilfe einer peristaltischen Pumpe zur Elution verwendet wird.

Weniger stark basische Peptide lösen sich bereits bei dem 0,01-molaren Puffer von der Säule. Zur Elution der stärker basischen Peptide sind höhere Ionenstärken vonnöten.

Material und Ausrüstung

Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	3 x 33 cm
Säulenmaterial	SP Sephadex C-25 (Pharmacia)
Flußrate	10 ml/min
Fraktionsgröße	30 ml/3 min
Auftragsmedium	destilliertes Wasser
Elution	linearer Gradient von 0,01 M über 0,1 und 0,3 bis 1 M

Fließmittel (2,4 Liter + 2,4 Liter)
Ammoniumacetatpuffer (pH 5,4)

Durchführung der Chromatographie

Die entsprechende Fraktion wird mittels 0,01-molarem Puffers auf die mit dem Kationenaustauscher gefüllte Säule aufgebracht.

1. Spülen mit 0,01-molarem Puffer (bis eindeutig zu erkennen, daß kein Peptid mehr von der Säule kommt)
2. linearer Gradient von 0,01 auf 0,1 molar (2,4 Liter + 2,4 Liter)
3. 0,1 molarer Puffer (bis auszuschließen ist, daß sich weiteres Peptid von der Säule löst)
4. linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 molar (2,4 Liter + 2,4 Liter)
5. 0,3 molarer Puffer (bis auszuschließen ist, daß sich weiteres Peptid von der Säule löst)
6. linearer Gradient von 0,3 auf 1 molar (2,4 Liter + 2,4 Liter)
7. 1 molarer Puffer

Um einen linearen Gradienten von dem Puffer niedrigerer auf den Puffer höherer Konzentration zu erzielen, werden Gradientenmischer aus Glas verwendet. Je nach Füllvolumen der Säule werden unterschiedlich große Gradientenmischer eingesetzt. Ein derartiger Gradientenmischer besteht aus zwei zylinderförmigen Glasgefäßen, die über einen kurzen Gummischlauch miteinander verbunden sind. Eines der beiden zylindrischen Glasgefäße besitzt eine weitere Öffnung, von welcher aus ein Gummischlauch eine Verbindung zur peristaltischen Pumpe und von hieraus zur Säule schafft. In das besagte Glasgefäß wird der Puffer mit der niedrigeren Pufferkonzentration gefüllt, während der Puffer mit der höheren Puffersalzkonzentration in das andere Glasgefäß kommt. Ein Magnetrührfischchen auf der Seite des geringer konzentrierten Puffers sorgt nun unter Einwirkung des Rührmotors für einen linearen Anstieg der Pufferkonzentration während der Chromatographie.

2.2.5 Größenausschlußchromatographie zur Entsalzung an Sephadex G-50

Prinzip der Chromatographie

Das Trennungsprinzip der Größenausschlußchromatographie (auch Gelfiltrationschromatographie genannt) wurde weiter oben bereits erläutert. Hier soll nun das Puffersalz Ammoniumacetat von den Peptiden bzw. Proteinen abgetrennt, die Fraktionen also entsalzt werden. Der Entsalzungseffekt entsteht dadurch, daß die kleinen Salzionen problemlos in die Gelporen gelangen können und somit lange auf der Säule verweilen und deutlich nach den Proteinen und Polypeptiden eluiert werden. Allerdings kann es trotzdem passieren, daß bisweilen die kleineren Polypeptide gleichzeitig mit dem Salz austreten. In so einem Falle wird im Anschluß eine weitere Größenausschlußchromatographie an einem anderen Gelmaterial (z. B. Sephadex G-25) durchgeführt.

Material und Ausrüstung

Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitsmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 100 cm oder 3 x 100 cm oder 3 x 120 cm (je nach Fraktionsgröße)
Säulenmaterial	Sephadex G-50 (Pharmacia)
Flußrate	je nach Säulengröße
Fraktionsgröße	je nach Flußrate unterschiedlich
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung der Chromatographie

Die zu entsalzende Fraktion wird auf die Säule aufgebracht. Anschließend wird so lange mit 0,3 molarer Essigsäure gespült, bis kein Salz mehr von der Säule kommt.

2.2.6 Entsalzung mittels Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-25

Prinzip der Chromatographie

Das Prinzip der Trennung ist identisch mit dem der Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50. Im Unterschied zu dem Sephadex G-50 hat das Sephadex G-25 kleinere Poren, in welche die Salzionen problemlos einzudringen vermögen, während die Polypeptide aufgrund ihrer Größe hauptsächlich von dem Elutionsmittelstrom durch die Säule transportiert werden und somit diese deutlich früher die Säule verlassen. Daher gelingt es mit dieser Methode oftmals, Fraktionen, die bei der vorangegangenen Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G-50 nicht entsalzt werden konnten, salzfrei zu gewinnen.

Material und Ausrüstung

Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 50 cm oder 4 x 45 cm oder 2,5 x 100 cm (je nach Fraktionsgröße)
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	je nach Säulengröße
Fraktionsgröße	je nach Flußrate unterschiedlich
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung der Chromatographie

Nach Aufbringen der entsprechenden Fraktionen auf die Säule wird mittels 0,3-molarer Essigsäure solange eluiert, bis kein Salz mehr von der Säule kommt. Im Normalfall sollte dann bereits die gesamte Menge an Polypeptiden bzw. Proteinen eluiert sein.

Durch die bisher beschriebenen Arbeitsschritte werden Polypeptidfraktionen gewonnen, die mittels Büchi-Rotationsverdampfern zunächst eingengt werden, um dann einen Gefriertrocknungsschritt zu durchlaufen. Diese lyophilisierten Fraktionen werden im Anschluß biologischen Aktivitätstests unterzogen (Toxizitätstests an Krabben, Blutgerinnungstests). Außerdem wird bei allen gewonnenen Fraktionen der Reinheitsgrad mittels HPLC festgestellt. Anhand dieser Untersuchungen werden die Fraktionen für die weiteren Aufreinigungsschritte selektiert. Entscheidend hierbei ist eine deutlich meßbare biologische Aktivität und ein Reinheitsgrad, der mittels der säulenchromatographischen Verfahren Ionenaustausch- und Größenausschlußchromatographie einen höheren Standard zu erreichen verspricht. Sind beispielsweise bei der analytischen HPLC-Untersuchung viele Peaks sehr nah bei einander zu beobachten, so ist zu vermuten, daß es sich beispielsweise um Isotoxine oder Isoenzyme handelt, die mit Hilfe der angewendeten Verfahren kaum voneinander zu trennen sein dürften. Hier könnte bestenfalls eine Trennung mittels präparativer HPLC versucht werden.

Um die Auswahlkriterien der Fraktionen nachvollziehen zu können, müssen an dieser Stelle Vorgriffe auf die Ergebnisse der HPLC- und Aktivitätsuntersuchungen vorgenommen werden. Die Details dieser Untersuchungen sind den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen.

Auf der folgenden Seite ist in Abbildung 2 ein Übersichtsschema der bisherigen Isolierungsvorgänge zu sehen.

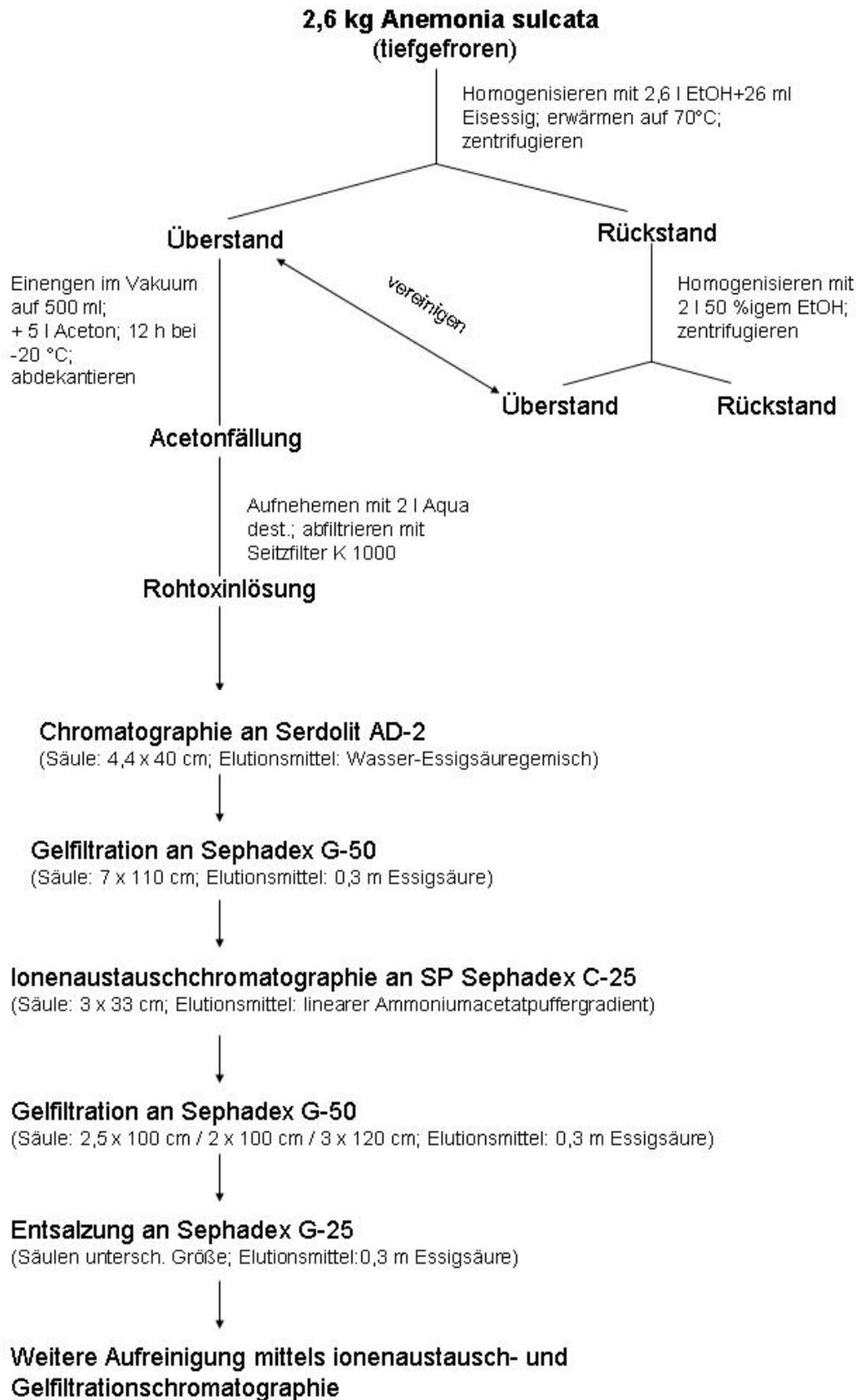


Abb. 3: Übersichtsschema über den bisherigen Isolierungsverlauf

2.2.7 Weitere Aufreinigung der gerinnungsaktiven Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b

2.2.7.1 Allgemeines

Mit den Fraktionen, die in der Gerinnung interessante Ergebnisse liefern und noch keinen so hohen Reinheitsgrad besitzen, werden **weitere Trennungsschritte** durchgeführt. Dabei soll der erste Schritt jeweils in einer **Ionenaustauschchromatographie** bestehen.

Vor der Durchführung dieser Ionenaustauschchromatographie zur weiteren Aufreinigung der interessanten Fraktionen wurde eine Vergleichschromatographie einer Polypeptidfraktion aus *Anemonia sulcata* an drei verschiedenen, starken Kationenaustauschern (**SP Sephadex C-25, Fractogel® EMD SO₃⁻ und Bio Rad Macro-Prep® High S Support**) durchgeführt, um ersehen zu können, welches Material die besten Trennergebnisse liefert. Als Ergebnis ist zu erwähnen, daß nach Auswertung der Chromatogramme keine gravierenden Unterschiede zwischen den drei Austauschermaterialien festzustellen waren. Aus diesem Grunde werden in den folgenden Chromatographien alle drei Materialien nebeneinander verwendet unter Berücksichtigung der Vor- und Nachteile in ihrer Handhabung.

Vor der weiteren praktischen Durchführung seien zunächst einmal kurz die Eigenschaften der Austauscher vorgestellt:

Charakterisierung der verwendeten Austauschermaterialien

Bei allen drei Harzen handelt es sich um starke Kationenaustauscher. Die Eigenschaft „stark“ beschreibt dabei keineswegs die Stärke der Bindung der entsprechenden Substanzen an die Austauschergruppen. Vielmehr charakterisiert sie die Eigenschaft der Harze, über einen weiten pH-Bereich in ionisierter Form vorzuliegen. Dies bietet gegenüber den schwachen Kationenaustauschern den Vorteil, daß man den pH-Wert des Elutionsmittels auf die Bedürfnisse der Probe abstimmen kann, ohne dabei die Funktionsfähigkeit des Harzes maßgeblich zu verändern.

SP Sephadex C-25: Die chemische Beschaffenheit des Harzes wurde bereits weiter oben näher erläutert. Vorteile, die dieses Harz bietet, sind eine sehr geringe unspezifische Adsorption der Moleküle wie Nukleinsäuren, Proteine und anderer labiler biologischer Substanzklassen an das Säulenmaterial, schonende Chromatographiebedingungen, so daß es zu keiner Denaturierung aufgetragener Proteine durch das Gel kommt, und eine hohe Probenkapazität.

Nachteilig auswirken kann sich allerdings das Quellungsverhalten des Gels, welches von der Ionenstärke des Elutionsmittels abhängig ist. So ist der Quellungsgrad des SP Sephadex C-25 bei geringer Ionenstärke maximal, während das Gelbett bei der Anwendung eines Salzgradienten die Eigenschaft des Schrumpfens aufweist. Dies führt zu einer Erhöhung des Säulendrucks, wodurch die Flußrate negativ beeinflusst wird. Hinzu kommt, daß sich das Gel nicht in der Säule regenerieren läßt, was wiederum ein häufiges Neubefüllen der Säule erfordert.

Fractogel® EMD SO₃⁻: Bei diesem Material handelt es sich um ein Harz auf Methacrylatbasis. Das Besondere an diesem sogenannten „Tentakelaustauscher“ sind die langen linearen Polymerketten, welche an die Hydroxylgruppen des Harzes gebunden sind. Sie tragen Sulphonylreste als funktionelle Gruppen und ragen wie Tentakel gerade aus dem Gel heraus. Diese Anordnung bietet günstige sterische Verhältnisse auch für große, unförmige Moleküle und ermöglicht diesen eine problemlose Bindung an das Austauschermaterial. Weiterhin weist das Gel eine gute Druckstabilität auf und ermöglicht das Arbeiten mit hohen Flußraten. Ein deutlicher Vorteil gegenüber dem SP Sephadex C-25 ist die Tatsache, daß Fractogel® EMD SO₃⁻ bei Anwendung eines Salzgradienten nicht zum Schrumpfen neigt und direkt in der Säule regenerierbar ist.

Bio Rad Macro-Prep® High S Support: Hier liegt ein hydrophiles Harz auf Methacrylatbasis vor, welches als funktionelle Gruppen Methylsulfonatreste enthält. Es weist eine hohe Probenkapazität bei guter Auflösung und hoher Flußrate auf. Zudem ist es chemisch und physikalisch stabil. Auch hier ist der Vorteil des Nichtschrumpfens bei Anwendung eines Salzgradienten und die Regenerierbarkeit in der Säule im Gegenteil zu SP Sephadex C-25 zu erwähnen.

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die zu reinigenden Fraktionen mit Wirkung auf die Blutgerinnung aufgeführt (Details siehe Kapitel 3.3, ab S. 133):

Tabelle 1: Fraktionen, die eine interessante Wirkung in den Blutgerinnungsuntersuchungen aufweisen und weiter aufgereinigt werden sollen

Proben-Nummer	bisherige Isolierungsschritte zur Gewinnung der Fraktion
ASI GP 2	XAD ₂ -Fr. 4/Seph. G-50 Fr. 3+3b/SP Seph. C-25 Fr. 10/Seph. G-50 Fr. 1
ASI GP 3	XAD ₂ -Fr. 4/Seph. G-50 Fr. 3+3b/SP Seph. C-25 Fr. 10/Seph. G-50 Fr. 2
ASI GP 9	XAD ₂ -Fr. 4/Seph. G-50 Fr. 3+3b/SP Seph. C-25 Fr. 16/Seph. G-50 Fr. 2
ASI GP 10	XAD ₂ -Fr. 4/Seph. G-50 Fr. 3+3b/SP Seph. C-25 Fr. 16/Seph. G-50 Fr. 3+4
ASI GP 11	XAD ₂ -Fr. 4/Seph. G-50 Fr. 3+3b/SP Seph. C-25 Fr. 17/Seph. G-50 Fr. 2

Bei den Fraktionen, die in die Blutgerinnung eingreifen, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Fraktionen, die Proteinaseinhibitoren enthalten. So wurde eine gewisse Gerinnungsaktivität der Proteinaseinhibitoren aus der *Anemonia sulcata* bereits 1978 beschrieben (H. D. Bruhn, L. Béress). Von diesen Proteinaseinhibitoren weiß man, daß sie bei der Elution mit Ammoniumacetatpuffer frühestens bei einer Pufferkonzentration von 1 Mol pro Liter eluiert werden. So wird hier die Elution gleich mit 0,1 molarem Puffer begonnen.

Dann folgt ein Gradient von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer, um mit einem Gradienten von 0,3 auf 1 molaren Puffer die Trennung abzuschließen.

2.2.7.2 ASI GP 2

a) Ionenaustauschchromatographie von ASI GP 2 an Bio Rad Macro-Prep® High S Support

Material und Geräte

Probe	ca. 50 mg Milligramm ASI GP 2, gelöst in 0,1 m Puffer
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	0,5 x 9 cm
Säulenmaterial	Bio Rad Macro-Prep® High S Support (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA)
Flußrate	2,5 ml/min
Fraktionsgröße	15 ml/6 min
Auftragsmedium	0,1 m Puffer (pH 5,1)
Elution	linearer Gradient von 0,1 m über 0,3 m auf 1 m (50 ml + 50 ml)
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

Die in 0,1 molarem Puffer (pH 5,1) gelöste Probe wird auf die mit Bio Rad-Gel gefüllte Säule aufgetragen.

- 1) Nachspülen mit 0,1 m Puffer
- 2) linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 m (50 ml + 50 ml)
- 3) Spülen mit 0,3 m Puffer (ca. 50 ml)
- 4) linearer Gradient von 0,3 auf 1 m (50 ml + 50 ml)
- 5) Spülen mit 1 m Puffer

b) Entsalzung der Folgefraktionen von ASI GP 2 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)

Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 30 cm (Fraktionen 2, 2b) und 4 x 40 cm (Fraktion 1)
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	3 ml/min und 5,5 ml/min
Fraktionsgröße	12 ml/4min und 22 ml/4 min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.7.3 ASI GP 3

a) Ionenaustauschchromatographie von ASI GP 3 an Bio Rad Macro-Prep® High S Support

Material und Geräte

Probe	ca. 50 mg Milligramm ASI GP 3, gelöst in 0,1 m Puffer
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	0,5 x 9 cm
Säulenmaterial	Bio Rad Macro-Prep® High S Support (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA)
Flußrate	2,5 ml/min
Fraktionsgröße	15 ml/6 min
Auftragsmedium	0,1 m Puffer (pH 5,1)
Elution	linearer Gradient von 0,1 m über 0,3 m auf 1 m (50 ml + 50 ml)
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

Die in 0,1 molarem Puffer (pH 5,1) gelöste Probe wird auf die mit Bio Rad-Gel gefüllte Säule aufgetragen.

- 1) Nachspülen mit 0,1 m Puffer
- 2) linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 m (50 ml + 50 ml)
- 3) Spülen mit 0,3 m Puffer (ca. 50 ml)
- 4) linearer Gradient von 0,3 auf 1 m (50 ml + 50 ml)
- 5) Spülen mit 1 m Puffer

b) Entsalzung der Folgefraktionen von ASI GP 3 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 30 cm (Fraktionen 1b) und 4 x 40 cm (Fraktion 1a und 1)
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	3 ml/min und 5,5 ml/min
Fraktionsgröße	12 ml/4min und 22 ml/4 min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.7.4 ASI GP 9

a) Ionenaustauschchromatographie von ASI GP 9 an SP Sephadex C-25

Material und Geräte

Probe	ca. 250 mg Milligramm ASI GP 9, gelöst in 0,1 m Puffer
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	2 x 16 cm
Säulenmaterial	SP Sephadex C-25 (Pharmacia, Schweden)
Flußrate	2 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/8 min
Auftragsmedium	0,1 m Puffer (pH 5,1)
Elution	linearer Gradient von 0,1 m über 0,3 m auf 1 m (300 ml + 300 ml)
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

Die in 0,1 molarem Puffer (pH 5,1) gelöste Probe wird auf die mit Bio Rad-Gel gefüllte Säule aufgetragen.

- 1) Nachspülen mit 0,1 m Puffer
- 2) linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 m (300 ml + 300 ml)
- 3) Spülen mit 0,3 m Puffer (ca. 300 ml)
- 4) linearer Gradient von 0,3 auf 1 m (300 ml + 300 ml)
- 5) Spülen mit 1 m Puffer

b) Entsalzung der Folgefraktionen von ASI GP 9 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	4 x 40 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	4 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/4 min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.7.5 ASI GP 10

a) Ionenaustauschchromatographie von ASI GP 10 an SP Sephadex C-25

Material und Geräte

Probe	ca. 120 mg Milligramm ASI GP 10, gelöst in 0,1 m Puffer
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	1 x 35 cm
Säulenmaterial	SP Sephadex C-25 (Pharmacia, Schweden)
Flußrate	2 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/8 min

Auftragsmedium	0,1 m Puffer (pH 5,1)
Elution	linearer Gradient von 0,1 m über 0,3 m auf 1 m (175 ml + 175 ml)
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

Die in 0,1 molarem Puffer (pH 5,1) gelöste Probe wird auf die mit Bio Rad-Gel gefüllte Säule aufgetragen.

- 1) Nachspülen mit 0,1 m Puffer
- 2) linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 m (175 ml + 175 ml)
- 3) Spülen mit 0,3 m Puffer (ca. 175 ml)
- 4) linearer Gradient von 0,3 auf 1 m (175 ml + 175 ml)
- 5) Spülen mit 1 m Puffer

b) Entsalzung der Folgefraktionen von ASI GP 10 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	4 x 40 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	3,5 ml/min
Fraktionsgröße	14 ml/4 min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.7.6 ASI GP 11

a) Ionenaustauschchromatographie von ASI GP 11 an Bio Rad Macro-Prep® High S Support

Material und Geräte

Probe	ca. 50 mg Milligramm ASI GP 11, gelöst in 0,1 m Puffer
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	0,5 x 9 cm
Säulenmaterial	Bio Rad Macro-Prep® High S Support (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA)
Flußrate	2,5 ml/min
Fraktionsgröße	15 ml/6 min
Auftragsmedium	0,1 m Puffer (pH 5,1)
Elution	linearer Gradient von 0,1 m über 0,3 m auf 1 m (50 ml + 50 ml)
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

Die in 0,1 molarem Puffer (pH 5,1) gelöste Probe wird auf die mit Bio Rad-Gel gefüllte Säule aufgetragen.

- 1) Nachspülen mit 0,1 m Puffer
- 2) linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 m (50 ml + 50 ml)
- 3) Spülen mit 0,3 m Puffer (ca. 50 ml)
- 4) linearer Gradient von 0,3 auf 1 m (50 ml + 50 ml)
- 5) Spülen mit 1 m Puffer (ca. 50 ml)

b) Entsalzung der Folgefraktionen von ASI GP 11 auf Sephadex G-25

Material und Geräte

Probe	die gewonnene Fraktion der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 30 cm

Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	3 ml/min
Fraktionsgröße	12 ml/4min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die Fraktion wird auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.8 Weitere Aufreinigung der Fraktionen mit Toxinwirkung: Folgefraktionen XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a

In der folgenden Tabelle 2 sind die entsprechenden Folgefraktionen der Fraktion XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a der Übersichtlichkeit halber aufgelistet:

Tabelle 2: Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a mit Toxinwirkung, die einer weiteren Aufreinigung unterzogen werden sollen

Proben-Nummer	bisherige Isolierungsschritte zur Gewinnung der Fraktion
01 AS 948	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4a/SP Seph. C-25 Fr. 6/Seph. G-50 Fr.2
02 AS 193	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4a/SP Seph. C-25 Fr. 12/Seph. G-50 Fr.2

2.2.8.1 01 AS 948

a) Ionenaustauschchromatographie von 01 AS 948 an Fractogel® EMD SO₃⁻

Material und Geräte

Probe	50 Milligramm 01 AS 948, gelöst in Aqua dest.
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	0,7 x 18 cm
Säulenmaterial	Fractogel® EMD SO ₃ ⁻ (Merck, Darmstadt)
Flußrate	1 ml/min
Fraktionsgröße	8 ml/8 min
Auftragsmedium	Aqua dest.
Elution	linearer Gradient von 0,01 über 0,1 m (50 ml + 50 ml), dann direkt auf 1 m
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

- 1) Auftragen und Nachspülen mit Aqua dest.

- 2) Spülen mit 0,01 m Puffer (bis sicher ist, daß kein Peak mehr kommt)
- 3) linearer Gradient von 0,01 m auf 0,1 m (50 ml + 50 ml)
- 4) Spülen mit 50 Millilitern 0,1 m Puffer (bis sicher ist, daß kein Peak mehr kommt)
- 5) Spülen mit 1 m Puffer

b) Entsalzung der Folgefraktionen von 01 AS 948 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 30 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	4 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/4min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.8.2 02 AS 193

a) Ionenaustauschchromatographie von 02 AS 193 an Fractogel® EMD SO_3^-

Material und Geräte

Probe	79 mg Milligramm 02 AS 193, gelöst in 0,01 m Puffer; Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)

Säulendimension	0,7 x 18 cm
Säulenmaterial	Fractogel® EMD SO ³ (Merck, Darmstadt)
Flußrate	2 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/8 min
Auftragsmedium	0,01 molarer Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)
Elution	linearer Gradient von 0,01 über 0,1 m und 0,3 m (100 ml + 100 ml), dann direkt auf 1 m
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

Zunächst wird die Substanz in 0,01 molarem Puffer gelöst. Die entstandene Lösung weist allerdings eine Trübung auf. Aus diesem Grunde werden einige Tropfen Eisessig hinzugegeben, wodurch die Trübung jedoch nicht behoben werden kann. Aus diesem Grunde wird die Probe filtriert, der Rückstand aufbewahrt und die nun klare Lösung auf die mit Fractogel gefüllte Säule aufgetragen.

- 1) Auftragen und Nachspülen mit 0,01 m Puffer
- 2) linearer Gradient von 0,01 auf 0,1 m (100 ml + 100 ml)
- 3) Spülen mit ca. 30 Millilitern 0,1 m Puffer (bis sicher ist, daß kein Peak mehr kommt)
- 4) linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 m (100 ml + 100 ml)
- 5) Spülen mit 1 m Puffer (ohne Gradienten)

b) Entsalzung der Folgefraktionen von 02 AS 193 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 30 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	4 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/4min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.9 Weitere Aufreinigung der Fraktionen mit Toxinwirkung: Folgefraktionen XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b

In der folgenden Tabelle 3 sind die entsprechenden Folgefraktionen der Fraktion **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b** der Übersichtlichkeit halber aufgelistet:

Tabelle 3: Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b mit Toxinwirkung, die einer weiteren Aufreinigung unterzogen werden sollen

Proben-Nummer	bisherige Isolierungsschritte zur Gewinnung der Fraktion
01 AS 597	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 6/Seph. G-50 Fr.2
01 AS 602	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 10/Seph. G-50 Fr.1
01 AS 604	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 10/Seph. G-50 Fr.5
01 AS 605	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 11/Seph. G-50 Fr.1

2.2.9.1 01 AS 604

Eine Ausnahme bildet die Fraktion **01 AS 604**, welche laut der HPLC-Ergebnisse bereits einen hohen Reinheitsgrad besitzt, so daß eine weitere Ionenaustauschchromatographie nicht sinnvoll erscheint. Allerdings ist diese Fraktion noch salzhaltig, weswegen sie lediglich einer **Entsalzung** auf **Sephadex G-25** unterzogen wird:

Material und Ausrüstung

Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	3 x 35 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	4 ml/min
Fraktionsgröße	je nach Flußrate unterschiedlich
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die Fraktion 01 AS 604 wird auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

Mit den übrigen Folgefraktionen der Fraktion XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b werden zunächst **Ionenaustauschchromatographien** durchgeführt. Dabei kommt lediglich Fractogel® EMD SO₃⁻ als Austauscherharz zum Einsatz.

2.2.9.2 01 AS 597

a) Ionenaustauschchromatographie von 01 AS 597 an Fractogel® EMD SO₃⁻

Material und Geräte

Probe	10 mg Milligramm 01 AS 597, gelöst in Aqua dest.
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionsssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	0,5 x 9 cm
Säulenmaterial	Fractogel® EMD SO ₃ ⁻ (Merck, Darmstadt)
Flußrate	0,5 ml/min
Fraktionsgröße	5 ml/10 min
Auftragsmedium	Aqua dest.
Elution	linearer Gradient von 0,01 auf 0,1 m (100 ml + 100 ml), dann direkt auf 1 m
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

- 1) Auftragen und Nachspülen mit Aqua dest.
- 2) Spülen mit 0,01 m Puffer
- 3) linearer Gradient von 0,01 auf 0,1 m (30 ml + 30 ml)
- 4) Spülen mit 0,1 m Puffer (ca. 30 ml)
- 5) Spülen mit 1 m Puffer (ohne Gradienten)

b) Entsalzung der Folgefraktionen von 01 AS 597 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)

Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 30 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	4 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/4min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die bei der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie gewonnenen Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.9.3 01 AS 602

a) Ionenaustauschchromatographie von 01 AS 602 an Fractogel® EMD SO₃⁻

Material und Geräte

Probe	ca. 50 mg Milligramm 01 AS 602, gelöst in 0,01 m Puffer; Zusatz von einigen Tropfen Essigsäure
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	0,7 x 18 cm
Säulenmaterial	Fractogel® EMD SO ₃ ⁻ (Merck, Darmstadt)
Flußrate	2,5 ml/min
Fraktionsgröße	20 ml/8 min
Auftragsmedium	0,01 m Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)
Elution	linearer Gradient von 0,01 m über 0,1 m auf 0,3 m (100 ml + 100 ml), dann direkt auf 1 m
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

Die in 0,01 molarem Puffer (pH 5,1) gelöste Probe wird auf die mit Fractogel gefüllte Säule aufgetragen.

- 1) Nachspülen mit 0,01 m Puffer
- 2) linearer Gradient von 0,01 auf 0,1 m (100 ml + 100 ml)
- 3) Spülen mit 0,1 m Puffer (ca. 100 ml)

- 4) linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 M (60 ml + 60 ml)
- 5) Spülen mit 1 M Puffer (ca. 60 ml)

b) Entsalzung der Folgefraktionen von 01 AS 602 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie (Fraktionen 1, 2, 2b, 3 und 4)
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 30 cm (Fraktionen 1, 2, 2b und 3) und 4 x 40 cm (Fraktion 4)
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	4 ml/min und 5,5 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/4min und 22 ml/4 min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

Durchführung

Die zuvor gewonnenen Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.9.4 01 AS 605

a) Ionenaustauschchromatographie von 01 AS 605 an Fractogel® EMD SO_3^-

Material und Geräte

Probe	10 mg Milligramm 01 AS 605, gelöst in Aqua dest.; Zusatz von einem Tropfen Essigsäure
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Peristaltische Pumpe	LKB 2115 Multiperplex (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	0,5 x 9 cm
Säulenmaterial	Fractogel® EMD SO_3^- (Merck, Darmstadt)
Flußrate	1,5 ml/min
Fraktionsgröße	12 ml/8 min
Auftragsmedium	Aqua dest.

Elution	linearer Gradient von 0,01 m über 0,1 m und 0,3 m (30 ml + 30 ml) auf 1 m (15 ml + 15 ml)
Fließmittel	Ammoniumacetatpuffer (pH 5,1)

Durchführung

Die in Aqua destillata gelöste Probe wird auf die mit Fractogel gefüllte Säule aufgetragen.

- 1) Nachspülen mit etwas Aqua dest
- 2) Spülen mit 0,01 m Puffer (pH 5,1)
- 3) linearer Gradient von 0,01 auf 0,1 m (30 ml + 30 ml)
- 4) Spülen mit 0,1 m Puffer (ca. 30 ml)
- 5) linearer Gradient von 0,1 auf 0,3 m (30 ml + 30 ml)
- 6) Spülen mit 0,3 molarem Puffer (ca. 60 ml)
- 7) linearer Gradient von 0,3 auf 1 m (15 ml + 15 ml)

b) Entsalzung der Folgefraktionen von 01 AS 605 auf Sephadex G-25

Material und Ausrüstung

Probe	die gewonnenen Fraktionen der vorangegangenen Ionenaustauschchromatographie (Fraktionen 1 und 2)
Detektor	LKB 2138 Uvicord S (Pharmacia, Schweden)
Wellenlänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmeßgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitmeßzelle	Mikrodurchflußzelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	LKB 2065 Fallbügelschreiber (Pharmacia, Schweden)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia LKB)
Säulendimension	2,5 x 30 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-25 (Pharmacia)
Flußrate	4 ml/min
Fraktionsgröße	16 ml/4min
Fließmittel	0,3 molare Essigsäure

b) Durchführung

Die zuvor gewonnenen Fraktionen werden nacheinander auf die mit Sephadex G-25 gefüllte Säule aufgetragen und mittels 0,3 molarer Essigsäure eluiert.

2.2.10 Ausblick

Mit Hilfe des angewendeten Isolationsverfahrens wurden etliche Fraktionen gewonnen, welche im Folgenden auf ihre biologische Aktivität untersucht werden sollen. Diese Untersuchungen werden zeigen, wie gut es mittels des Verfahrens gelungen ist, die unterschiedlichen Substanzen voneinander zu trennen. Die Hoffnung basiert darauf, daß es gelungen ist, die beiden unterschiedlichen Aktivitäten (Toxizität auf Krabben,

Blutgerinnungsaktivität) so voneinander abgetrennt zu haben, daß sie in unterschiedlichen Fraktionen zu finden sein werden.

2.3 Analytische HPLC zur Abschätzung des Reinheitsgrades

2.3.1 Prinzip

Der Name HPLC steht für Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography). Dabei handelt es sich um eine Sonderform der Säulenchromatographie. Es wird nämlich ein Fließmittel (mobile Phase) unter erhöhtem Druck über eine gefüllte Säule (stationäre Phase) geschickt. Die Trennleistung bei einer Säulenchromatographie wird maßgeblich durch die Partikelgröße der stationären Phase bestimmt: Je kleiner die Partikel sind, desto besser ist die Trennleistung. Allerdings kommt es bei sehr kleinen Partikeln zu einem starken Druckabfall in der Säule. Dies bedeutet bei Chromatographien unter Atmosphärendruck unzumutbar niedrige Flußraten. Dieses Problems entledigt man sich bei der HPLC durch Anlegen eines erhöhten Drucks. So sind ausreichend hohe Flußraten bei sehr guten Trennleistungen gewährleistet.

2.3.2 Material

Eppendorfmixer 5432

Eppendorf Centrifuge 5414S

Aqua bidest (ipse)

Trifluoressigsäure (TFA), Merck, Darmstadt

Acetonitril (HPLC-Grad), Merck, Darmstadt

Waters HPLC-Anlage:

Waters data model 730

2 Wasserspumpen (600-A, 501) GBC LC 1610

Waters automated gradient controller model 640

Autosampler (GBC, Modell LC 1610) und EZ Chrome Software

Waters Lambda Max LC Spectrophotometer ($\lambda = 280 \text{ nm}$) und einstellbarem Watersdetektor 484 ($\lambda = 220 \text{ nm}$)

Säule: Machery & Nagel MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18

2.3.3 Aufbau einer HPLC-Anlage

Eine HPLC-Anlage besteht aus folgenden Bestandteilen:

- Pumpen
- Gradientenmischer
- Probeneinlaßsystem
- Trennsäulen
- Säulenfüllung: Das Säulenmaterial besteht in dieser Chromatographie aus einer sogenannten Reversed-Phase-Säule. Dabei handelt es sich um Kieselgel, dessen eigentlich polare Silanolgruppen durch Alkylierung hydrophobiert wurden. In diesem Fall wurden durch Alkylierung Octadecylgruppen (C-18) eingeführt, wodurch das Säulenmaterial unpolare Eigenschaften erhält. Bindungen an die Säule erfolgen demnach durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den zu trennenden Substanzen und der stationären Phase. Die Trennungen beruhen vor allem auf den unterschiedlichen unpolaren Eigenschaften der Polypeptide aus den Seeanemonenfraktionen. Je mehr unpolare, hydrophobe Anteile ein Polypeptid besitzt, desto stärker sind die Wechselwirkungen mit der Säule. Um die stärker gebundenen Verbindungen wieder von der Säule lösen zu können, muß ein Fließmittel mit

stärkeren Elutionseigenschaften verwendet werden. Bei der Reversed-Phase-Chromatographie kehrt sich die Elutionskraft der elutropen Reihe um, was bedeutet, daß das polare Wasser weniger Elutionskraft aufweist als das unpolarere Acetonitril. Zu Beginn der Chromatographie wird nur ein Acetonitrilanteil von 10 Prozent verwendet. Dadurch lösen sich nur weniger stark gebundene Polypeptide von der Säule. Im Laufe der Chromatographie erhöht sich der Anteil an Acetonitril nach und nach, wodurch immer stärker gebundene Polypeptide von der Säule gespült werden. Außerdem sind die Säulenmaterialpartikel porös, wodurch zusätzlich ein Molekularsiebeffekt entsteht, der zu der Trennung beiträgt.

- Fließmittel A: Acetonitril
- Fließmittel B: Aqua bidest mit Tetrafluoressigsäure (10 mmolar)
- Detektor: 220 nm und 280 nm

2.3.4 Durchführung

Von den lyophilisierten Fraktionen werden jeweils zwischen 100 und 400 Mikrogramm in Eppendorfgefäße eingewogen. Anschließend wird mit Aqua bidest dergestalt aufgefüllt, daß sich eine Konzentration von 1 Milligramm Seeanemonenfraktion pro Milliliter ergibt. Diese Ansätze werden anschließend in dem Eppendormixer 5432 fünf Minuten lang auf Stufe 1 gemischt, um dann in der Eppendorf Centrifuge 5414S etwa zwei Minuten bei 12 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert zu werden. Von der entstehenden Lösung werden dann jeweils mindestens 30 Mikroliter luftblasenfrei in die Probenbehälter des HPLC-Autosamplers pipettiert. Daraufhin wird der Probenhalter in den Autosampler gebracht, und die Messungen können gestartet werden.

Die Probe wird von dem Gerät automatisch auf die Säule aufgetragen. Dann wird mit einem Lösungsmittelgemisch von zehn Prozent Acetonitril und 90 Prozent Aqua bidest mit TFA gespült. In der nächsten halben Stunde erhöht sich der Anteil von Acetonitril gleichmäßig auf 50 Prozent. Zu diesem Zeitpunkt hat sich bereits der größte Teil des biologisch aktiven Materials von der Säule gelöst. Danach wird innerhalb von fünf Minuten ein Anteil von 100 Prozent Acetonitril erreicht und drei Minuten lang mit reinem Acetonitril gespült. Nun müßten sich die gebundenen Substanzen quantitativ von der Säule gelöst haben. Aus diesem Grund wird der Gradient innerhalb von zwei Minuten wieder auf die Ausgangskonzentration von zehn Prozent Acetonitril heruntergefahren und zur Equilibrierung der Säule 15 Minuten lang mit dieser Zusammensetzung gespült. Im Anschluß an diesen Spülvorgang ist die Säule bereit zur Vermessung der nächsten Probe.

Im Anschluß folgt eine Übersicht über das Elutionsprogramm der HPLC-Analyse:

- 1) Auftragen der Probe
- 2) Spülen mit 10 % Acetonitril (Fließmittel A) und 90 % Aqua bidest mit TFA (Fließmittel B)
- 3) Linearer Gradient von 10 % auf 50 % Acetonitril innerhalb von 30 Minuten
- 4) Linearer Gradient von 50 auf 100 % Acetonitril innerhalb von 5 Minuten
- 5) Spülen mit 100 % Acetonitril für 3 Minuten
- 6) Linearer Gradient von 100 auf 10 % Acetonitril (Anfangskonzentration) innerhalb von 2 Minuten

- 7) Spülen mit 10 % Acetonitril (Fließmittel A) und 90 % Aqua bidest mit TFA (Fließmittel B) für 15 Minuten; die Säule ist so equilibriert für weitere HPLC-Läufe

2.4 Gerinnungsuntersuchungen

2.4.1 Theoretische Grundlagen der Blutstillung

Die auf obige Weise gewonnenen Fraktionen sollen nun bezüglich ihrer Wirksamkeit auf die Gerinnung untersucht werden. Dies geschieht mittels verschiedener Gerinnungstests. Um die Prinzipien, nach denen diese Tests funktionieren, nachvollziehen zu können, erscheint es zunächst angebracht, sich die physiologischen Abläufe der Gerinnung vor Augen zu führen.

Der erste Abschnitt der Gerinnung, die sogenannte **primäre Hämostase**, setzt bei Gefäßverletzungen ein, bei denen es zur Freilegung von Subendothel und damit von Kollagen kommt. An dieses Kollagen lagern sich zunächst Thrombocyten an (*Plättchen-Adhäsion*), wobei der Von-Willebrand-Faktor als Brückenprotein dient. Die Plättchen verkleben daraufhin untereinander (*Plättchen-Aggregation*) und bilden einen Plättchenpfropf als primären Wundverschluss. Die nun aktivierten Plättchen stülpen ihre Membraninnenseite, die gerinnungsaktive Phospholipide und verschiedene Rezeptoren enthält, in einem sogenannten Flip-Flop-Mechanismus nach außen. Auf diese Weise wird beispielsweise der Glykoproteinrezeptor IIb/IIIa für den Von-Willebrand-Faktor und Fibrinogen zugänglich. An den Phospholipiden der Plättchenmembran kommt es zur Anreicherung von Gerinnungsfaktoren, an die sich die plasmatische Gerinnung anschließt, deren Endpunkt die Bildung eines festen Fibringerinnsels darstellt. (Details s. Gawaz, 2001)

Bei dieser **plasmatischen Gerinnung** (oder auch **sekundäre Hämostase** genannt) spielen eine Reihe von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen, die sogenannten Gerinnungsfaktoren, eine entscheidende Rolle. Sie werden mit römischen Ziffern benannt und lassen sich nach ihren Funktionen in 4 Gruppen einteilen: Die meisten von ihnen sind *Proenzyme*, die mit einer potentiellen *Proteinaseaktivität* ausgestattet sind, welche im normalen Zustand nicht zu Tage tritt. Vielmehr müssen sie zunächst durch einen übergeordneten aktivierten Gerinnungsfaktor, welcher bereits Proteinaseaktivität besitzt, aktiviert werden. Bei Proteinasen (auch Proteasen genannt) handelt es sich um Enzyme, die durch ihre Fähigkeit, Peptidbindungen von Proteinen aufzuspalten, charakterisiert sind. Die Proteinaseaktivität des übergeordneten aktivierten Faktors wird nun dazu eingesetzt, um von dem inaktiven untergeordneten Faktor ein bestimmtes Stück aus dem Aminosäurestrang abzuspalten, wodurch das aktive Zentrum des Proenzym freigelegt wird und der untergeordnete Faktor seine enzymatische Aktivität entfalten kann. Damit ist dieser Gerinnungsfaktor aktiviert und kann jetzt seinerseits einen untergeordneten inaktiven Gerinnungsfaktor in seine aktive Form überführen. Somit läuft der Gerinnungsvorgang kaskadenartig von Faktor über Faktor bis hin zur Fibringerinnselbildung ab, wie dies im endogenen Gerinnungssystem exemplarisch geschieht. Die aktivierten Faktoren werden durch ein „a“ nach ihrer römischen Kennzahl dargestellt. Desweiteren haben einige der Faktoren die Aufgabe von *Cofaktoren* zu übernehmen. Sie greifen meist in Form von Akzeleratoren in das Gerinnungsgeschehen ein und beschleunigen auf diese Weise den Ablauf der Gerinnungsvorgänge bis um das Tausendfache, womit sie eine ausreichend schnelle Reaktion auf Blutungsvorgänge garantieren. Bei der dritten Gruppe handelt es sich um *Katalysatoren*. Neben dem Lipoprotein Gewebefaktor (tissue factor, TF) gehören zu dieser Gruppe auch Calciumionen und Phospholipide. Die vierte Gruppe stellt das *Substrat Fibrinogen* dar, welches unter Thrombineinwirkung letztendlich das feste Blutgerinnsel ausbildet.

Nachdem nun die wichtigsten Bestandteile des plasmatischen Gerinnungssystems dargestellt wurden, können wir uns dessen Ablauf widmen. Es kann in zwei verschiedene Äste aufgeteilt werden: das exogene und das endogene Gerinnungssystem.

Das **exogene** (oder **extrinsische**) **System** hat einen kürzeren Reaktionsweg und läuft daher zügiger ab. Es wird durch das Gewebethromboplastin, das aus verletzten Zellen freigesetzt wird, in Gang gebracht. Bei dem Gewebethromboplastin handelt es sich um ein Phospholipoprotein, welches aus dem Gewebefaktor (TF) und Phospholipiden besteht. An den Proteinanteil dieses Phospholipoproteins wird mit Hilfe von Calciumionen ein Protein mit verborgener Proteinase-Aktivität gebunden, der sogenannte Gerinnungsfaktor VII. Die aufgeführten Komponenten bilden zusammen den sogenannten Faktor-VIIa-TF-Komplex. Die örtliche Konzentrierung durch Bildung des Komplexes ermöglicht eine Vervielfachung der Enzymaktivität und somit eine starke Beschleunigung des Gerinnungsvorganges. Durch die Bindung an den Gewebefaktor wird Faktor VII autokatalytisch in seine aktivierte Form überführt und erlangt hieraufhin die Fähigkeit, einen weiteren Gerinnungsfaktor durch proteolytische Aktivität in seine aktivierte Form zu überführen, nämlich den Faktor X. Bei diesem Faktor X handelt es sich um den zentralen Angelpunkt der plasmatischen Gerinnung. Bei ihm treffen das exogene und endogene Gerinnungssystem aufeinander und gehen auf eine gemeinsame Endstrecke.

Außerdem aktiviert der Faktor-VIIa-TF-Komplex auch Faktor IX zu IXa, welcher seinerseits wiederum Faktor X zu Faktor Xa zu aktivieren vermag. Dieser Zusammenhang zwischen den Faktoren VII, IX und X, und somit zwischen dem endogenen und exogenen Gerinnungssystem, wird als Jossa-Schleife bezeichnet (Barthels und von Depka, 2003; Hemker und Poliwoda, 1998). Letztendlich werden relativ geringe Mengen an Faktor Xa durch den Faktor-VIIa-TF-Komplex gebildet, da dieser Prozeß nach kurzer Zeit durch den Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) unterbunden wird. Allerdings ist diese geringe Menge an Faktor Xa ausreichend, um kleine Mengen von Prothrombin (Faktor II) in proteolytisch wirksames Thrombin (Faktor IIa) umzuwandeln. Dieses Thrombin ist das zentrale Gerinnungsenzym und besitzt die Fähigkeit, sowohl Thrombocyten, als auch den Faktor XI und die Cofaktoren V und VIII zu aktivieren.

Mit der Aktivierung des Faktors XI durch Thrombin wird die **endogene** (oder **intrinsische**) **Gerinnung** angestoßen. So aktiviert Faktor XIa weiteren Faktor IX zu IXa. Dieser bildet zusammen mit seinem Cofaktor VIIIa, mit Calciumionen und den Phospholipiden der Plättchen den Tenasekomplex. Auch diese Komplexbildung bewirkt eine starke Beschleunigung der Enzymaktivität des Faktors IXa und somit eine verstärkte Faktor-Xa-Bildung. Die anschließende Thrombinbildung aus Prothrombin durch Faktor Xa, die dem ersten Schritt der gemeinsamen Endstrecke des exo- und endogenen Gerinnungssystems entspricht, findet ebenfalls wieder durch Hilfe eines Komplexes, nämlich des Prothrombinase-Komplexes, statt. Die Serinproteinase des Komplexes ist in diesem Falle der Faktor Xa und der entsprechende Cofaktor Faktor Va. Das gebildete Thrombin besitzt die Fähigkeit, die Fibrinopeptide A und B vom Fibrinogen (Faktor I) abzuspalten, wodurch wasserlösliche Fibrinmonomere entstehen. Diese reagieren daraufhin mit einer spontanen Fibrinpolymerisation, aus der wasserlösliche Fibrinpolymere hervorgehen. Bei der sich anschließenden Fibrinstabilisierung kommt es unter der Einwirkung von Faktor XIIIa, bei dem es sich um eine durch Thrombin aktivierte Transglutaminase handelt, zu einer Quervernetzung der Fibrinpolymere. Dadurch entsteht schließlich ein wasserunlösliches Fibringerinnsel als dauerhafter Wundverschluß. (Übersicht s. Dempfle, 1999)

Neben der Aktivierung des Faktors XI durch Thrombin, welches der exogenen Gerinnung entstammt, gibt es eine weitere Aktivierungsmöglichkeit für das endogene Gerinnungssystem.

So wird durch aktivierende Oberflächen wie z. B. freiliegendes Kollagen der Gerinnungsfaktor XII aktiviert. Diese Reaktion verläuft zunächst autokatalytisch, gleich nach Anlauf der Reaktion jedoch sorgt aktivierter Faktor XII für eine Aktivierung von Präkallikrein zu aktivem Kallikrein, welches wiederum die Umsetzung von Faktor XII in die aktivierte Form beschleunigt. Dieses Präkallikrein liegt dabei genau wie der Faktor XI an Hochmolekulargewichtskininogen (HMWK) adsorbiert vor, welches sich seinerseits in Nachbarschaft des Faktors XII an das Kollagen bindet und als Cofaktor fungiert. Der Gerinnungsablauf verläuft nun kaskadenartig über eine Aktivierung von Faktor XI, weiter über die Aktivierung von Faktor IX hin zur Aktivierung von Faktor X nach dem zuvor beschriebenen Schema.

Mit Entstehung des Faktors Xa beginnt die zuvor bereits angesprochene gemeinsame Endstrecke der plasmatischen Gerinnung, die in die Bildung von unlöslichen Fibrinpolymeren mündet, womit der Endpunkt der plasmatischen Gerinnung erreicht ist. Im Anschluß kommt es nun durch Mitwirkung der Thrombocyten zur Retraktion des Fibringerinnsels, die mit einer Auspressung von Serum einhergeht. Durch diesen Vorgang ist für einen dauerhaften Verschuß der Gefäßverletzung gesorgt.

Der Stellenwert des Faktors XIIa bei der Aktivierung der endogenen Gerinnungsabläufe wird heute jedoch eher als gering eingestuft. Grund zu dieser Annahme gibt beispielsweise die Tatsache, daß ein ausgeprägter Faktor-XII-Mangel zu keiner nennenswerten Erhöhung der Blutungsneigung führt (Kubalek, 2000, nach: Gailani, 1994). Vielmehr wird bei der Aktivierung des endogenen Systems über Faktor XI dem Präkallikrein die entscheidende Rolle zugesprochen (Kubalek, 2000, nach: Schmaier, 1997; Motta et al., 1998; Roikjaer et al., 1998).

Damit es nicht zu einer ungebremsten Fibrinbildung kommen kann, hat die Natur für entsprechende physiologische **Inhibitoren der Gerinnung** gesorgt.

Zu nennen wäre vor allem das **Antithrombin**, welches natürlicherweise im Plasma vorkommt. Seine Aufgaben bestehen in erster Linie in einer Hemmung der Faktoren IIa (Thrombin) und Xa. In deutlich geringerem Umfang werden auch die Serinproteinasen Faktor IXa, XIa und XIIa durch Antithrombin inaktiviert. Dabei sorgt der Serinproteinaseninhibitor (Serpine) Antithrombin als sogenanntes „Suicid-Substrat“ für eine 1:1-Komplexbildung mit den jeweiligen zu hemmenden Faktoren, welche gleichbedeutend mit einer irreversiblen Hemmung derselbigen ist. Die Hemmwirkung wird um ein Vielfaches (ca. 200-fach) durch das Einwirken von Heparin verstärkt, welches eine Konformationsänderung des Antithrombins bewirkt, aus welcher eine Freilegung seines aktiven Zentrums resultiert. Für die Beschleunigung der Inaktivierung von Thrombin muß sich das Heparin sowohl an das Antithrombin als auch an das Thrombin binden, während für die Faktor Xa-Inaktivierung eine Bindung an das Antithrombin ausreichend ist. Antithrombin ist nur in der Lage, freie, aktivierte Faktoren zu inaktivieren. Die Faktoren hingegen, die an Fibrin oder Phospholipide gebunden sind, können durch Antithrombin nicht inaktiviert werden (Weitz et al., 1990; Eisenberg et al., 1993).

Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung eines ungehinderten Gerinnungsablaufes bietet der **Protein-C-Pathway**. Das **Protein C** wird mittels des Thrombin-Thrombomodulin-Komplexes in aktiviertes Protein C (APC) überführt. Dieses kann daraufhin mit seinem Cofaktor **Protein S** die aktivierten Cofaktoren Va und VIIa proteolytisch inaktivieren. Liegt Faktor Va im Prothrombinase-Komplex an Faktor Xa gebunden vor, so ist dieser vor einer

Spaltung durch APC geschützt. Protein S besitzt nun die Fähigkeit, Faktor Xa an sich zu binden und somit dessen Schutzfunktion für den Faktor Va außer Kraft zu setzen.

Auch die bereits erwähnte Inaktivierung von Faktor Xa und Faktor-VIIa-TF-Komplex durch den **Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)** ist eine Hemmmöglichkeit des Gerinnungsgeschehens. Bei diesem Inhibitor handelt es sich um ein im Plasma zirkulierendes, mit Lipoproteinen assoziiertes Protein, welches Faktor Xa direkt durch 1:1-Komplexierung zu hemmen vermag. Dieser Komplex wird durch Calciumionen stabilisiert. Er bindet sehr effektiv den Thromboplastin-Faktor VIIa-Komplex und unterbindet somit dessen gerinnungsaktivierende Wirkung (Kubale, 2000, nach: Broze et al., 1988; Hemker und Kessels, 1991; Sandset et al., 1991; Mann und Lorand, 1993).

Eine Inhibierung der Kontaktaktivierung des endogenen Systems über die Faktoren XIIa und XIa ist durch den **C1-Inhibitor** möglich, welcher neben dem Faktor XIIa und XIa auch das Kallikrein zu hemmen vermag.

Das **α_2 -Makroglobulin** ist kein spezifischer Inhibitor, vielmehr weist es einen weiten Wirkungsbereich auf: So ist es in der Lage, Thrombin, Kallikrein, Faktor Xa und Protein C zu hemmen. Unter normalen Bedingungen tritt sein Hemmeffekt kaum hervor. Bei einer starken Erhöhung der Plasmaserinproteinasen und bei gleichzeitiger Abnahme der Hauptinhibitoren, wie sie unter einigen pathologischen Umständen auftreten kann, kommt die Hemmwirkung von α_2 -Makroglobulin zur Geltung (Kubalek, 2000, nach: Bodmer und Schnebli, 1984; Salvesen und Pizzo, 1994).

Das **α_1 -Antitrypsin** übt eine Hemmwirkung auf die Faktoren XIa und Xa sowie auf APC aus, die allerdings keine große Rolle im Gerinnungsgeschehen spielt (Kubalek, 2000, nach: Ellis et al., 1984; Espana et al., 1990; Wuillemin et al., 1996).

Schließlich hat unser Körper die Option, bereits gebildete Fibringerinnsel durch das proteolytische Enzym **Plasmin**, welches Fibrinogen und polymerisiertes Fibrin proteolytisch abbauen kann, wieder aufzulösen. Dieser Vorgang wird als **Fibrinolyse** bezeichnet. Aktiviert wird das Proenzym Plasminogen physiologischerweise durch zwei verschiedene Aktivatoren. Zum einen wäre der t-PA (tissue-Plasminogen-Aktivator) zu nennen, welcher aus dem Endothel stammt. Er fungiert als direkter 1:1-Aktivator, dessen eigentliche Wirkung eher als schwach einzustufen ist. Allerdings bewirkt die Gegenwart von Fibrin eine hundertfache Steigerung der Aktivatoreigenschaften. Auf diese Weise bleibt die Fibrinolyseaktivität auf das Fibringerinnsel beschränkt. Der andere Aktivator des Plasmins ist die Urokinase, die im Plasma als einkettiges Proenzym vorliegt. Das zweikettige aktive Enzym ist theoretisch dazu befähigt, Plasminogen in freier Lösung zu aktivieren, die tatsächliche Aktivität jedoch ist vor allem auf Fibringerinnsel konzentriert. Dies ist mit der Tatsache zu erklären, daß das Proenzym der Urokinase fibrin gebundenes Plasminogen aktiviert. Das daraufhin entstandene fibrin gebundene Plasmin wandelt wiederum das Proenzym in aktive Urokinase um.

(für weitere Details siehe Bruhn und Fölsch, 1999; Barthels und von Depka, 2003)

Zwecks einer übersichtlicheren Darstellung wird an dieser Stelle ein Schema des Gerinnungsablaufs eingefügt:

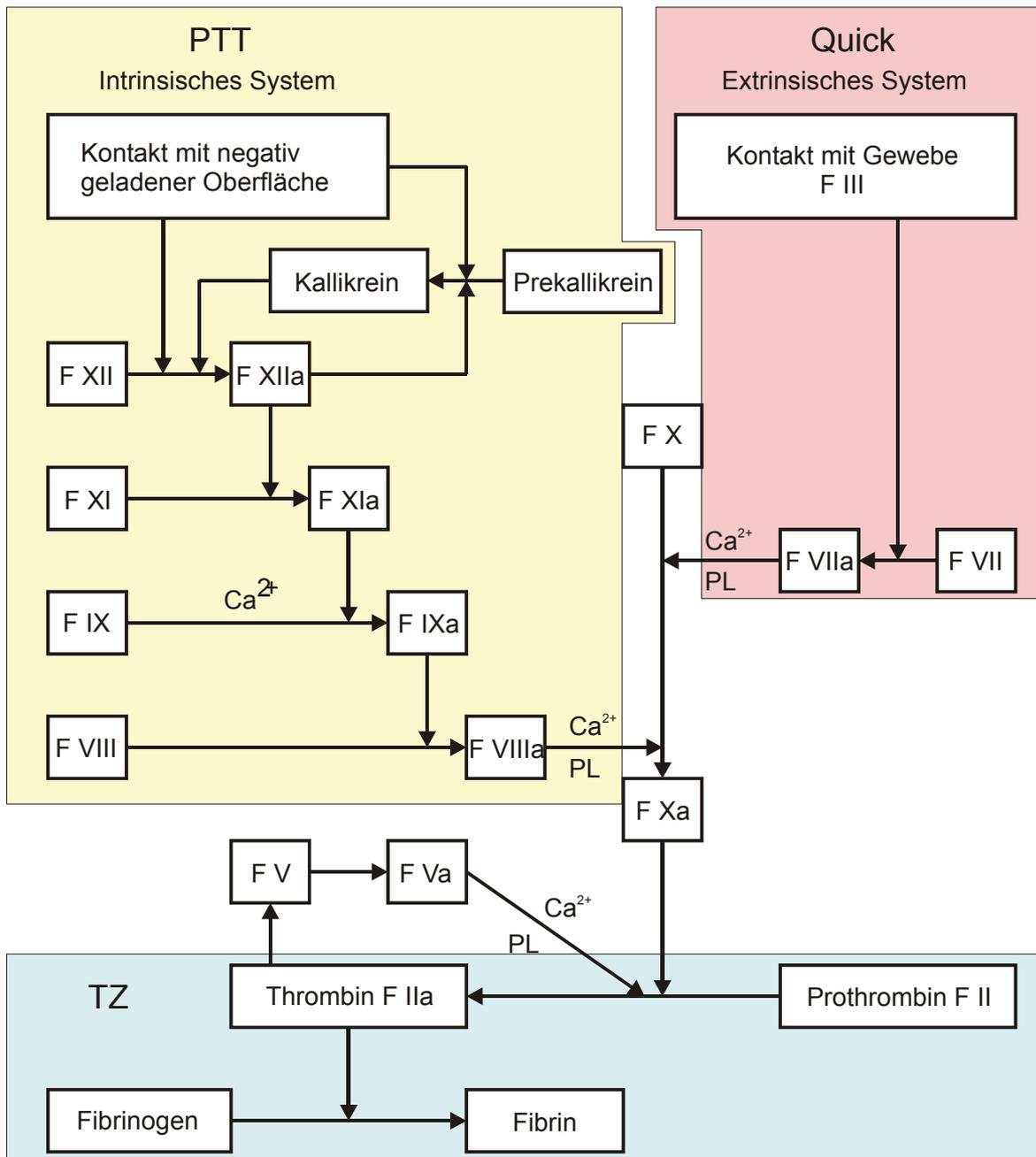


Abb. 4: Übersicht über den Ablauf des plasmatischen Gerinnungssystems (gelb unterlegt: intrinsisches Gerinnungssystem; rot unterlegt: extrinsisches Gerinnungssystem; blau unterlegt: gemeinsame Endstrecke); aus T. Bruhn, 2001/2002

2.4.2 Auswahl der zu prüfenden Fraktionen

Um zunächst einen Überblick gewinnen zu können, in welchen Fraktionen sich Gerinnungsaktivität verbirgt, erscheint es sinnvoll, zuerst weiter oben im Isolierungsgang bei den noch nicht so weit aufgereinigten Fraktionen einzusteigen. Diese Ergebnisse helfen dabei, gezielt die Folgefraktionen herauszusuchen zu können, bei denen es sich lohnt, die Gerinnungswerte genauer zu überprüfen. Aus diesem Grunde werden zu Beginn die Serdolit AD-2-Fraktionen 3 bis 6/3 mittels globaler Gerinnungstests untersucht. Diese Tests erlauben eine Aussage darüber, ob eine Fraktion sich auf den Ablauf des exogenen oder endogenen Gerinnungssystems auswirkt. Sollten bei diesen Tests von der Norm abweichende Werte in einer bestimmten XAD₂-Fraktion festgestellt werden, so sollen im Anschluß auch deren Folgefraktionen mit Hilfe dieser Globaltests auf Gerinnungsaktivität geprüft werden. Wenn sich hier wiederum etwas Interessantes zeigen sollte, so wird von der entsprechenden Fraktion eine Einzelfaktoranalyse vorgenommen werden.

Zudem werden die Serdolit AD-2-Fraktionen weiteren Gerinnungstests unterzogen.

Der Übersichtlichkeit halber werden die einzelnen Fraktionen mit Probennummern versehen. Eine Auflistung der vergebenen Nummern ist in den Tabellen 4 und 5 zu sehen:

Tabelle 4: Fraktionen nach Serdolit AD-2-Chromatographie und anschließender Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50

Proben-Nummer	Isolationsschritte
ASI 3a	XAD ₂ -Fr. 3 / Seph. G-50-Fr. 1
ASI 3b	XAD ₂ -Fr. 3 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI 3c	XAD ₂ -Fr. 3 / Seph. G-50-Fr. 3
ASI 3d	XAD ₂ -Fr. 3 / Seph. G-50-Fr. 4
ASI 4a	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 1a
ASI 4b	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 1b
ASI 4c	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI 4d	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3a
ASI 4e	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3-3b
ASI 5a	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50-Fr. 1
ASI 5b	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50-Fr. 2

Proben-Nummer	Isolationsschritte
ASI 5c	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50-Fr. 3
ASI 5d	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50-Fr. 4a
ASI 5e	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50-Fr. 4b
ASI 5f	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50-Fr. 5
ASI 6/1a	XAD ₂ -Fr. 6/1 / Seph. G-50-Fr. 1
ASI 6/1b	XAD ₂ -Fr. 6/1 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI 6/1c	XAD ₂ -Fr. 6/1 / Seph. G-50-Fr. 3
ASI 6/1d	XAD ₂ -Fr. 6/1 / Seph. G-50-Fr. 3-4
ASI 6/1e	XAD ₂ -Fr. 6/1 / Seph. G-50-Fr. 4
ASI 6/1f	XAD ₂ -Fr. 6/1 / Seph. G-50-Fr. 4b
ASI 6/2a	XAD ₂ -Fr. 6/2 / Seph. G-50-Fr. 1
ASI 6/2b	XAD ₂ -Fr. 6/2 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI 6/2c	XAD ₂ -Fr. 6/2 / Seph. G-50-Fr. 3
ASI 6/2d	XAD ₂ -Fr. 6/2 / Seph. G-50-Fr. 4
ASI 6/2e	XAD ₂ -Fr. 6/2 / Seph. G-50-Fr. 4b
ASI 6/3a	XAD ₂ -Fr. 6/3 / Seph. G-50-Fr. 1

Tabelle 5: Folgefraktionen der XAD₂ / Seph. G-50-Fraktion 3+3b

Proben-Nummer	Isolationsschritte
ASI GP 1	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 9 / Seph. G-50-Fr. 2 / Seph. G-25-Fr. 1

Proben-Nummer	Isolationsschritte
ASI GP 2	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G5-0-Fr. 1
ASI GP 3	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI GP 4	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph. G-50-Fr. 1
ASI GP 5	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI GP 6	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 13 / Seph. G-50-Fr. 1
ASI GP 7	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 13 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI GP 8	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 13 / Seph. G-50-Fr.3
ASI GP 9	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI GP 10	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50-Fr. 3
ASI GP 11	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI GP 12	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 19 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI GP 13	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr 20 / Seph. G-50-Fr. 1.
ASI GP 14	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 20 / Seph. G-50-Fr. 2
ASI GP 15	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 25 / Seph. G-50-Fr. 1

Proben-Nummer	Isolationsschritte
ASI GP 16	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50-Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 25 / Seph. G-50-Fr. 2

2.4.3 Gewinnung eines Plasmapools

Zur Analyse der Gerinnungsaktivitäten der Seeanemonenfraktionen wird menschliches Plasma benötigt, das keinerlei Abnormalitäten bezüglich der Gerinnungsparameter aufweisen darf. Derartiges Normalplasma wird täglich aus diagnostischen Gründen an der 1. Medizinischen Universitätsklinik Kiel gewonnen.

Bei der Blutabnahme muß das Blut zunächst ungerinnbar gemacht werden, da es ansonsten sehr schnell zur Gerinnung kommen würde, womit das Blut für weitere Untersuchungen unbrauchbar wäre. Als Antikoagulant hat sich hierbei Citrat (0,1 molar) zur Calciumionenbindung und somit zur Gerinnungshemmung bewährt. Heparin ist ungeeignet, da es einzelne Gerinnungsfaktoren hemmt. Ein ebenso ungeeignetes Antikoagulant für diese Zwecke ist das Dikaliumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Dieses hat die Nachteile, daß es die Cofaktoren VIII und V in ihrer Wirksamkeit abschwächt und zudem die Polymerisierung von Fibrinmonomeren hemmt, wodurch eine Verlängerung der Gerinnung vorgetäuscht werden könnte.

Bei der Blutentnahme verfährt man nun dergestalt, daß man in der Spritze einen Volumenteil 0,1 molare Natriumcitratlösung vorlegt. Mengenmäßig muß soviel Natriumcitratlösung verwendet werden, daß man nach der Blutentnahme ein Verhältnis von 9 Volumenteilen Venenblut zu 1 Volumenteil Natriumcitratlösung erreicht. Verwendet wird hierbei das Sarstedt-Monovettensystem®, bestehend aus 5-Milliliter-Monovetten, gefüllt mit 0,5 Milliliter Citratlösung (0,106 mol/l), und 0,8 x 33 mm Kanülen der Firma Sarstedt. Bei der Citratblutgewinnung zum Zwecke der aPTT-Bestimmung (endogenes Gerinnungssystem) muß gewährleistet sein, daß kein Gewebefaktor, welcher das exogene System anstoßen würde, in die Blutprobe gelangt. Dies gelingt, indem man die ersten Tropfen des entnommenen Venenblutes verwirft.

Die vorgeschriebene Menge an Blut muß möglichst schaumfrei entnommen werden. Die Vermischung von dem Venenblut mit der vorgelegten Citratlösung muß instantan vonstatten gehen. Bei diesem Vorgang ist äußerste Vorsicht geboten, da man nicht zu stark schütteln darf aufgrund der Gefahr von Schaumbildung und der dadurch hervorgerufenen Gerinnungsaktivierung. Am vorteilhaftesten ist hierbei, die Spritze mehrfach leicht zu neigen, um die Vermischung zu erzielen.

Das so gewonnene Citratblut muß anschließend einer Zentrifugation unterzogen werden, um die corpuskulären Bestandteile abzutrennen. Dies ist wichtig, damit aus den Erythrocyten keine gerinnungsaktiven Substanzen in das Plasma austreten können. Die Standardbedingungen einer Zentrifugation vor gerinnungsphysiologischen Untersuchungen sind zehn Minuten bei 1500 g (entspricht ca. 3000 Umdrehungen pro Minute). Nach der Zentrifugation wird das überstehende Plasma entnommen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Wird das gewonnene Plasma nicht innerhalb der nächsten vier Stunden bearbeitet, so muß es bei - 20 °C eingefroren werden.

Um nun einen Plasmapool zu erhalten, wird das Citratplasma möglichst vieler (mindestens aber zehn) gesunder Patienten in aliquotem Verhältnis zusammengegeben. Das so

gewonnene Mischplasma dient einem fortan als Pool, aus dem man sich die benötigte Plasamenge für die jeweiligen Gerinnungsanalysen entnimmt. (siehe Rick, 1990)

2.4.4 Herstellung der Probenverdünnungen

Zunächst wird von den gewonnenen Fraktionen, die in gefriergetrockneter, lyophilisierter Form vorliegen, eine kleine Menge in Eppendorfgefäße eingewogen. Anschließend wird mit physiologischer Kochsalzlösung derart verdünnt, daß eine Konzentration von 1 Milligramm Seeanemonenextrakt pro Milliliter vorliegt. Die so erhaltene Lösung wird daraufhin mit dem zuvor beschriebenen gepoolten Citratplasma im Verhältnis 1+9 Teile versetzt, wodurch man eine Konzentration von 0,1 Milligramm Seeanemonenextrakt pro Milliliter erzielt. In dieser Verdünnung werden die Proben für die folgenden Untersuchungen verwendet.

Bei den Leerwertmessungen wird die Menge der eingewogenen Seeanemonensubstanz durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt.

2.4.5 BCS (Behring Coagulation System)

Bei dem BCS (Behring Coagulation System) handelt es sich um ein hochautomatisiertes Gerät zur Abarbeitung von Gerinnungstests.

Das Gerät ist ausgestattet mit einer Rackstation und einem Analysenbereich. In der Rackstation werden die Proben und Reagenzien in maximal 11 Racks untergebracht. Dabei stehen von diesen Racks die drei linken für die Reagenzien zur Verfügung, während die übrigen für die Aufnahme von Probenmaterial vorgesehen sind. Allerdings können die Probenracks bei Bedarf auch mit Reagenzien bestückt werden. Die Gefäße müssen mit Barcodes versehen sein, damit das Analysengerät diese identifizieren kann. Das Gerät selbst kann bei entsprechender Eingabe der benötigten Informationen derartige Barcodes ausdrucken. Die Identifikation erfolgt nach dem Einfahren der Racks in den Arbeitsbereich. Ist ein Gefäß nicht mit einem Barcode versehen, oder ist dieser unleserlich für das Gerät, so wird das Rack wieder aus dem Analysenbereich hinausgefahren. Gegebenenfalls muß dann die Identifikation manuell erfolgen.

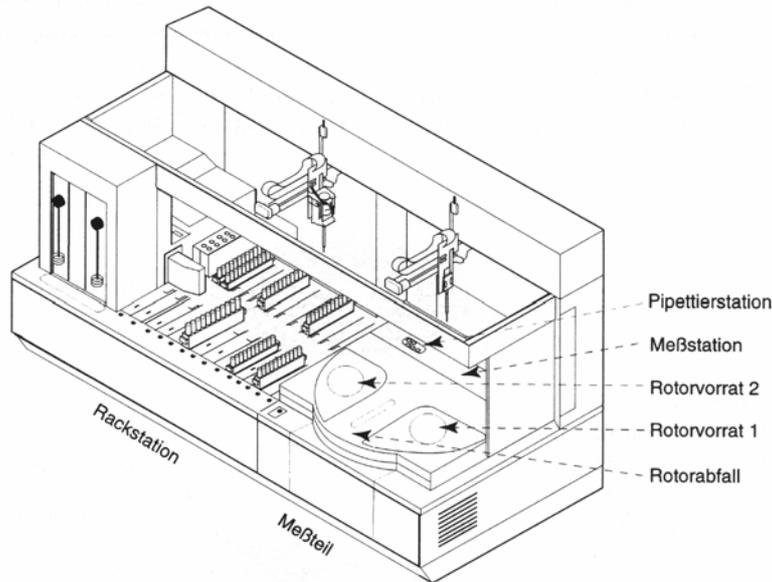


Abb. 5: Rackstation des BCS-Gerätes der Firma Dade Behring (Marburg); aus H. D. Bruhn, U. R. Fölsch

Das BCS kann in seiner Arbeitsweise konfiguriert werden und damit auf die Bedürfnisse der jeweiligen analytischen Fragestellung eingestellt werden. Die Software hat über den Barcode die Möglichkeit der Zuordnung bestimmter Daten einer Charge (z. B. Sollwert, Bezugskurven etc.), die für die Auswertung entscheidend sind.

Der Analysenbereich des BCS ist stets auf 37°C temperiert. Er besteht aus einem Rotorhandler, einem Photometer und fünf Positionen für die Küvettenrotoren (zwei für den Vorrat, eine Abfall-, eine Pipettier- und eine Meßposition).

Ein Küvettenrotor besteht aus je 20 Reaktions- und Meßküvetten, wobei jede Küvette drei Pipettierpositionen, die durch Rampen getrennt sind, sowie zwei Vorverdünnungskammern besitzt. Die Pipettierschritte werden automatisch durch das Gerät ausgeführt, wodurch die Proben und die Reagenzien in die entsprechenden Pipettierkammern des Küvettenrotors gelangen. Zum Starten der Reaktion beginnt der Rotor, sich zu drehen. Durch die Zentrifugalkraft kommt es zur Durchmischung der Proben mit den Reagenzien in der Vorverdünnungskammer, und die entsprechenden Gerinnungsvorgänge nehmen ihren Lauf. Im Anschluß gelangt der Ansatz in die Meßküvette, wo die photometrische Vermessung stattfindet.

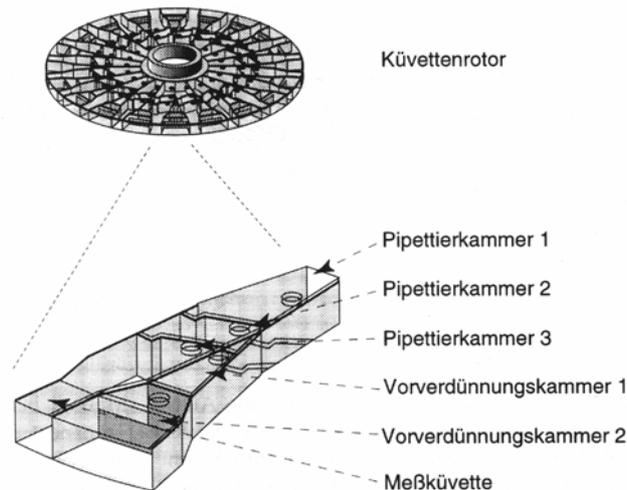


Abb. 6: Küvettenrotor des BCS-Gerätes der Firma Dade Behring (Marburg); aus H. D. Bruhn, U. R. Fölsch

Bei allen Messungen wird die Zeit von der Reagenzzugabe bis zur Fibrinbildung gemessen. Dieses Ereignis geht mit einer Viskositäts-erhöhung und mit einer Trübung des Ansatzes einher. Diese Tatsache macht man sich bei der Detektion zu nutze. So wird das Erreichen einer „Schwellentrübung“ photometrisch erfaßt. Die erhaltenen Ergebnisse können vom Gerät umgerechnet werden, beispielsweise in Prozent der Norm bei der Quickwert-Bestimmung. Im Vergleich zu Kugel- oder Häkchenkoagulometern kann bei diesem Gerät der Gerinnungsvorgang ungestört ablaufen, was besonders präzise Ergebnisse ermöglicht.

2.4.6 Kugelkoagulometer KC 10 nach Amelung

Bei der APC-Resistenzbestimmung kommt in dieser Arbeit das Kugelkoagulometer KC 4 zum Einsatz. Der Testansatz wird hierbei in zylinderförmige Kunststoffprobenbehälter pipettiert. Diese schräg gelagerten Probenbehälter drehen sich während der Bestimmung um die eigene Achse. Zu dem Testansatz wird vor Beginn der Messung jeweils eine kleine Metallkugel gegeben. Diese verweilt zunächst bei der Drehbewegung des Probenbehälters an der gleichen Stelle, nämlich am tiefsten Punkt des Behälters. Bilden sich nun im Rahmen der Gerinnungsanalyse Fibrinfasern, so erfassen diese die Kugel und ziehen sie mit sich. Passiert die Kugel auf ihrem Weg einen installierten magnetischen Sensor, so löst sie ein Signal aus, welches automatisch registriert wird. Der Zeitraum von der Reagenzienzugabe bis zur Auslösung des Signals wird gestoppt.

2.4.7 ELISA-Reader MRX

Dieses Gerät ermöglicht die Auswertung bestimmter immunologischer Untersuchungsmethoden, nämlich des sogenannten ELISA (enzyme linked immuno sandwich assay: siehe S. 70). Hierbei wird ein mit einem Enzym versehener Antikörper an die zu untersuchende Substanz mit Antigenstruktur gebunden. Dieses an den Antikörper gebundene Enzym ist in der Lage, ein zugesetztes chromogenes Substrat zu spalten, so daß eine farbige Verbindung entsteht, welche im Anschluß photometrisch vermessen werden kann. Dabei ist die Menge des entstandenen Farbstoff und somit die gemessene Absorption proportional zu der Menge an der zu untersuchenden Substanz. Eben diese photometrische Vermessung wird mittels des ELISA-Readers MRX der Firma Dynex durchgeführt.

2.4.8 Thromboplastinzeit (Quickwert)

Prinzip

Bei der Thromboplastinzeitbestimmung handelt es sich um einen sogenannten globalen Gerinnungstest. Dies bedeutet, daß nicht ein einzelner Gerinnungsfaktor mit Hilfe dieses Tests untersucht wird, sondern das gesamte exogene Gerinnungssystem. Demzufolge werden die Faktoren des Prothrombinkomplexes - **Faktor II, VII und X** - untersucht. Weniger empfindlich werden zudem der **Faktor V** und **Fibrinogen** erfaßt.

Im Klinikalltag wird die Quickwert-Bestimmung routinemäßig zur Überwachung der oralen Antikoagulantientherapie mit Cumarinen eingesetzt. Weitere Einsatzgebiete sind die Erfassung von Vitamin K-Mangelzuständen, Beurteilung der Leberfunktion, Erfassung und Verlaufskontrolle verschiedener Blutungsleiden.

Das Reagenz Thromborel® S enthält einen Gewebefaktor aus der menschlichen Plazenta, der - wie zuvor gesehen - den exogenen Gerinnungsablauf katalysiert.

Das exogene Gerinnungssystem wird durch Zugabe des calciumhaltigen Thromborel®-Reagenzes zu der Citratplasma-Probenlösung gestartet, wodurch es zur Fibrinbildung kommt. Wichtig ist hierbei, daß das Thromboplastinreagenz und die im Reagenz enthaltenen Calciumionen im Überschuß hinzugefügt werden, so daß sie nicht zum reaktionslimitierenden Faktor geraten. Mit der Gerinnung geht eine Trübung des Ansatzes einher, die photometrisch verfolgt werden kann. Für die Auswertung gibt man dem Gerät eine Schwellentrübung vor. Die Zeit, die bis zum Erreichen dieser Schwellentrübung verstreicht, ist dann die Thromboplastinzeit.

Die Auswertung der erlangten Daten muß mittels einer Bezugsgeraden erfolgen, da die Werte stark von dem eingesetzten Thromboplastinreagenz abhängig sind. Aus diesem Grunde muß für jede Charge eines Reagenzes zunächst eine derartige Bezugsgerade erstellt werden, die dann von der Software des BCS erfaßt und für die Auswertung automatisch herangezogen wird. Für die Erstellung der Geraden wird Plasma aus dem zuvor gewonnenen Plasmapool verwendet.

Es existieren verschiedene Maßeinheiten für die Angabe der Aktivität des exogenen Gerinnungsablaufs. Gängig ist die Prothrombin-Ratio (PR), bei der es sich um den Quotienten aus der Reaktionszeit der Probe [sec] und der Reaktionszeit des Normalplasmas [sec] handelt.

Am geläufigsten ist hierzulande der sogenannte Quick-Wert, der in Prozent Gerinnungsaktivität angegeben wird im Vergleich zu einem Normwert. Diese Werte sind allerdings stark abhängig von dem eingesetzten Thromboplastinreagenz und somit nicht vergleichbar innerhalb verschiedener Laboratorien, die unterschiedliche Reagenzien einsetzen.

Daher hat es sich mehr und mehr eingebürgert, das Ergebnis als INR (International Normalized Ratio) anzugeben. Die INR kann unter Kenntnis der Internationalen Sensitivitäts-Indices (ISI), die die Eigenschaften des jeweiligen Reagenzes charakterisieren, aus dem PR berechnet werden:

$$\text{INR} = \text{PR}^{\text{ISI}}$$

Diese Werte sind international einheitlich und können somit direkt miteinander verglichen werden.

Material

- Thromboplastinreagenz Thromborel® S (Firma Dade Behring. Marburg GmbH)
- physiologische Kochsalzlösung

- gepooltes Normalplasma (eigene Herstellung)
- BCS-Gerät

Durchführung

Thromborel® S wird in der angegebenen Menge destillierten Wassers gelöst und auf 37 °C temperiert. Hat das Reagenz diese Temperatur erreicht, so muß es mindestens 30 Minuten weiter bei 37 °C inkubiert werden. Anschließend werden Proben und Reagenz nach folgendem Schema pipettiert:

1. Teströhrchen auf 37°C vorwärmen
2. 100 µl Normalplasma in Teströhrchen pipettieren (Plasma+Proben oder Plasma+NaCl für den Leerwert)
3. 1 Minute bei 37°C temperieren
4. 200 µl Thromborel® S (auf 37°C temperiert) hinzupipettieren
5. Messung starten

Diese Pipettierschritte übernimmt das vollautomatisierte Behring Coagulation System (BCS).

Zur Erstellung der Kalibriergeraden stellt man mit physiologischer Kochsalzlösung folgende Verdünnungen aus dem gepoolten Normalplasma her:

Prozent der Norm	100 %	50 %	25 %	12,5 %	10 %
Plasmaverdünnung	unverdünnt	1 + 1	1 + 3	1 + 7	1 + 9

Nun wird die Thromboplastinzeit dieser Verdünnungen vermessen. Die ermittelten Zeiten werden doppeltlogarithmisch gegen die Prozente der Norm aufgetragen. Mit Hilfe der entstehenden Bezugskurve lassen sich daraufhin die ermittelten Thromboplastinzeiten der gemessenen Proben einem Quick-Wert (Prozent der Norm) zuordnen.

2.4.9 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Prinzip

Dieser Parameter der Gerinnungsanalytik dient zur Aufdeckung von Abnormalitäten im Bereich des endogenen Gerinnungssystems. Auch hierbei handelt es sich um einen Globaltest. Mit Hilfe des Testes werden die **Faktoren VIII, IX, XI und XII** sowie **Präkallikrein** und High Molecular Weight Kininogen (**HMWK**) erfaßt. Diese Faktoren sind Bestandteil des intrinsischen Gerinnungssystems. Außerdem werden die **Faktoren X, V und II** gemessen, wodurch sich eine Überlappung mit dem Quick-Test ergibt.

Im Klinikalltag wird dieser Test vor allem zu folgenden Zwecken eingesetzt:

- Therapieüberwachung mit unfraktionierten Heparinen
- Suchtest auf angeborene Hämostasestörungen (Hämophilie A und B), auf Hämophilie C (entspr. Faktor-X-Mangel) und auf Faktor XI- bzw. XII-Mangel
- Grundlage für Diagnostik der Faktor V-Leiden-Mutation

Zur Aktivierung der endogenen Gerinnung sind - wie zuvor gesehen - Phospholipide nötig. Als Äquivalent für die humanen Phospholipide, die am Gerinnungsgeschehen beteiligt sind, kommen in dem entsprechenden Reagenz Pathromtin®SL (Firma Dade Behring Marburg

GmbH) pflanzliche Phospholipide zum Einsatz. Außerdem ist dem Reagenz ein Oberflächenaktivator hinzugefügt, um die Faktoren des endogenen Gerinnungssystems zu aktivieren. Bei dem Aktivator handelt es sich um Siliziumdioxid-Partikel. Letztendlich gestartet wird die endogene Gerinnung durch Zugabe einer 0,025 molaren Calciumchloridlösung.

Material

- Pathromtin® SL (Dade Behring, Marburg): enthält u. a. Siliziumdioxid-Partikel und pflanzliche Phospholipide
- Calciumchloridlösung 0,025 mol/l (Dade Behring, Marburg)
- gepooltes Normalplasma (eigene Herstellung)
- Kontroll-Plasma N und Kontroll-Plasma P (Dade Behring, Marburg)
- BCS
- Teströhrchen aus Plastik

Durchführung

Das Pathromtin® SL-Reagenz ist nach kurzem Aufschütteln gebrauchsfertig und wird bei Raumtemperatur verwendet. Die Calciumchloridlösung hingegen muß vor der Anwendung auf 37°C erwärmt werden.

Pipettiert wird nach folgendem Schema:

1. 100 µl gepooltes Normalplasma
2. 100 µl Pathromtin® SL
3. 2 Minuten bei 37°C inkubieren
4. 100 µl Calciumchloridlösung (0,025 molar, 37°C!) ⇒ Start der Messung der Gerinnungszeit

Die Pipettierschritte werden auch bei dieser Bestimmung von dem BCS-Gerät übernommen.

Es müssen an jedem Arbeitstag Kontrollmessungen erfolgen, um ersehen zu können, ob das Reagenz noch verwendbar ist. Gleiches gilt für das Normalplasma aus dem Plasmapool. Für die Kontrollmessungen wird von der Firma Dade Behring ein Kontroll-Plasma N für den Normalbereich und ein Kontroll-Plasma P für den pathologischen Bereich mitgeliefert. Die Kontrollproben müssen auf die gleiche Weise behandelt werden wie die Proben. Die ermittelten Werte müssen dabei in dem Sollwertbereich liegen (siehe chargenabhängige Wertetabelle).

2.4.10 Einzelfaktorenanalyse

Prinzip

Ergibt sich bei den obig beschriebenen globalen Gerinnungstesten (Quickwert und aPTT) ein interessanter (von der Norm abweichender) Wert, so ist es sinnvoll, eine entsprechende Einzelfaktorenanalyse vorzunehmen, um genau ersehen zu können, an welcher Stelle die untersuchte Seeanemonenfraktion in den exogenen bzw. in den endogenen Weg der Gerinnungskaskade eingreift.

Auch in der Klinik werden diese Untersuchungen zur genauen Lokalisierung eines Defektes im Gerinnungssystem angewendet.

Zur Einzelfaktoranalyse verwendet man sogenannte *Faktoren-Mangelplasmen*. Dabei handelt es sich um Plasmen, die alle Gerinnungsfaktoren bis auf den zu untersuchenden Faktor im Überschuß enthalten. Der in der Probe zu untersuchende Faktor fehlt gänzlich in dem Mangelplasma. Bei Mischung des Probenplasmas mit dem Mangelplasma hängt die Gerinnungsbildung ausschließlich von der Konzentration des im Mangelplasma nicht enthaltenen Faktors ab. Im hinzupipettierten Citratplasma-Proben-Gemisch liegt der entsprechende Faktor in physiologischer Konzentration vor. Ist nun in der Probe allerdings eine Substanz enthalten, welche eine Hemmwirkung auf diesen Faktor ausübt, so führt dies zu einer deutlichen Verzögerung der Gerinnungsbildung. Durch Hemmung der anderen Gerinnungsfaktoren würde eine Verzögerung der Gerinnungsbildung nicht zu beobachten sein, da diese Faktoren im Überschuß vorhanden sind und deswegen die Hemmwirkung der hinzugegebenen Probelösung nicht ausreichen würde, um die gesamte Aktivität dieser Faktoren zu unterbinden.

Die Zusammensetzung der Mangelplasmen hängt davon ab, ob der exogene oder der endogene Gerinnungszweig untersucht werden soll.

a) Faktoren des exogenen Gerinnungssystems:

Für die *exogene Gerinnung* sind die *Faktoren II, V, VII* und *X* sowie der Gewebefaktor vonnöten. In den entsprechenden Mangelplasmen fehlt jeweils einer der drei zuvor genannten Gerinnungsfaktoren. Von der Firma Dade Behring Marburg GmbH gibt es einen Reagenziensatz, welcher diese drei Mangelplasmen enthält. Der Gewebefaktor entstammt dabei dem Thromborel® S-Reagenz, welches wir bereits bei der Thromboplastinzeitbestimmung kennengelernt haben und welches bei der Einzelfaktoranalyse dem Ansatz beigelegt werden muß, um die Gerinnungsreaktion zu starten. Das Meßprinzip ist mit der Quickwertbestimmung identisch. Die Auswertung erfolgt mittels einer Kalibriergeraden. Zur Erstellung dieser Geraden wird das Citratplasma aus dem Plasmapool herangezogen und daraus mittels einer entsprechenden Imidazolpufferlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Diese Verdünnungen werden nach gleichem Pipettierschema wie die Proben (siehe unten) vermessen und die ermittelten Zeiten anschließend gegen die Faktorenaktivität in Prozent der Norm auf logarithmisches Papier aufgetragen. Dabei ergibt sich bei richtiger Durchführung eine Gerade.

Material für Bestimmung der Faktoren des exogenen Gerinnungssystems

- entspr. Mangelplasmen (Dade Behring, Marburg)
- Thromborel® S-Reagenz (Dade Behring, Marburg)
- Imidazol-Pufferlösung pH 7,6 (Dade Behring, Marburg)
- Kontroll-Plasma N und Kontroll-Plasma P (Dade Behring, Marburg)
- gepooltes Normalplasma (eigene Herstellung)
- BCS (Dade Behring, Marburg)

Durchführung der Bestimmung der Faktoren des exogenen Gerinnungssystems

Zunächst muß eine Kalibriergerade erstellt werden. Dazu werden aus dem gepoolten Normalplasma und dem Imidazol-Puffer folgende Verdünnungen hergestellt werden:

Verdünnung (Citratplasma:Puffer)	1 : 20	1 : 40	1 : 200	1 : 2000
Prozent der Norm	100	50	10	1

Bei der Vermessung des Citratplasma-Proben-Gemisches muß zunächst eine Verdünnung mit Imidazolpufferlösung von 1:20 vorgenommen werden, bevor laut Pipettierschema verfahren werden kann.

Pipettierschema:

1. 100 µl Mangelplasma
2. 100 µl Probenverdünnung (Citratplasma + Probenfraktion, 9 + 1)
3. 60 sec bei 37°C inkubieren
4. 200 µl Thromborel® S (zuvor auf 37°C temperiert) zum Ansatz hinzufügen und Gerinnungszeit des Ansatzes registrieren

b) Faktoren des endogenen Gerinnungssystems:

Die für die *endogene Gerinnung* entscheidenden Faktoren sind Faktor VIII, IX, X, XI und XII. Zur Aktivierung ist zusätzlich ein Phospholipid unerlässlich, welches dem bereits zuvor erwähntem Reagenz Pathromtin® SL entstammt, das zur Bestimmung der aPTT verwendet wurde. Auch hier gibt es für die Einzelfaktoranalyse von der Firma Dade Behring, Marburg GmbH einen entsprechenden Reagenziensatz mit Mangelplasmen.

Das Prinzip der Messungen entspricht dem der Einzelfaktoren aus dem exogenen Gerinnungszweig, allerdings wird hier natürlich nicht die Thromboplastinzeit, sondern die aPTT bestimmt.

Material für Bestimmung der Faktoren des endogenen Gerinnungssystems

- entspr. Mangelplasmen (Dade Behring, Marburg)
- Pathromtin® SL (Dade Behring, Marburg)
- Calciumchlorid-Lösung 0,025 mol/l (Dade Behring, Marburg)
- Imidazol-Pufferlösung pH 7,6 (Dade Behring, Marburg)
- Kontroll-Plasma N und Kontroll-Plasma P (Dade Behring, Marburg)
- gepooltes Normalplasma (eigene Herstellung)
- BCS (Dade Behring, Marburg)

Durchführung der Bestimmung der Faktoren des endogenen Gerinnungssystems

Auch hier muß zunächst mittels Verdünnungsreihen aus Citratplasma und Imidazolpufferlösung pH 7,6 eine Bezugskurve erstellt werden. Folgende Verdünnungen werden hergestellt:

Verdünnung (Citratplasma:Puffer)	1 : 5	1 : 10	1 : 50	1 : 500
Prozent der Norm	100	50	10	1

Die auf diese Weise hergestellten Verdünnungen – wie auch später die Proben – werden nach folgendem Schema pipettiert und vermessen:

1. 100 µl Mangelplasma
2. 100 µl Probenverdünnung
3. 100 µl Pathromtin® SL

4. 2 Minuten inkubieren bei 37°C
5. 100 µl Calciumchloridlösung (zuvor auf 37°C temperiert) zum Ansatz hinzugeben und den Eintritt des Gerinnungsprozesses nach Zugabe der Calciumionen registrieren

Die 0,025 molare Citratplasma-Proben-Gemische müssen vor dem Pipettieren noch im Verhältnis 1:5 mit dem Imidazolpuffer verdünnt werden.

Auch hier werden die gemessenen Gerinnungszeiten anhand von Kalibrierkurven auf logarithmischem Papier den Prozent der Norm zugeordnet.

2.4.11 Thrombinzeit

Prinzip

Die Methode basiert auf der Zugabe einer definierten Menge Thrombin, die dem Testreagenz entstammt, zu den entsprechenden Citratplasma-Proben. Auf diese Weise verlieren alle übergeordneten Gerinnungsfaktoren den Einfluß auf die Gerinnungsbildung, die lediglich von der Fibrinogenkonzentration des zu untersuchenden Plasmas abhängt. Selbst die Gegenwart von Calciumionen ist nicht erforderlich; sie beschleunigen allerdings die Gerinnungsbildung.

In der Klinik dient die Thrombinzeit vor allem der Überwachung der Therapie mit unfraktionierten Heparinen. Außerdem findet sie häufig Anwendung bei der Kontrolle von fibrinolytischen Therapien oder bei der Suche nach angeborenen oder erworbenen Gerinnungsstörungen.

In dieser Dissertation wird der Test zur Untersuchung des Einflusses der Seeanemonenfraktionen auf die Aktivität des letzten Schrittes der Gerinnungskaskade, nämlich die Fibrinbildung (Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin durch Thrombin), herangezogen.

Material

- Test-Thrombin-Reagenz (Dade-Behring, Marburg): besteht aus einer definierten Menge an Thrombin vom Rind und Rinderalbumin
- HEPES-Pufferlösung (25 mmol/l) pH 7,4, (Dade Behring, Marburg)
- gepooltes Normalplasma (eigene Herstellung)

Durchführung

Um die Wirkung der Seeanemonenfraktionen auf die Thrombinzeit beurteilen zu können, muß zunächst einmal der Leerwert durch Vermessung von gepooltem Citratplasma mit physiologischer Kochsalzlösung ermittelt werden. Dieser Wert entspricht dem Normalwert.

Anschließend werden die Proben untersucht, indem die Menge an Kochsalzlösung durch Seeanemonenextrakt, der laut Kapitel 2.4.4 gewonnen wurde, ersetzt wird. Wäre ein Einfluß (aktivierend oder inhibierend) der Inhaltsstoffe der Extrakte auf die Thrombinzeit vorhanden, so würde sich das als eine Verkürzung bzw. eine Verlängerung der gemessenen Gerinnungsbildungszeit bemerkbar machen.

Das Test-Thrombin-Reagenz muß vor der Verwendung in dem beiliegenden Puffer gelöst werden und auf 37°C temperiert werden.

Pipettierschema:

1. 100 µl Citratplasma (9+1 Teile Citratplasmapool und NaCl bzw. Citratplasmapool und Seeanemonenextrakt)
2. 60 Sekunden bei 37°C inkubieren
3. 200 µl Test-Thrombin-Reagenz (37°C)
4. Gerinnungszeit messen

Die Messungen werden auch hier mit dem BCS von Dade-Behring (Marburg) durchgeführt. Der Referenzbereich ist von dem jeweiligen Testansatz abhängig. Angegeben wird die Thrombinzeit in Sekunden.

2.4.12 Fibrinogen-Bestimmung**Prinzip der Bestimmung**

Zur Bestimmung der Fibrinogenaktivität wird in dieser Arbeit die Methode nach Claus angewendet. Dabei handelt es sich um den meistverwendeten kommerziell erhältlichen Test zur Fibrinogenbestimmung. Das Testprinzip beruht darauf, daß Citratplasma mit einem Überschuß an Thrombin (Faktor IIa) versetzt wird, wodurch die Fibrinbildung einsetzt. Die Gerinnungszeit ist dabei vom Fibrinogengehalt der Plasmaprobe abhängig. Dabei gilt, daß in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,4 Gramm Fibrinogen pro Liter bei Zugabe einer standardisierten Menge an Thrombin die gemessene Gerinnungszeit proportional zu der Fibrinogenkonzentration ist. Bei dieser Methode handelt es sich folglich um eine Variation der Thrombinzeitbestimmung, mit dem Unterschied, daß das zu untersuchende Plasma in den optimalen Meßbereich verdünnt (0,1 bis 0,4 g/l) wird. Thrombin-hemmende Substanzen (Heparin bis 2 U/ml oder Hirudin in therapeutischen Konzentrationen) beeinflussen den Test nicht.

Eingesetzt wird die Fibrinogenbestimmung zur Erfassung verschiedener Fibrinogenmangelzustände und Dysfibrinogenämien, zum Nachweis von erhöhten Fibrinogenspiegeln oder zur Überwachung von Fibrinogensubstitutionstherapien.

Zur Untersuchung des Einflusses der Seeanemonenextrakte auf die Fibrinogenaktivität wird zunächst einmal die Gerinnungszeit von gepooltem Normalplasma ermittelt und dann verglichen mit der Gerinnungszeit von gepoolten Normalplasma, das mit Seeanemonenextrakt versetzt wurde. Befindet sich in dem Seeanemonenextrakt eine Substanz, die Einfluß auf die Fibrinogenaktivität nimmt, so wird sich das in einer veränderten Gerinnungszeit niederschlagen: eine Substanz mit hemmenden Einfluß würde eine Verlängerung, eine aktivierende Substanz eine Verkürzung der Gerinnungszeit erreichen.

Material

- Multifibren® U – Reagenz (Dade Behring, Marburg): enthält u. a. Thrombin vom Rind, Fibrinaggregation-verzögerndes Peptid, Calciumchlorid)
- destilliertes Wasser (eigene Herstellung)
- BCS-Gerät (Dade Behring, Marburg)

Durchführung

Das Fibrinogenreagenz muß zunächst in destilliertem Wasser gelöst und bei 37 °C inkubiert werden.

Als Leerwertprobe dienen 90 µl gepooltes Normalcitratplasma und 10 µl physiologische Kochsalzlösung.

Bei der Probe wird die Kochsalzlösung durch 10 µl Seeanemonenextrakt ersetzt.

Pipettierschema:

1. 110 µl Leerwertansatz oder Probe
2. 60 sec. bei 37°C
3. 200 µl Fibrinogenreagenz (37°C)
4. Gerinnungszeit bestimmen

Als Analysengerät dient – wie bei den Bestimmungen zuvor – das BCS von Dade Behring. Zur Auswertung muß zunächst für jedes Gerät und für jede neue Charge des Testreagenzes eine Bezugsgerade erstellt werden. Dazu gibt es das Fibrinogen Kalibrator-Kit. Die darin enthaltenen Kalibratoren werden als Probe mit dem BCS vermessen und die ermittelten Gerinnungszeiten in doppeltlogarithmischer Form aufgetragen. Die Angabe der Fibrinogenkonzentration erfolgt in mg/dl. Die erhaltene Bezugskurve kann nun für jede Messung mit derselben Charge des Fibrinogenreagenzes zur Auswertung herangezogen werden. Allerdings ist es notwendig, jeden Tag Kontrollen mit den entsprechenden Kontrollplasmen durchzuführen (Kontroll-Plasma N für den normalen und Kontroll-Plasma P für den pathologischen Wertebereich).

2.4.13 Protein-C-Bestimmung

Prinzip

Bei dem Protein C handelt es sich um einen wichtigen Inhibitor des plasmatischen Gerinnungssystems. Durch Aktivierung, die vor allem durch die Komplexbildung von Thrombin mit Thrombomodulin beschleunigt wird, kommt es zur Bildung von aktiviertem Protein C (APC). Dieses APC besitzt Serinproteasenaktivität und kann daher die Faktoren Va und VIIIa des plasmatischen Gerinnungssystems inaktivieren. Diese beiden Faktoren tragen – wie zuvor gesehen – maßgeblich zu einer lawinennartigen Steigerung der Thrombinbildung bei. Außerdem steigert APC die Fibrinolyseaktivität. Aus diesen Fähigkeiten kann man ersehen, daß APC einen entscheidenden Beitrag zur Vermeidung thromboembolischer Ereignisse leistet.

In der Klinik wird die Protein-C-Diagnostik vor allem zur Abklärung venöser oder arterieller Thromboembolien eingesetzt, besonders wenn diese vor dem 40. Lebensjahr, in auffälliger Häufigkeit, an ungewöhnlichen Orten oder zu bestimmten Zeitpunkten (z. B. Schwangerschaft) auftreten.

Es gibt verschiedene Methoden zur Protein-C-Bestimmung. In dieser Arbeit findet die Bestimmung mit Hilfe eines chromogenen Substrats Anwendung. Im Klinikalltag kann es mit dieser Methode bei Patienten mit Vitamin-K-Mangel oder bei Patienten, die unter Cumarintherapie stehen, zu falsch hohen Ergebnissen kommen. Diese Tatsache läßt sich dadurch erklären, daß für die Synthese des funktionsfähigen Protein C eine γ -Carboxylierung von Glutaminsäureresten am N-terminalen Ende notwendig ist, die nur unter Einwirkung von Vitamin K möglich ist. Allerdings sind auch die nichtfunktionsfähigen, decarboxylierten Protein-C-Vorstufen in der Lage, das eingesetzte chromogene Substrat zu spalten, wodurch eine Absorption der Probelösung gemessen wird, die nicht der tatsächlichen Aktivität des

vorhandenen Protein C entspricht. In solchen Fällen muß die Bestimmung mittels des Protein-C-Gerinnungstests erfolgen. Da aber in dem vorliegenden Untersuchungsmaterial (gepooltes Normalplasma) derartige Einflüsse ausgeschlossen werden können, kann die Methode mit dem chromogenem Substrat für die vorliegende Aufgabenstellung herangezogen werden.

Bei der Protein-C-Bestimmung wird zunächst das Protein C im Plasma mittels des Schlangengiftes Protac aktiviert. Das APC setzt dann das zugefügte chromogene Substrat um, wodurch ein Farbstoff entsteht, der photometrisch bei 405 nm vermessen wird. Die gemessene Absorption ist der Protein-C-Aktivität proportional.

Material

- Berichrom® Protein C-Testkit (Dade Behring, Marburg):
 - Protein-C-Aktivator: Extrakt aus dem Gift der Agkistrodon contortrix
 - Substrat-Reagenz: pyro-Glutaminsäure-Prolin-Arginin-methoxy-nitroanilid
 - HEPES-Puffer (25 mmol/l, pH 8,25)
- gepooltes Normalplasma (eigene Herstellung)
- BCS-Gerät (Dade Behring, Marburg)

Durchführung

Zunächst muß wieder einmal eine Leerwertmessung mit gepooltem Normalplasma und physiologischer Kochsalzlösung erfolgen. Dazu werden 90 µl Citratplasma mit 10 µl Kochsalzlösung sorgfältig gemischt und bei 37°C inkubiert. Die Proben werden alle so präpariert, daß jeweils 90 µl gepooltes Normalplasma mit 10 µl der jeweiligen Seeanemonenfraktion (Konzentration von 1 mg/ml) zusammengegeben werden. Auch hier folgt eine Inkubation bei 37°C.

Der Protein-C-Aktivator von der Firma Dade Behring (Marburg), bei dem es sich um einen Extrakt aus dem Gift der Schlange Agkistrodon contortrix handelt, muß zunächst in der vorgegebenen Menge an mitgelieferter HEPES-Pufferlösung gelöst werden, um anschließend auf 37°C temperiert zu werden.

Das Substrat-Reagenz (Dade Behring, Marburg), welches das chromogene Substrat enthält, muß vor Anwendung in der vorgegebenen Menge destilliertem Wasser gelöst und ebenfalls auf 37°C erwärmt werden.

Auch diese Messung wird mittels des BCS-Gerätes durchgeführt. Die Messung erfolgt nach der kinetischen Methode.

Pipettierschema:

1. 100 µl Plasmaprobe
2. 1000 µl Protein C-Aktivator
3. Mischen und exakt 5 min bei 37°C inkubieren
4. 200 µl Substrat-Reagenz
5. Mischen und ΔE (405 nm) in nm/min bestimmen. Nach ca. 15 sec die Extinktion ablesen und gleichzeitig die Stoppuhr starten. Nach genau 60 und 120 sec Ableseung wiederholen, die jeweiligen ΔE /min durch Differenzbildung berechnen und aus beiden Meßwerten den Mittelwert bilden.

2.4.14 Aktiviertes-Protein-C-Resistenz-Bestimmung (APC-Resistenz)

Prinzip

Der häufigste angeborene Risikofaktor für eine Thrombophilie im europäischen Raum ist die Resistenz gegen aktiviertes Protein C (APC). Die Ursache für diese Resistenz ist zumeist in der Mutation des Gens, welches für den Gerinnungsfaktor V kodiert, begründet. Dadurch kommt es in der Aminosäuresequenz des Faktors V zu einem Austausch des Argininrests in Position 506 gegen einen Glutaminrest. Diese Mutation sorgt dafür, daß der mutierte Faktor V resistent gegenüber der Einwirkung des APC wird. Beschrieben wurde diese Mutation erstmals 1991 in der holländischen Stadt Leiden, weswegen man auch von dem Faktor-V-Leiden oder der Leiden-Mutation spricht. Oftmals werden APC-Resistenz und Faktor-V-Leiden gleichgesetzt, was in den meisten Fällen auch der Wahrheit entspricht. Allerdings gibt es in seltenen Fällen APC-Resistenzen, die nicht durch die oben beschriebene Mutation bedingt sind. So kann die Mutation auch eine andere Position in der Aminosäuresequenz betreffen.

Bei dem Faktor V Leiden unterscheidet man zwischen einer homozygoten und einer heterozygoten Mutation in dem Faktor-V-Gen. Homozygote Patienten haben ein 50- bis 100-fach erhöhtes Thromboserisiko im Vergleich zu Patienten ohne diesen Defekt, bei heterozygoten Patienten liegt dieses Risiko siebenfach höher. Kommen weitere Risikofaktoren hinzu, steigt das Risiko deutlich an. So verursacht die Einnahme von oralen Kontrazeptiva eine 30-fache Steigerung des Risikos bei heterozygoten Patienten im Vergleich zu Nichtträgern der Mutation.

In der Klinik wird diese Bestimmung routinemäßig durchgeführt zur Abklärung bei Thrombosen, die vor dem 40. Lebensjahr auftreten. Ebenso sollte bei familiär gehäuft auftretenden venösen Thromboembolien, besonders bei jugendlicher Thromboseneigung, bei wiederholten thromboembolischen Ereignissen, bei Thrombosen mit ungewöhnlicher Lokalisation, Thrombosen in der Schwangerschaft oder im Wochenbett sowie bei Thrombosen unter Einnahme von Ovulationshemmern eine APC-Resistenzuntersuchung stattfinden.

Zur Bestimmung der APC-Resistenz wird eine Variante der aPTT-Bestimmung, nämlich die Methode nach Dahlbäck, angewendet. Dabei handelt es sich um eine Doppelbestimmung der aPTT mit und ohne Zusatz einer standardisierten Menge an aktiviertem Protein C. Der Ansatz ohne APC dient als Leerwert. Das zugesetzte APC inaktiviert die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa, wodurch die aPTT im Vergleich zu dem Leerwert eine 2- bis 3-fache Verlängerung erfährt. Liegt eine APC-Resistenz vor, so spricht der Faktor Va nicht auf die inhibitorische Wirkung des aktivierten Protein C an und es ist keine deutliche Verlängerung der aPTT im Vergleich zum Leerwert zu erwarten (weniger als das 2-fache). Der Einfluß anderer Faktoren des Gerinnungssystems auf die aPTT kann durch Zusatz von Faktor-V-Mangelplasma ausgeschlossen werden.

Die APC-Resistenz wird als Ratio angegeben:

APC-Resistenz = aPTT (nach Zusatz von APC) / aPTT (Leerwert)

Material

- Coatest APC Resistance V (Firma Chromogenix, Westminster, Colorado)
- Calciumchloridlösung, 25 mmol/l (eigene Herstellung)
- destilliertes Wasser (eigene Herstellung)
- physiologische Kochsalzlösung (eigene Herstellung)

- Kugelkoagulometer 10 (Amelung)

Durchführung

Alle Reagenzien werden vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht. Die Calciumchloridlösung und das APC-Reagenz müssen bei 37°C inkubiert werden.

Für den Leerwert werden 900 µl gepooltes Normalplasma mit 100 µl physiologischer Natriumchloridlösung versetzt. Zur Vermessung der Proben werden jeweils 900 µl gepooltes Normalplasma mit 100 µl Seeanemonenfraktion versetzt.

Nun muß jede Probe zweimal vermessen werden: einmal mit und einmal ohne APC-Reagenz. Für die Messung mit APC-Reagenz werden je 100 µl Probe (Seeanemonen-Plasma-Mischung bzw. für den Leerwert Kochsalzlösung-Plasma-Mischung) mit 100 µl APC-Reagenz gemischt. Bei der Vermessung ohne APC-Reagenz werden anstelle des Reagenzes 100 µl Kochsalzlösung eingesetzt. Alle Ansätze müssen nun mindestens drei Minuten bei 37°C inkubiert werden.

Nach der Inkubation wird ein Teil Calciumchloridlösung zu den Ansätzen gegeben und die Zeitmessung der Fibrinbildung instantan gestartet.

Es werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.4.15 Plasminogen-Bestimmung

Prinzip

Plasminogen ist das Proenzym der fibrinolytischen Serinprotease Plasmin. Plasmin an sich ist eher eine unspezifische Protease, die neben Fibrin auch Fibrinogen, Faktor VIII und Von-Willebrand-Faktor spaltet. Plasmin hat die Fähigkeit, Fibringerinnsel aufzulösen, was für eine erfolgreiche Rekanalisation verschlossener Gefäße unerlässlich ist. Normalerweise ist die Konzentration an Plasminogen im Plasma recht hoch, so daß es relativ selten zu relevanten Mangelzuständen kommt. Auftreten können diese Mangelzustände bei Hyperfibrinolyse (Plasminämien), systemischer fibrinolytischer Therapie, eingeschränkter Syntheseleistung der Leber, Verbrauchskoagulopathie, größeren operativen Eingriffen und als physiologischer Befund beim Neugeborenen.

Erhöhte Plasminogenkonzentrationen findet man während Akuter-Phase-Reaktionen (z. B. Entzündungen) und im letzten Trimenon der Schwangerschaft. Auch bei Diabetes mellitus und Karzinomen können erhöhte Plasminogenspiegel beobachtet werden.

Plasminogen muß zunächst zu Plasmin aktiviert werden. Hierfür stehen im Plasma verschiedene Aktivatoren zur Verfügung, allen voran der Gewebeplasminogenaktivator (t-PA). Außerdem zu nennen wären die Urokinase und das Kontaktsystem der Gerinnung.

Therapeutisch einsetzbar ist die Streptokinase, welche ein bakterielles Produkt ist. Die Streptokinase selbst ist kein Enzym. Vielmehr bildet sie mit dem Plasminogen einen 1:1-Komplex, welcher nun wiederum befähigt ist, freies Plasminogen zu aktivieren.

Plasminogen hat eine hohe Affinität zu Fibrin, so daß es an den Orten des Bedarfs zu einer Anreicherung des Plasminogens kommt. Freies, im Plasma befindliches Plasmin wird relativ rasch inaktiviert durch den Plasmininhibitor (α_2 -Antiplasmin) oder auch durch Antithrombin.

Die Methode der Wahl ist die Bestimmung der biologischen Aktivität des Plasminogens mit Hilfe eines chromogenen Substrats. Zu diesem Zwecke wird Plasminogen durch Zugabe von Streptokinase im Überschuß in einen Streptokinase-Plasminogen-Komplex (1:1) umgewandelt. Dieser Komplex besitzt die Fähigkeit, das chromogene Substrat zu spalten, wodurch ein Produkt entsteht, welches anschließend photometrisch bei 405 nm vermessen wird.

Material

- Berichrom® Plasminogen-Testkit (Dade Behring, Mahrburg):
 - Streptokinase-Reagenz (Streptokinase in Phosphatpuffer)
 - Plasmin-Substrat-Lösung (mit dem chromogenen Substrat HD-Norvalylcyclohexylalanyl-lysyl-p-nitroanilid, 3 mmol/l)
- destilliertes Wasser (eigene Herstellung)
- gepooltes Normalplasma (eigene Herstellung)
- Kontroll-Plasma N und Kontroll-Plasma P (Dade Behring, Marburg)
- BCS-Gerät (Dade Behring, Marburg)

Durchführung

Zunächst müssen das Streptokinase-Reagenz und das Plasmin-Substrat in der angegebenen Menge destilliertem Wasser gelöst, um anschließend bei 37 °C inkubiert zu werden.

Pipettierschema:

1. 20 µl Plasma-Probe (gepooltes Normalplasma mit NaCl bzw. Seeanemonenfraktion)
2. Streptokinase-Reagenz
3. mischen und bei 37°C inkubieren
4. 100 µl Plasmin-Substrat
5. mischen und $\Delta E_{405 \text{ nm}}/\text{min}$ bestimmen: innerhalb von 30 sec die Extinktion ablesen, Stoppuhr starten und nach 60 bis 120 Sekunden Extinktion erneut ablesen, die jeweiligen $\Delta E_{405 \text{ nm}}/\text{min}$ durch Differenzbildung berechnen und den Mittelwert bilden

Zu jeder Meßserie muß ein Standardplasma mit genau definiertem Sollwert der Plasminogenaktivität (Prozent der Norm) mitvermessen werden. Aus dieser Messung läßt sich ein Faktor F ermitteln, der zur Berechnung der Plasminogenaktivität der Proben benötigt wird.

$$F = \text{Sollwert [\% der Norm]} / \Delta E_{405 \text{ nm}}/\text{min}$$

Mit Hilfe dieses Faktors berechnet sich die Plasminogenaktivität der Probe wie folgt:

$$\text{Plasminogenaktivität [\% der Norm]} = F \cdot \Delta E_{405 \text{ nm}}/\text{min}$$

2.4.16 Tissue-Plasminogenaktivator-(t-PA)-Bestimmung

Prinzip

Bei dem t-PA handelt es sich um den wichtigsten physiologischen Plasminogenaktivator. Ohne ihn würde eine physiologische Fibrinolyse im menschlichen Blut nicht möglich sein. Auch t-PA ist eine Serinprotease, die allerdings bereits im aktiven Zustand aus dem Endothel an das Blut abgegeben wird. Ebenso wie das Plasminogen wird der t-PA an Fibrin gebunden, welches wiederum die Aktivität von t-PA um ein Vielfaches steigert. Durch diese Tatsache wird gewährleistet, daß die fibrinolytische Aktivität hauptsächlich am Ort des Bedarfs entfaltet wird.

Gebildet wird t-PA vor allem im Endothel. Stimuliert wird diese Bildung durch Faktoren wie Streß, Venenstau und vasoaktive Substanzen. Zudem können Tumore (metastasierendes Prostatakarzinom) und schweres Leberversagen zu erhöhten t-PA-Spiegeln führen.

Ein zu niedriger t-PA-Spiegel kann beispielsweise bei venösen und arteriellen Verschlusskrankheiten, bei Diabetes mellitus, bei der koronaren Herzkrankheit, bei adipösen Patienten, bei Patienten mit Hypertriglyceridämie und bei Einnahme von Ovulationshemmern auftreten.

Zur Bestimmung der t-PA-Aktivität wird hier eine immunologische Methode herangezogen. So handelt es sich bei dem Test um einen Einschritt-Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip (ELISA: enzyme linked immuno sandwich assay). Dabei wird t-PA an stationäre Antikörper auf Mikrotiterplatten gebunden. Danach wird an die gebundenen t-PA-Moleküle ein zweiter Antikörper gebunden, der über eine Peroxidaseaktivität verfügt. Auf diese Weise entsteht eine sandwichartige Anordnung der Antikörper und des t-PA mit dem t-PA in der Mitte. Dabei ist jedes t-PA-Molekül mit genau zwei Antikörpern verbunden. Nachdem durch mehrere Waschvorgänge die nicht gebundenen Antikörper entfernt worden sind, werden zu dem Ansatz chromogenes Substrat (Phenylendiamin) und Wasserstoffperoxid gegeben, woraufhin eine Farbreaktion abläuft. Die Farbtintensität ist dabei der Menge an t-PA proportional, weswegen die photometrische Konzentrationsermittlung bei 492 nm möglich ist.

Material

- Testkit Asserachrom® t-PA (Firma Roche)

Dieses Testkit beinhaltet verschiedene Komponenten:

- 1) Mikrotiterstreifen, die mit t-PA-Antikörper bezogen sind
- 2) t-PA-Antikörper mit Peroxidase konjugiert
- 3) chromogenes Substrat: o-Phenylendiamin
- 4) Wasserstoffperoxid
- 5) Pufferkonzentrat (Albumin, Tween 20, Phosphatpuffer)
- 6) Waschlösungskonzentrat Natriumchlorid, Tween 20)
- 7) t-PA-Standard
- 8) t-PA-Kontrolle

- ELISA-Reader MRX (Dynex)

Durchführung

Zunächst müssen die verschiedenen Lösungen, wie vorgeschrieben, angesetzt und bei den vorgegebenen Temperaturen inkubiert werden.

Zur Vermessung der Proben greift man wieder auf die Normalplasma-Seeanemonenextraktproben mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml an Seeanemonenextrakt zurück. Bei dem Leerwert ist anstelle des Seeanemonenextraktes die gleiche Menge an physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt.

Von diesen Plasmaproben wird jeweils ein Teil mit vier Teilen Puffer gelöst.

Pipettierschema:

1. 200 µl oben hergestellte Probenverdünnung in Mikrotiterstreifen pipettieren
2. für 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubieren; anschließend 5 x mit 250 µl Waschlösung spülen
3. 200 µl -Pa-Antikörper-Peroxidase-Lösung
4. für 2 h bei Raumtemperatur inkubieren; anschließend 5 x mit 250 µl Waschlösung spülen; sofort nach den Spülvorgängen o-Phenylaminlösung zugeben
5. 200 µl o-Phenylaminlösung
6. Genau 6 min bei RT inkubieren, dann die Reaktion stoppen mit:
7. 50 µl 3 molare Schwefelsäure oder 100 µl 1 molare Salzsäure
8. 10 min bei RT inkubieren und dann photometrische Vermessung bei 492 nm gegen den Reagenzienleerwert (hergestellt, indem man die Plasmaproben durch die gleiche Menge an Puffer ersetzt und der gleichen Prozedur wie die Proben unterzieht) durchführen

Für die Auswertung muß eine Kalibriergerade erstellt werden. Hierfür verwendet man die t-PA-Standardlösung des Reagenziensatzes und stellt eine Verdünnungsreihe nach folgendem Schema her:

t-PA-Standardlösung:Puffer:

- 1) unverdünnte t-PA-Standardlösung
- 2) 1:2
- 3) 1:4
- 4) 1:8
- 5) 1:16
- 6) reiner Puffer

Die Erstellung der Kalibriergeraden erfordert eine doppelt logarithmische Darstellung der gemessenen Absorptionen gegen die t-PA-Konzentrationen in ng/ml.

Die photometrische Vermessung erfolgt mit dem ELISA-Reader MRX. Dieses Gerät erstellt die Kalibriergerade selbständig, berechnet sofort die Konzentration an t-PA aus der gemessenen Absorption und gibt das Ergebnis gleich als Mittelwert aus der Doppelbestimmung an, ohne die Einzelwerte anzuzeigen. Diese Methode ist für den Klinikalltag am praktikabelsten.

2.4.17 Plasminogenaktivator-Inhibitor-(PAI)-Bestimmung

Prinzip

Der Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI) ist der wichtigste physiologische Inhibitor von t-PA und Urokinase. Es gibt verschiedene Arten von PAI: Der eigentliche Inhibitor von t-PA und Urokinase ist PAI-1. Er wird vor allem im Endothel gebildet und von dort an die Blutbahn abgegeben. Aber auch in Thrombocyten, Hepatocyten und zahlreichen Gewebezellen kommt PAI-1 vor. Er liegt in zwei verschiedenen Form vor: in gebundener und ungebundener Form. Als Inhibitor aktiv ist nur die ungebundene Form. Bei dem PAI-1 handelt es sich um ein einkettiges Polypeptid mit **Serinproteaseninhibitorwirkung**, er ist ein sogenanntes Serpin. Er kann durch verschiedene Proteasen inaktiviert werden, so zum Beispiel durch Komplexbildung mit t-PA und Urokinase oder auch durch aktiviertes Protein C (APC). Außerdem können Thrombin und Elastase PAI-1 zerstören.

Die Reaktion mit APC verläuft normalerweise sehr langsam. Bei Anwesenheit von Vitronectin wird sie allerdings um das 1000-fache beschleunigt, so daß PAI-1 ein potenterer Inhibitor von APC ist als der APC-Inhibitor selbst.

Daneben gibt es noch PAI-2, welcher ausschließlich Urokinase hemmt und nur in der Schwangerschaft nachweisbar ist. PAI-3 ist mit dem APC-Inhibitor identisch.

Die PAI-Bestimmung beruht darauf, daß in dem Probenplasma enthaltenener PAI die im Überschuß vorgelegte Urokinase zum Teil inaktiviert. Der Überschuß an Urokinase wandelt wiederum zugesetztes Plasminogen in Plasmin um, welches dann ein chromogenes Substrat spaltet. Dabei entsteht freies p-Nitroanilin, das photometrisch bei 405 nm vermessen wird. Durch Zugabe von Chloramin T wird störendes α_2 -Antiplasmin mittels Oxidation inaktiviert.

Material

- Testkit Berichrom PAI (Dade Behring, Marburg)

Dieses Kit enthält folgende Reagenzien:

- 1) PAI-Standard S1: 0,0 U/ml PAI
- 2) PAI-Standard S2: 5 bis 7 U/ml PAI (exakte Konzentrationsangabe: siehe Flaschenaufdruck)
- 3) PAI-Kontrollplasma: 2,5 bis 4,0 U/ml PAI
- 4) Urokinase-Reagenz: 5 IU/ml Urokinase in Tris-Puffer pH 8,4
- 5) Plasminogen-Reagenz: 15 CTA-U/ml Plasminogen in Tris-Puffer pH 8,4
- 6) Oxidans: Chloramin T, 1,8 g/l
- 7) Plasmin-Substrat: HD-Norvalyl-cyclohexyl-alanyl-lysyl-p-nitroanilid, 0,06 mmol/l
- 8) Substratverdünnungslösung: NaCl (35 g/l) und Tris (50 mmol/l) pH 8,4
 - destilliertes Wasser (eigene Herstellung)
 - BCS-Gerät (Dade Behring, Marburg)

Durchführung

Die Reagenzien (auch das Substrat!) werden mit der angegebenen Menge an destilliertem Wasser gelöst und bei 37°C inkubiert.

Pipettierschema:

1. 50 µl Plasmaprobe mit Seeanemonenextrakt oder NaCl / Standard
2. 100 µl Urokinase-Reagenz
3. mischen und 5 min bei 37°C inkubieren

4. 200 µl Plasminogen-Reagenz
5. 200 µl Oxidans
6. mischen und exakt 5 min bei 37°C inkubieren
7. 500 µl Plasmin-Substrat
8. mischen und $\Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}$ bestimmen: nach 60 sec Extinktion bestimmen und Stoppuhr starten; in 3 Intervallen von jeweils genau 60 sec die Extinktion ablesen, die jeweiligen $\Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}$ durch Differenzbildung berechnen und aus den 3 Meßwerten den Mittelwert bilden

Die Auswertung erfolgt mittels eines Faktors (F), der vor jeder Meßreihe bestimmt werden muß. Dazu verwendet man die Standards S1 und S2:

$$F = \text{PAI Aktivität}_{S1} (\text{U/ml}) / \Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}_{S1} - \Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}_{S2}$$

$$\text{PAI-Aktivität}_{\text{Probe}} (\text{U/ml}) = F \times (\Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}_{S1} - \Delta E_{405\text{nm}}/\text{min}_{\text{Probe}})$$

2.4.18 Präkallikrein-Bestimmung

Prinzip

Bei dem Präkallikrein handelt es sich um einen Kontaktfaktor, der sich direkt an negativ geladene Oberflächen binden kann. Es wird in der Leber gebildet und ist im Blut zu 75 Prozent an HMWK (High Molecular Weight Kininogen) gebunden. Ferner ist es das Proenzym von Kallikrein, welches seinerseits den Gerinnungsfaktor XII zu XIIa aktiviert. Zudem kann Kallikrein in das Fibrinolyse-System eingreifen, indem es Plasminogen und Urokinase direkt spalten kann. Auch in dem Komplementsystem spielt es eine Rolle.

Ein Mangel an Präkallikrein manifestiert sich durch eine deutlich verlängerte aPTT. Allerdings ist mit diesem Mangel keine erhöhte Blutungsneigung verbunden, nicht einmal bei großen Operationen.

Bei der Präkallikreinbestimmung wird das Präkallikrein durch einen Aktivator zu Kallikrein umgesetzt, welches wiederum ein chromogenes Substrat dergestalt spaltet, daß p-Nitroanillin frei wird, das dann bei 405 nm photometrisch vermessen wird. Die gemessene Absorption ist dabei der Kallikreinkonzentration direkt proportional.

Material

- Testkit UnitestTMPrekallikrein (Firma Unicorn Diagnostics, London);

Im Kit enthalten sind:

1. UnirateTMPKK, Plasmakallikrein-Substrat: 10 µmol/vial chromogenes Substrat (MBz-Pro-Phe-Arg-pNA); wird vor dem Einsatz in 10 ml sterilem, destilliertem Wasser gelöst
2. Präkallikrein-Aktivator: in 5 ml destilliertem Wasser lösen
3. Puffer-Konzentrat: den Inhalt des Vials in 90 ml destilliertem Wasser lösen; so entsteht ein 0,05 molarer Tris-HCl-Puffer vom pH-Wert 8,0
4. Standard-Plasma: 1 ml Wasser hinzugeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, dann vorsichtig mischen

- BCS-Gerät (Dade Behring, Marburg)

Durchführung

Zunächst muß eine Kalibriergerade mittels des beigefügten Standardplasmas erstellt werden, die dann zur Probenauswertung herangezogen wird. Hierbei folgt man folgendem Verdünnungsschema:

Standardplasma [μ l]	Tris-Puffer [μ l]	Aktivität-(Standard) [%]
75	2500	150
50	2500	100

100 %-Aktivität (Standard)	Tris-Puffer	Standard [%]
600	200	75
400	400	50
200	600	25
0	800	0

Anschließend werden 50 μ l von jedem Testplasmansatz noch mit 2500 μ l Puffer gemischt.

Die Aktivator- und Substratlösungen werden bei 37°C inkubiert

Nun pipettiert man jeweils 200 μ l von jedem Plasmaansatz in eine Küvette und inkubiert zwei Minuten lang bei 37°C. Dann werden 200 μ l von der Aktivatorlösung hinzupipettiert, gemischt und ebenfalls zwei Minuten inkubiert. Anschließend fügt man die chromogene Substratlösung (200 μ l) hinzu und mischt den Ansatz. Nach einer halben Stunde wird die Absorption bei 405 nm gemessen.

Die Kallibriergerade erhält man, indem man die gemessenen Absorptionen gegen die Standard-Prozente aufträgt.

Die Proben bzw. der Leerwert werden daraufhin in gleicher Weise vorbehandelt und vermessen.

Die Aktivität in U/ml erhält man durch Berechnung nach folgender Formel:

$$\text{Präkallikrein (U/ml)} = \% \text{ Aktivität} \times \text{Potenz des Standards} / 100$$

Die Potenz des Standards variiert von Charge zu Charge und ist jeweils auf dem Vial vermerkt. Bei dem hier verwendeten Testkit liegt die Standard-Potenz bei 1,11 U/ml.

2.4.19 Bestimmung des Einflusses ausgewählter Seeanemonenfraktionen auf die Plättchenaggregation

Prinzip

Angewendet wird die Methode nach Born, bei der die Aggregationsfähigkeit der Thrombocyten im plättchenreichen Plasma unter Zusatz von aggregationsinduzierenden Substanzen, nämlich Kollagen und ADP, gemessen wird. Die Aggregation wird dabei photometrisch über die Bestimmung der Lichtdurchlässigkeit ermittelt. So nimmt die Lichtdurchlässigkeit des plättchenreichen Testansatzes mit zunehmender Aggregation zu.

Auszugehen ist davon, daß bei einer Aggregation aller enthaltenen Plättchen der Ansatz eine Lichtdurchlässigkeit aufweisen würde, die der von plättchenarmem Plasma entspräche. Demzufolge wird sowohl plättchenarmes als auch plättchenreiches Plasma für die Bestimmung benötigt. Mit dem plättchenarmen Plasma wird zunächst eine Referenzwertmessung durchgeführt. Der ermittelte Referenzwert entspricht einer Lichtdurchlässigkeit und somit einer Plättchenaggregation von 100 Prozent. Das plättchenreiche Plasma (mit Kochsalzlösung bzw. mit Seeanemonenprobe) wird nun in die Küvette des Aggregometers, die sich zwischen einer Lichtquelle und einer Photozelle befindet, pipettiert. Dabei ist die Küvette auf 37 °C temperiert. Das Plasma wird während der Bestimmung stetig durch einen im Gerät installierten Rührer mit konstanter Geschwindigkeit gerührt. Durch Zugabe von ADP bzw. Kollagen wird die Aggregation induziert. Das Ergebnis der Vermessung von plättchenreichem Plasma mit Kochsalzlösung (Leerwert) bzw. plättchenreichem Plasma mit Seeanemonenfraktion wird in Prozent der Lichtdurchlässigkeit des Referenzwertes angegeben. Registriert wird die Aggregatbildung als Kurve mittels eines Schreibers (U. Budde (2002); M. Barthels, M. von Depka (2003); nach Born (1962) und Lechner (1982)).

In der Klinik wird diese Methode zum Nachweis von Plättchenfunktionsstörungen, die oftmals mit verschiedenen Krankheiten wie z. B. Urämie oder Leberfunktionsstörungen einhergehen, angewendet. Außerdem ist die Thrombocytenfunktion bisweilen durch Medikamenteneinnahme (z. B. Antirheumatika oder Penicilline) in Form einer unerwünschten Arzneimittelwirkung gestört.

Material

- Kollagen in einer Endkonzentration von 1,9 µg/ml (Mölab, Hilden)
- ADP in einer Endkonzentration von 0,2 µmol/Ansatz (Mölab, Hilden)
- plättchenreiches Plasma, das innerhalb von 60 Minuten nach Entnahme vermessen werden muß
- plättchenarmes Plasma für die Referenzwertbestimmung
- Aggregometer PAP 4 (Firma Mölab, Hilden)
- Aggregometerküvetten
- Aqua bidest (eigene Herstellung)

Durchführung

Zunächst wird aus einer frischen Blutprobe durch Zentrifugation bei 150 x g (fünf Minuten) plättchenreiches Plasma gewonnen. Dieses wird abpipettiert, um dann den Überstand einer weiteren Zentrifugation bei 1500 x g (15 Minuten) zu unterwerfen. Dadurch wird plättchenarmes Plasma erhalten, das für die Referenzwertbestimmung verwendet wird.

Zu 450 Mikrolitern plättchenreichem Plasma werden 50 Mikroliter der entsprechenden Seeanemonenfraktion (in einer Konzentration von 1 mg/ml) oder der physiologischen Kochsalzlösung (Leerwert) pipettiert. Nach gründlicher Durchmischung werden dem Ansatz anschließend entweder 50 Mikroliter ADP-Lösung (0,2 µmolar) oder 50 Mikroliter Kollagenlösung (1,9 mg/ml) hinzugefügt, wodurch die Plättchenaggregation gestartet wird. Von diesem Zeitpunkt an wird die Änderung der Extinktion im Vergleich zum Referenzwert über einen Zeitraum von fünf Minuten mittels des Aggregometers vermessen.

Die Auswahl der zu untersuchenden Fraktionen beschränkt sich auf drei Fraktionen, die in den vorangegangenen Gerinnungstests einen deutlichen Einfluß auf einige der bestimmten Parameter zeigten. Bei diesen Fraktionen handelt es sich um die Fraktionen ASI 4c, 4d und 4e.

2.5 Toxizitätsuntersuchungen an der Strandkrabbe

2.5.1 Allgemeines

Es ist über *Anemonia sulcata* bekannt, daß in dieser Seeanemone Polypeptide enthalten sind, die an verschiedenen Ionenkanälen eine Wirkung entfalten können. So bewirken die Toxine ATX I, II, III und IV eine Verzögerung der Inaktivierung an spannungsabhängigen Natriumkanälen. Andere Toxine blockieren Kaliumkanäle. Deren Aktivität ist allerdings nicht mittels der Toxizitätsuntersuchungen an der Strandkrabbe bestimmbar.

Mit den im Folgenden beschriebenen Versuchsreihen sollen die Natriumkanalaktivitätsmodifizierenden Eigenschaften in den einzelnen Fraktionen aufgespürt werden, um abschätzen zu können, wie effizient die Abtrennung der Toxine von den gerinnungsaktiven Inhaltsstoffen der *Anemonia sulcata* mittels der angewandten Isolierungsmethode möglich ist. Zu diesem Zweck wird sich hier die Tatsache zunutze gemacht, daß die Strandkrabbe sehr spezifisch mit tetanischen Krämpfen auf die natriumkanalwirksamen Toxine der *Anemonia sulcata* reagiert. Diese Methode ist als zuverlässiger Screening-Test auf die *Anemonia-sulcata*-Toxine einsetzbar, der deutlich weniger Zeit- und Kostenaufwand mit sich bringt als die Patch-Clamp-Messungen.

2.5.2 Material

- Strandkrabben (gefangen in der Ostsee)
- Insulinspritzen
- Aqua destillata

2.5.3 Durchführung

Es wird eine kleine Menge einer 1-prozentigen wäßrigen Lösung der entsprechenden Testfraktion intramuskulär in das dritte Laufbein der **Strandkrabbe *Carcinus maenas*** injiziert. Dabei verwendet man ca. 0,1 Milliliter Lösung pro 10 Gramm Strandkrabbe. Sind in der Fraktion Toxine enthalten, so reagiert die Krabbe innerhalb weniger Sekunden mit tetanischen Krämpfen der Extremitäten auf die Injektion. Schließlich kommt es unter Kontraktion der Extremitäten zur vollständigen Lähmung und zum Tod des Tieres (L. Béress, R. Béress, 1971). Falls keine tetanische Reaktion beobachtet werden kann, wird die Konzentration der Testlösung erhöht, um sicherzustellen, daß wirklich keine toxische Wirkung in der Fraktion verborgen ist. Erfolgt nach dieser Dosiserhöhung immer noch keine Krampfreaktion, so kann man die entsprechenden Folgefraktionen von weiteren Tests ausschließen.

Auf diese Weise ist mittels dieses Screenings eine schnelle Separation der toxischen Fraktionen möglich. Bei der Auswahl der Fraktionen wird nach dem gleichen Prinzip wie zuvor bei den Gerinnungstests vorgegangen. Hier werden also zunächst die Sephadex G-50-Folgefraktionen der XAD₂-Chromatographie getestet, um gezielt diejenigen Fraktionen herauszusuchen, bei denen eine Aktivität im Krabbentest zu beobachten ist. Nach weiteren Aufreinigungsschritten werden dann die Folgefraktionen der aktiven Fraktionen ebenfalls dem Krabbentest unterzogen.

2.6 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie findet in vielen wissenschaftlichen Bereichen Anwendung zur Strukturaufklärung von unbekanntem Verbindungen. Aufgrund der Spezifität und des geringen Substanzbedarf ist diese Methode hervorragend geeignet, um Substanzen beispielsweise in Körperflüssigkeiten und Organen qualitativ und quantitativ nachzuweisen. So ist sie ein wertvolles Instrument in der biochemischen, pharmakokinetischen, physiologischen und toxikologischen Analytik. In dieser Arbeit wird die Massenspektrometrie zur Molekulargewichtsaufklärung der aus der Seeanemone *Anemone sulcata* isolierten Polypeptide herangezogen.

2.6.1 Prinzip

In der Massenspektrometrie werden Moleküle in den Gaszustand überführt und ionisiert. Hierzu sind verschiedene Ionisierungsprinzipien denkbar. Zur Anwendung kommt in dieser Arbeit die sogenannte Elektrospray-Ionisation (ESI). Sie bietet den Vorteil, daß auch in Lösung vorliegende Moleküle problemlos unter Atmosphärendruck verdampft werden können. Vor Einführung dieser Technik war es nur möglich, die Proben in festem oder bereits gasförmigem Zustand in die Probekammer einzubringen.

Bei der ESI wird die Lösung der zu analysierenden Moleküle aus einer Kapillare in ein starkes elektrostatisches Feld versprüht. An die Kapillare wird entweder ein stark positives oder stark negatives Potential angelegt, wodurch es gleichzeitig mit der Verneblung zu einer Ionisierung kommt. Je nach Polarität der Kapillare kommt es dabei zu positiv oder negativ geladenen Tröpfchen. Zur Erzielung ausreichend hoher Flußraten wird die ESI pneumatisch unterstützt. Dies bedeutet, daß dem Spray ein warmer Stickstoffstrom (250 °C) entgegengerichtet wird, der für eine effektivere Verneblung und Desolvatisierung der zu untersuchenden Moleküle sorgt.

Zur Beschreibung der Prozesse bei der Ionisierung existieren zwei verschiedene Modellvorstellungen.

Das ältere der beiden Modelle stammt von Dole und heißt „Modell des geladenen Rückstandes“ (charged-residue Modell, CRM). Es besagt, daß die ursprünglich gebildeten Tröpfchen eine so hohe Oberflächenladung besitzen, daß es zu Coulomb-Explosionen kommt, aus denen kleinere geladene Tröpfchen hervorgehen. Schließlich handelt es sich um Tröpfchen, die nur noch aus einem Analyt-Molekül bestehen. Anschließend werden diese desolvatisiert, wodurch freie, gasförmige, elektrisch geladene Moleküle entstehen.

Das zweite Modell, entwickelt von Iribarne und Thomson, wird Ionenemissions-Modell (ion evaporation model, IEM) genannt. Es geht davon aus, daß die hochgeladenen Tröpfchen, die zu Beginn entstehen, direkt Ionen emittieren.

Neueren Untersuchungen zufolge veranschaulichen beide Modelle jeweils Einzelaspekte der ESI treffend. Vermutlich liegt die Wahrheit in einer Kombination der beiden Vorstellungen.

Tatsache ist, daß es bei dieser recht schonenden Methode hauptsächlich zur Bildung von Ionen kommt, die von dem gesamten Molekül gebildet werden. Folglich tritt eine Fragmentierung der Moleküle – wie sie bei vielen anderen Ionisationsmethoden üblich ist – nicht auf. Aus diesem Grunde ist die Bestimmung des Molekulargewichts der analysierten Substanzen recht unkompliziert. Die positiv geladenen Ionen entstehen bei der ESI durch Anlagerung von Kationen an die zu untersuchenden Moleküle, wobei die Ladungszahl direkt der Zahl der angelagerten Kationen entspricht. In diesem Fall werden zur Ionenbildung Protonen herangezogen, welche der Essigsäure aus dem Lösungsmittelgemisch entstammen. Neben dem Charakteristikum der „Nicht-Fragmentierung“ besitzt die ESI ein weiteres typisches Merkmal, nämlich die Mehrfachionisierung. Prinzipiell kann man davon ausgehen, daß es bei Molekülen mit einem Molekulargewicht bis 1000 Da zur Bildung von einfach

geladenen Kationen kommt. Bei größeren Molekülen ist mit der Bildung von mehrfach geladenen Kationen zu rechnen. Je größer dabei das Molekulargewicht ist, desto höher ist die Zahl der mittleren Ladung der gebildeten Ionen. Eben diese Mehrfachionisierung ermöglicht die Bestimmung von Makromolekülen mit Molekulargewichten über 100 000 Da. Dieser Umstand prädestiniert diese Methode für die Anwendung in der Peptid- und Proteinanalytik.

Die **Molekülionentrennung** erfolgt mit Hilfe einer sogenannten Ionenfalle (ion trap). Diese besteht aus einer ringförmig gebogenen Elektrode, die zu beiden Seiten von einer Endkappe flankiert wird. An die Ringelektrode wird ein Hochfrequenzfeld angelegt, welches dafür sorgt, daß die eintretenden Molekülionen im Inneren der Elektrode gehalten werden. Um diesen Innenraum verlassen zu können, bedarf es für die Molekülionen je nach Masse/Ladungsverhältnis einer unterschiedlichen Feldstärke. Durch Variation der Feldstärke gelingt es demnach, die Molekülionen aufgrund ihres unterschiedlichen Masse/Ladungsverhältnisses voneinander getrennt dem Detektor zuzuführen (W. D. Lehmann, 1996). Unter den gewählten Bedingungen unterbleibt – wie bereits weiter oben erwähnt – eine Fragmentierung der Moleküle, wodurch alle entstehenden Molekülionen annähernd über das gleiche Molekulargewicht verfügen. In diesem Falle erfolgt dementsprechend die Trennung der Molekülionen lediglich aufgrund der unterschiedlichen Ladungen.

Der **Ionennachweis** erfolgt im Anschluß aufgrund der Ladung der Teilchen mittels eines Sekundärelektronenvervielfachers. Aufgezeichnet wird das Massenspektrum durch Auftragen der Intensität (Anteil der Teilchen, die in einer bestimmten Zeiteinheit detektiert werden) gegen das Masse-Ladungsverhältnis (m/z).

2.6.2 Material und Geräte

- Massenspektrometer: Esquire-LC (Firma Bruker, Bremen)
- Software: Bruker Daltonics Data Analysis (Bruker, Bremen)
- Aqua bidest (ipse)
- Acetonitril, HPLC-Grade (Merck, Darmstadt)
- Eisessig (Merck, Darmstadt)

2.6.3 Aufbau

Ionisierungseinheit:	Electrosprayionisations-Vorrichtung
Analysator:	Ionenfalle
Detektion:	Sekundärelektronenvervielfacher
Aufzeichnung:	PC mit entspr. Bruker-Software

2.6.4 Durchführung

Von den zwölf zu untersuchenden Proben werden jeweils ca. 0,1 Milligramm eingewogen und in einem Lösungsmittelgemisch aus jeweils 100 Mikrolitern Aqua bidest und Acetonitril mit 10 Mikrolitern Eisessig gelöst. Die zugesetzte Essigsäure stellt sicher, daß sich lediglich protonierte Ionen bilden und kein anderes Kation zur Ionenbildung herangezogen wird. Dies ist entscheidend, um bei der Auswertung das korrekte Molekulargewicht berechnen zu können.

Die gelöste Probe wird nun durch das Probeneinlaßsystem in das Massenspektrometer eingebracht. An der Kapillare liegt eine Spannung von -4000 V, an der entsprechenden Gegenelektrode -500 V. Durch diese Potentialdifferenz kommt es zur Ionisierung der versprühten Probentröpfchen. Ein Stickstoffstrom mit einem Druck von 3 Psi sorgt für eine feine Verneblung. Die gewählte Flußrate beträgt 100 Mikroliter pro Stunde. In dem Ion-Trap-

Gerät laufen nun mehrere Messungen der gleichen Probe hintereinander ab. Beim Erreichen von reproduzierbaren Ergebnissen können die Messungen an einer Probe abgebrochen werden. Das zur Auswertung herangezogene Massenspektrum entspricht dabei dem gemittelten Massenspektrum aller Messungen an der gleichen Probe.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Isolierungsmethode

3.1.1 Ergebnisse der Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2

Das Säulenmaterial **Serdolit AD-2** ist in der Lage, biologisch aktive Polypeptide und Proteine zu binden. Salze, stark polare Verunreinigungen und andere biologische Makromoleküle (z. B. Polysaccharide und Nucleinsäuren) können durch diesen Chromatographieschritt bereits von den Peptiden abgetrennt werden, da sie ungebunden die Säule verlassen. Bei der Anwendung des Essigsäuregradienten entsteht folgendes Chromatogramm:

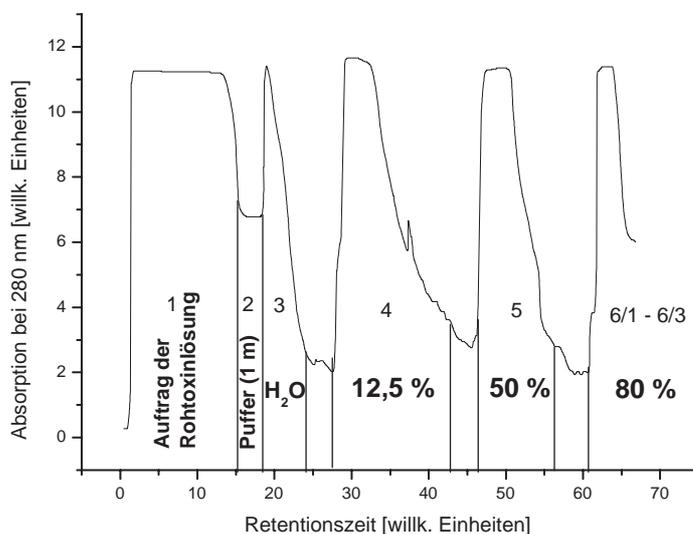


Abb. 7: Chromatographie des Rohextraktes aus 2,6 kg *Anemonia sulcata* an Serdolit-AD-2-Chromatographie mit einem Wasser-Essigsäurestufengradienten (0 %, 12,5 %, 50 % und 80 % Essigsäure)

Bei der Elution ergeben sich acht verschiedene Hauptfraktionen (1, 2, 3, 4, 5, 6/1, 6/2 und 6/3). In den ersten beiden Fraktionen, die mit Ammoniumacetatpuffer (1 molar) von der Säule gespült werden, sind wasserlösliche, stark polare Substanzen enthalten (Nucleinsäuren, Polysaccharide, Peptide, Proteine etc., wie auch anorganische Salze), die sich nicht an das Säulenmaterial binden. Sie sind bisher nicht weiter untersucht worden.

Die dritte Fraktion wird durch destilliertes Wasser eluiert. Sie enthält Polypeptide und Proteine, die ebenfalls noch relativ starke Polarität aufweisen und sich daher nur locker an das Serdolit® AD-2 binden.

In der vierten Fraktion, die mittels 12,5-prozentiger Essigsäure von der Säule eluiert wird, sind Polypeptide bzw. Proteine mittlerer Polarität enthalten.

Etwas schwächer polare Polypeptide oder Proteine sind in der Fraktion 5 zu erwarten, welche sich bei einer Essigsäurekonzentration von 50 Prozent von der Säule löst.

Die Fraktionen 6/1 bis 6/3 werden bei einer Essigsäurekonzentration von 80 Prozent eluiert und enthalten demnach relativ unpolare Polypeptide oder Proteine, die aufgrund ihrer starken Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial erst zu diesem späten Zeitpunkt eluiert werden.

Die Fraktionen 3, 4, 5, 6/1, 6/2 und 6/3 werden im Wasserstrahlpumpenvakuum eingengt und lyophilisiert, um anschließend auf **Sephadex G-50** weiter aufgetrennt zu werden.

3.1.2 Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G-50

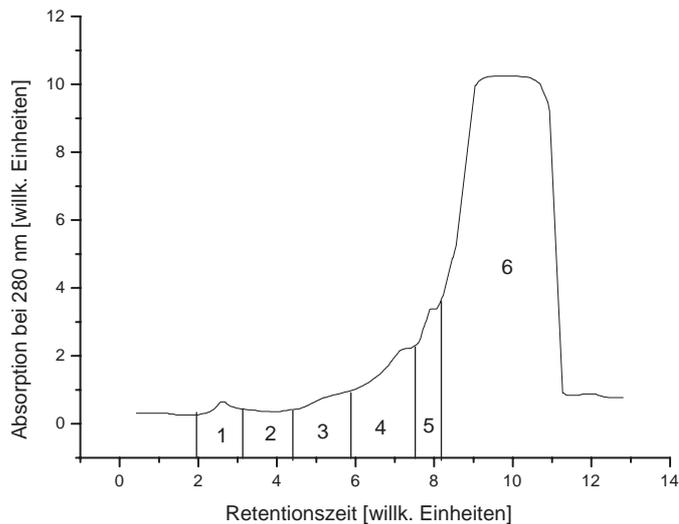


Abb. 8: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 3** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Bei der Größenausschlußchromatographie wird die **Serdolit-Fraktion 3** in sechs Folgefraktionen aufgetrennt. Die eindeutig größte Absorption wird bei Folgefraktion 6 gemessen. Dies bedeutet, daß die Hauptmenge der in der Serdolit-AD-2-Fraktion 3 enthaltenen Polypeptide aus Molekülen mit einem mittleren Molekulargewicht um 5000 Dalton besteht.

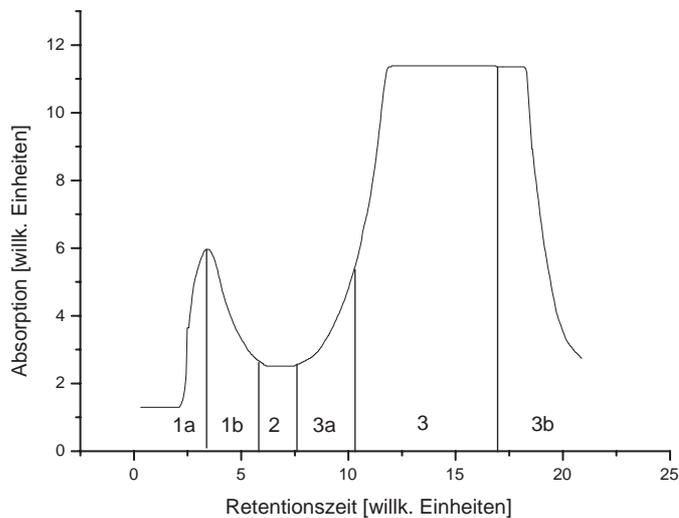


Abb. 9: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 4** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Die **Serdolit-Fraktion 4** wird mittels der Gelfiltrationschromatographie in sechs Fraktionen zerlegt, wobei die Fraktionen 3 und 3b nach der Chromatographie vereinigt werden.

In dem Chromatogramm ist zu erkennen, daß die Absorption bei der Fraktion 3+3b am höchsten ist. Daran ist zu erkennen, daß auch in der XAD₂-Fr. 4 die Polypeptide von mittlerem Molekulargewicht mengenmäßig dominieren. Allerdings ist auch bei den Fraktionen 1 und 1b ein deutlicher Peak zu beobachten. Es sind folglich auch etwas höhermolekulare Polypeptide in der Serdolit-AD-2-Fraktion 4 zu finden.

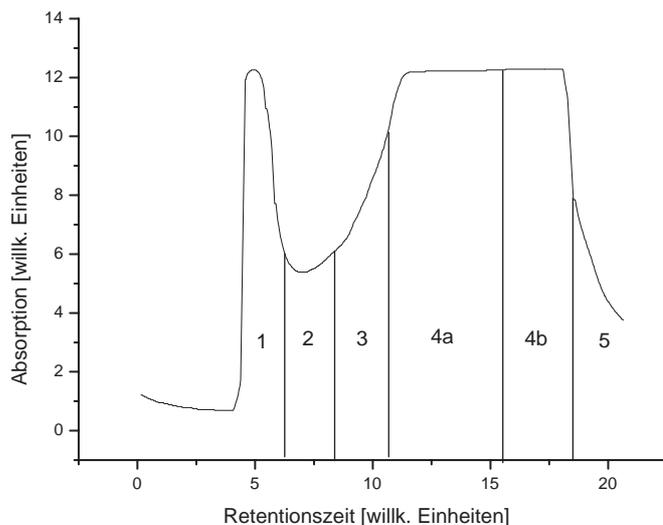


Abb. 10: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 5** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Auch die Gelfiltrationschromatographie der **Serdolit-Fraktion 5** liefert sechs Folgefraktionen. Ein deutlicher Peak gehört zu der Fraktion 1. Diese Fraktion enthält höhermolekulare Substanzen. Danach folgen zwei Fraktionen (Fraktion 2 und 3), die bei 280 Nanometern das Licht nicht sehr ausgeprägt absorbieren. Dies deutet entweder darauf hin, daß in ihnen kaum Polypeptide oder Proteine enthalten sind, oder es handelt sich um Polypeptide bzw. Proteine, die kaum aromatische Aminosäuren enthalten.

Der größte Peak wird durch die Fraktionen 4a und 4b hervorgerufen. Bei ihnen handelt es sich um Substanzen von mittlerem Molekulargewicht.

Damit weist das Chromatogramm einen ähnlichen Verlauf auf wie die vorangegangenen Gelfiltrationschromatographien: Auch hier überwiegen die Polypeptide mit einem mittleren Molekulargewicht.

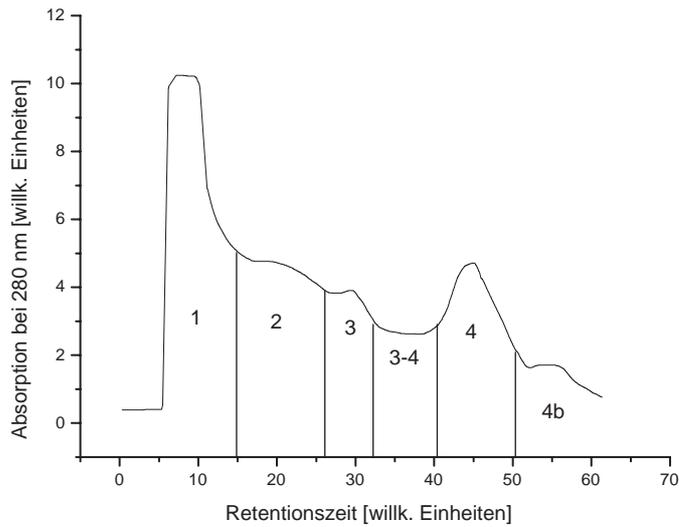


Abb. 11: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 6/1** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Laut des Chromatogramms wurde die **Serdolit-Fraktion 6/1** in sechs Folgefraktionen aufgereinigt.

Die Fraktion 1 macht den eindeutig größten Peak des Chromatogramms aus. Die Lichtabsorption der Fraktionen 2 und 3 bei 280 Nanometern ist nicht so hoch. Die Zwischenfraktion 3-4 weist eine noch geringere Absorption bei 280 Nanometern auf, während die Fraktion 4 wiederum bei dieser Wellenlänge stärker absorbiert. Die letzte Fraktion, Fraktion 4b, hat von allen Fraktionen die geringste Absorption vorzuweisen.

Folglich zeigen sich bei dieser Gelfiltrationschromatographie andere Mengenverhältnisse als bei den vorangegangenen. So herrschen in der XAD₂-Fr. 6/1 die höhermolekularen Polypeptide vor.

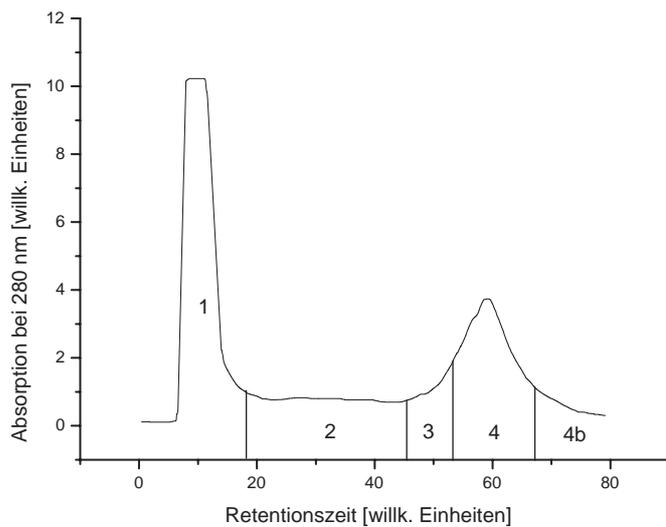


Abb. 12: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 6/2** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Fünf Folgefraktionen ergeben sich aus der Größenausschlußchromatographie der **Serdolit-Fraktion 6/2**.

In diesem Chromatogramm findet man einen ausgeprägten Peak bei der Fraktion 1. Diese Fraktion enthält höhermolekulare Substanzen. Ein weiterer Peak befindet sich bei der Fraktion 4, die aus Substanzen mittleren Molekulargewichts besteht. Die übrigen Fraktionen (2, 3 und 4 b) weisen eine nur sehr geringe Absorption bei 280 Nanometern auf.

Somit ist bei dieser Fraktion ein ähnliches Mengenverhältnis zu beobachten, wie bei XAD₂-Fr. 6/1. Auch hier wird das Chromatogramm eindeutig von den höhermolekularen Substanzen bestimmt.

Ein vergleichbares Bild ergibt die Gelfiltrationschromatographie der XAD₂-Fr. 6/3:

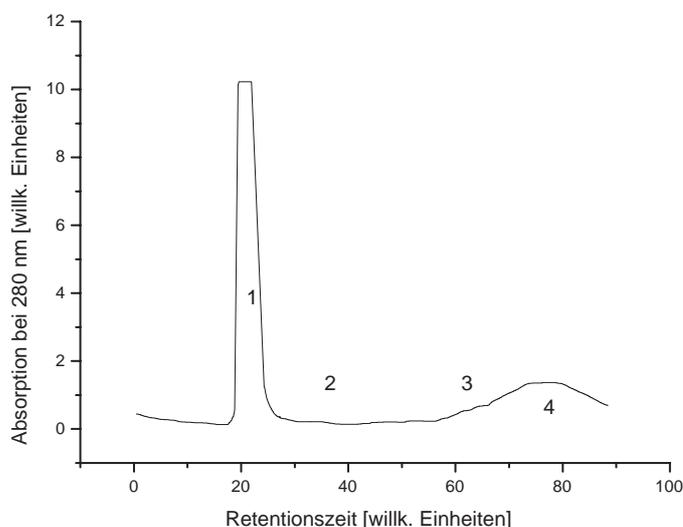


Abb. 13: Chromatographie von XAD₂-Fr. 6/3 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Der Gelfiltrationschromatographie der **Serdolit-Fraktion 6/3** entspringen vier Folgefraktionen. Ansonsten ähnelt das Chromatogramm dem der Fraktion 6/2. So verursacht die Fraktion 1, welche höhermolekulare Substanzen enthält, einen ausgeprägten Peak. Ein kleinerer Peak wird durch die Fraktion 4 erzeugt. Die Fraktionen 2 und 3 absorbieren bei 280 Nanometern hingegen in keinem nennenswerten Ausmaße.

Die gewonnenen Fraktionen der Sephadex G-50-Chromatographie werden mit Hilfe von Büchi-Rotationsverdampfern im Vakuum einrotiert und mittels Gefriertrocknung lyophilisiert, um anschließend biologischen Aktivitätstests unterzogen zu werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im Detail den entsprechenden Kapiteln zu entnehmen (siehe Kapitel 3.3: „Ergebnisse der Gerinnungsanalysen“, ab Seite 130; siehe Kapitel 3.4: „Ergebnisse der Toxizitätstests an der Strandkrabbe“, ab Seite 149).

Die Fraktionen, die bei diesen Untersuchungen die interessantesten Ergebnisse liefern, werden dann durch Ionenaustauschchromatographie an **SP Sephadex C-25** weiter aufgereinigt.

Zwecks besserer Übersichtlichkeit sollen an dieser Stelle zunächst die Chromatographieergebnisse der **gerinnungsaktiven Fraktionen** gezeigt werden. Im Anschluß daran folgen die Chromatogramme der weiteren Toxinfraktionenaufreinigung.

3.1.3 Serdolit AD-2 Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b

3.1.3.1 Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25

Die Fraktion, die sich in den Gerinnungsanalysen als vielversprechend erweist, ist die Fraktion **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b**.

Diese wird zunächst einer Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25 unterzogen.

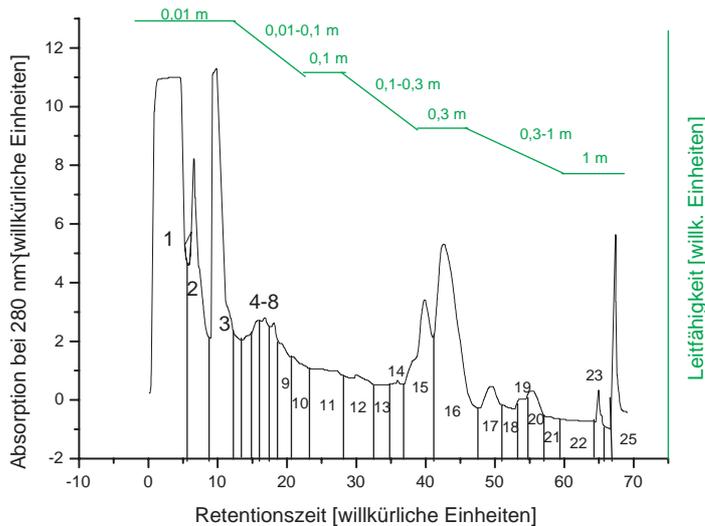


Abb. 14: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b** an SP Sephadex C-25 mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Die Fraktion XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b wird mittels der durchgeführten Ionenaustauschchromatographie in 25 Fraktionen aufgetrennt. Diese Auftrennung wird durch einen linearen Puffergradienten von 0,01 molarem auf 1 molaren Ammoniumacetatpuffer (pH 5,4) erreicht. Die jeweiligen Fraktionen werden wie folgt von der Säule eluiert:

- Fraktionen 1 bis 3: 0,01- molares Puffergleichgewicht
- Fraktionen 4 bis 9: Gradient von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer
- Fraktionen 10 bis 11: 0,1 molares Puffergleichgewicht
- Fraktionen 12 bis 15: Gradient von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer
- Fraktionen 16 bis 21: 0,3 molares Puffergleichgewicht
- Fraktionen 22 bis 25: 1 molares Puffergleichgewicht

Die gewonnenen Fraktionen werden anschließend einer Entsalzungschromatographie an Sephadex G-50 unterzogen, um danach ihre Aktivität in weiteren Gerinnungsanalysen (Thrombinzeit, Fibrinogen-, Protein-C-, APC-Resistenz-, Plasminogen-, t-PA-, PAI- und Präkallikrein-Bestimmung, Plättchenfunktionstest) zu überprüfen. Im Folgenden werden nur die Chromatogramme derjenigen Fraktionen gezeigt, die sich in diesen Untersuchungen als besonders aktiv erwiesen haben. (Die genauen Untersuchungsergebnisse sind in den entsprechenden Kapiteln 3.3.3 bis 3.3.11 ab Seite 136 aufgeführt.) Dabei handelt es sich um folgende Fraktionen:

- **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10**

- XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 16
- XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 17
- XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 19
- XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 20

Nachfolgend sind die Chromatogramme dieser Entsalzungen aufgeführt:

3.1.3.2 Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G-50

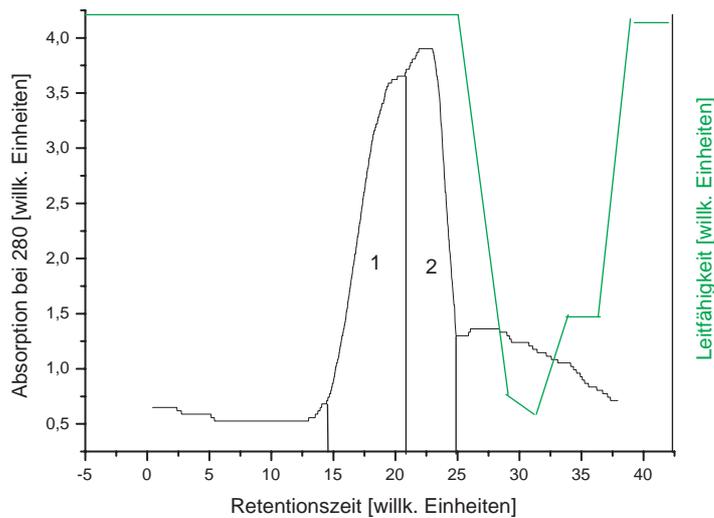


Abb. 15: Chromatographie von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. Fr.10 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Durch die Chromatographie an **Sephadex G-50** gelingt eine weitere Aufspaltung von **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. Fr.10** in zwei Folgefraktionen. Zudem kommt das Salz erst deutlich nach den beiden Substanzpeaks, was der Anstieg der Leitfähigkeit zeigt. Somit ist es gelungen, die beiden Folgefraktionen salzfrei zu gewinnen.

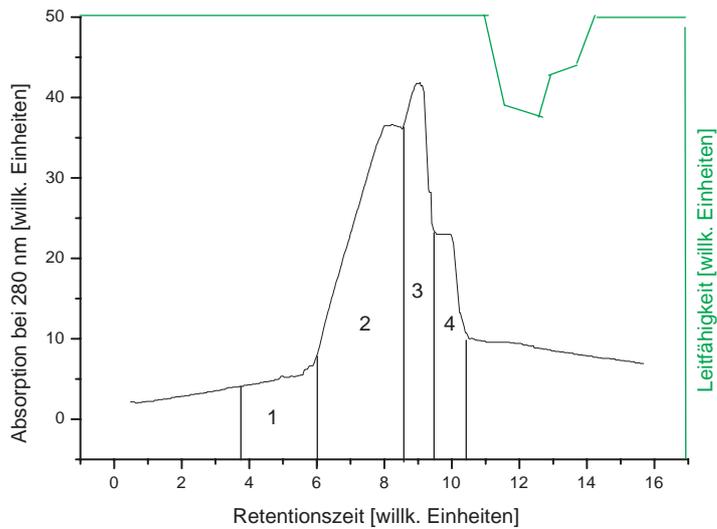


Abb. 16: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Bei diesem Entsalzungsschritt von **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16** an **Sephadex G-50** werden vier Folgefraktionen gewonnen, die ebenfalls alle salzfrei vorliegen. Das Salz wird auch hier erst nach den Substanzpeaks von der Säule eluiert.

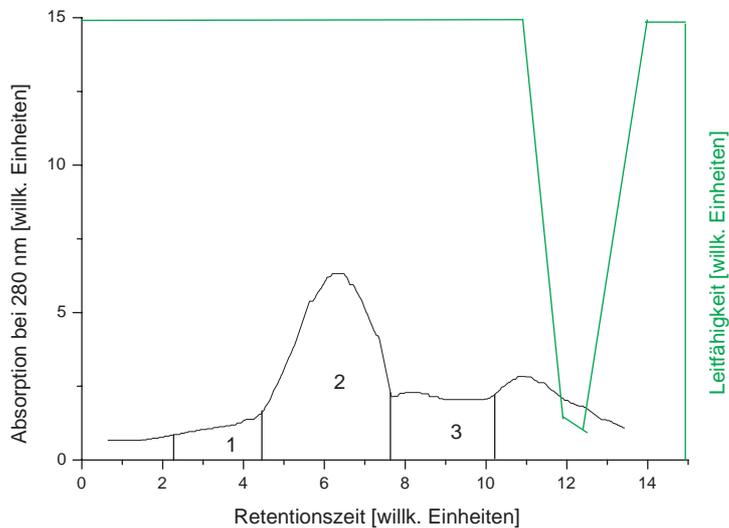


Abb. 17: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Sephadex C-25 Fr. 17** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Die drei aus der Entsalzung von **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Sephadex C-25 Fr. 17** an **Sephadex G-50** hervorgegangenen Fraktionen werden alle deutlich vor dem Salz von der Säule gespült.

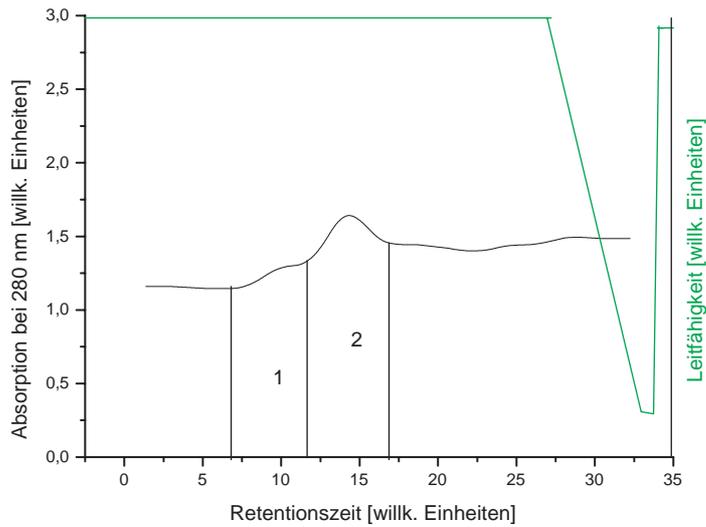


Abb. 18: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 19** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Hier ergeben sich aus **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 19** zwei Folgefraktionen bei dem Entsalzungsschritt, der auch in diesem Falle erfolgreich verlaufen ist.

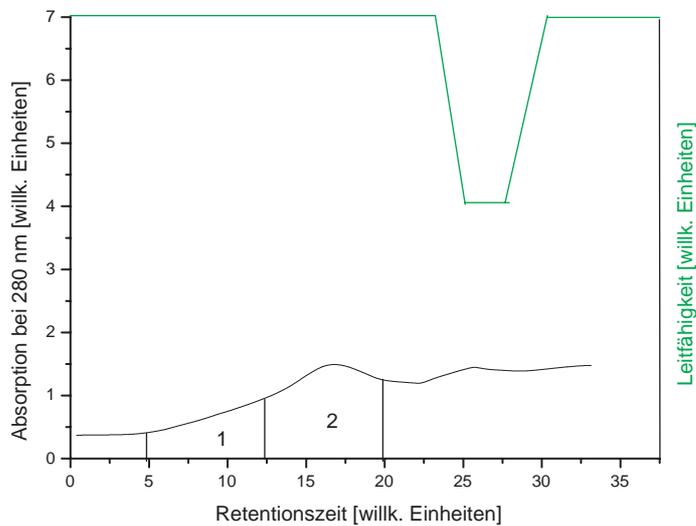


Abb. 19: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 20** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Auch hier ist eine gelungene Entsalzung von **XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 20** vorzuweisen, der zwei salzfreie Folgefraktionen entspringen.

3.1.3.3 Ergebnisse der weiteren Aufreinigung der gerinnungsaktiven Fraktionen mittels Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie

Anhand der durchgeführten Gerinnungsanalysen und der HPLC-Ergebnisse werden nun diejenigen Fraktionen herausgesucht, bei denen sich eine **weitere Aufreinigung mittels säulenchromatographischer Verfahren** anbietet. Zur Erinnerung seien diese Fraktionen hier noch einmal kurz aufgeführt:

Tabelle 6: gerinnungsaktive Proben für die weitere Aufreinigung

Proben-Nummer	bisherige Isolierungsschritte zur Gewinnung der Fraktion
ASI GP 2	XAD ₂ -Fr. 4/G50 Fr. 3+3b/SP Fr. 10/G50 Fr. 1
ASI GP 3	XAD ₂ -Fr. 4/G50 Fr. 3+3b/SP Fr. 10/G50 Fr. 2
ASI GP 9	XAD ₂ -Fr. 4/G50 Fr. 3+3b/SP Fr. 16/G50 Fr. 2
ASI GP 10	XAD ₂ -Fr. 4/G50 Fr. 3+3b/SP Fr. 16/G50 Fr. 3+4
ASI GP 11	XAD ₂ -Fr. 4/G50 Fr. 3+3b/SP Fr. 17/G50 Fr. 2

Diese Fraktionen werden zur weiteren Aufreinigung **Ionenaustauschchromatographien** unterzogen. Als Ionenaustauscher kommen hierbei die drei zuvor erwähnten Austauscherharze zum Einsatz (siehe Kapitel 2.2.7.1, ab S. 33). Dabei ergeben sich folgende Chromatogramme:

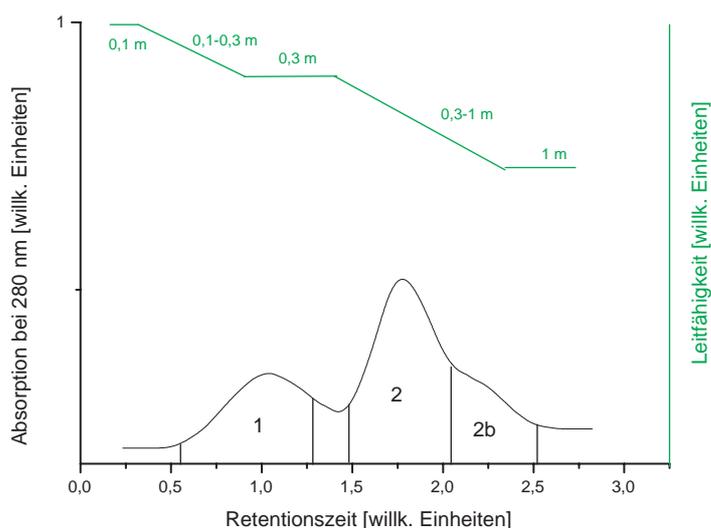


Abb. 20: Chromatographie von ASI GP 2 an Bio Rad Macro-Prep High S Support mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

In dem Chromatogramm wird die Ionenaustauschchromatographie der Fraktion **ASI GP 2** an **Bio Rad Macro-Prep High S Support** gezeigt. Es entstehen dabei drei Fraktionen, wovon sich die erste bei dem Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer und beim 0,3 molaren Gleichgewicht löst. Die zweite Fraktion wird bei dem Gradienten von 0,3 auf 1 molar, und die dritte Fraktion bei eben diesem Gradienten und dem 1 molaren Gleichgewicht von der Säule gespült.

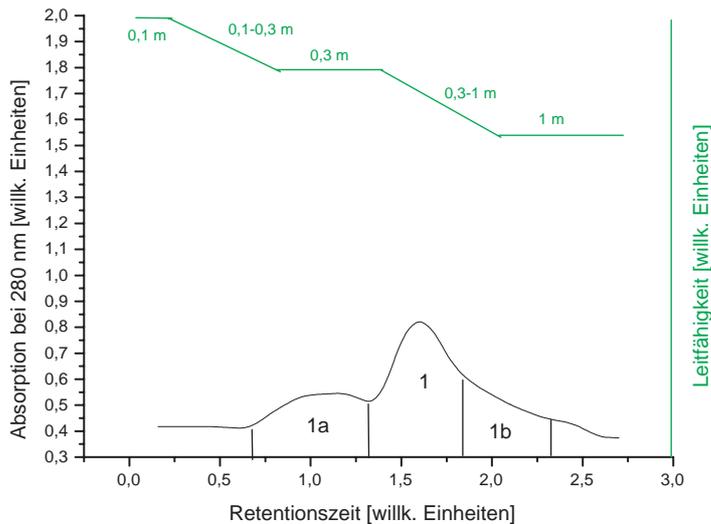


Abb. 21: Chromatographie von **ASI GP 3** an **Bio Rad Macro-Prep High S Support** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Die Fraktion **ASI GP 3** ergibt bei der Ionenaustauschchromatographie an **Bio Rad Macro-Prep High S Support** ebenfalls drei Folgefraktionen. Der erste Peak wird im Chromatogramm bei dem 0,3 molaren Puffergleichgewicht sichtbar. Der zweite folgt beim Gradienten von 0,3 auf 1 molaren Puffer. Der letzte Peak erscheint beim Gradienten von 0,3 auf 1 molaren Puffer sowie beim 1 molaren Puffergleichgewicht.

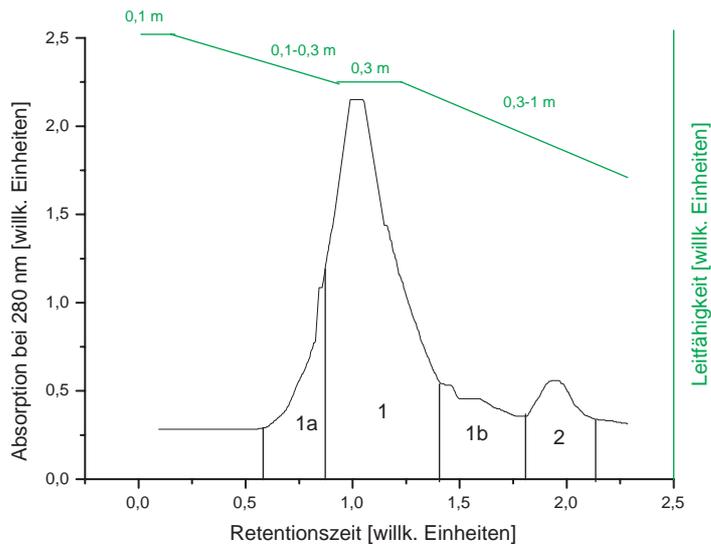


Abb. 22: Chromatographie von **ASI GP 9** an **Bio Rad Macro-Prep High S Support** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Aus der Ionenaustauschchromatographie der Fraktion **ASI GP 9** an **SP Sephadex C-25** resultieren vier Folgefraktionen, von denen die erste bei dem Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer, die zweite im 0,3 molaren Gleichgewicht, die dritte und vierte nacheinander beim Gradienten von 0,3 auf 1 molaren Puffer eluiert werden.

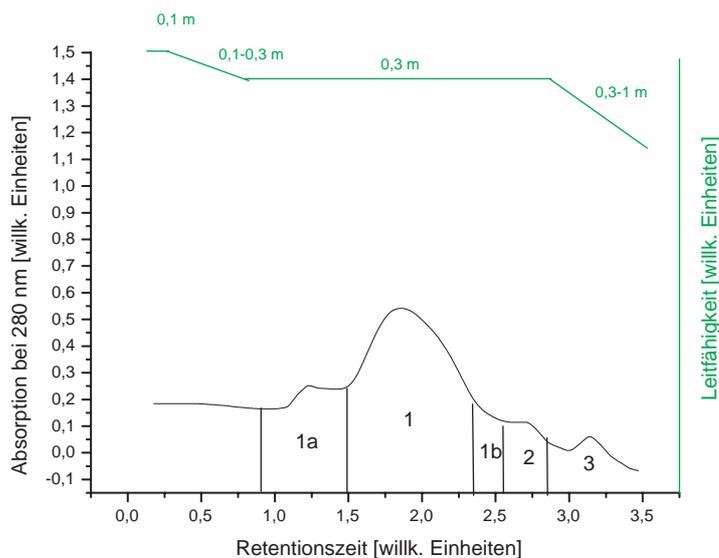


Abb. 23: Chromatographie von **ASI GP 10** an **Bio Rad Macro-Prep High S Support** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Fünf Fraktionen zieht die Ionenaustauschchromatographie der Fraktion **ASI GP 10** an **SP Sephadex C-25** nach sich. Die ersten vier Fraktionen werden dabei beim 0,3 molaren

Puffergleichgewicht eluiert, während die letzte Fraktion sich bei dem Gradienten von 0,3 auf 1 molaren Puffer von dem Säulenmaterial löst.

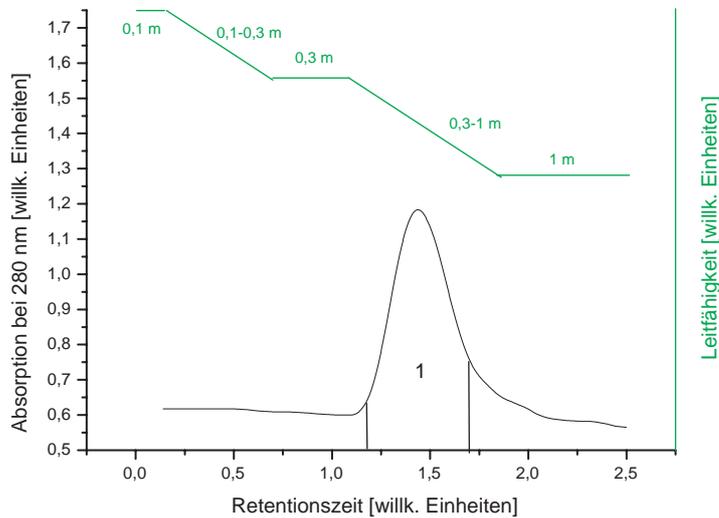


Abb. 24: Chromatographie von **ASI GP 11** an **Bio Rad Macro-Prep High S Support** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Bei der Durchführung der Ionenaustauschchromatographie der Fraktion **ASI GP 11** an **Bio Rad Macro-Prep High S Support** kann keine weitere Aufreinigung erreicht werden, da sich lediglich ein großer Peak aus der Chromatographie ergibt. Dieser wird bei dem Gradienten von 0,3 auf 1 molaren Puffer von der Säule gespült.

Die Chromatogramme der abschließenden Entsalzungen an Sephadex G-25 werden hier nicht gezeigt, da sie im Prinzip alle sehr ähnlich aussehen. So entsteht aus allen Fraktionen nach der Entsalzung jeweils nur eine Fraktion, die stets salzfrei gewonnen werden kann. Die einzige kleine Ausnahme bildet die Fraktion ASI GP 9 / SP Seph. C-25 Fr. 1, aus der bei der Entsalzung zwei Fraktionen, nämlich die Fraktionen 1a und 1b hervorgehen, die beide ebenfalls salzfrei sind.

Alle gewonnenen Fraktionen werden im Vakuum einrotiert und gefriergetrocknet. Die anschließende HPLC-Analyse wird über die Güte der weiteren Auftrennungsversuche Aufschluß geben.

3.1.4 Serdolit AD-2 Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a

Bei den **Toxizitätsuntersuchungen an Krabben** erweist sich vor allem die Serdolit-Fraktion 5 als besonders aktiv auf die spannungsabhängigen Natriumkanäle (für Einzelheiten siehe Kapitel 3.4, ab S. 149). Aus der sich anschließenden Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50 gehen zwei Fraktionen mit deutlicher Toxinwirkung hervor:

XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a

XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b

Im weiteren Verlauf dieser Dissertation werden zunächst einmal die Chromatogramme der nachfolgenden Aufreinigungsschritte der Fraktion **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a** aufgeführt.

3.1.4.1 Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25

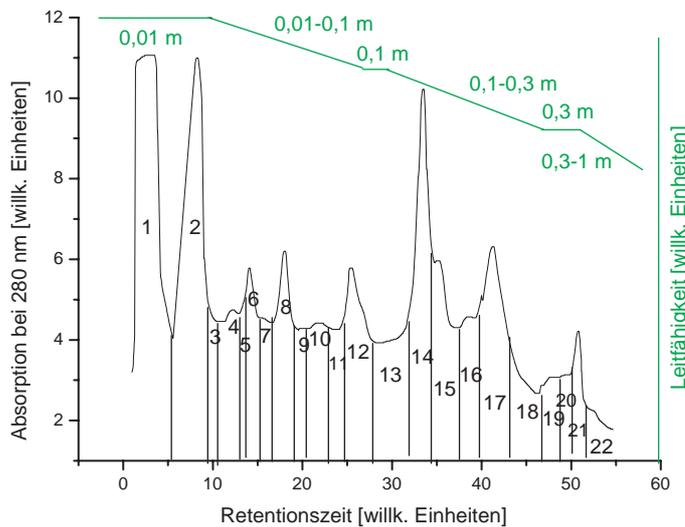


Abb. 25: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a** an **SP Sephadex C-25** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Aus der Fraktion **XAD₂ Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a** ergeben sich bei der **Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25** mit einem linearen Ammoniumacetatpuffer (pH 5,4) 22 Fraktionen, die folgendermaßen von der Säule eluiert werden:

- Fraktionen 1 und 2: 0,01 molares Puffergleichgewicht
- Fraktionen 3 bis 11: Gradient von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer
- Fraktion 12: 0,1 molares Puffergleichgewicht
- Fraktionen 13 bis 18: Gradient von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer
- Fraktionen 19 und 20: 0,3 molares Gleichgewicht
- Fraktionen 21 und 22: Gradient von 0,3 auf 1 molaren Puffer

3.1.4.2 Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie an **Sephadex G-50**

Im Anschluß wird bei allen gewonnenen Fraktionen eine **Entsalzung an Sephadex G-50** durchgeführt, um daraufhin erneut Toxizitätsuntersuchungen an Krabben vorzunehmen. Im Folgenden werden die Chromatogramme der Fraktionen gezeigt, die interessante Ergebnisse in diesen Aktivitätsuntersuchungen aufweisen. Dabei sind folgende Fraktionen besonders hervorzuheben (für Einzelheiten siehe Kapitel 3.4.2 a), S. 151):

- **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 2** (eluiert beim Gradienten von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer)
- **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 2** (eluiert beim Gradienten von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer bzw. beim 0,1 molaren Puffergleichgewicht)
- **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 14 / Seph. G-50 Fr. 2** (eluiert beim Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer)
- **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 1** (eluiert beim Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer)

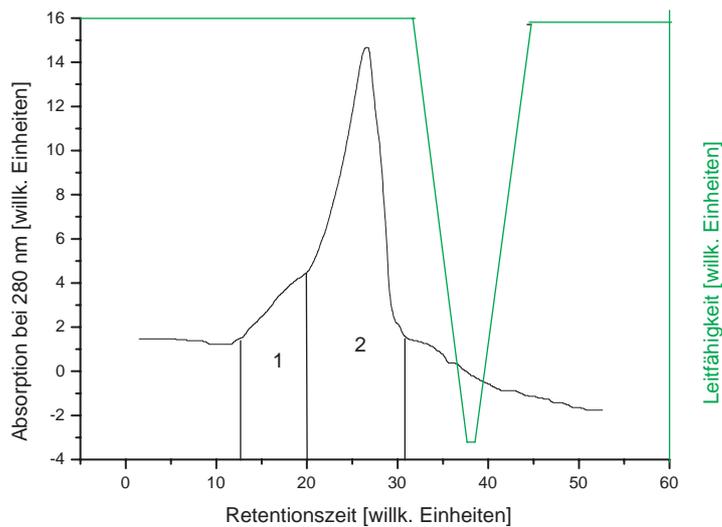


Abb. 26: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fraktion 6 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

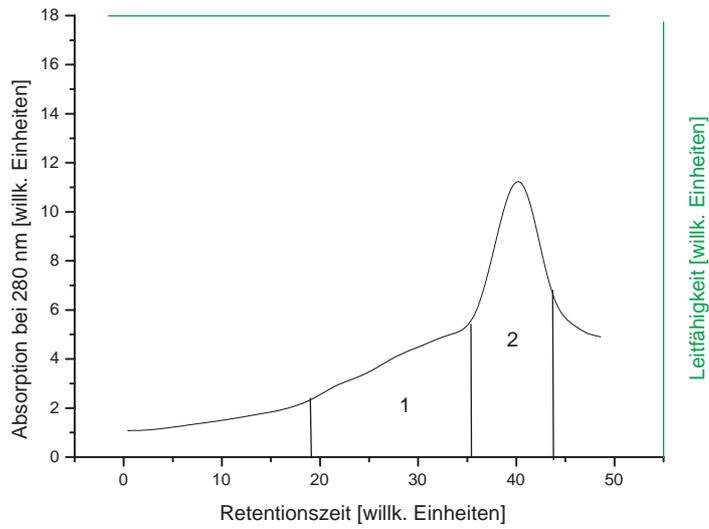


Abb. 27: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 12** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

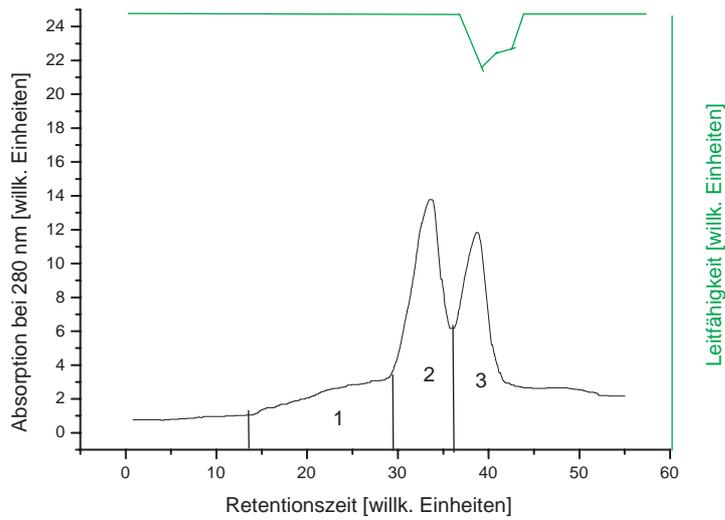


Abb. 28 Chromatographie von **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 14** an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

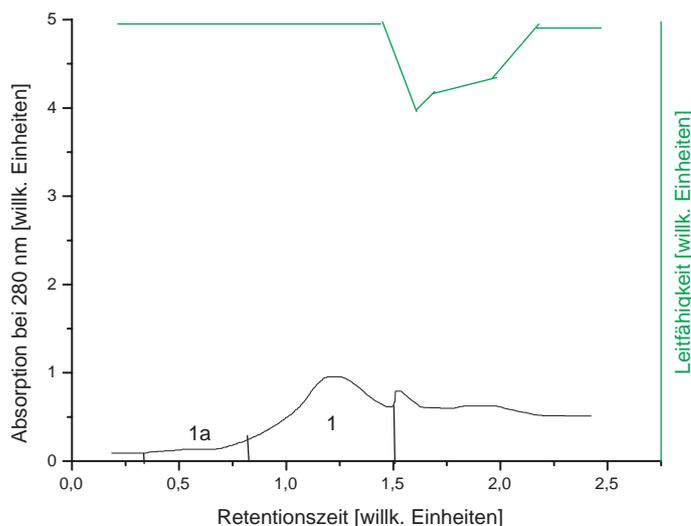


Abb. 29: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 16 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Bei allen Entsalzungsvorgängen werden zwei Folgefraktionen gewonnen, die alle jeweils vor dem Salz die Säule verlassen. Somit haben alle Entsalzungen das angestrebte Ziel erreicht.

Die gewonnenen Fraktionen werden im Vakuum einrotiert, durch Gefriertrocknung lyophilisiert und in Krabbenests auf ihre Toxinwirkung untersucht. Zudem wird mit jeder Fraktion eine analytische HPLC zur Abschätzung des Reinheitsgrades durchgeführt.

An dieser Stelle muß erneut auf die Ergebnisse der Toxizitäts- und der HPLC-Untersuchungen vorgegriffen werden, um eine Auswahl für die weitere Aufreinigung treffen zu können. In der nachfolgenden Tabelle sind die toxischen Fraktionen aufgeführt, die zusätzlichen Reinigungsschritten unterzogen werden sollen.

3.1.4.3 Ergebnisse der weiteren Aufreinigung der Fraktionen mit Toxinwirkung mittels Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie

Tabelle 7: Fraktionen mit Toxinwirkung für die weitere Aufreinigung (Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a)

Proben-Nummer	bisherige Isolierungsschritte zur Gewinnung der Fraktion
01 AS 948	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4a/SP Seph. C-25 Fr. 6/Seph. G-50 Fr.2
02 AS 193	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4a/SP Seph.C-25 Fr. 12/Seph. G-50 Fr.2

Die ausgewählten Fraktionen werden einer Ionenaustauschchromatographie an den zuvor erwähnten Austauscherharzen unterzogen. Diese Aufreinigungsschritte der Toxinfraktionen liefern folgende Chromatogramme:

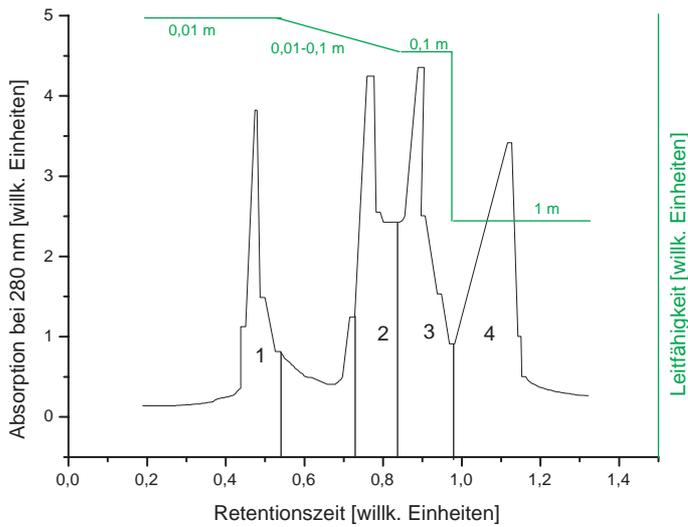


Abb. 30: Chromatographie von **01AS948 an Fractogel EMD SO₃⁻** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Wie das Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie der Toxinfraktion **01 AS 948** an **Fractogel® EMD SO₃⁻** belegt, wird bereits mit 0,01 molarem Puffer ein Peptidpeak von der Säule gespült. Während des sich anschließenden Gradienten von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer erscheint ein weiterer Peak im Chromatogramm. Ein dritter Peak zeigt sich beim Spülen mit 0,1 molarem Puffer. Im Anschluß an diesen Spülschritt wird ohne Gradienten direkt 1 molarer Puffer verwendet. Entgegen den Erwartungen erscheint noch ein Peak bei diesem Spülvorgang. An dieser Stelle wäre es daher besser gewesen, nicht gleich mit 1 molarem Puffer zu spülen, sondern zuvor noch einen Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer anzusetzen, um eine bessere Auftrennung zu erreichen.

Die gewonnen Mengen sind allerdings so minimal, daß sich eine abschließende Entsalzung an Sephadex C-25 nicht lohnen würde. Aus diesem Grunde wird sie hier nicht durchgeführt.

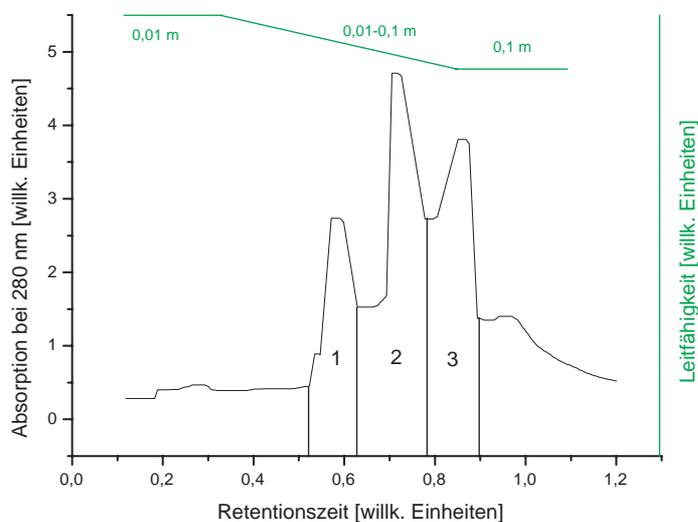


Abb. 31: Chromatographie von **02AS193 an Fractogel EMD SO₃⁻** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Dieses Chromatogramm entsteht bei der Ionenaustauschchromatographie der Fraktion **02 AS 193** an **Fractogel EMD SO₃⁻**. Insgesamt erscheinen im Chromatogramm drei Peaks. Die ersten beiden werden bei dem Gradienten von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer von der Säule eluiert, der dritte Peak erscheint beim Spülen mit 0,1 molarem Puffer. Beim nachfolgenden Spülen mit 1 molarem Puffer kommt kein Peptid mehr von der Säule.

Bei den **Entsalzungen an Sephadex G-25** ergibt sich bei allen drei Fraktionen das gleiche Bild: Es entsteht jeweils eine salzfreie Fraktion.

3.1.5 Serdolit AD-2 Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b

3.1.5.1 Ergebnisse der Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25

Wie weiter oben bereits erwähnt, zeigt auch die Fraktion **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b** ausgeprägte **Toxinwirkung** bei den Krabbentests. Folglich wird auch sie einer Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25 unterzogen.

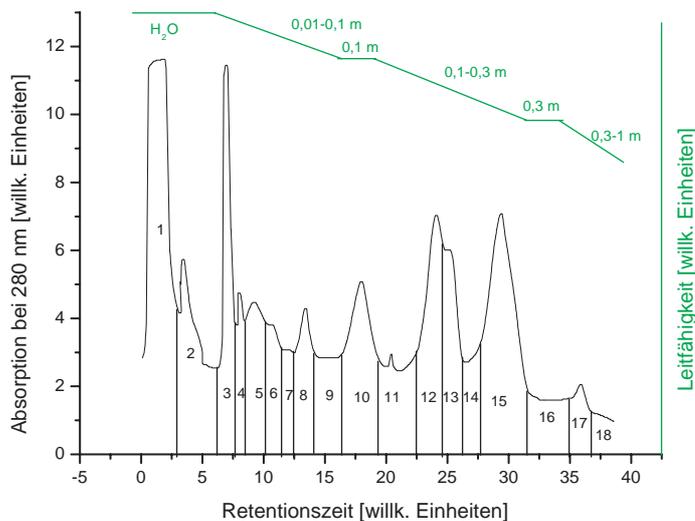


Abb. 32: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b** an **SP Sephadex C-25** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

In 18 Fraktionen wird die Fraktion **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b** mit Hilfe der **Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25** unter Anwendung des linearen Puffergradienten aufgetrennt:

- Fraktionen 1 und 2: Aqua destillata
- Fraktionen 3 bis 9: Gradient von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer

- Fraktion 10: 0,1 molares Puffergleichgewicht
- Fraktionen 11 bis 15: Gradient von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer
- Fraktion 16: 0,3 molares Puffergleichgewicht
- Fraktionen 17 und 18: Gradient von 0,3 auf 1 molaren Puffer

Die gewonnenen Fraktionen werden daraufhin einer Größenausschlußchromatographie an **Sephadex G-50** unterworfen. Die daraus resultierenden Fraktionen werden wiederum an Krabben auf ihre Toxizität hin untersucht. Große Wirksamkeit in diesen **Krabbentests** zeigt sich vor allem bei den unten aufgeführten Fraktionen (für Einzelheiten siehe Kapitel 3.4.2 b), S. 152-153):

- **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 2** (eluiert beim Gradienten von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer)
- **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 3** (0,1 molares Puffergleichgewicht)
- **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. Fr. 11 / Seph. G-50 Fr. 1** (beim Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer)
- **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 1** (beim Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer)

3.1.5.2 Ergebnisse der Gelfiltrationschromatographie an **Sephadex G-50**

An dieser Stelle sollen nun die Chromatogramme der **Entsalzungen** der obig beschriebener Fraktionen an **Sephadex G-50** eingefügt werden:

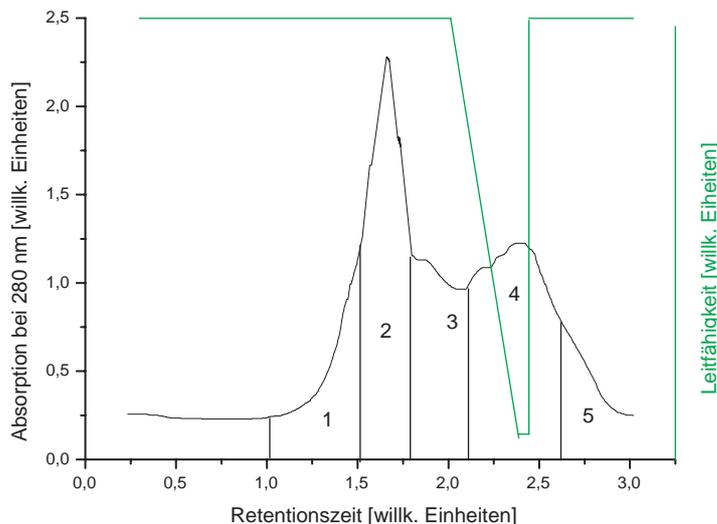


Abb. 33: Chromatographie von **XAD₂-Fr.5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 6** an **Sephadex G-50** mit 0,3-molarer Essigsäure

Die Entsalzung der Fraktion **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. Fr. 6** ergibt fünf Folgefraktionen, wobei die vierte Fraktion mit dem Salz von der Säule gespült wird. Die fünfte Fraktion ist hingegen wieder salzfrei. In einem weiteren Entsalzungsschritt soll nun

versucht werden, die Fraktion 4 ebenfalls salzfrei zu gewinnen. Dazu wird als Säulenmaterial **Sephadex G-25** verwendet, in der Hoffnung, einen besseren Trenneffekt von Peptid und Salz erzielen zu können. Das Chromatogramm dazu folgt im Anschluß:

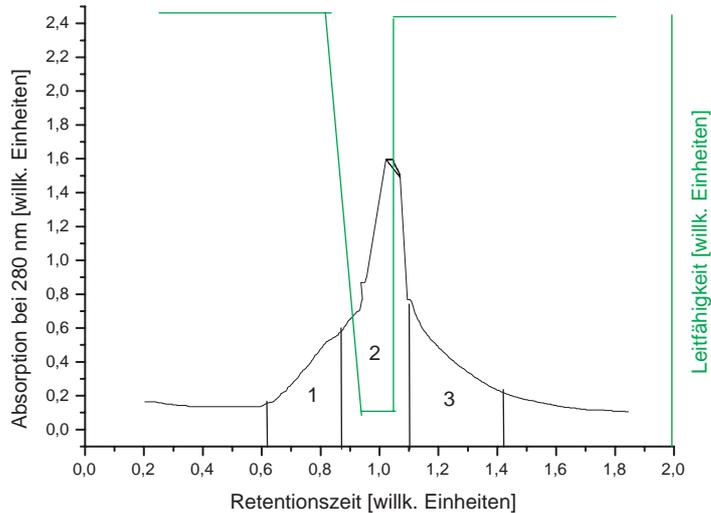


Abb. 34: Chromatographie von XAD₂-Fr.5 / Seph. G-50 Fraktion 4b / SP Seph. C-25 Fraktion 6 / Seph. G-50 Fraktion 4 an Sephadex G-25 mit 0,3-molarer Essigsäure

Bei dieser **Entsalzungschromatographie an Sephadex G-25** ergeben sich drei Fraktionen. Während es gelingt, die erste davon salzfrei darzustellen, wird die zweite gleichzeitig mit dem Salz eluiert. Die dritte Fraktion ist wiederum salzfrei.

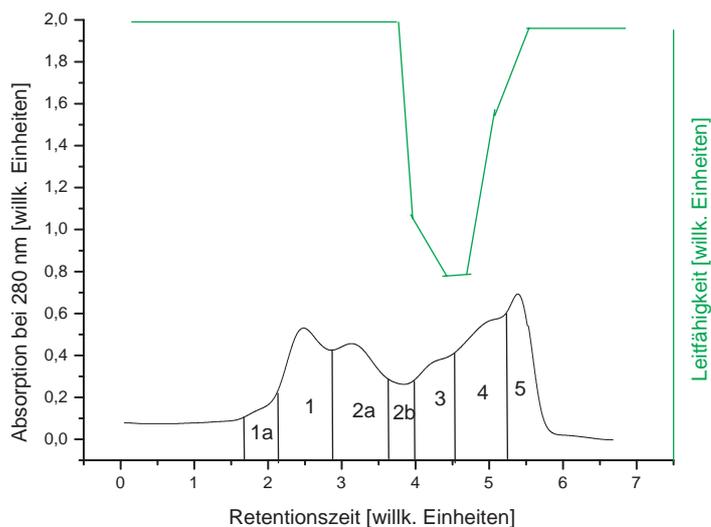


Abb. 35: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Von den sieben bei der Größenausschlußchromatographie an **Sephadex G-50** aus **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10** gewonnenen Fraktionen sind fünf nach der Chromatographie salzfrei (Fraktion 1a, 1, 2a, 2b und 5). Die Fraktionen 3 und 4 verlassen zusammen mit dem Salz die Säule. Auch hier wird im Anschluß versucht, die salzhaltigen Fraktionen mittels erneuter Gelfiltrationschromatographie an **Sephadex G-25** von dem Salz zu befreien:

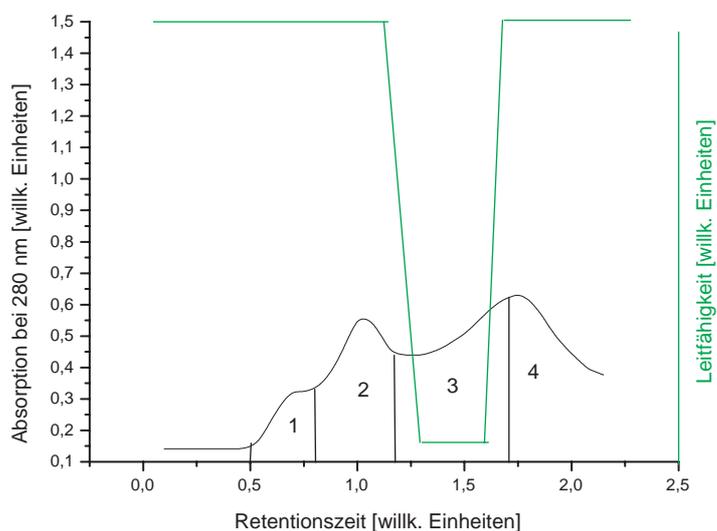


Abb. 36: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 3** an **Sephadex G-25** mit 0,3-molarer Essigsäure

Die **Fraktion 3** der zuvor durchgeführten Chromatographie an Sephadex G-50 wird bei der Gelfiltrationschromatographie an **Sephadex G-25** in vier Fraktionen aufgetrennt. Von diesen sind drei salzfrei (Fraktionen 1, 2 und 4). Die Fraktion 3 läßt sich auch mit dieser Methode nicht entsalzen.

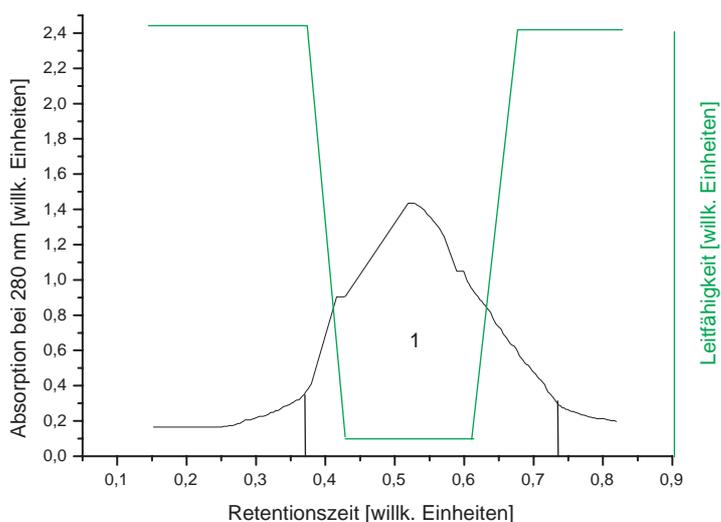


Abb. 37: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 4** an **Sephadex G-25** mit 0,3-molarer Essigsäure

In diesem Falle gelingt die Entsalzung der **Fraktion 4** der vorangegangenen Chromatographie an Sephadex G-50 auch mittels **Sephadex G-25** nicht. Aus der Chromatographie resultiert ein Peak, der gleichzeitig mit dem Salz von der Säule gespült wird.

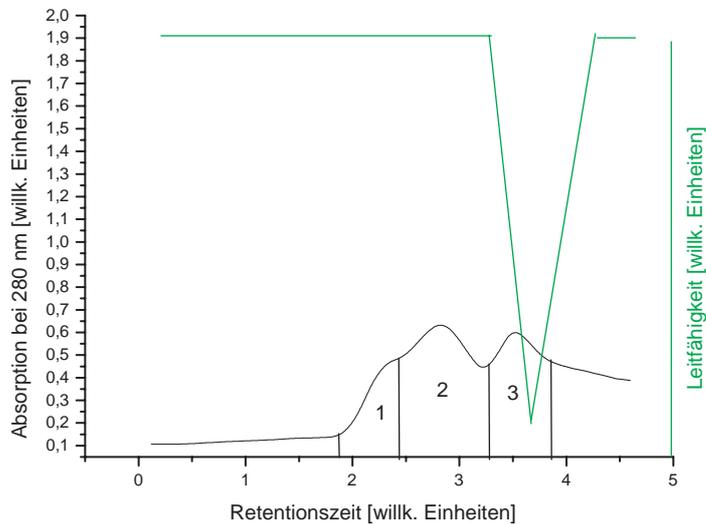


Abb. 38: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

In drei Fraktionen wird die Fraktion XAD₂-Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 aufgeteilt. Dabei sind die Fraktionen 1 und 2 salzfrei, während die Fraktion 3 noch Puffersalz enthält. Da es sich bei den Fraktionen 1 und 2 offensichtlich um die Hauptfraktionen handelt, wird nicht versucht, Fraktion 3 salzfrei zu gewinnen.

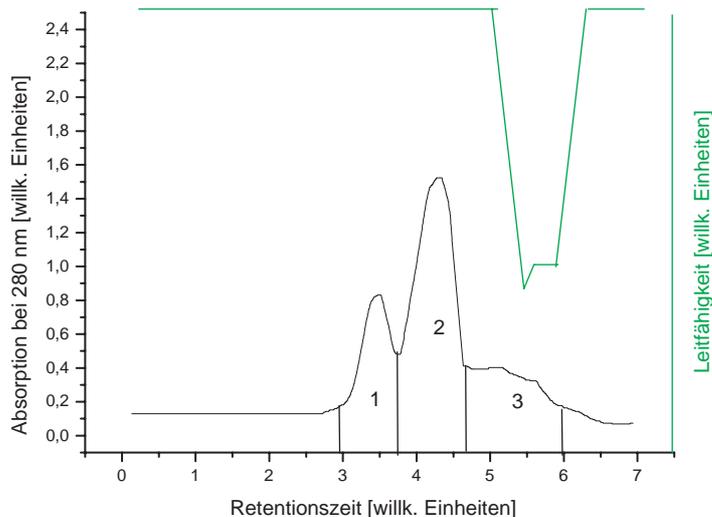


Abb. 39: Chromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 an Sephadex G-50 mit 0,3-molarer Essigsäure

Die Chromatographie der Fraktion **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. Fr. 12** an **Sephadex G-50** ergibt drei Folgefraktionen, von denen die ersten beiden salzfrei eluiert werden. Die dritte Fraktion ist allerdings noch salzhaltig. Die anschließende Chromatographie an **Sephadex G-25** zur Entsalzung eben dieser dritten Fraktion ergibt zwei salzfreie Fraktionen (siehe folgende Abbildung).

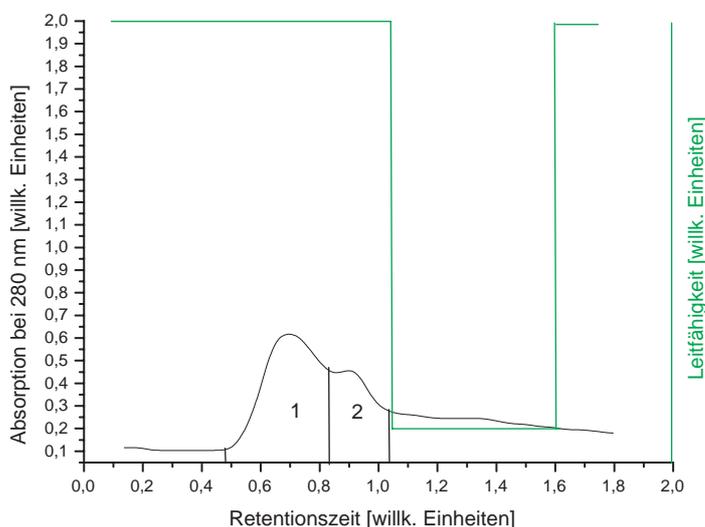


Abb. 40: Chromatographie von **XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 3** an **Sephadex G-25** mit 0,3-molarer Essigsäure

3.1.5.3 Ergebnisse der **weiteren Aufreinigung** der Fraktionen mit Toxinwirkung

An dieser Stelle wird ebenso verfahren, wie zuvor bereits erwähnt: Anhand der Ergebnisse aus den Toxizitätstesten an Krabben (siehe Kapitel 3.4, ab S. 149) und der HPLC-Analyse (siehe Kapitel 3.2, ab S. 119) werden die Fraktionen selektiert, welche sich für eine weitere Aufreinigung anbieten:

Tabelle 8: Fraktionen mit Toxinwirkung für die weitere Aufreinigung (Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b)

Proben-Nummer	Bisherige Reinigungsschritte zur Gewinnung der Fraktion
01 AS 597	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 6/Seph. G-50 Fr.2
01 AS 602	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 10/Seph. G-50 Fr.1
01 AS 604	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 10/Seph. G-50 Fr.5
01 AS 605	XAD ₂ -Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 11/Seph. G-50 Fr.1

Es folgen die Chromatogramme dieser Fraktionen.

Bei **Toxinfraktion 01 AS 604** handelt es sich laut HPLC bereits um eine relativ reine Fraktion, die lediglich noch entsalzt werden soll. Bei dieser Entsalzungschromatographie an **Sephadex G-25** zeigt sich folgendes Chromatogramm:

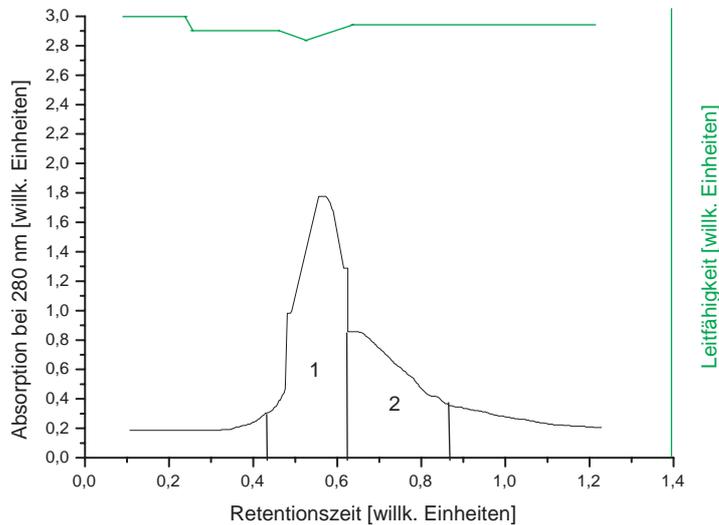


Abb. 41: Chromatographie von **01AS604** an **Sephadex G-25** mit 0,3-molarer Essigsäure

Die Leitfähigkeit beginnt bereits vor dem ersten Peak etwas anzusteigen. Die zunehmende Leitfähigkeit bedeutet, daß Salz von der Säule kommt. Eine geringfügig stärkere Leitfähigkeit wird bei der Elution des ersten Peaks gemessen. Allerdings verrät der niedrige Anstieg der Leitfähigkeit, daß der Salzgehalt der Fraktion 1 als vernachlässigbar anzusehen ist. Die Fraktion 2 ist vollständig salzfrei. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Fraktion **01 AS 604** bereits weitestgehend salzfrei vorlag und eine weitere Entsalzung mittels Gelfiltrationschromatographie an Sephadex G-25 nicht mehr möglich ist. Die gewonnenen Fraktionen werden im Büchi-Rotationsverdampfer einrotiert und anschließend lyophilisiert.

Die übrigen ausgewählten Fraktionen (01 AS 597, 01 AS 602 und 01 AS 605) werden einer Ionenaustauschchromatographie unterzogen. Als Austauschharz wird hierbei durchgehend auf **Fractogel® EMD SO₃⁻** zurückgegriffen:

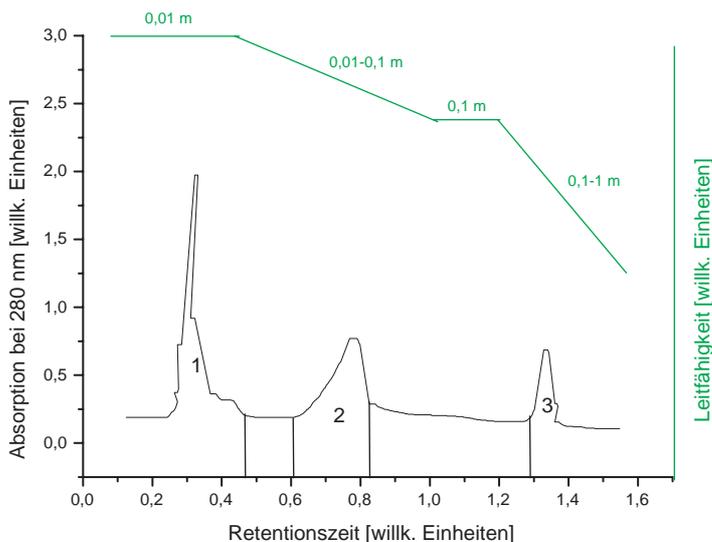


Abb. 42: Chromatographie von **01AS597 an Fractogel® EMD SO₃⁻** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Die Ionenaustauschchromatographie an **Fractogel® EMD SO₃⁻** der Fraktion **01 AS 597** trennt diese in drei Fraktionen. Die erste löst sich bereits beim Spülen mit 0,01 molarem Puffer von der Säule. Die zweite Fraktion folgt beim Gradienten von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer. Anschließend wird mit 0,1 molarem Puffer gespült, wobei sich keine Peptidfraktion von der Säule löst. Da nun kein Peptid mehr auf der Säule vermutet wurde, wurde gleich ein Gradient von 0,1 auf 1 molaren Puffer angesetzt. Entgegen der Erwartung wurde hierbei noch eine Fraktion von der Säule eluiert. Auch hier wäre es demnach zwecks einer effizienteren Auftrennung sinnvoll gewesen, einen Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer zwischenzuschieben.

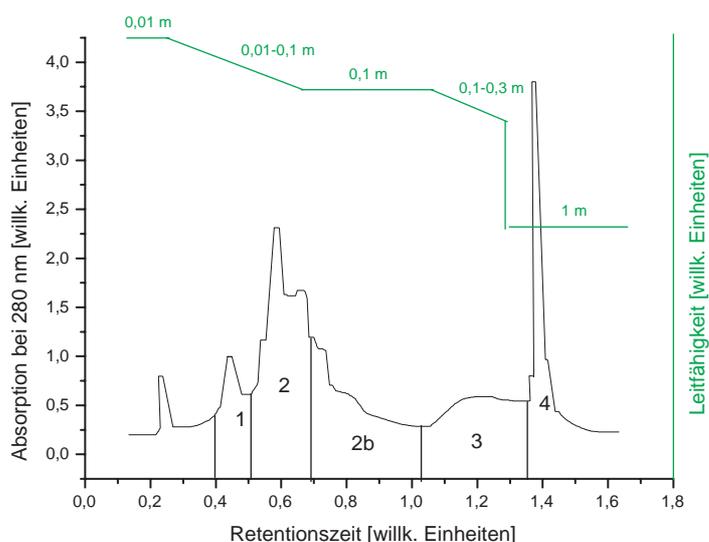


Abb. 43: Chromatographie von **01AS602 an Fractogel EMD SO₃⁻** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Die Chromatographie der Fraktion **01 AS 602** an **Fractogel® EMD SO₃⁻** bringt fünf Folgefraktionen hervor. Die ersten beiden werden während des Gradienten von 0,01 auf 0,1 molaren Puffer von der Säule gespült. Die dritte Fraktion (Fraktion 2b) löst sich beim Spülen mit 0,1 molaren Puffer von der Säule, während der dritte Peak beim Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer folgt. Nach diesem Gradienten wird direkt mit 1 molarem Puffer gespült, wodurch sich eine weitere Peptidfraktion von der Säule löst.

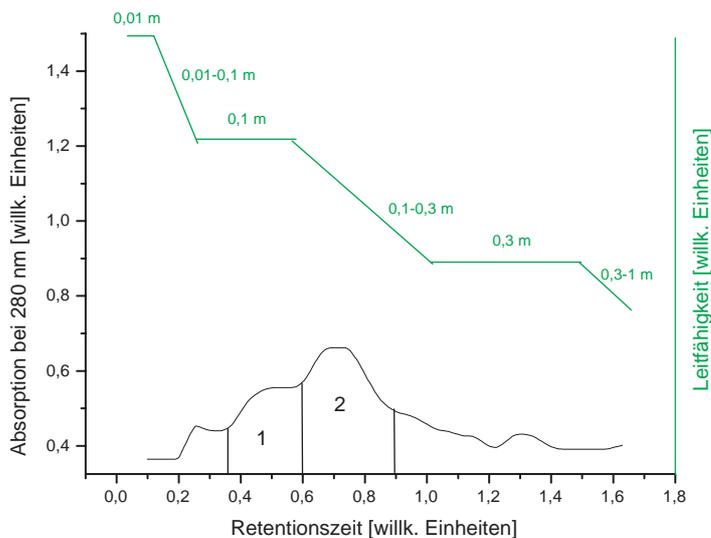


Abb. 44: Chromatographie von **01AS605** an **Fractogel® EMD SO₃⁻** mit linearem Ammoniumacetatpuffergradienten pH 5,4

Der Ionenaustauschchromatographie der Fraktion **01 AS 605** an **Fractogel® EMD SO₃⁻** entspringen zwei Folgefraktionen. Die erste Fraktion wird mit 0,1 molarem Puffer und die zweite bei dem Gradienten von 0,1 auf 0,3 molaren Puffer von der Säule gespült.

Bei den meisten **Entsalzungen an Sephadex G-25** kommt es zu dem gleichen Ergebnis. So entsteht jeweils eine salzfreie Fraktion. Eine Ausnahme bilden da die Fraktionen 01AS602/Fractogel Fr. 2b und 3: Hier entspringen jeweils zwei Fraktionen, von denen jeweils die zweite noch salzhaltig ist.

Auf den folgenden Seiten sind Diagramme zur übersichtlichen Darstellung der Isolierungsvorgänge abgebildet (Abbildungen 44 bis 52).

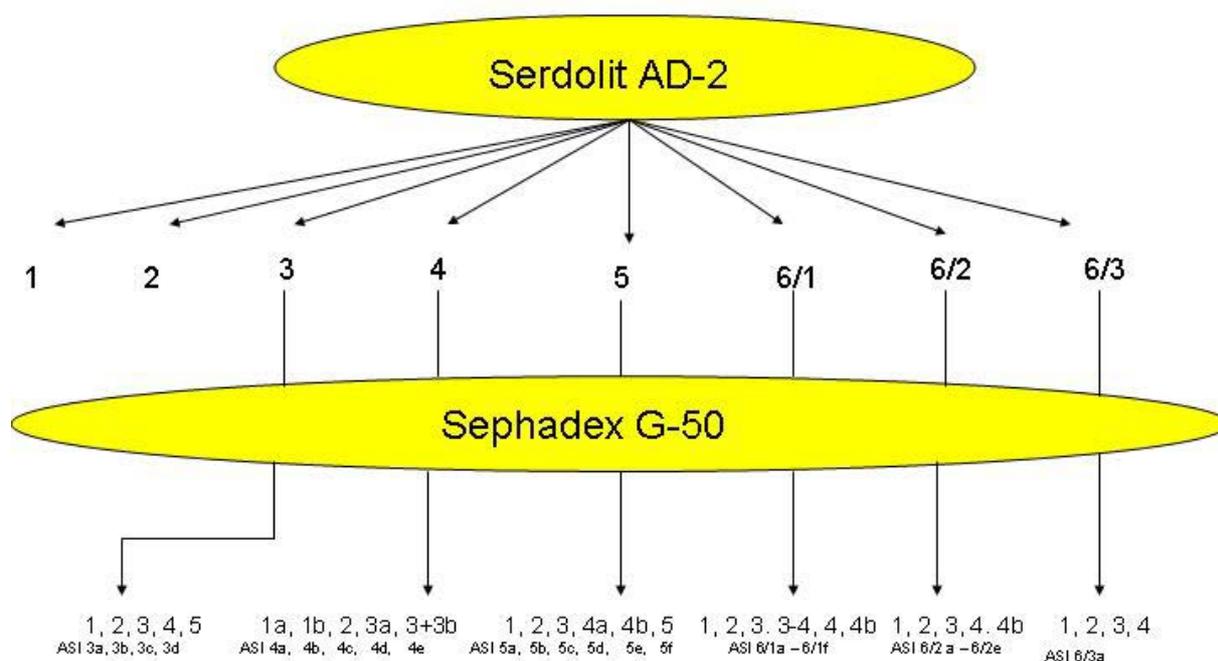


Abb. 45: Übersicht über die Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2 und die anschließende Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50

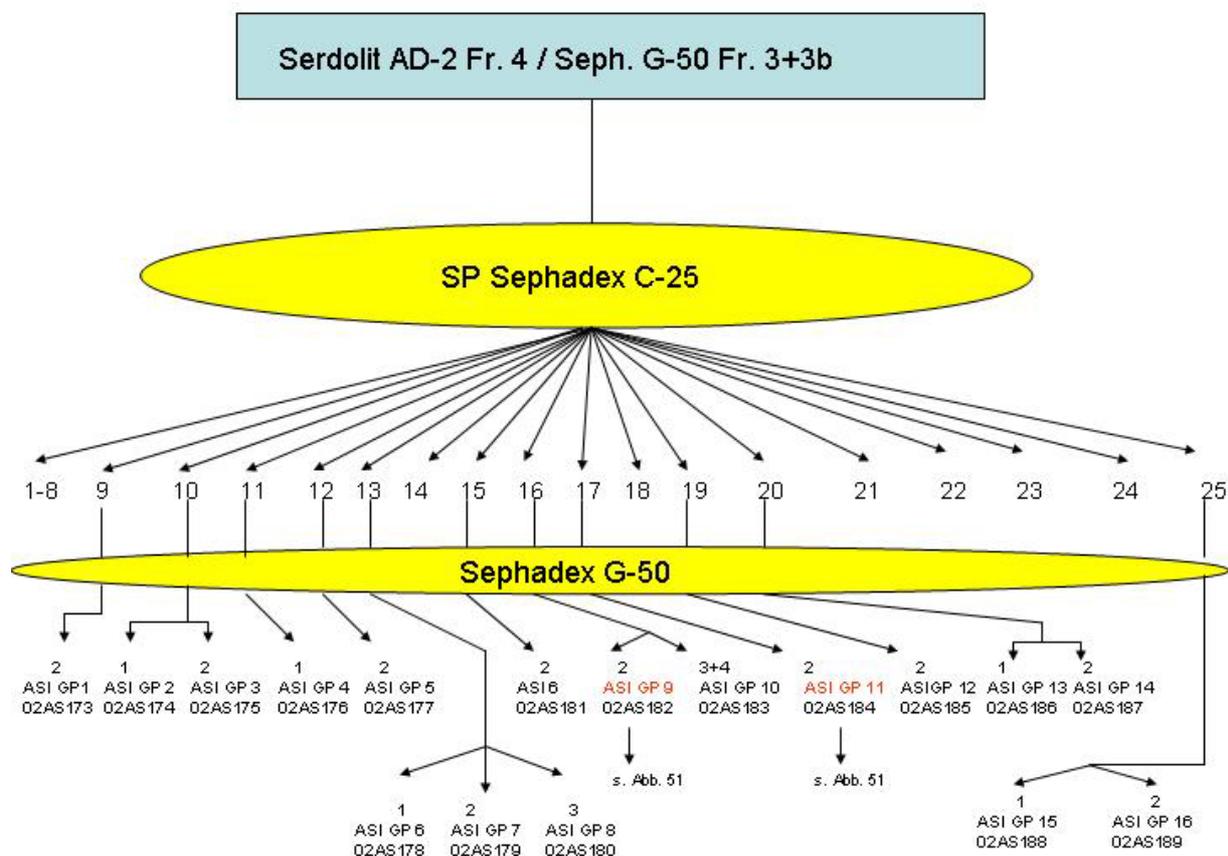


Abb. 46: Übersicht über die Ionenaustauschchromatographie von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b an SP Sephadex C-25

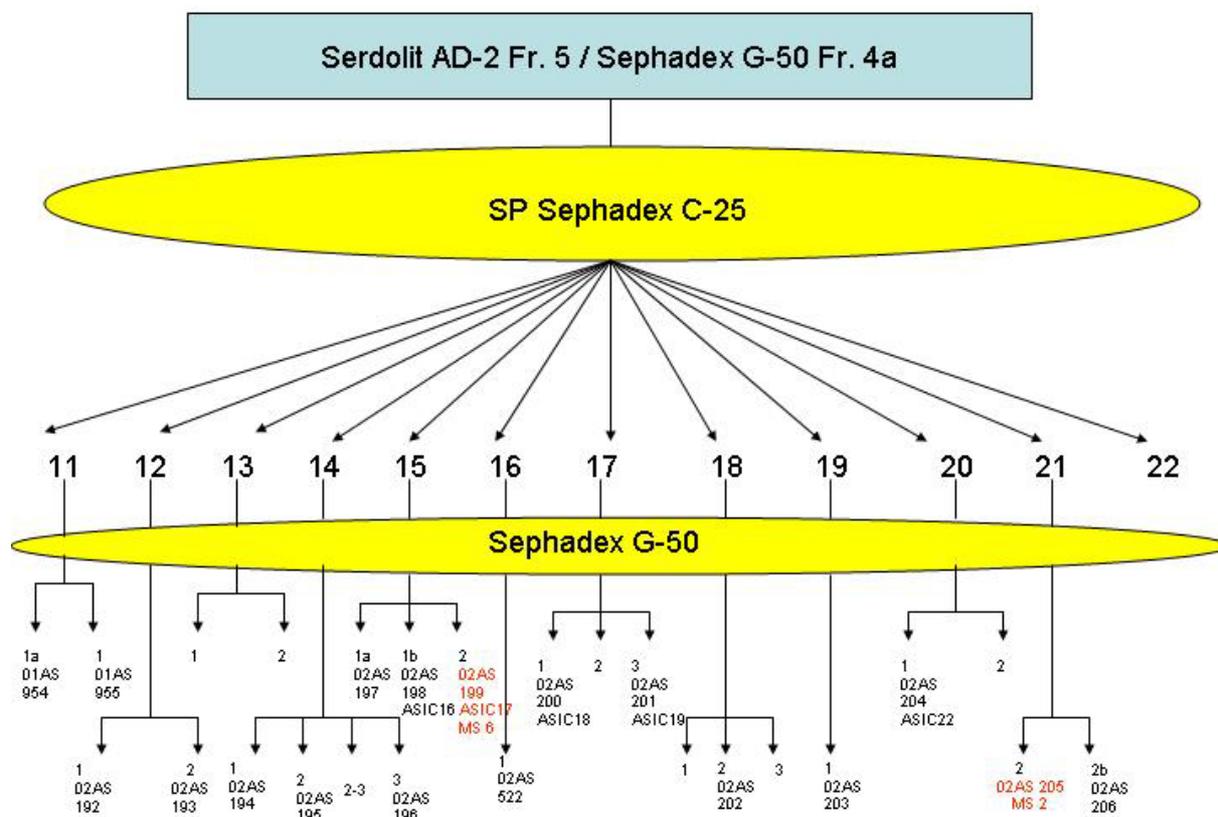
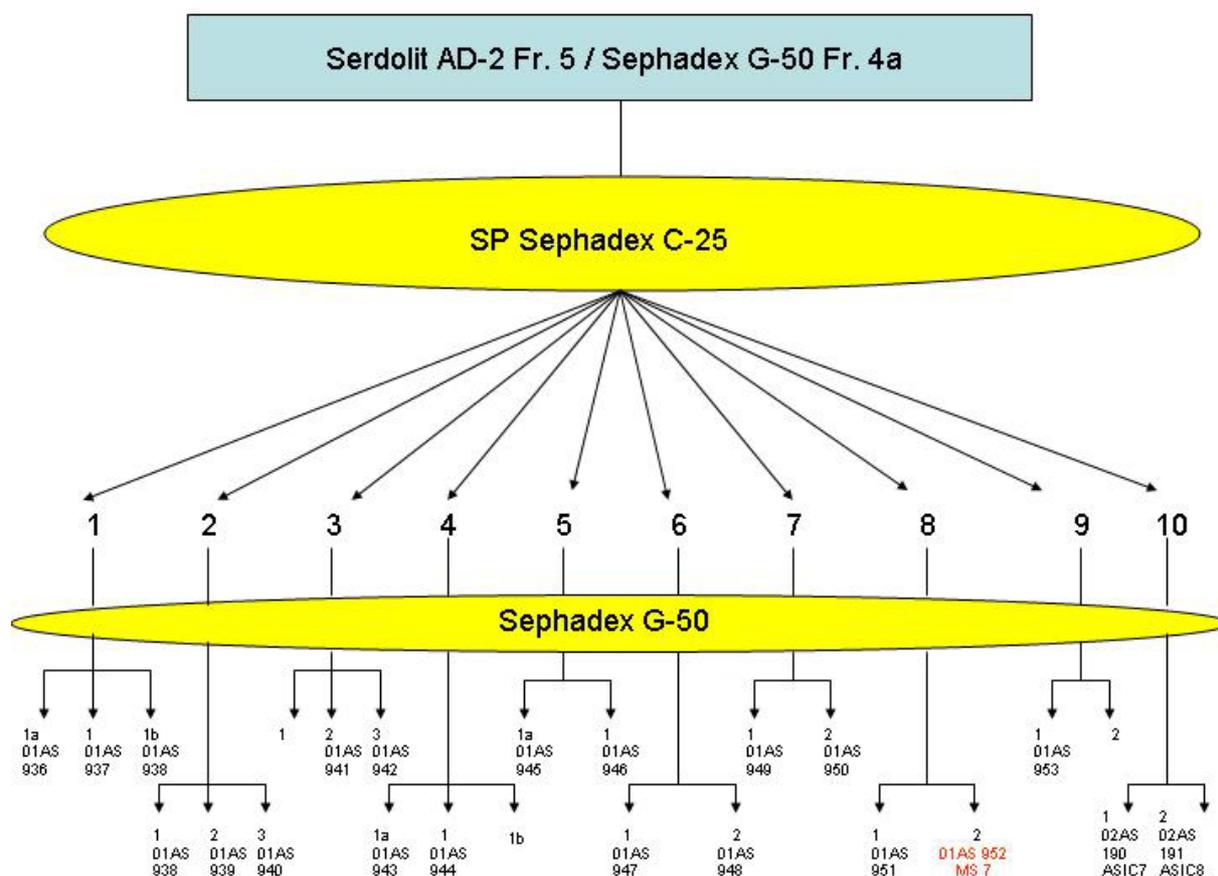
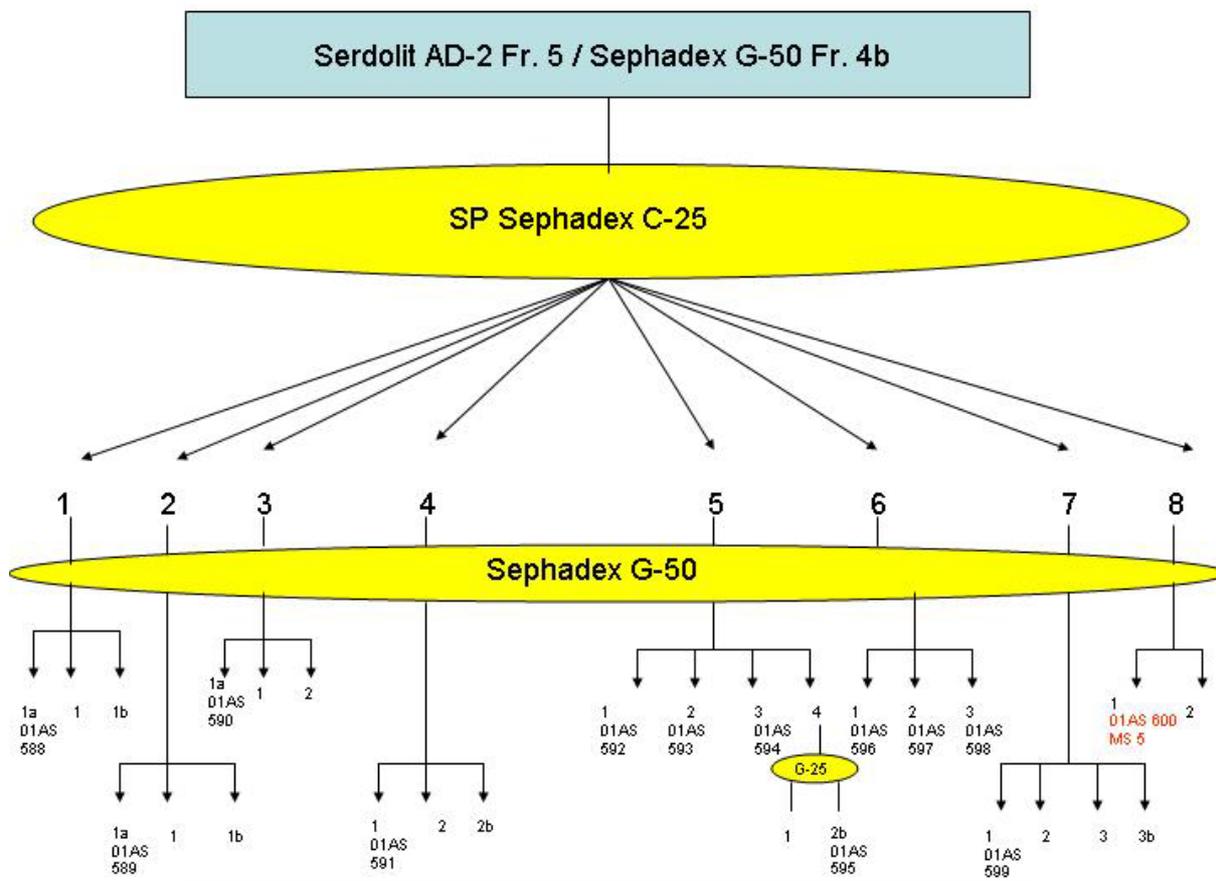


Abb. 47+48: Übersicht über die Ionenaustauschchromatographie von XAD2-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a an SP Sephadex C-25, Teil 1+2



Serdolit AD-2 Fr. 5 / Seph. G-50 Fr.4b

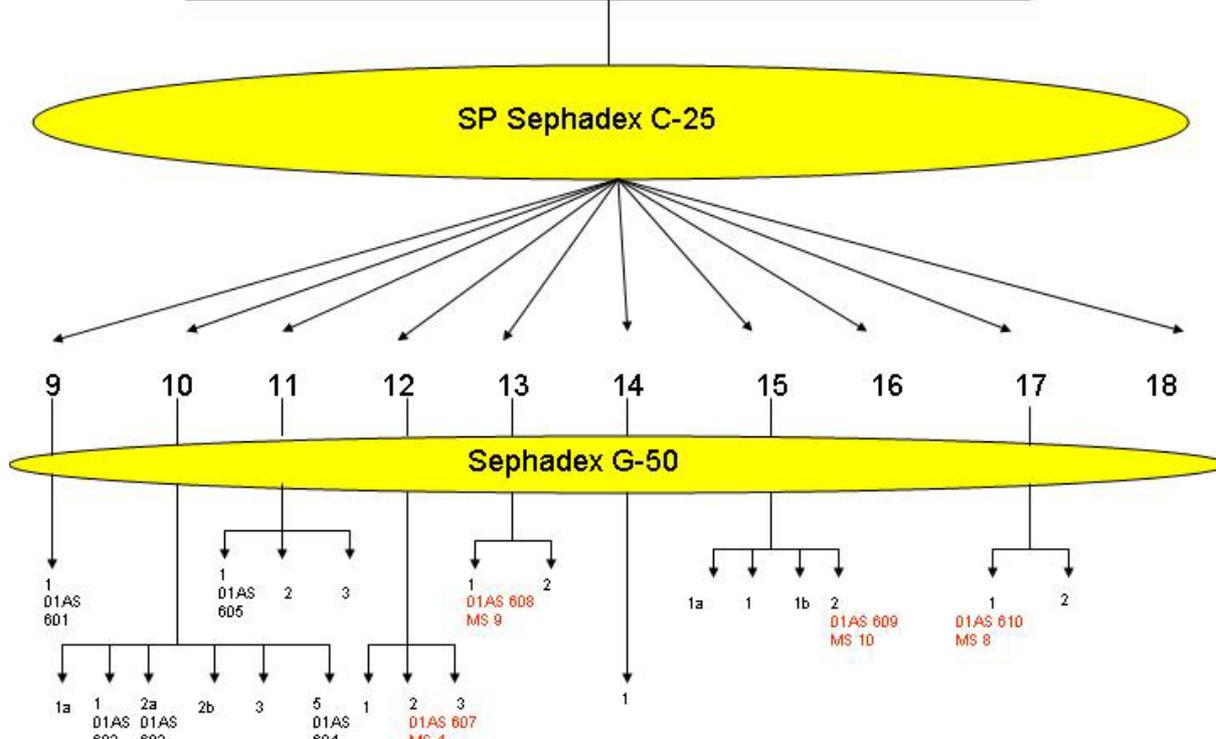


Abb. 49+50: Übersicht über die Ionenaustauschchromatographie von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b an SP Sephadex C-25, Teil 1+2

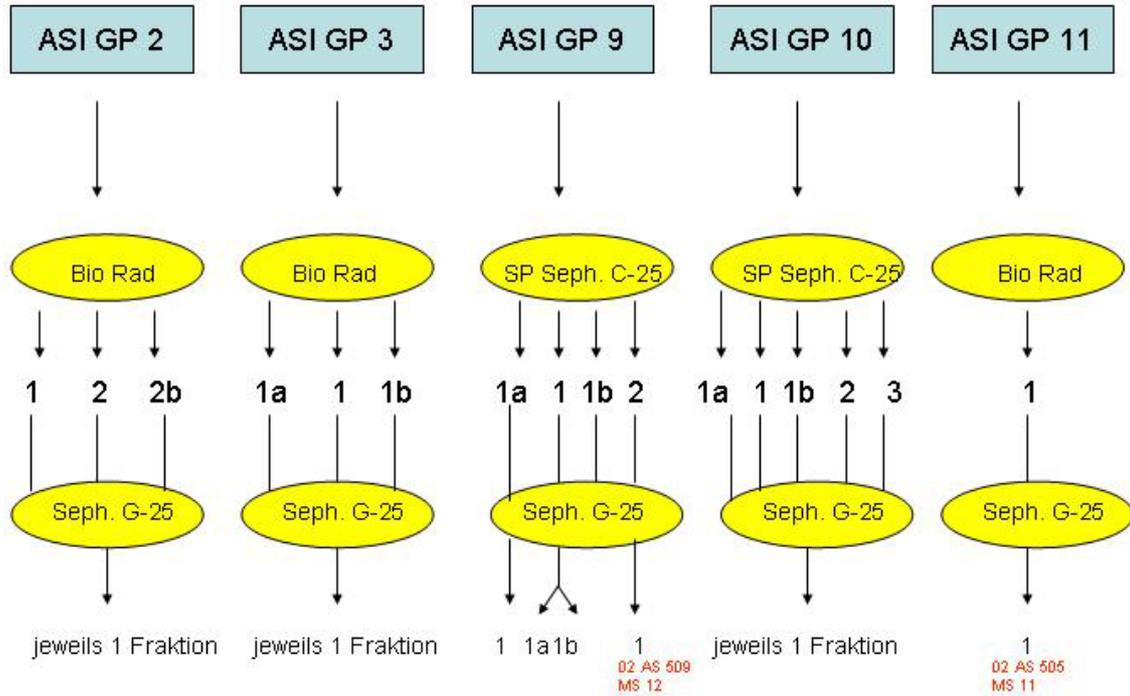


Abb. 51: weitere Aufreinigung der gerinnungsaktiven Substanzen mittels Ionenaustauschchromatographie und Entsalzung

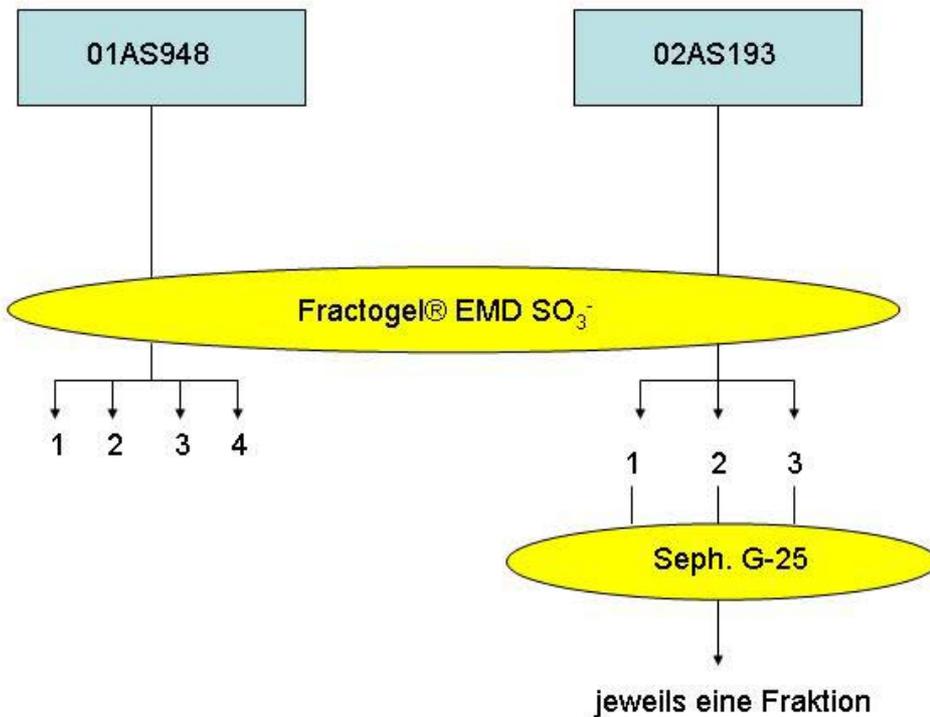


Abb. 52: weitere Aufreinigung der Folgefraktionen von XAD2-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a mit Toxinwirkung

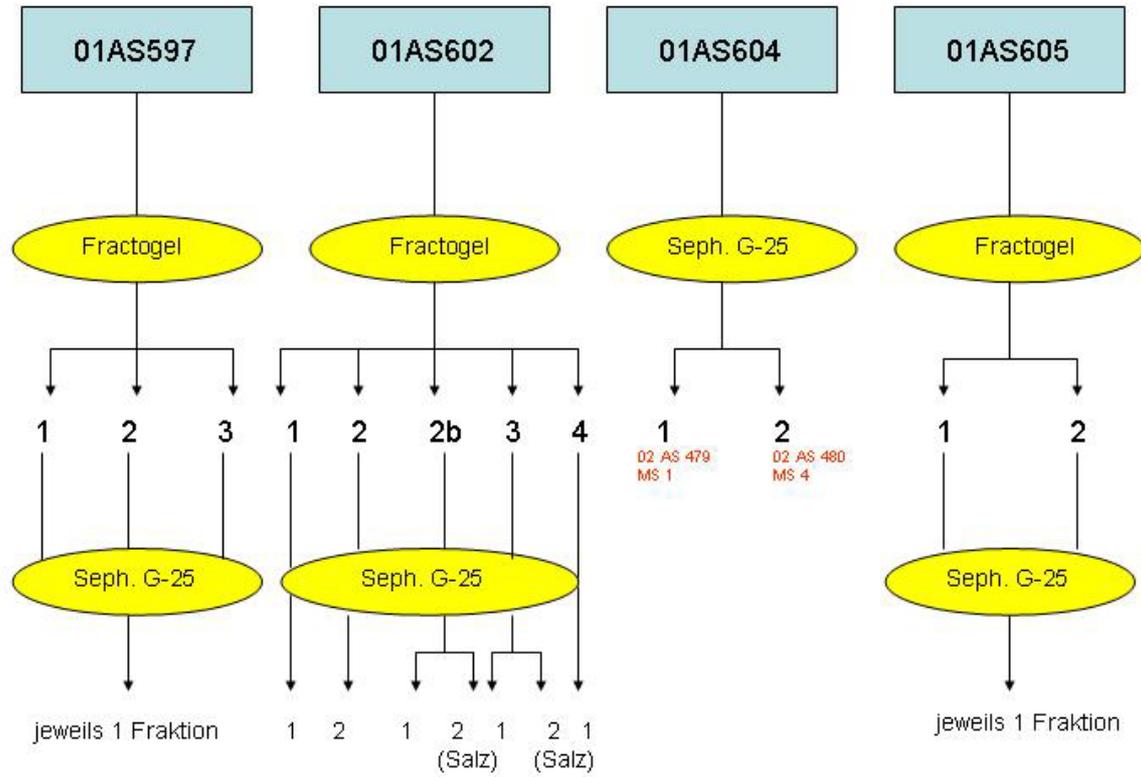


Abb. 53: weitere Aufreinigung der Folgefraktionen von XAD2-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b mit Toxinwirkung

3.2 Ergebnisse der analytischen HPLC-Untersuchungen zur Bestimmung des Reinheitsgrades

3.2.1 Fraktionen mit hohem Reinheitsgrad ohne weitere Aufreinigungsschritte

Zunächst werden die Chromatogramme derjenigen Fraktionen gezeigt, die nach der ersten Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25 und der anschließenden Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50 bereits einen so hohen Reinheitsgrad aufweisen, daß keine weitere Aufreinigung mehr notwendig ist und somit direkt das Molekulargewicht der entsprechenden Substanz bestimmt werden kann.

Zunächst sei kurz daran erinnert, welche Arten von Polypeptiden in den entsprechenden Fraktionen erwartet werden:

XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b: gerinnungsaktiv (vermutlich Proteinaseinhibitoren)

XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a: aktiv im Krabbentest (vermutlich Toxine)

XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b: aktiv im Krabbentest (vermutlich Toxine)

a) Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b

Diese Fraktion bringt nach der ersten Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25 und der anschließenden Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50 noch keine Fraktionen hervor, die einen ausreichend hohen Reinheitsgrad besitzen, um einer massenspektrometrischen Molekulargewichtsbestimmung zugeführt werden zu können. Aus diesem Grunde können an dieser Stelle keine Chromatogramme gezeigt werden.

b) Chromatogramme der Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a

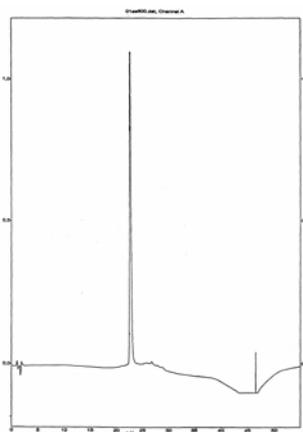


Abb. 54: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 952** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 8 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

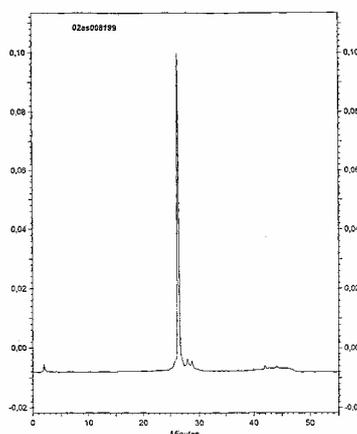


Abb. 55: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 199** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 15 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

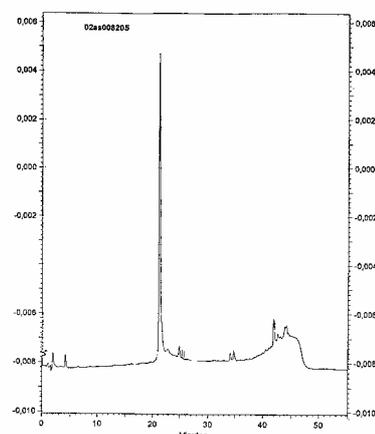


Abb. 56: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 205** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 21 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

Aus der XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a resultieren nach der ersten Ionenaustauschchromatographie und der nachfolgenden Größenausschlußchromatographie drei Fraktionen, in deren Chromatogrammen ein so dominanter Hauptpeak zu erkennen ist, daß eventuelle Nebenpeaks im Vergleich zu diesem vernachlässigbar sind. Die Peaks, die in den Chromatogrammen jenseits einer Retentionszeit jenseits von 40 Minuten zu erkennen sind, sind auf das Lösungsmittel und nicht auf Substanzen aus den Seeanemonenfraktionen zurückzuführen. Somit besitzen die Fraktionen **01 AS 597**, **02 AS 199** und **02 AS 205** einen hinreichenden Reinheitsgrad für eine massenspektrometrische Molekulargewichtsuntersuchung, ohne weiterer Aufreinigungsschritte zu bedürfen.

c) Chromatogramme der Folgefractionen von **XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b**

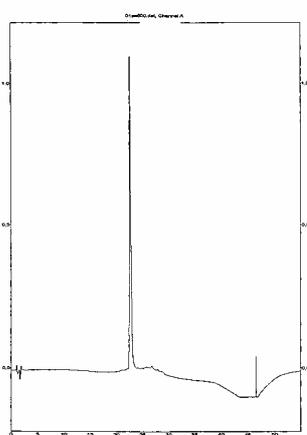


Abb. 57: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 600** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 8 / Seph-G-50 Fr.1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

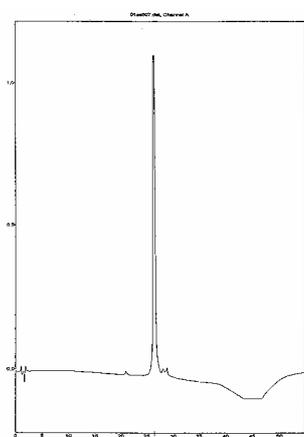


Abb. 58: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 607** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 12 / Seph-G-50 Fr.2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

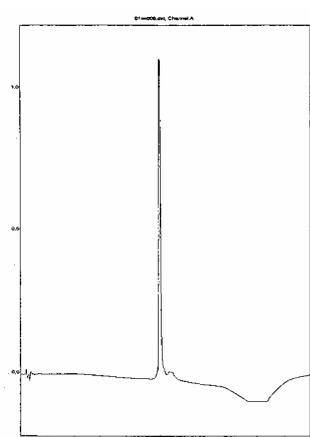


Abb. 59: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 608** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 13 / Seph-G-50 Fr.1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

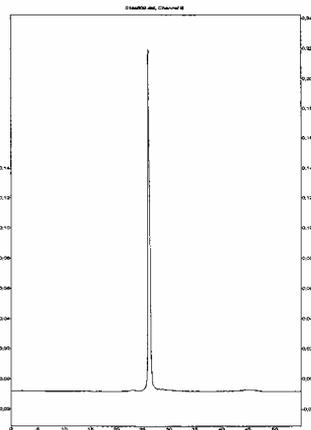


Abb. 60: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 609** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 15 / Seph. G-50 Fr.2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

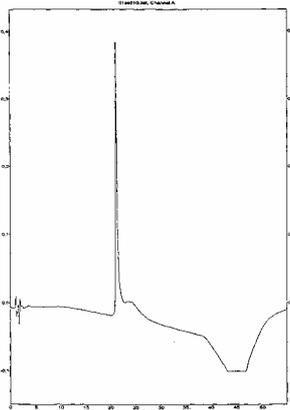


Abb. 61: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 610** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph.C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr.1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

Für die Fraktionen:

- **01 AS 600**
- **01 AS 607**
- **01 AS 608**
- **01 AS 609**
- **01 AS 610**

gilt im Prinzip das unter 3.2.1 b) Gesagte. Diese Fraktionen weisen eine ausreichende Reinheit für die Molekulargewichtsbestimmung per Massenspektrometrie auf.

3.2.2 Fraktionen mit geringerem Reinheitsgrad für die weitere Aufreinigung

Nun werden die Chromatogramme derjenigen Fraktionen gezeigt, die interessante Ergebnisse in den Aktivitätstests zeigen, die aber noch nicht so rein sind, daß sie einer massenspektrometrischen Untersuchung zwecks Molekulargewichtsbestimmung zugeführt werden können. Aus diesen Gründen wurden sie zur weiteren Aufreinigung ausgewählt.

a) Folgefraktionen der Fraktion XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b

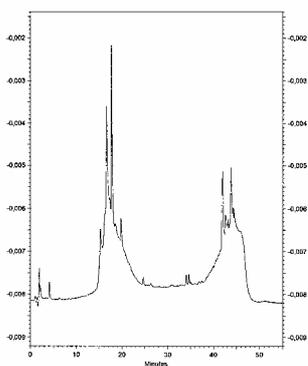


Abb. 62: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 2** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

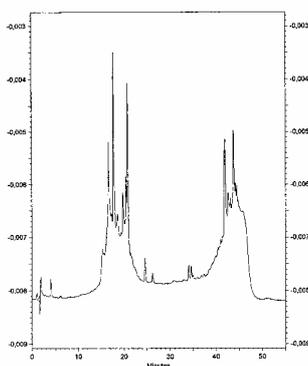


Abb. 63: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 3** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

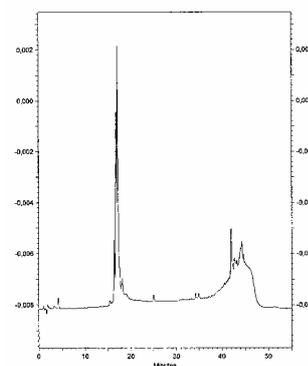


Abb. 64: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 9** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

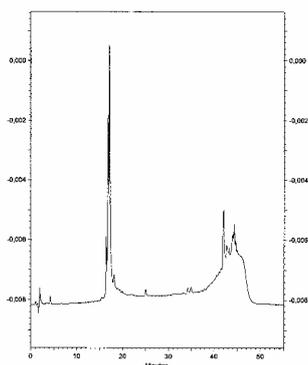


Abb. 65: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 10** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 3) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

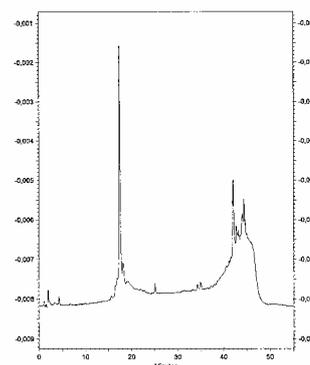


Abb. 66: Chromatogramm der HPLC von **ASI GP 11** (XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

In allen fünf aufgeführten Chromatogrammen sind deutlich mehrere Peaks erkennbar, sie besitzen somit noch keinen Reinheitsgrad, der eine massenspektrometrische Untersuchung ermöglicht. Da diese Fraktionen in den Gerinnungstests (siehe Kapitel 3.3) einen deutlichen Einfluß auf einige der untersuchten Parameter ausüben, sind sie für weitere Aufreinigungsschritte ausgewählt worden. Hierbei handelt es sich um folgende Fraktionen:

- ASI GP 2
- ASI GP 3
- ASI GP 9
- ASI GP 10
- ASI GP 11

b) Folgefraktionen der Fraktion **XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a**

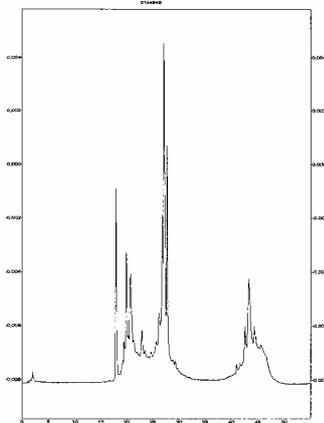


Abb. 67: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 948** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph- G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

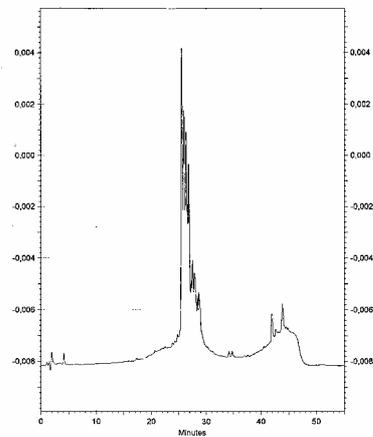


Abb.68: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 193** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

Auf die Fraktionen **01 AS 948** und **02 AS 193** ist das unter 3.2.2 a) Aufgeführte übertragbar. Auch sie sind für eine weitere Aufreinigung ausgewählt worden, allerdings nicht aufgrund ihrer Wirkung auf die Blutgerinnung, sondern vielmehr wegen ihrer Toxinwirkung im Krabbentest (siehe Kapitel 3.3 bzw. 3.4).

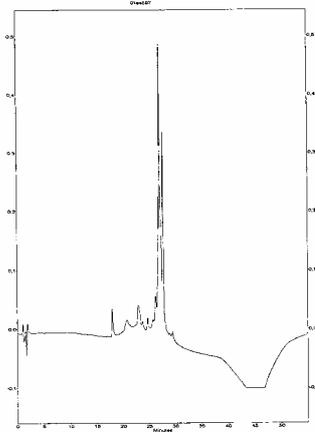
c) Folgefraktionen der Fraktion XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b

Abb. 69: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 597** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph- G-50 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

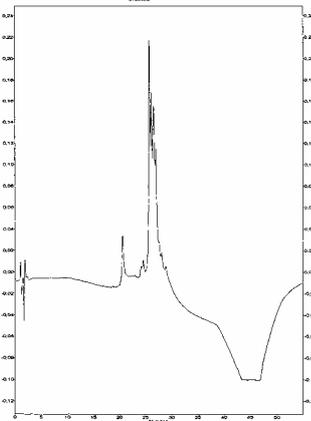


Abb. 70: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 602** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph- G-50 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

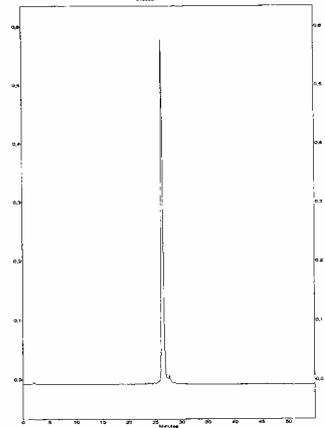


Abb. 71: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 604** (XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph- G-50 Fr. 5) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

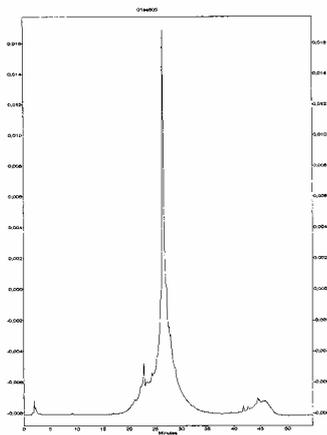


Abb. 72: Chromatogramm der HPLC von **01 AS 605** (XAD₂-Fr. 5/Seph. G-50 Fr. 4b/SP Seph. C-25 Fr. 11/Seph- G-50 Fr. 1) auf MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit Wasser-TFA/Acetonitrilgradienten

Die Fraktionen

- **01 AS 597**
- **01 AS 602**
- **01 AS 604**
- **01 AS 605**

üben ebenfalls Toxinwirkung auf die Strandkrabbe aus (siehe Kapitel 3.4). Auch ihre Chromatogramme bestehen aus mehreren Peaks, weswegen sie zwecks der Erlangung eines höheren Reinheitsgrades für eine weitere Aufreinigung ausgesucht worden sind.

3.2.3 Fraktionen mit einem sehr hohen Reinheitsgrad nach weiterer Aufreinigung

Im Folgenden sind die Chromatogramme derjenigen Fraktionen abgebildet, die durch die weitere Aufreinigung einen so hohen Reinheitsgrad erreicht haben, daß sie für die massenspektrometrischen Untersuchungen geeignet sind (Abbildungen 72 bis 75).

a) Chromatogramme der Folgefraktionen **XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b**

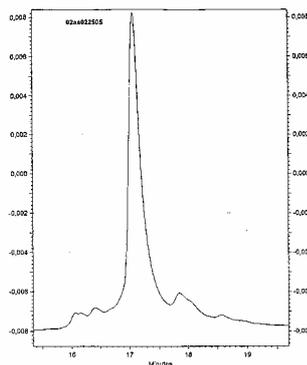


Abb. 73 : Chromatogramm der HPLC von **02 AS 505**: (ASI GP 11//XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr. 2 // Bio Rad Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

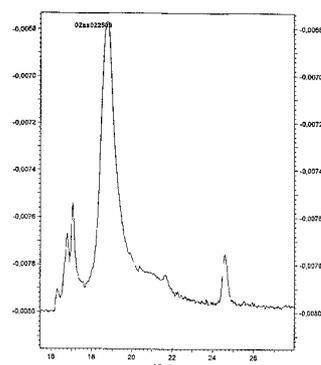


Abb. 74: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 509** (ASI GP 9 // XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 2 // SP Seph. C-25 Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

Die beiden Fraktionen **02 AS 505** und **02 AS 509**, deren Vorgängerfraktionen einen Einfluß auf die Blutgerinnung ausüben, haben durch die weitere Aufreinigung mittels Ionenaustausch- und Größenausschlußchromatographie einen höheren Reinheitsgrad als ihre Vorgängerfraktionen erlangt. Allerdings fällt auf, daß sie nicht so rein sind, wie die Toxinfraktionen, deren Reindarstellung gelungen ist. Trotz dieser Tatsache ist der erzielte Reinheitsgrad ausreichend für eine massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung.

b) Chromatogramme der Folgefraktionen von **XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a**

Durch die weiteren Aufreinigungsschritte der entsprechenden Fraktionen konnte keine deutliche Erhöhung des Reinheitsgrades erreicht werden. Aus diesem Grunde sind hier keine Chromatogramme aufgeführt.

c) Chromatogramme der Folgefraktionen von **XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b**

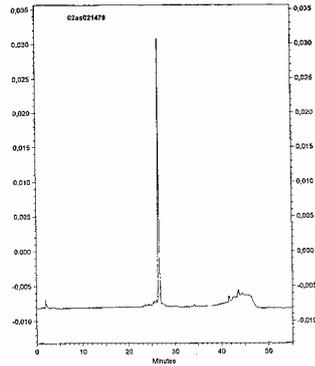


Abb. 75: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 479** (01 AS 604 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 5 // Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

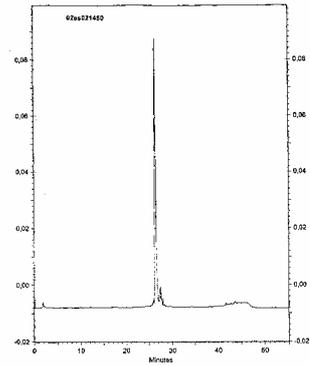


Abb. 76: Chromatogramm der HPLC von **02AS480** (01 AS 604 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 5 // Seph. G-25 Fr. 2) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

Durch die Entsalzung der Fraktion 01 AS 604 ist es gelungen, zwei hoch reine Fraktionen zu gewinnen, nämlich die Fraktionen **02 AS 479** und **02 AS 480**. Diese werden im Anschluß massenspektrometrisch auf ihr Molekulargewicht untersucht.

3.2.4 Fraktionen mit geringerem Reinheitsgrad trotz weiterer Aufreinigungsschritte

Es gibt einige Fraktionen, die trotz einer zweiten Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Gelfiltration keinen ausreichend hohen Reinheitsgrad für die Massenspektrometrie erlangen. Aufgrund der Tatsache, daß es sich bei dieser Gruppe um eine Vielzahl von Chromatogrammen handelt, die im Prinzip alle eine ähnliche Aussage beinhalten, erscheint es sinnvoll, nur einige ausgewählte Beispiele aus jeder Gruppe stellvertretend für alle Chromatogramme zu präsentieren.

a) Folgefraktionen der Fraktion XAD₂-Fr. 4 / Sephadex G-50 Fr. 3+3b

Als Beispiel dienen in diesem Falle die Folgefraktionen der Fraktion ASI GP 2, die aus der weiteren Aufreinigung dieser Fraktion mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration hervorgehen.

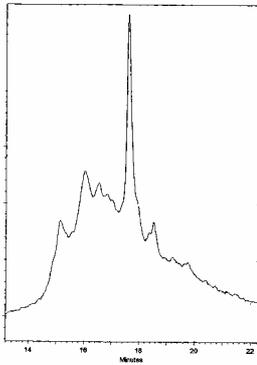


Abb 77.: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 497** (ASI GP 2 // XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1 // Bio Rad Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

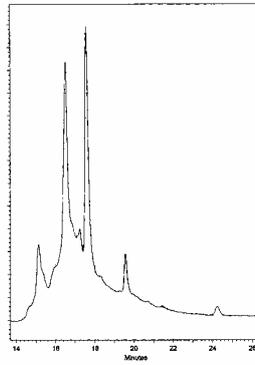


Abb. 78: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 498** (ASI GP 2 // XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1 // Bio Rad Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

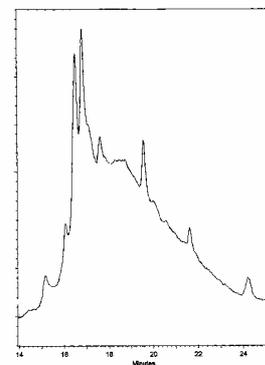


Abb. 79: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 499** (ASI GP 2 // XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / Sp Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1 // Bio Rad Fr. 2b / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

Man erkennt in den drei Chromatogrammen der Fraktionen **02 AS 497**, **02 AS 498** und **02 AS 499** jeweils mehrere Peaks.

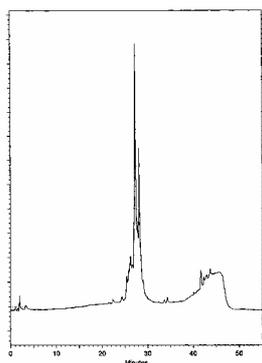
b) Chromatogramme der Folgefraktionen von **XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4a**

Abb. 80: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 490** (02 AS 193 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr. 2 // Fractogel Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

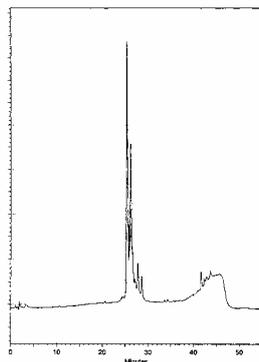


Abb. 81: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 491** (02 AS 193 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr. 2 // Fractogel Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

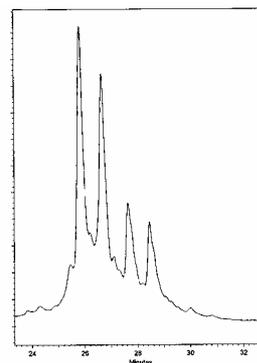


Abb. 82: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 492** (02 AS 193 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph- G-50 Fr. 2 // Fractogel Fr. 3 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

Auch bei den drei Folgefraktionen **02 AS 490**, **02 AS 491** und **02 AS 492** sind in den Chromatogrammen deutlich mehrere Peaks zu sehen.

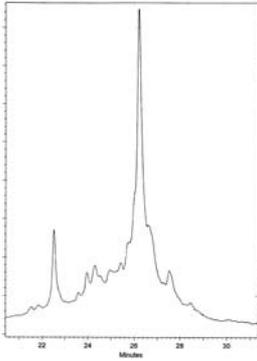
c) Chromatogramme der Folgefraktionen von **XAD₂-Fr. 5 / Sephadex G-50 Fr. 4b**

Abb. 83: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 495**
(01 AS 605 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph- G-50 Fr. 1 // Fractogel Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

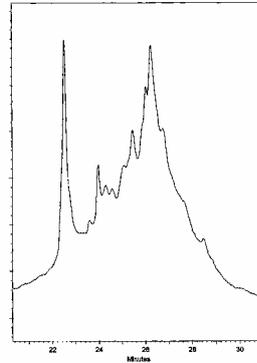


Abb. 84: Chromatogramm der HPLC von **02 AS 496**
(01 AS 605 // XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph- G-50 Fr. 1 // Fractogel Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1) auf einer MN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C-18-Säule mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-Gradienten

Die Fraktionen **02 AS 495** und **02 AS 496** zeigen in den Chromatogrammen ebenfalls noch viele Peaks.

3.3 Ergebnisse der Gerinnungsanalysen

Zur Darstellung der Gerinnungsergebnisse sind alle Meßwerte der jeweiligen Bestimmungen in Tabellen aufgeführt, wobei die interessantesten Ergebnisse dick gedruckt aufgeführt werden. Zudem sind die jeweiligen Tabellenzeilen, in denen die interessanten Ergebnisse erscheinen, der Übersichtlichkeit halber farbig unterlegt. So sind die potentiell gerinnungshemmenden Einflüsse orange (bzw. bei nicht so starker Ausprägung gelb), und die potentiell gerinnungsverstärkenden Einflüsse grün unterlegt:

	potentiell gerinnungshemmender Einfluß
	potentiell gerinnungshemmender Einfluß (nicht stark ausgeprägt)
	potentiell gerinnungsfördernder Einfluß

3.3.1 Statistische Betrachtung der Gerinnungsanalysen

Alle Gerinnungsanalysen der einzelnen Seeanemonenfraktionen werden als Doppelbestimmung durchgeführt. Diese Methode ist bei entsprechenden Bestimmungen im Klinikalltag gängig. Es hat sich gezeigt, daß Mehrfachbestimmungen keine Verbesserung der statistischen Aussagefähigkeit der Werte mit sich bringen. Die Ergebnisse der Bestimmungen, die nachfolgend in den Tabellen aufgeführt werden, sind die berechneten Mittelwerte der Doppelbestimmung.

Nimmt man eine Gaußverteilung der Meßwerte an, so ergibt sich daraus, daß mit 97,5 prozentiger Wahrscheinlichkeit alle Meßwerte in einem Bereich von dem Mittelwert plus/minus zweimal den Variationskoeffizienten liegen. Dementsprechend sind Abweichungen von diesem Bereich mit 97,5 prozentiger Wahrscheinlichkeit auf Auswirkungen des Seeanemonenextraktes auf diesen Gerinnungsparameter, und nicht auf den statistischen Fehler dieser Meßmethode zurückzuführen. Diese Abweichung des Meßwertes von dem Leerwert kann folglich als signifikant betrachtet werden. Da jedes in den Gerinnungsanalysen verwendete Reagenz eine andere Schwankungsbreite der Meßergebnisse aufweist, erscheint es sinnvoll, für die Beurteilung der Signifikanz einer Abweichung den Variationskoeffizienten der Meßmethode, der den Herstellerangaben zu entnehmen ist, heranzuziehen.

3.3.2 Ergebnisse der Globaltests (Quick-Test und aPTT) einschließlich der Einzelfaktorenbestimmung

Zunächst sollen die Ergebnisse der beiden Globaltests (Quick-Test und aPTT) aufgeführt werden. Im Anschluß daran folgen die Ergebnisse der Einzelfaktorenanalysen. Alle angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Es ist nicht notwendig, aus statistischen Gründen mehr als zwei Meßwerte von einer Probe zu bestimmen, da der Gerätehersteller garantiert, daß eine ausreichend hohe Genauigkeit bei einer Doppelbestimmung erreicht wird. Die Gerinnungsanalysen in der Klinikroutine werden ebenfalls als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 9: Ergebnisse der Leerwertbestimmung der globalen Gerinnungstests:

	gelöst	Quick / [% d. Norm]	aPTT / [sec]
NaCl	ja	91	32,2

Tabelle 10: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fraktion 3, Sephadex G50-Fraktion 1, 2, 3, 4

Proben- Nummer	gelöst	Quick / [% d. Norm]	aPTT / [sec]
ASI 3a	Ja	95	35,4
ASI 3b	ja	95	41,0
ASI 3c	ja	98	52,7
ASI 3d	nein	95	30,9

Tabelle 11: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fraktion 4, Sephadex G50-Fraktion 1a, 1b, 2, 3a, 3+3b

Proben- Nummer	gelöst	Quick / [% d. Norm]	aPTT / [sec]
ASI 4a	ja	98	39,2
ASI 4b	ja	93	32,1
ASI 4c	ja	98	32,8
ASI 4d	ja	94	54,5
ASI 4e	ja	96	70,2

Tabelle 12: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fraktion 5, Sephadex G50-Fraktion 1, 2, 3, 4a, 4b, 5

Proben- Nummer	gelöst	Quick / [% d. Norm]	aPTT / [sec]
ASI 5a	nein	99	32,1
ASI 5b	nein	96	32,3
ASI 5c	ja	96	31,1
ASI 5d	ja	97	38,9
ASI 5e	ja	90	37,0
ASI 5f	nein	94	31,0

Tabelle 13: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fraktion 6/1, Sephadex G50-Fraktion 1, 2, 3, 3-4, 4, 4b

Proben- Nummer	gelöst	Quick / [% d. Norm]	aPTT / [sec]
ASI 6/1a	nein	100	30,5
ASI 6/1b	nein	95	30,3
ASI 6/1c	ja	95	30,4
ASI 6/1d	nein	102	29,6
ASI 6/1e	nein	96	29,8
ASI 6/1f	nein	95	30,4

Tabelle 14: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fraktion 6/2, Sephadex G50-Fraktion 1, 2, 3, 4, 4b

Proben- Nummer	gelöst	Quick / [% d. Norm]	aPTT / [sec]
ASI 6/2a	nein	99	31,5
ASI 6/2b	nein	99	30,8
ASI 6/2c	nein	97	30,7
ASI 6/2d	nein	101	29,8
ASI 6/2e	ja	95	29,7

Tabelle 15: Ergebnisse der globalen Gerinnungstests der XAD₂-Fraktion 6/3, Sephadex G50-Fraktion 1

Proben- Nummer	gelöst	Quick / [% d. Norm]	aPTT / [sec]
ASI 6/3a	ja	97	30,7

Um diese Tatbestände anschaulicher zu gestalten, soll die Wirkung einiger Fraktionen auf die aPTT in einem Säulendiagramm dargestellt werden. Die gemessene Gerinnungszeit der Leerwertprobe wird dazu gleich 100 Prozent gesetzt und mit den gemessenen Gerinnungszeiten der Proben ins Verhältnis gesetzt. Dadurch ergibt sich folgendes Diagramm:

aPTT [% der Norm]

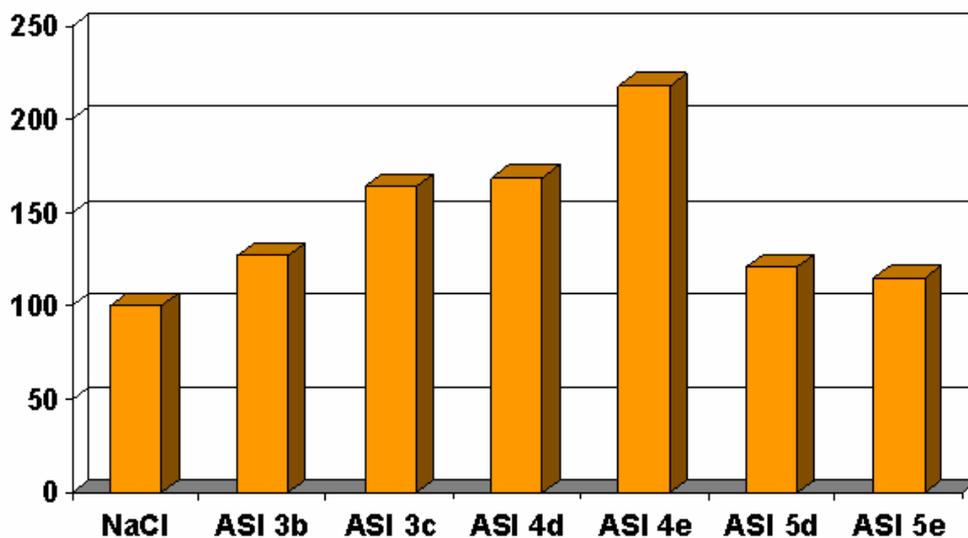


Abb. 85: Verlängerung der aPTT durch bestimmte Seeanemonenfraktionen; aufgetragen ist die aPTT in Prozent der Norm bezogen auf den Leerwert mit physiologischer Natriumchloridlösung (Die normalerweise übliche Angabe der aPTT in Sekunden wurde ersetzt durch die Angabe in Prozent der Norm, um das Ausmaß der Einwirkung der Seeanemonenextrakte zu verdeutlichen.)

Der Normbereich des Quickwerts im Klinikalltag bewegt sich in der Regel zwischen 70 und 100 % der Norm (M. Barthels, H. Poliwoda), während als Normwerte für die aPTT bei dem verwendeten Testsystem zwischen 26 und 36 Sekunden (Herstellerangaben im Beipackzettel des Pathromtin® SL-Reagenzes) anzusehen sind. Die Nullwertproben mit dem gepoolten Normalplasma und physiologischer Natriumchloridlösung liegen mit einem Quick-Wert von 91 % und einer aPTT von 32,2 Sekunden innerhalb dieser Bereiche.

Bei der Beurteilung der Gerinnungsergebnisse muß man wissen, ob eine Abweichung vom Leerwert auf die normalen Meßschwankungen, die die entsprechende Analyse mit sich bringt, zurückzuführen sind, oder ob sie durch den Einfluß der untersuchten Seeanemonenfraktion hervorgerufen wird und somit als relevant zu betrachten ist. Die normale Schwankungsbreite der Analysen wird durch den Variationskoeffizienten charakterisiert, welcher den Herstellerangaben zu entnehmen ist. Als relevant kann eine Abweichung angesehen werden, die zweimal größer als der Variationskoeffizient des Tests ist. Dies gilt sowohl für Abweichungen, die oberhalb als auch unterhalb des Leerwertes liegen.

Bei der Ergebnisbetrachtung fällt auf, daß nur geringe Wirkungen auf den Quickwert zu beobachten sind: Die gemessenen Quickwerte liegen alle zwischen 90 und 100 % der Norm. Der Variationskoeffizient des Tests liegt laut Herstellerangaben (siehe Beipackzettel des Thromborel® S-Reagenzes, Dade Behring) bei hintereinander durchgeführten Analysen bei maximal 2,5 Prozent. Dies bedeutet, daß der normale Schwankungsbereich zwischen 86 und 96 Prozent liegt. Unterhalb von 86 Prozent liegt keiner der gemessenen Quick-Werte. Abweichungen nach oben sind zwar zu verzeichnen, allerdings sind diese mit einem Maximalwert von 102 Prozent so gering, daß sie zu vernachlässigen sind, wenn man sich vor Augen führt, daß erst bei Quick-Werten von über 120 Prozent eine deutlich erhöhte Gerinnbarkeit des Plasmas zu erwarten ist. Somit kann festgestellt werden, daß die Inhaltsstoffe der Seeanemone *Anemonia sulcata* die exogenen Gerinnungsprozesse weitestgehend unbeeinflusst lassen.

Der Variationskoeffizient für Messungen, die hintereinander durchgeführt werden, liegt bei der aPTT-Messung bei maximal 1,2 Prozent. Der normale Schwankungsbereich erstreckt sich folglich von 31,4 bis 33 Sekunden. Beim Durchschauen der Tabelle fallen etliche Werte aus diesem Bereich heraus. Besonders augenfällig sind jedoch die Abweichungen der G-50-Fractionen der XAD₂-Fraktion 4 (ASI 4d: 54,5 sec; ASI 4e: 70,2 sec), die in einer deutlichen Verlängerung der aPTT bestehen. Auch die Sephadex G-50-Fractionen der XAD₂-Fraktion 3 zeigen Verlängerungen der aPTT, die als relevant zu bezeichnen sind (ASI 3b: 41,0 sec; ASI 3c: 52,7 sec). Auch in den übrigen Serdolit-Fractionen kommen Werte vor, die außerhalb des Schwankungsbereichs des Tests liegen. Allerdings sind diese bei weitem nicht so beeindruckend wie bei XAD₂-Fraktion 4.

Aufgrund der obigen Ergebnisse wurden weitere Untersuchungen bezüglich der einzelnen Gerinnungsfaktoren vorgenommen. Aufgeführt werden hier die Ergebnisse der beiden interessantesten Fraktionen (ASI 4d und ASI 4e):

Tabelle 16: Ergebnisse der Einzelfaktorenbestimmung von Fraktionen, die eine besonders starke aPTT-Verlängerung bewirken

Proben- Nummer	F VIII [% d. Norm]	F IX [% d. Norm]	F X [% d. Norm]	F XI [% d. Norm]	F XII [% d. Norm]
ASI 4d	112	112	101	86	80
ASI 4e	86	83	100	58	49

Auffälligkeiten zeigen sich bei diesen Untersuchungen lediglich die Faktoren XI und XII bei der Fraktion ASI 4e: mit 58 und 49 Prozent der Norm liegen die Aktivitäten der beiden

Gerinnungsfaktoren deutlich unter dem Normbereich von 70 bis 120 bzw. 70 bis 150 Prozent der Norm. Diese Tatsache erklärt die verlängerte PTT bei den zuvor diskutierten Ergebnissen.

Die interessante Fraktion XAD₂-Fraktion 4 / Sephadex G-50 Fraktion 3+3b wurde nun weiteren Reinigungsschritten unterzogen (SP Sephadex C25 / Sephadex G-50). Die resultierenden Fraktionen wurden ebenfalls mit Hilfe der Gerinnungsanalysen untersucht. Unten folgen die Ergebnisse:

Tabelle 17: Ergebnisse der globalen Gerinnungstest der Folgefraktionen der XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b

Proben-Nummer	gelöst	Quick [% d. Norm]	aPTT [sec]
NaCl	ja	97	29,3
ASI GP 1	ja	97	31,7
ASI GP 2	ja	99	57,2
ASI GP 3	ja	96	47,9
ASI GP 4	ja	98	40,8
ASI GP 5	ja	94	41,3
ASI GP 6	ja	95	37,6
ASI GP 7	ja	100	32,6
ASI GP 8	nein	95	30,2
ASI GP 9	ja	94	77,1
ASI GP 10	ja	95	84,2
ASI GP 11	ja	90	76,2
ASI GP 12	ja	92	56,6
ASI GP 13	ja	95	96,3
ASI GP 14	ja	91	71,5
ASI GP 15	ja	94	42,2
ASI GP 16	ja	96	40,0

Die interessantesten Ergebnisse sind in der Tabelle dick gedruckt. Die Fraktionen ASI GP 9 bis ASI GP 14 weisen dabei eine gravierende Verlängerung der aPTT im Vergleich zum Leerwert auf. So bewirkt die Fraktion ASI GP 13 eine Verdreifachung der aPTT.

Auch diese Daten sollen zur Veranschaulichung in einem Säulendiagramm dargestellt werden:

aPTT [% der Norm]

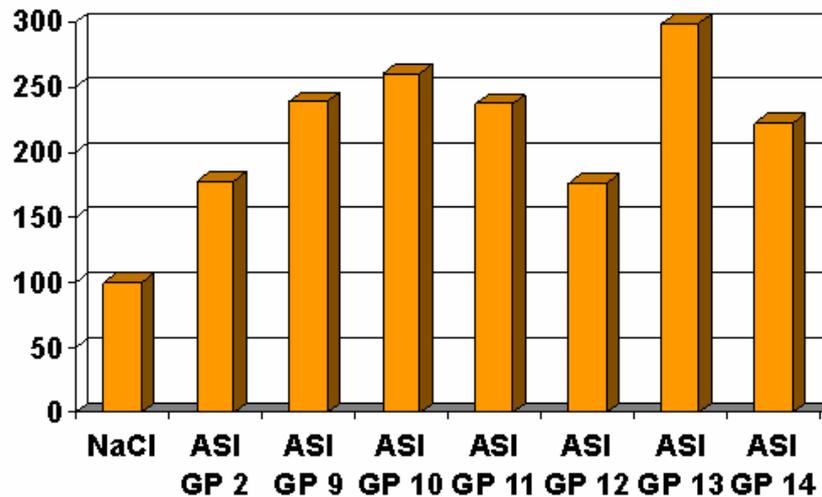


Abb. 86: Verlängerung der aPTT durch bestimmte Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b; aufgetragen ist die aPTT in Prozent der Norm bezogen auf den Leerwert mit physiologischer Natriumchloridlösung

Im Anschluß werden die Ergebnisse aus den Einzelfaktorenanalysen der dick gedruckten Fraktionen gezeigt:

Tabelle 18: Ergebnisse der Einzelfaktorenbestimmung der Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b, die eine besonders starke aPTT-Verlängerung bewirken

Proben- Nummer	F VIII	F IX	F X	F XI	F XII
ASI GP 2	93	91	112	61	69
ASI GP 9	61	53	112	35	27
ASI GP 10	54	45	111	35	25
ASI GP 11	71	68	108	46	41
ASI GP 12	108	110	110	81	81
ASI GP 13	107	100	109	77	71
ASI GP 14	81	82	114	59	65

Ein Blick auf die Einzelfaktoranalyse verdeutlicht ebenfalls den Einfluß auf die Gerinnungsfaktoren XI und XII. Des weiteren ist bei einigen Fraktionen (ASI GP 9 und 10) eine Verminderung der Aktivität der Faktoren VIII und IX zu verzeichnen.

Entsprechend der Gerinnungswerte bieten sich für eine weitere Aufreinigung die Fraktionen ASI GP 9 bis ASI GP 14 an.

Gegen eine Weiterbearbeitung der Fraktionen ASI GP 13 und 14 sprechen hingegen die HPLC-Chromatogramme. Diese offenbaren nämlich, daß entsprechende Fraktionen noch aus sehr vielen verschiedenen Einzelsubstanzen zusammengesetzt sind. Somit wäre eine weitere Aufreinigung recht aufwendig, weswegen sich für die bereits reineren Fraktionen entschieden wird.

Bei den Fraktionen ASI GP 2 und ASI GP 3 liegt der Fall genau andersherum: Hier ist die Gerinnungsaktivität zwar nicht so stark ausgeprägt, allerdings belegen die Chromatogramme einen höheren Reinheitsgrad als bei den zuvor diskutierten Fraktionen. Ein weiteres wichtiges Argument, welches für die weitere Aufreinigung dieser beiden Fraktionen spricht, ist die Tatsache, daß eine ausreichende Substanzmenge vorliegt.

3.3.3 Ergebnisse der Thrombinzeit-Bestimmung

Die Ergebnisse der Thrombinzeitbestimmungen sind in Tabelle 19 wiedergegeben.

Tabelle 19: Ergebnisse der Thrombinzeitbestimmung:

Proben-Nummer	Thrombinzeit [sec]
Leerwert mit NaCl	7,8
ASI 3a	7,8
ASI 3b	7,7
ASI 3c	7,8
ASI 3d	7,8
ASI 4a	7,8
ASI 4b	7,7
ASI 4c	7,7
ASI 4d	7,8
ASI 4e	7,8
ASI 5a	7,7
ASI 5b	7,8
ASI 5c	7,8
ASI 5d	7,8
ASI 5e	7,7
ASI 5f	7,8
ASI 6/1a	7,8
ASI 6/1b	7,8
ASI 6/1c	7,8
ASI 6/1d	7,7
ASI 6/1e	7,7
ASI 6/1f	7,7
ASI 6/2a	7,7
ASI 6/2b	7,8
ASI 6/2c	7,8
ASI 6/2d	7,8

Proben-Nummer	Thrombinzeit [sec]
ASI 6/2e	7,7
ASI 6/3a	7,7

Der Hersteller gibt in der Testbeschreibung an, daß bei Serienmessungen mit einem Variationskoeffizienten von 1,9 Prozent zu rechnen ist.

Der Leerwert wird dabei gleich 100 Prozent gesetzt. Damit entsprechen 1,9 Prozent einem Wert von 0,1 Sekunden. Alle Abweichungen, die außerhalb des Bereiches 7,8 +/- 0,2 Sekunden liegen, wären demnach auf die Wirkung der entsprechenden Seeanemonenfraktion zurückzuführen.

Anhand der obigen Ergebnisse läßt sich jedoch aussagen, daß keine der untersuchten Fraktionen einen Einfluß auf die Thrombinzeit hat, da keiner der Werte außerhalb der Schwankungsbreite liegt.

3.3.4 Ergebnisse der Fibrinogen-Bestimmung

Die Ergebnisse der Fibrinogen-Bestimmung zeigen sich wie in Tabelle 20 aufgelistet:

Tabelle 20: Ergebnisse der Fibrinogenbestimmung

Proben-Nummer	Fibrinogenkonzentration [mg/dl]
Leerwert mit NaCl	370
ASI 3a	375
ASI 3b	380
ASI 3c	377
ASI 3d	383
ASI 4a	394
ASI 4b	401
ASI 4c	389
ASI 4d	384
ASI 4e	386
ASI 5a	370
ASI 5b	375
ASI 5c	380
ASI 5d	372
ASI 5e	366
ASI 5f	367
ASI 6/1a	373
ASI 6/1b	370
ASI 6/1c	374
ASI 6/1d	385
ASI 6/1e	394
ASI 6/1f	372
ASI 6/2a	368
ASI 6/2b	371
ASI 6/2c	360
ASI 6/2d	375
ASI 6/2e	371
ASI 6/3a	373

Dieser Test hat für Werte, die im Normalbereich liegen, laut Herstellerangaben einen maximalen Variationskoeffizienten von 5 Prozent. Bei Werten im pathologischen Bereich muß man mit einem Variationskoeffizienten von maximal 6 Prozent rechnen.

Man kann also davon ausgehen, daß alle Abweichungen, die mehr als Leerwert +/- 12 Prozent (zweimal den Variationskoeffizienten) betragen, durch Einwirkung der Seeanemonenextrakte hervorgerufen werden. Aus einem Leerwert von 370 mg/dl ergibt sich somit ein Schwankungsbereich von 326 bis 414 mg/dl.

Aus diesem Bereich fällt keiner der gemessenen Werte heraus. Es ist somit kein deutlicher Einfluß der Seeanemonenfraktionen auf die Fibrinogenkonzentration zu erkennen.

3.3.5 Ergebnisse der Protein-C-Bestimmung

Bei der Vermessung der Proben ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 21: Ergebnisse der Protein C-Bestimmung

Proben-Nummer	Protein C-Aktivität [Prozent der Norm]
Leerwert	119
ASI 3a	101
ASI 3b	78
ASI 3c	24
ASI 3d	99
ASI 4a	111
ASI 4b	116
ASI 4c	59
ASI 4d	14
ASI 4e	7
ASI 5a	89
ASI 5b	110
ASI 5c	114
ASI 5d	51
ASI 5e	68
ASI 5f	109
ASI 6/1a	120
ASI 6/1b	118
ASI 6/1c	111
ASI 6/1d	120
ASI 6/1e	119
ASI 6/1f	118
ASI 6/2a	119
ASI 6/2b	110
ASI 6/2c	120
ASI 6/2d	118
ASI 6/2e	121
ASI 6/3a	120

Der Variationskoeffizient dieser Bestimmungsmethode liegt bei 1,9 Prozent. Bei der Leerwertvermessung ergibt sich eine Protein-C-Aktivität von 119 Prozent. Der

Schwankungsbereich der Bestimmung umfaßt folglich Werte zwischen 114,5 und 123,5 Prozent.

Die meisten der gemessenen Aktivitäten der Proben liegen nahe bei diesem Leerwert. Allerdings ist es auffällig, daß bei einigen Proben eine stark verminderte Protein-C-Aktivität zu beobachten ist. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen bei der Fraktion ASI 4e ersichtlich, wo nur noch eine Aktivität von 7 Prozent gemessen werden konnte. Dies entspricht einer Minderung um fast zwei Größenordnungen. Andere Werte bestätigen diesen Trend (Fraktionen ASI 3c, 4d und 5d). Die genannten Fraktionen wirken somit deutlich potentiell gerinnungsverstärkend.

3.3.6 Ergebnisse der APC-Resistenz-Bestimmung

Die Ergebnisse der APC-Resistenz-Bestimmung sind der Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Ergebnisse der APC-Resistenz-Bestimmung

Proben-Nummer	Fibrinbildungszeit mit APC-Reagenz [sec]	Fibrinbildungszeit ohne APC-Reagenz [sec]	APC-Ratio
Leerwert	102,9	38,5	2,7
ASI 3a	116,1	38,3	3,0
ASI 3b	108,2	41,4	2,6
ASI 3c	114,7	43,4	2,6
ASI 3d	106,1	38,6	2,7
ASI 4a	129,7	41,1	3,2
ASI 4b	111,0	38,5	2,9
ASI 4c	99,2	36,7	2,7
ASI 4d	100,3	43,8	2,3
ASI 4e	102,1	50,9	2,0
ASI 5a	107,7	39,0	2,8
ASI 5b	104,3	36,3	2,9
ASI 5c	100,6	37,5	2,7
ASI 5d	105,3	40,1	2,6
ASI 5e	101,4	38,5	2,6
ASI 5f	101,3	37,9	2,7
ASI 6/1a	98,7	36,8	2,6
ASI 6/1b	99,7	37,5	2,7
ASI 6/1c	100,9	37,1	2,7
ASI 6/1d	97,8	37,7	2,6
ASI 6/1e	97,2	38,0	2,6

Proben-Nummer	Fibrinbildungszeit mit APC-Reagenz [sec]	Fibrinbildungszeit ohne APC-Reagenz [sec]	APC-Ratio
ASI 6/1f	90,7	36,8	2,5
ASI 6/2a	101,7	37,9	2,7
ASI 6/2b	103,1	38,4	2,7
ASI 6/2c	103,5	37,7	2,7
ASI 6/2d	102,7	38,7	2,7
ASI 6/2e	103,4	38,4	2,7
ASI 6/3a	88,2	39,3	2,2

In der Klinik bedeutet eine APC-Ratio von über 2,0, daß eine APC-Resistenz weitestgehend ausgeschlossen werden kann.

Liegt die Ratio zwischen 2,0 und 1,5, so handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine heterozygote APC-Resistenz, liegt sie gar zwischen 1,3 und 1,0, so kann von einer homozygoten APC-Resistenz ausgegangen werden (M. Barthels und M. von Depka, 2003).

Bei den oben vermessenen Proben liegen alle Werte bei mindestens 2,0. Die Leerwert-Ratio liegt bei 2,7. Die meisten Seeanemonenfraktion-Verhältnisse liegen nahe bei diesem Wert. Dies ließe vermuten, daß kaum ein Einfluß der Seeanemonenextrakte auf die APC-Ratio zu verzeichnen wäre.

Allerdings fallen einige dieser Ergebnisse etwas aus dem Rahmen: So zeigt beispielsweise die Fraktion ASI 4e mit dem Wert 2,0 im Vergleich zu dem Leerwert eine deutlich erniedrigte Ratio. Schaut man sich den Einfluß der Fraktion auf die Aktivität des Proteins C an, wird dieses Ergebnis untermauert. So bewirkt diese Fraktion nämlich eine sehr prägnante Abnahme der Protein-C-Aktivität. Ebenfalls eine deutliche Erniedrigung der APC-Ratio bewirkt die Fraktion ASI 4d.

Einige andere Werte wiederum zeigen den gegenteiligen Effekt, nämlich eine Zunahme der APC-Ratio. Zu nennen wären die Fraktionen ASI 3a (APC-Ratio = 3,0) und ASI 4a (APC-Ratio = 3,2).

Um abzuklären, ob die beobachteten Ergebnisse eventuell therapeutische Relevanz haben könnten, soll nun der Einfluß der Fraktionen, die in den obigen APC-Resistenz-Messungen deutlich von der Norm abweichende Ergebnisse aufweisen, auf pathologisches Patientenplasma untersucht werden.

Hierzu wird Patientenplasma eingesetzt, das eine APC-Ratio von 1,7 aufweist, wonach folglich eine APC-Resistenz vorliegt. Dieses Plasma wird nun nach Zusatz der entsprechenden Seeanemonenfraktionen erneut vermessen. Dabei ergeben sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 24: APC-Resistenz-Untersuchungen mit ausgesuchten Seeanemonenfraktionen an pathologischem Patientenplasma

Proben-Nummer	Fibrinbildungszeit mit APC-Reagenz [sec]	Fibrinbildungszeit ohne APC-Reagenz [sec]	APC-Ratio
reines Patientenplasma	67,5	39,3	1,7
ASI 3a	72,4	40,4	1,8
ASI 4a	77,5	41,0	1,9
ASI 4b	75,4	40,0	1,9
ASI 4c	74,7	40,6	1,8
ASI 4d	77,6	45,7	1,7
ASI 4e	81,4	51,8	1,6

Wie oben bereits erwähnt, gelten alle APC-Rationes, die unter 2,0 liegen, als pathologisch. Der Ausgangswert des Patientenplasmas lag bei 1,7. Mit den Fraktionen ASI 4a und 4b gelingt es, das Verhältnis auf den Wert 1,9, also nahe an den Grenzbereich zum Gesunden, anzuheben. Dieser Wert gilt zwar immer noch als pathologisch, allerdings ist deutlich die Tendenz zu beobachten, daß die ungünstige APC-Ratio durch diese Fraktionen verbessert werden kann. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus den obigen APC-Resistenzuntersuchungen, bei denen die genannten Fraktionen eine signifikant höhere APC-Ratio bedingten, als sie bei dem Leerwert zu verzeichnen war.

Genau gegenteilig verhält sich die Fraktion ASI 4e: Durch ihren Einfluß vermindert sich die APC-Ratio auf 1,6. Auch dieses Ergebnis deckt sich mit den obigen Untersuchungen. So bewirkte die Fraktion ASI 4e eine dramatische Abnahme der Protein-C-Aktivität und ebenfalls eine deutliche Verminderung der APC-Ratio.

3.3.7 Ergebnisse der Plasminogen-Bestimmung

Tabelle 25: Ergebnisse der Plasminogen-Bestimmung

Proben-Nummer	Plasminogen [% der Norm]
Leerwert	97
ASI 3a	94
ASI 3b	90
ASI 3c	46
ASI 3d	93
ASI 4a	94
ASI 4b	97
ASI 4c	89
ASI 4d	35
ASI 4e	22
ASI 5a	101
ASI 5b	96
ASI 5c	97
ASI 5d	63
ASI 5e	73
ASI 5f	116

Proben-Nummer	Plasminogen [% der Norm]
ASI 6/1a	95
ASI 6/1b	97
ASI 6/1c	97
ASI 6/1d	99
ASI 6/1e	127
ASI 6/1f	100
ASI 6/2a	96
ASI 6/2b	96
ASI 6/2c	95
ASI 6/2d	97
ASI 6/2e	95
ASI 6/3a	95

Der Referenzbereich in der Klinik liegt zwischen 75 und 140 Prozent (M. Barthels, M. von Depka, 2003). Dies bedeutet, daß alle Werte für die Plasminogenaktivität innerhalb dieses Bereichs als normal angesehen werden können.

Der Hersteller des Tests gibt den Variationskoeffizienten für eine Probe im Normalbereich mit 2,9 Prozent an, womit sich ein Schwankungsbereich von 91 bis 103 Prozent ergibt.

Zieht man dieses Kriterium zur Auswertung heran, so stellt man fest, daß es signifikante Abweichungen in beide Richtungen gibt.

Zum einen kann man eine starke Hemmung der Plasminogenaktivität in den Fraktionen ASI 3c, 4d und 4e beobachten. Ähnliche Tendenzen sind bei den Fraktionen ASI 5d und 5e zu verzeichnen, allerdings sind sie hier nicht ganz so ausgeprägt. Allen diesen Fraktionen ist jedoch gemein, daß sie eine Verschiebung der Plasminogenaktivität unter den Referenzbereich (also in den pathologischen Bereich hinein) bewirken.

Zum anderen ist auch eine Verstärkung der Plasminogenaktivität zu erkennen, und zwar bei der Fraktion ASI 6/1e. Hier liegt der Wert bei 127 Prozent der Norm. Im Vergleich zu dem Leerwert von 97 Prozent der Norm ist dies eine deutliche Erhöhung der Aktivität. Allerdings liegt dieser Wert noch in dem Referenzbereich des Tests.

3.3.8 Ergebnisse der t-PA-Bestimmung

Tabelle 26: Ergebnisse der t-PA-Bestimmung

Proben-Nummer	t-Pa-Konzentration [ng/ml]
Leerwert	7,56
ASI 3a	7,11
ASI 3b	6,39
ASI 3c	7,94
ASI 3d	8,27
ASI 4a	6,05
ASI 4b	6,32
ASI 4c	6,61
ASI 4d	5,96
ASI 4e	5,73
ASI 5a	5,60

Proben-Nummer	t-Pa-Konzentration [ng/ml]
ASI 5b	8,13
ASI 5c	8,10
ASI 5d	6,78
ASI 5e	7,94
ASI 5f	7,21
ASI 6/1a	6,66
ASI 6/1b	6,58
ASI 6/1c	6,00
ASI 6/1d	7,65
ASI 6/1e	8,01
ASI 6/1f	7,61
ASI 6/2a	7,34
ASI 6/2b	6,64
ASI 6/2c	7,74
ASI 6/2d	7,04
ASI 6/2e	8,75
ASI 6/3a	8,48

In dem Beipackzettel des verwendeten Tests ist keine Angabe bezüglich des Variationskoeffizientens zu finden. Der Referenzbereich des t-PA-Spiegels im Plasma liegt im Klinikalltag zwischen 1,4 und 8,4 Nanogramm pro Milliliter (M. Barthels und M.von Depka, 2003).

Alle gemessenen Werte liegen innerhalb dieses Referenzbereiches. Allerdings sind einige deutliche Abweichungen von dem Leerwert zu verzeichnen, die aus dem Schwankungsbereich des Testes herausfallen dürften und somit vermutlich nicht auf Meßungenauigkeiten beruhen. Dabei sind auch hier sowohl Abweichungen nach oben als auch nach unten zu beobachten.

So erniedrigen beispielsweise die Fraktionen ASI 3b, ASI 4a bis 4e, ASI 5a, ASI 6/1a bis c und ASI 6/2b die meßbare t-PA-Konzentration deutlich.

Im Gegenteil dazu erhöhen die Fraktionen ASI 3d, ASI 5b und c, ASI 6/2e und ASI 6/3a die erfaßte t-PA-Konzentration.

3.3.9 Ergebnisse der PAI-Bestimmung

Tabelle 27: Ergebnisse der PAI-Bestimmung

Proben-Nummer	PAI-Aktivität [U/ml]
Leerwert	1,7
ASI 3a	3,3
ASI 3b	4,6
ASI 3c	5,8
ASI 3d	2,8
ASI 4a	3,3
ASI 4b	2,0
ASI 4c	8,6
ASI 4d	8,6
ASI 4e	8,6
ASI 5a	3,0

Proben-Nummer	PAI-Aktivität [U/ml]
ASI 5b	3,0
ASI 5c	2,6
ASI 5d	8,6
ASI 5e	8,4
ASI 5f	2,5
ASI 6/1a	2,1
ASI 6/1b	1,9
ASI 6/1c	2,2
ASI 6/1d	1,3
ASI 6/1e	1,8
ASI 6/1f	1,9
ASI 6/2a	1,8
ASI 6/2b	2,8
ASI 6/2c	1,6
ASI 6/2d	1,7
ASI 6/2e	1,8
ASI 6/3a	1,9

Der Variationskoeffizient des Tests liegt maximal bei sechs Prozent. Demnach sind alle Abweichungen, die außerhalb des Schwankungsbereiches von 1,5 bis 1,9 Einheiten pro Milliliter hinausgehen, als signifikant anzusehen.

Dieses Kriterium trifft auf die meisten der Fraktionen zu. In der Tabelle sind nur die auffälligsten Werte dick gedruckt. Hierbei handelt es sich um die Fraktionen ASI 4c, 4d, 4e und ASI 5d und 5e. Bei ihnen allen wurden Aktivitäten von über 8 U/ml gemessen, was einer dramatischen Erhöhung der PAI-Aktivität entspricht. Die wird besonders deutlich bei der Darstellung im Balkendiagramm. Hierzu wird wiederum die PAI-Aktivität der Leerwertprobe gleich 100 Prozent gesetzt. Setzt man die PAI-Aktivität der Proben damit ins Verhältnis, so ergibt sich nachfolgendes Diagramm:

PAI-Aktivität [% der Norm]

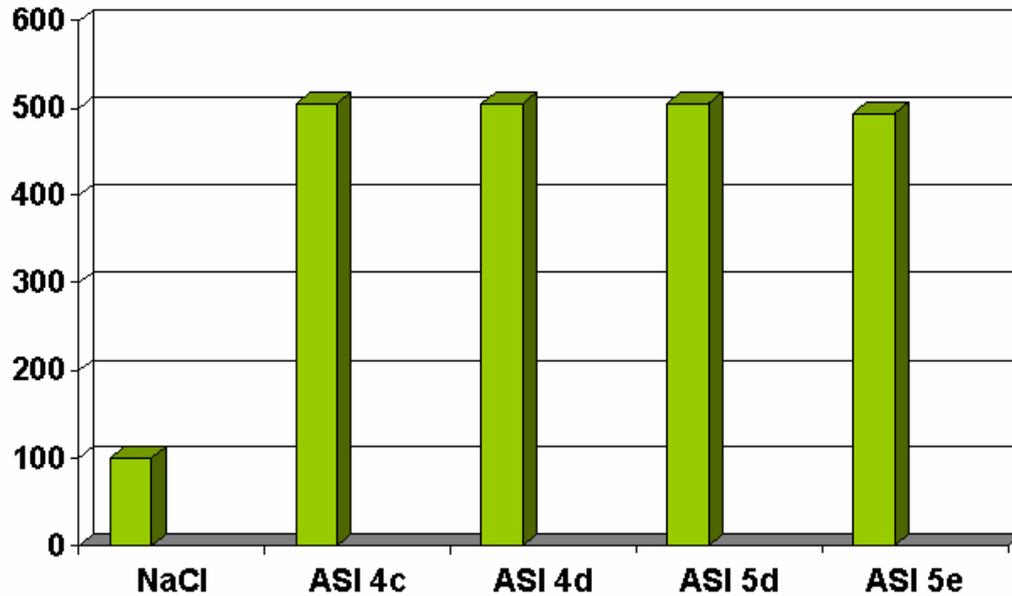


Abb. 87: Erhöhung der PAI-Aktivität durch einige Seeanemonenfraktionen; aufgetragen ist die PAI-Aktivität in Prozent der Norm bezogen auf den Leerwert mit physiologischer Natriumchloridlösung

Im Klinikalltag geht man von einem Normbereich von 0,3 bis 3,5 U/ml aus. Der Leerwert von Normalplasma mit NaCl-Lösung liegt mit 1,7 U/ml innerhalb dieses Bereiches. Einige der Seeanemonenfraktionen sind also in der Lage, die PAI-Aktivität von Normalwerten deutlich in den pathologischen Bereich im Sinne einer Erhöhung zu verschieben.

3.3.10 Ergebnisse der Präkallikrein-Bestimmung

Hier sind nur die Fraktionen untersucht worden, die bei der aPTT-Bestimmung eine deutliche Verlängerung derselbigen bewirkten, da das Präkallikrein zu dem Kontaktsystem des endogenen Gerinnungssystems gehört. Aus diesem Grund soll hier überprüft werden, ob diese Verlängerung unter Umständen durch das Präkallikrein mitverursacht werden könnte.

Tabelle 28: Ergebnisse der Präkallikrein-Bestimmung

Proben-Nummer	PKK-Aktivität [%]	PKK-Aktivität [U/ml]
Leerwert	55	0,60
ASI 4a	47	0,52
ASI 4b	47	0,52
ASI 4c	41	0,45
ASI 4d	38	0,42
ASI 4e	35	0,39

Der Variationskoeffizient dieser Bestimmung liegt bei vier Prozent. Dies bedeutet folglich, daß methodische Schwankungen von vier Prozent innerhalb der Messungen auftreten können. Alle Abweichungen, die außerhalb des Bereichs von 0,55 bis 0,65 liegen, können nicht auf Meßschwankungen zurückgeführt werden und müssen demnach als signifikant betrachtet werden.

Demzufolge zeigen alle vermessenen Fraktionen Abweichungen, die außerhalb der Schwankungsbreite des Tests liegen und somit auf eine Einwirkung der Seeanemonenfraktionen zurückzuführen sind. Diese Abweichungen bestehen bei allen Fraktionen in einer Abnahme der Präkallikreinaktivität. Innerhalb der Folgefraktionen der XAD₂-Fraktion 4, die auch in den übrigen Gerinnungstests die deutlichsten Wirkungen zeigten, ist folglich eine hemmende Einwirkung auf das Präkallikrein zu verzeichnen.

3.3.11 Ergebnisse der Plättchenfunktions-Bestimmung

3.3.11.1 Leerwertbestimmung mit ADP

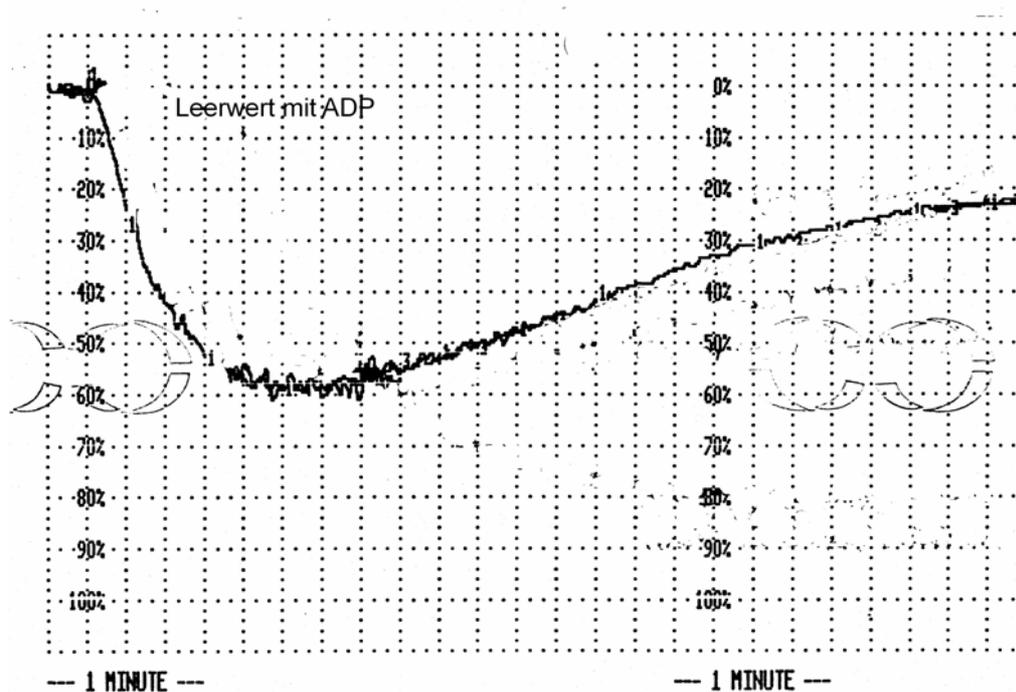


Abb. 88: Plättchenfunktionsbestimmung des Leerwertansatzes mit 0,2 μ molarer ADP-Lösung als induzierendes Agens; die Bestimmung erfolgt mittels Extinktionsmessung; Ordinate: Extinktion, Abszisse: Zeit

3.3.11.2 Leerwertbestimmung mit Kollagen



Abb. 89: Plättchenfunktionsbestimmung des Leerwertansatzes mit Kollagenlösung (1,9 mg/ml) als induzierendes Agens; die Bestimmung erfolgt mittels Extinktionsmessung; Ordinate: Extinktion, Abzisse: Zeit

3.3.11.3 Bestimmung von Fraktion 4c mit ADP und Kollagen

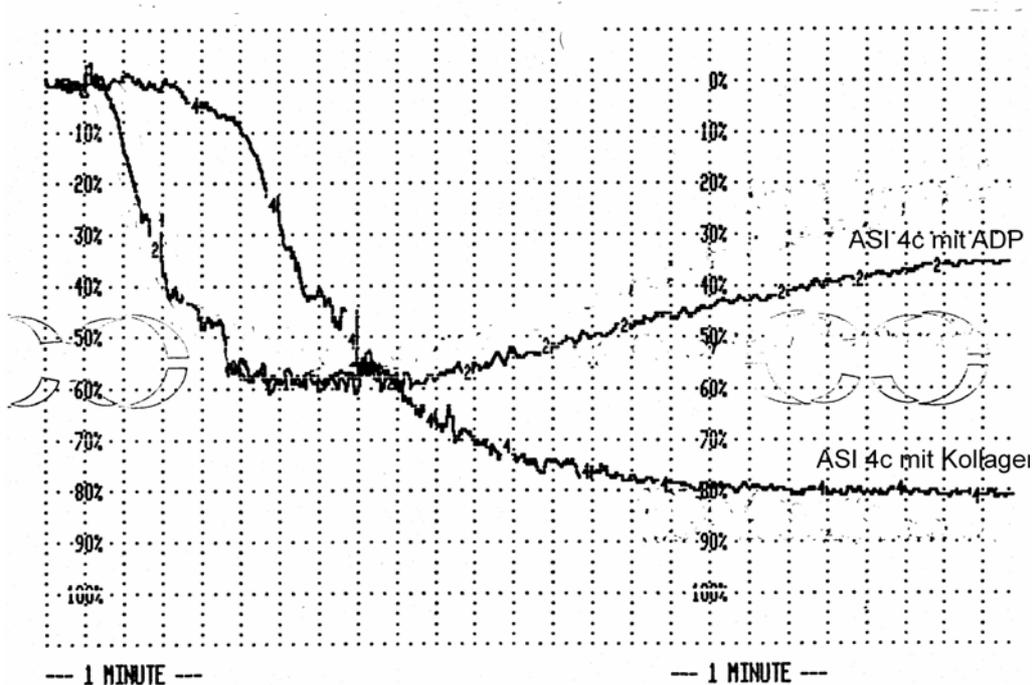


Abb. 90: Plättchenfunktionsbestimmung der Fraktion ASI 4c mit 0,2 μ molarer ADP-Lösung und mit Kollagenlösung (1,9 mg/ml) als induzierendes Agens; die Bestimmung erfolgt mittels Extinktionsmessung; Ordinate: Extinktion, Abzisse: Zeit

3.3.11.4 Bestimmung von den Fraktionen ASI 4d und ASI 4e mit ADP und Kollagen

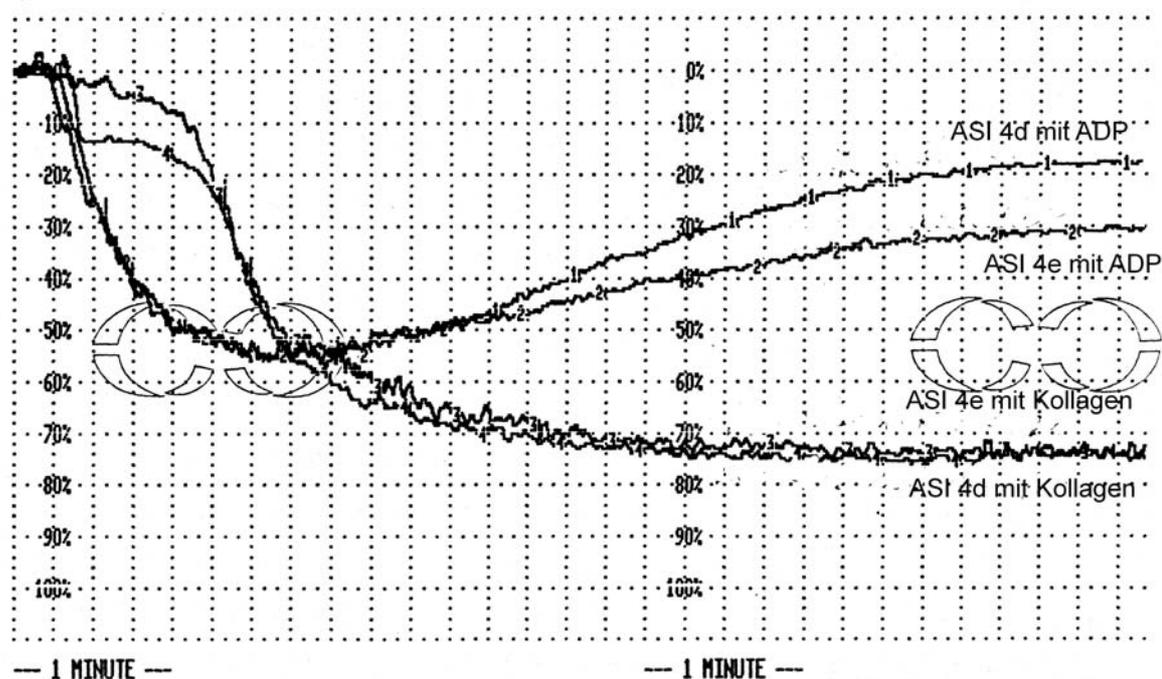


Abb. 91: Plättchenfunktionsbestimmung der Fraktion ASI 4d und ASI 4e mit 0,2 μ molarer ADP-Lösung und mit Kollagenlösung (1,9 mg/ml) als induzierendes Agens; die Bestimmung erfolgt mittels Extinktionsmessung; Ordinate: Extinktion, Abzisse: Zeit

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Plättchenfunktionsbestimmungen in tabellarischer Form zusammengefaßt:

a) Ergebnisse der ADP-induzierten Bestimmungen

Tab. 29: Ergebnisse der ADP-induzierten Plättchenfunktions-Bestimmung

Fraktion	Aggregation [%]
Leerwert mit NaCl	21
ASI 4c	22
ASI 4d	17
ASI 4e	30

Nach Herstellerangaben weist diese Methode einen Variationskoeffizienten von 6 Prozent auf. Dadurch ergibt sich bei einem Leerwert von 21 Prozent Aggregation ein Schwankungsbereich von 15 bis 27 Prozent. Nur einer der Werte liegt außerhalb dieses Schwankungsbereichs: So bewirkt eine die Fraktion ASI 4e eine verstärkte Aggregation unter ADP als Plättchenaggregation-induzierendes Agens im Vergleich zum Leerwert.

b) Ergebnisse der Kollagen-induzierten Bestimmung

Tab. 30: Ergebnisse der Kollagen-induzierten Plättchenfunktions-Bestimmung

Fraktion	Aggregation [%]
Leerwert mit NaCl	89
ASI 4c	81
ASI 4d	75
ASI 4e	72

Auch diese Methode weist nach Herstellerangaben einen Variationskoeffizienten von 6 Prozent auf. Der Schwankungsbereich liegt folglich bei 83 bis 95 Prozent. Aus diesem Bereich fallen die Werte der Fraktionen ASI 4d und 4e heraus, indem sie eine Verringerung der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation herbeiführen.

3.4 Ergebnisse der Toxizitätstests an der Strandkrabbe

3.4.1 Ergebnisse der Fraktionen nach Serdolit- und Sephadex-G-50-Chromatographie

Tabelle 31: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fraktionen von **XAD₂-Fr. 3**

Proben-Nummer	Reaktion (bei üblicher Konz.)	Reaktion (bei sehr hoher Konz.)
ASI 3a	-	-
ASI 3b	-	-
ASI 3c	-	-
ASI 3d	-	-
ASI 3e	-	-
ASI 3f	-	-

Die Sephadex G-50- Fraktionen der Serdolit Fraktion 3 zeigen allesamt keinerlei toxische Wirkung auf die Strandkrabbe. Hiermit läßt sich ausschließen, daß in diesen Fraktionen die *Anemonia sulcata* - Toxine ATX I bis IV enthalten sind.

Tabelle 32: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fraktionen von **XAD₂-Fr. 4**

Proben-Nummer	Reaktion (bei üblicher Konz.)	Reaktion (bei sehr hoher Konz.)
ASI 4a	-	-
ASI 4b	-	-
ASI 4c	-	-
ASI 4d	-	-
ASI 4e	-	-
ASI 4f	-	-

Die Ergebnisse der Krabbentest mit den Sephadex G-50-Fraktionen der Serdolit-Fraktion fallen ebenfalls alle negativ aus. Auch in diesen Fraktionen ist keinerlei Toxinwirkung zu finden.

Tabelle 33: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fraktionen von **XAD₂-Fr. 5**

Proben-Nummer	Reaktion (bei üblicher Konz.)	Reaktion (bei sehr hoher Konz.)
ASI 5a	-	-
ASI 5b	-	-
ASI 5c	-	-
ASI 5d	++++	
ASI 5e	+++	
ASI 5f	+	

Bei den Sephadex G-50-Fraktionen der Serdolit-Fraktion 5 gestaltet sich die Situation anders. Hier ist bei einigen Fraktionen deutliche Toxinwirkung bei der Strandkrabbe festzustellen. Bei diesen Fraktionen handelt es sich um die Fraktionen **ASI 5d, 5e** und **5f**, wobei die Fraktion 5d die stärkste und die Fraktion 5f die schwächste toxische Wirkung aufweist.

Tabelle 34: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fraktionen von **XAD₂-Fr. 6/1**

Proben-Nummer	Reaktion (bei üblicher Konz.)	Reaktion (bei sehr hoher Konz.)
ASI 6/1a	-	-
ASI 6/1b	-	-
ASI 6/1c	++	
ASI 6/1d	-+	
ASI 6/1e	-	-
ASI 6/1f	-	-

In den Sephadex G-50-Fraktionen der Serdolit-Fraktion 6/1 ist bei zwei Fraktionen, nämlich der Fraktion ASI 6/1e und ASI 6/1f, ebenfalls leichte Toxinwirkung feststellbar, allerdings in deutlich geringerem Maße als bei den Folgefraktionen der Serdolit-Fraktion 5.

Tabelle 35: Toxizitätsergebnisse der Sephadex G-50-Fraktionen von **XAD₂-Fr. 6/2**

Proben-Nummer	Reaktion (bei üblicher Konz.)	Reaktion (bei sehr hoher Konz.)
ASI 6/2a	-	-
ASI 6/2b	+-	
ASI 6/2c	-	-
ASI 6/2d	-	-
ASI 6/2e	-	-

Bei den Sephadex G-50-Fraktionen der Serdolit-Fraktion 6/2 ergibt sich in der Fraktion ASI 6/2 eine gewisse Wirksamkeit auf die Strandkrabbe. Allerdings ist dieser Effekt nicht besonders stark ausgeprägt.

Tabelle 36: Toxizitätstestergebnisse der Sephadex G-50-Fraktionen von **XAD₂-Fr. 6/3**

Proben-Nummer	Reaktion (bei üblicher Konz.)	Reaktion (bei sehr hoher Konz.)
ASI 6/3a	-	-
ASI 6/3b	-	-
ASI 6/3c	-	-
ASI 6/3d	-	-

Bei den Sephadex G-50-Fraktionen der Serdolit-Fraktion 6/3 liegt die gleiche Situation vor, wie bei den Folgefraktionen der Serdolit-Fraktionen 3 und 4. Auch hier ist keine toxische Aktivität auf die Strandkrabbe zu konstatieren.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die Toxizität vor allem in den Folgefraktionen der Serdolit-Fraktion 5 zu finden ist. Die Toxizität, die sich in den Fraktionen ASI 6/1c, ASI 6/1d und ASI 6/2b zeigt, ist im Vergleich dazu zu vernachlässigen. Mit diesem Chromatographieschritt ist es demnach bereits gelungen, die Toxine in der Serdolit-Fraktion 5 zu konzentrieren.

Aufgrund dieser Ergebnisse werden die weiteren Krabbentests auf die Folgefraktionen der XAD₂-Fraktion 5 beschränkt, wobei das Hauptaugenmerk auf den Folgefraktionen von **ASI 5d** und **ASI 5e** liegt.

3.4.2 Ergebnisse der Toxizitätstests mit den Folgefraktionen der XAD₂-Fraktion 5

a) XAD₂-Fraktion 5 / Seph. G50-Fr. 4a (entspr. ASI 5d)

Tabelle 37: Toxizitätstestergebnisse der Folgefraktionen von XAD₂-Fraktion 5 / G50-Fr. 4a

Proben-Nummer	weitere Isolationsschritte	Toxizität
01AS937	SP Fr. 1 / G50 Fr. 1	-
01AS939	SP Fr. 2 / G50 Fr. 2	-
01AS941	SP Fr. 3 / G50 Fr. 2	+/-
01AS942	SP Fr. 3 / G50 Fr. 3	-
01AS944	SP Fr. 4 / G50 Fr. 1max	+
01AS945	SP Fr. 5 / G50 Fr. 1a	+
01AS946	SP Fr. 5 / G50 Fr. 1	-
01AS947	SP Fr. 6 / G50 Fr. 1	-
01AS948	SP Fr. 6 / G50 Fr. 2	++++
01AS 949	SP Fr. 7 / G50 Fr. 1	+/-
01AS950	SP Fr. 7 / G50 Fr. 2	++
01AS951	SP Fr. 8 / G50 Fr. 1	+/-
01AS952	SP Fr. 8 / G50 Fr. 2	+ / ++
01AS953	SP Fr. 9 / G50 Fr. 1	-
	SP Fr. 9 / G50 Fr. 2	++
02AS190	SP Fr. 10 / G50 Fr. 1	+/-
02AS191	SP Fr. 10 / G50 Fr. 2	++
01AS954	SP Fr. 11 / G50 Fr. 1a	-
01AS955	SP Fr. 11 / G50 Fr. 1	-
02AS192	SP Fr. 12 / G50 Fr. 1	-
03AS193 (ASIC11)	SP Fr. 12 / G50 Fr. 2	++++
	SP Fr. 13 / G50 Fr. 1	-
	SP Fr. 13 / G50 Fr. 2	-
02AS194 (ASIC 12)	SP Fr. 14 / G50 Fr. 1	-+
02AS195 (ASIC 13)	SP Fr. 14 / G50 Fr. 2	++++
	SP Fr. 14 / G50 Fr. 2-3	+++
02AS196 (ASIC 14)	SP Fr. 14 / G50 Fr. 3	+++
02AS197 (ASIC 15)	SP Fr. 15 / G50 Fr. 1a	-
02AS198 (ASIC 16)	SP Fr. 15 / G50 Fr. 1b	++
02AS199 (ASIC 17)	SP Fr. 15 / G50 Fr. 2	-
02AS522	SP Fr. 16 / G50 Fr. 1	++++
02AS200 (ASIC 18)	SP Fr. 17 / G50 Fr. 1	++
	SP Fr. 17 / G50 Fr. 2	++
02AS201 (ASIC 19)	SP Fr. 17 / G50 Fr. 3	-
	SP Fr. 17 / G50 Fr. 3b	+-(Zittern)
	SP Fr. 18 / G50 Fr. 1	-
02AS202 (ASIC 20)	SP Fr. 18 / G50 Fr. 2	-
	SP Fr. 18 / G50 Fr. 3	-
02AS203 (ASIC 21)	SP Fr. 19 / G50 Fr. 1	-
02AS204 (ASIC 22)	SP Fr. 20 / G50 Fr. 1	+
	SP Fr. 20 / G50 Fr. 2	-
02AS205 (ASIC 23)	SP Fr. 21 / G50 Fr. 2	-
02AS206 (ASIC 24)	SP Fr. 21 / G50 Fr. 2b	-

b) XAD₂-Fr. 5 / Seph. G50 Fr. 4b (entspr. ASI 5e)

Tabelle 38: Toxizitätstestergebnisse der Folgefraktionen von XAD₂-Fraktion 5 / G50-Fr. 4b

Proben-Nummer	weitere Isolationsschritte	Toxizität
01AS588	SP Fr. 1 / G50 Fr. 1	-
01AS589	SP Fr. 2 / G50 Fr. 1a	-
	SP Fr. 2 / G50 Fr. 1	-
01AS590	SP Fr. 3 / G50 Fr. 1a	-
	SP Fr. 3 / G50 Fr. 1/G25 Fr.1	+
	SP Fr. 3 / G50 Fr. 1/G25 Fr.2	-
01AS591	SP Fr. 4 / G50 Fr. 1	-
	SP Fr. 4 / G50 Fr. 2	++
01AS592	SP Fr. 5 / G50 Fr. 1	-
01AS593	SP Fr. 5 / G50 Fr. 2	+
01AS594	SP Fr. 5 / G50 Fr. 3	+/-
	SP Fr. 5 / G50 Fr. 4 / G25 Fr. 1	-
01AS595	SP Fr. 5 / G50 Fr. 4 / G25 Fr. 2b	+++
01AS596	SP Fr. 6 / G50 Fr. 1	+/-
01AS597	SP Fr. 6 / G50 Fr. 2	++++
01AS598	SP Fr. 6 / G50 Fr. 3	+(Zittern)
	SP Fr. 6 / G50 Fr. 4 / G25 Fr. 1	+++
	SP Fr. 6 / G50 Fr. 4 / G25 Fr. 2	-
	SP Fr. 6 / G50 Fr. 4 / G25 Fr. 3	+/-
	SP Fr. 6 / G50 Fr. 5	++-
01AS600	SP Fr. 8 / G50 Fr. 1	-
	SP Fr. 8 / G50 Fr. 2 / G25 Fr. 1	-
	SP Fr. 8 / G50 Fr. 2 / G25 Fr. 2	-
	SP Fr. 8 / G50 Fr. 2 / G25 Fr. 3	-
01AS601	SP Fr. 9 / G50 Fr. 1	++
	SP Fr. 10 / G50 Fr. 1a	-
01AS602	SP Fr. 10 / G50 Fr. 1	++
01AS603	SP Fr. 10 / G50 Fr. 2a	+/-
	SP Fr. 10 / G50 Fr. 2b	-
	SP Fr. 10 / G50 Fr. 3 / G25 Fr. 1	+(Zittern)
	SP Fr. 10 / G50 Fr. 3 / G25 Fr. 2	-
	SP Fr. 10 / G50 Fr. 3 / G25 Fr. 4	+++

Proben-Nummer	weitere Isolationsschritte	Toxizität
01AS604	SP Fr. 10 / G50 Fr. 5	+++
01AS605	SP Fr. 11 / G50 Fr. 1	+++
	SP Fr. 11 / G50 Fr. 2	+
01AS607	SP Fr. 12 / G50 Fr. 1	++++
	SP Fr. 12 / G50 Fr. 2	-+
	SP Fr. 12 / G50 Fr. 3 / G25 Fr. 1	+-
	SP Fr. 12 / G50 Fr. 3 / G25 Fr. 2	+-
01AS608	SP Fr. 13 / G50 Fr. 1 / G50 Fr. 1	+
	SP Fr. 13 / G50 Fr. 2	-
	SP Fr. 14 / G50 Fr. 1	+-
	SP Fr. 15 / G50 Fr. 1a	+
	SP Fr. 15 / G50 Fr. 1	+
	SP Fr. 15 / G50 Fr. 1b	+
01AS609	SP Fr. 15 / G50 Fr. 2	-
01AS610	SP Fr. 17 / G50 Fr. 1	-
	SP Fr. 17 / G50 Fr. 2	-

Während der Krabben tests an den Folgefraktionen von ASI 5d und 5e zeigen etliche Fraktionen eine toxische Wirkung. Besonders ausgeprägt ist diese Wirkung bei den folgenden Fraktionen:

ASI 5d-Folgefraktionen:

- SP Seph. Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 2
- SP Seph. Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 2
- SP Seph. Fr. 14 / Seph. G-50 Fr. 2
- SP Seph. Fr. 14 / Seph. G-50 Fr. 2-3
- SP Seph. Fr. 14 / Seph. G-50 Fr. 3
- SP Seph. Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 1

ASI 5e-Folgefraktionen:

- SP Seph. Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4 / Seph. G-25 Fr. 2b
- SP Seph. Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 2
- SP Seph. Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 4 / Seph. G-25 Fr. 1
- SP Seph. Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 3 / Seph. G-25 Fr. 4
- SP Seph. Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 1

3.5 Ergebnisse der Massenspektrometrie

3.5.1 statistische Betrachtung der massenspektrometrischen Untersuchungen

Untersuchungen bezüglich der Präzision und Genauigkeit der angewendeten Methode wurden nicht eigens für diese Arbeit durchgeführt. Vielmehr wurde hier auf Literaturdaten zurückgegriffen, welche sich auf ein Quadrupol-Massenspektrometer beziehen. Es können ähnliche Zusammenhänge für ein Ion-Trap-Gerät angenommen werden. So beträgt die erreichbare Präzision der Massenbestimmung an einem Quadrupol-Massenspektrometer knapp 0,01 %. Außerdem ist in der Regel mit einer Genauigkeit von 0,03 bis 0,005 % zu rechnen. Dies bedeutet beispielsweise für ein Molekül mit einem Molekulargewicht von 10000 Da einen maximalen Schwankungsbereich von +/- 3 Da.

Das Gerät wurde vor der Untersuchung mit Hilfe nicht-peptidischer Substanzen kalibriert.

3.5.2 allgemeine Aspekte der Auswertung

Bei der Molekulargewichtsbestimmung von Peptiden und Proteinen muß der Isotopeneffekt in Betracht gezogen werden. Aus diesem Grunde ist es notwendig, zwischen der monoisotopischen Masse und der mittleren Masse zu unterscheiden. Für die Berechnung der monoisotopischen Masse werden stets die Isotope der kleinsten Masse herangezogen. Bei Molekülen mit einem Molekulargewicht unter 1200 Da entsprechen die Verhältnisse weitestgehend dieser Berechnung: Hier wird das intensivste Signal in einem Massenspektrum durch monoisotopische Moleküle verursacht. Je größer die Moleküle werden, desto größer wird der Anteil schwererer Isotope. Beispielsweise liegt C-13-Kohlenstoff natürlicherweise in einer Häufigkeit von 1,1 % vor bezogen auf das gesamte Kohlenstoffvorkommen. Dies macht sich bei dem mittleren Molekulargewicht größerer Moleküle bemerkbar.

3.5.3 theoretische Berechnung der mittleren Molekulargewichte der untersuchten Proben

Aus den erhaltenen Massenspektren läßt sich nun das Molekulargewicht der untersuchten Verbindungen berechnen. Wie dies gelingt, wird im Folgenden hergeleitet.

Zunächst soll die Differenz zweier benachbarter m/z -Werte gebildet werden. Dabei entsprechen m_1 bzw. m_2 den Massen der jeweiligen Moleküle, während q_1 bzw. q_2 ihre Ladung darstellen. Daraus ergibt sich für die Differenz folgender Zusammenhang:

$$\Delta = \frac{m_2}{q_2} - \frac{m_1}{q_1}$$

Aufgrund der Tatsachen, daß es unter den gewählten Bedingungen bei der Ionisation zu keiner Fragmentierung der untersuchten Moleküle kommt und daß zu der Ionenbildung ausschließlich Protonen herangezogen werden, deren Molekulargewicht vernachlässigbar ist, kann davon ausgegangen werden, daß m_1 und m_2 nahezu identisch sind. Man kann demnach Folgendes voraussetzen:

$$m_1 = m_2 = M$$

Daher gilt für die obige Differenz Δ :

$$\Delta = \frac{M}{q_2} - \frac{M}{q_1} = M \left(\frac{1}{q_1} - \frac{1}{q_2} \right) = \frac{M}{q_1 q_2} (q_1 - q_2)$$

Stellt man diese Gleichung etwas um, ergibt sich:

$$\frac{M}{q_1 \Delta} = \frac{q_2}{q_1 - q_2}$$

Durch weitere Umstellung erhält man folgende Gleichungen:

$$Q_1 = \frac{M / q_1}{\Delta} = \frac{q_2}{q_1 - q_2}$$

$$Q_2 = \frac{M / q_2}{\Delta} = \frac{q_1}{q_1 - q_2}$$

Man kann nun davon ausgehen, daß die beiden benachbarten Peaks von Molekülen verursacht werden, die in ihrer Ladung um 1 variieren. Man nehme also an, daß q_1 eine positive Ladung mehr besitzt als q_2 . Demzufolge gilt:

$$q_1 - q_2 = 1$$

$$Q_1 = q_2$$

$$Q_2 = q_1$$

Aus dem bisher Gesehenen läßt sich schließen, daß aus den erhaltenen Daten die Ladung der Moleküle zu ermitteln ist, die diesen Peak verursachen. Dazu muß zunächst die Differenz der m/z-Werte zweier benachbarter Peaks gebildet werden. Dividiert man darauhin die beiden m/z-Werte nacheinander durch die zuvor gebildete Differenz, so erhält man die Ladung q des jeweils anderen Peaks.

Mit Hilfe der ermittelten Ladung läßt sich aus dem m/z-Wert die entsprechende Masse des Molekülions berechnen, welches den Peak verursacht. Um nun das Molekulargewicht des ursprünglichen Moleküls zu ermitteln, muß bedacht werden, daß sich bei der Ionenbildung je nach Ladung eine bestimmte Anzahl von Protonen an das Molekül angelagert haben. Handelt es sich beispielsweise um ein vierfach positiv geladenes Ion, so müssen von der ermittelten Molekülionenmasse vier Dalton subtrahiert werden, um das Molekulargewicht des Moleküls zu erhalten.

3.5.4 Berechnungsbeispiel anhand der Probe MS 2 (02 AS 205)

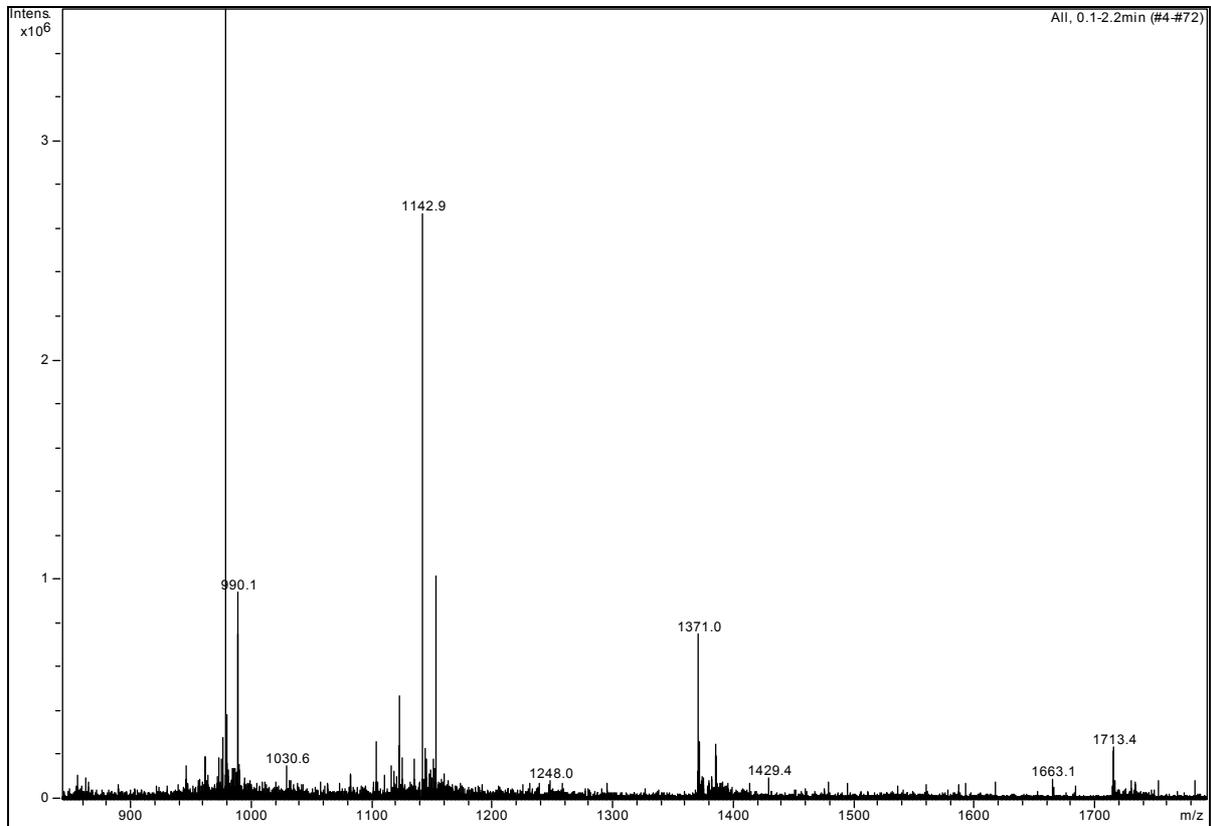


Abb. 92: Massenspektrum der Probe **02AS205**;

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

In dem Spektrum erkennt man drei markante m/z-Werte (980,3 (ganz großer Peak), 1143,4 und 1371,9 Da).

Um die Ladung des Moleküliions, welches den entsprechenden Peak verursacht hat, bestimmen zu können muß man zunächst die Differenz der nebeneinander liegenden Peaks berechnen:

$$1142,9 \text{ Da} - 980,3 \text{ Da} = 162,6 \text{ Da}$$

Anschließend werden beide der m/z-Werte durch die errechnete Differenz geteilt. Das Ergebnis zeigt den Betrag der Ladung der jeweils den anderen Peak erzeugenden Moleküliionen an:

$$1142,9 \text{ Da} : 162,6 \text{ Da} = 7$$

$$980,3 \text{ Da} : 162,6 \text{ Da} = 6$$

Dies bedeutet, daß die Moleküliionen, die den Peak bei dem m/z-Wert 1142,9 Da verursachen, 6-fach positiv geladen sind, während die Moleküliionen, die für den Peak bei 980,3 Da verantwortlich sind, eine 7-fache positive Ladung besitzen. Ebenso vorgehen kann man mit den Peaks bei 1142,9 Da und bei 1371,0 Da:

$$1371,0 \text{ Da} - 1142,9 \text{ Da} = 228,1 \text{ Da}$$

$$1371,0 \text{ Da} : 228,1 \text{ Da} = 6$$

$$1142,9 \text{ Da} : 228,1 \text{ Da} = 5$$

Das Ergebnis ist deckungsgleich mit dem Ergebnis des anderen Wertepaares. So ergibt sich für den Peak bei 1142,9 Da eine 6-fach positive Ladung. Die Molekülionen bei dem m/z-Wert 1371,0 Da besitzen eine 5-fach positive Ladung. Diese Ergebnisse zeigen, daß die richtigen m/z-Peaks zur Berechnung des Molekulargewichts herangezogen wurden.

Nun muß der m/z-Wert noch mit seiner Ladung multipliziert werden, und das Molekulargewicht der Protonen, die zur Ionenbildung herangezogen wurden, subtrahiert werden, und man erhält das Molekulargewicht des untersuchten Peptids.

$$980,3 \text{ Da} \cdot 7 - 7 \text{ Da} = 6855,1 \text{ Da}$$

$$1142,9 \text{ Da} \cdot 6 - 6 \text{ Da} = 6851,4 \text{ Da}$$

$$1371,9 \text{ Da} \cdot 5 - 5 \text{ Da} = 6854,5 \text{ Da}$$

Berechnet man hieraus den Mittelwert, so ergibt sich Molekulargewicht von circa 6854 Da für das untersuchte Polypeptid.

Die Molekulargewichte der übrigen Proben werden analog zu diesem Beispiel berechnet.

3.5.5 Massenspektren der untersuchten Proben

MS 1 (02 AS 479)

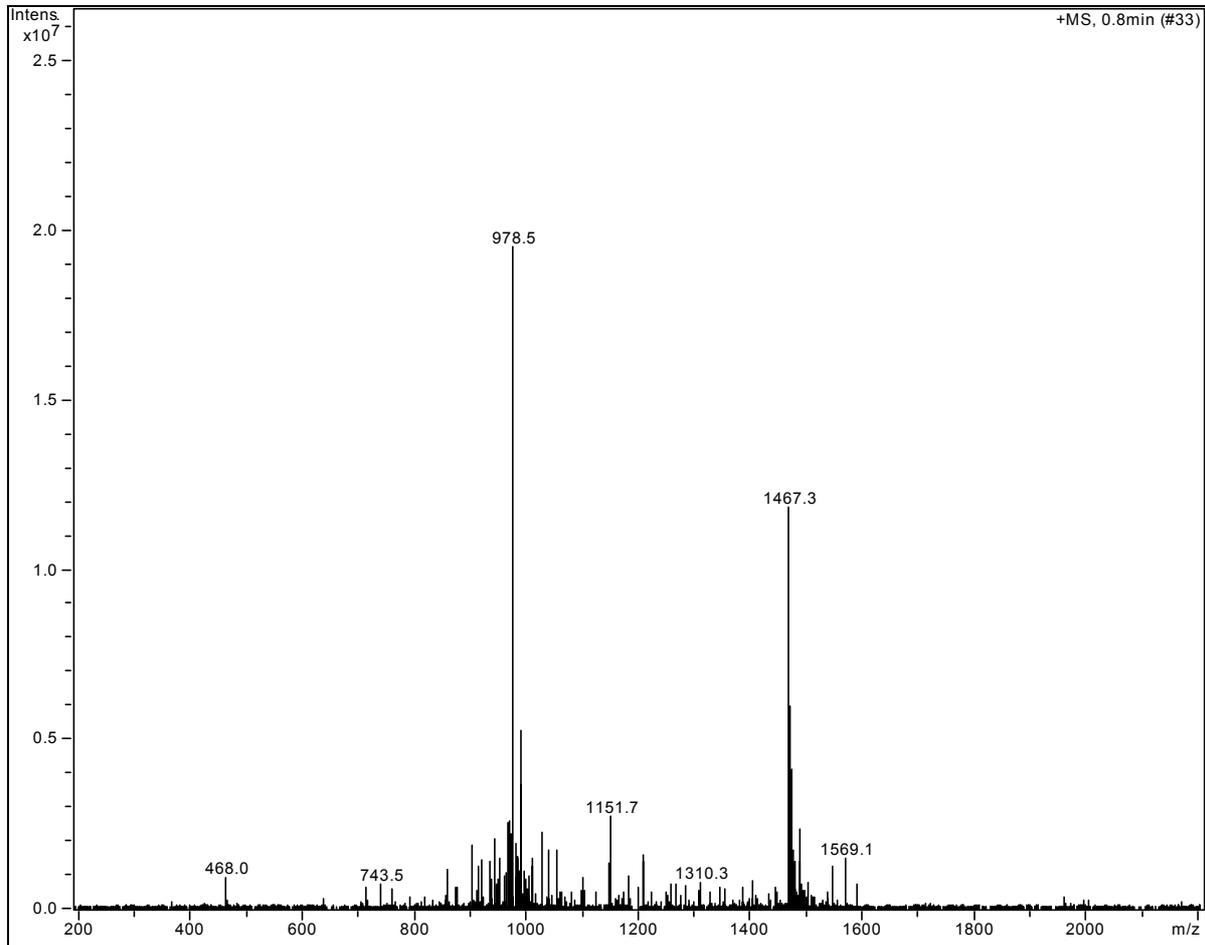


Abb. 93: Massenspektrum der Probe **02AS479**;

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

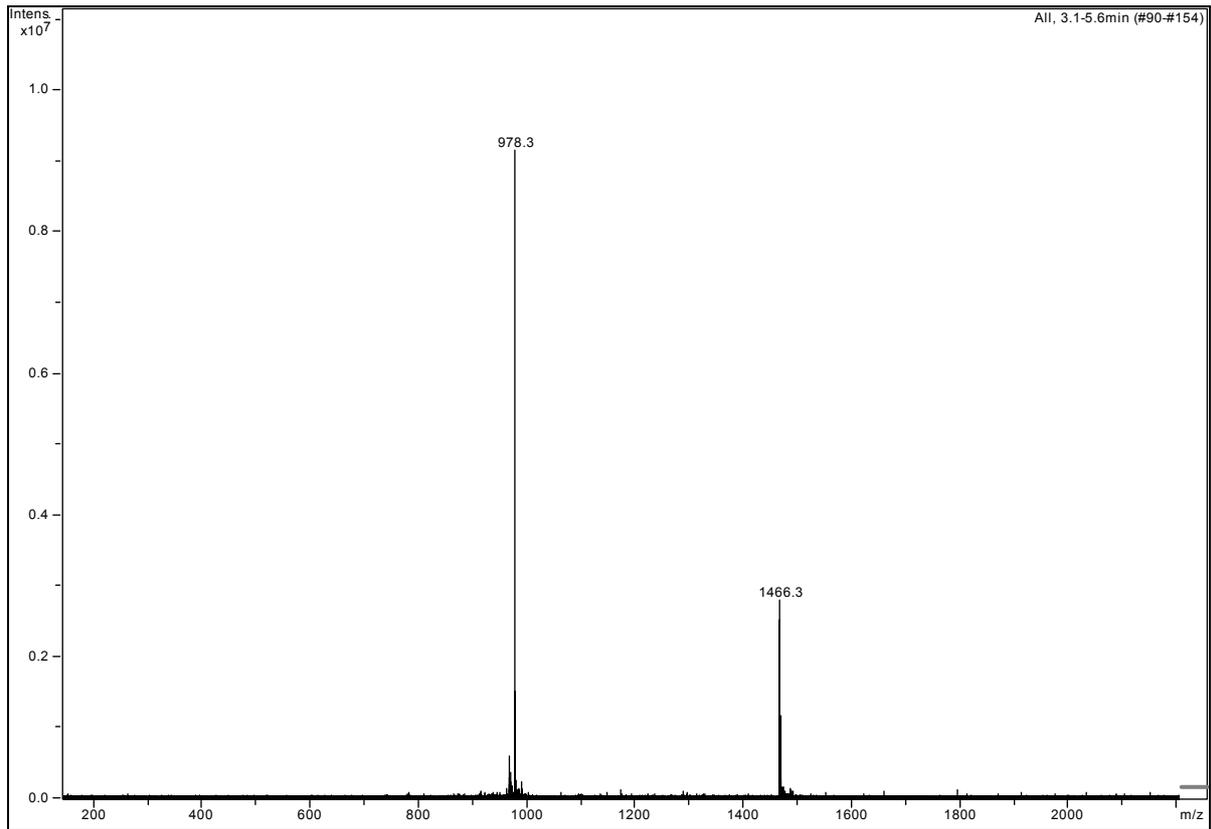
MS 3 (02 AS 480)

Abb. 94: Massenspektrum der Probe **02AS480**;

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

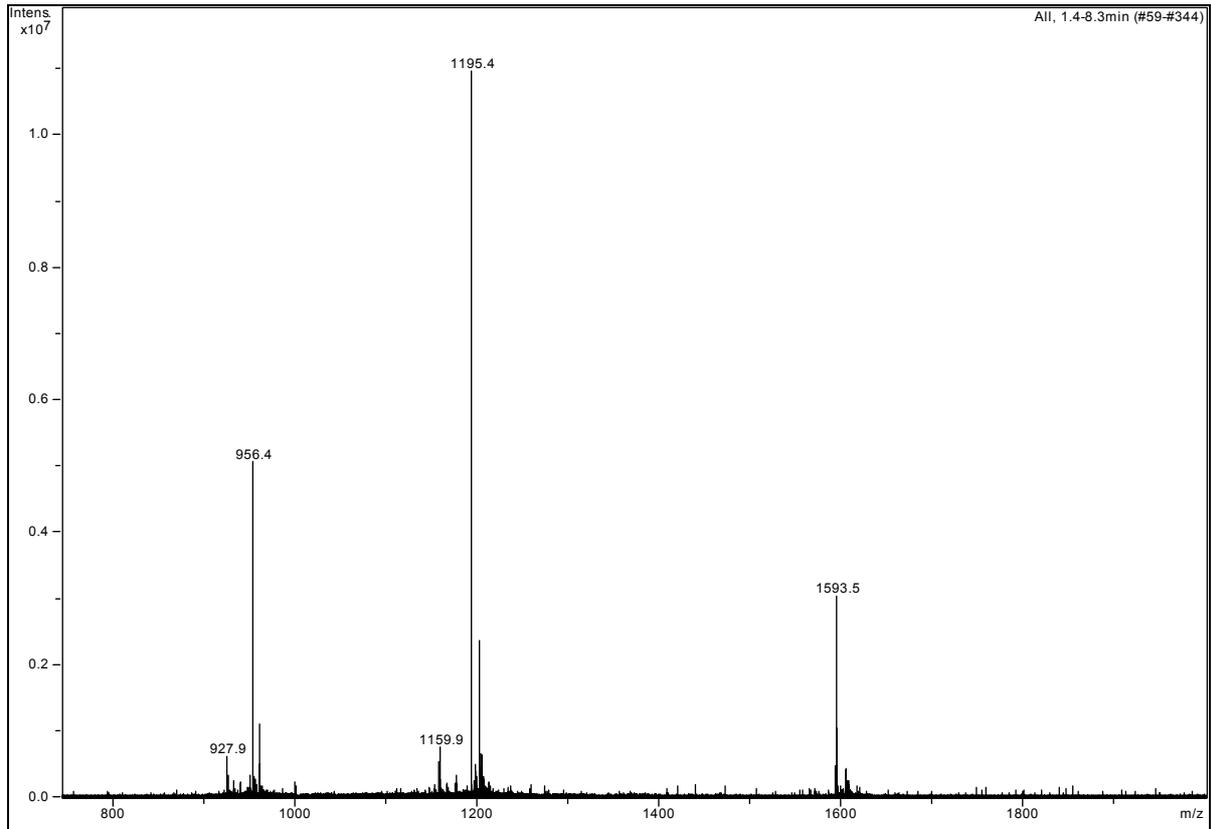
MS 4 (01 AS 607)

Abb. 95: Massenspektrum der Probe **01AS607**;

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

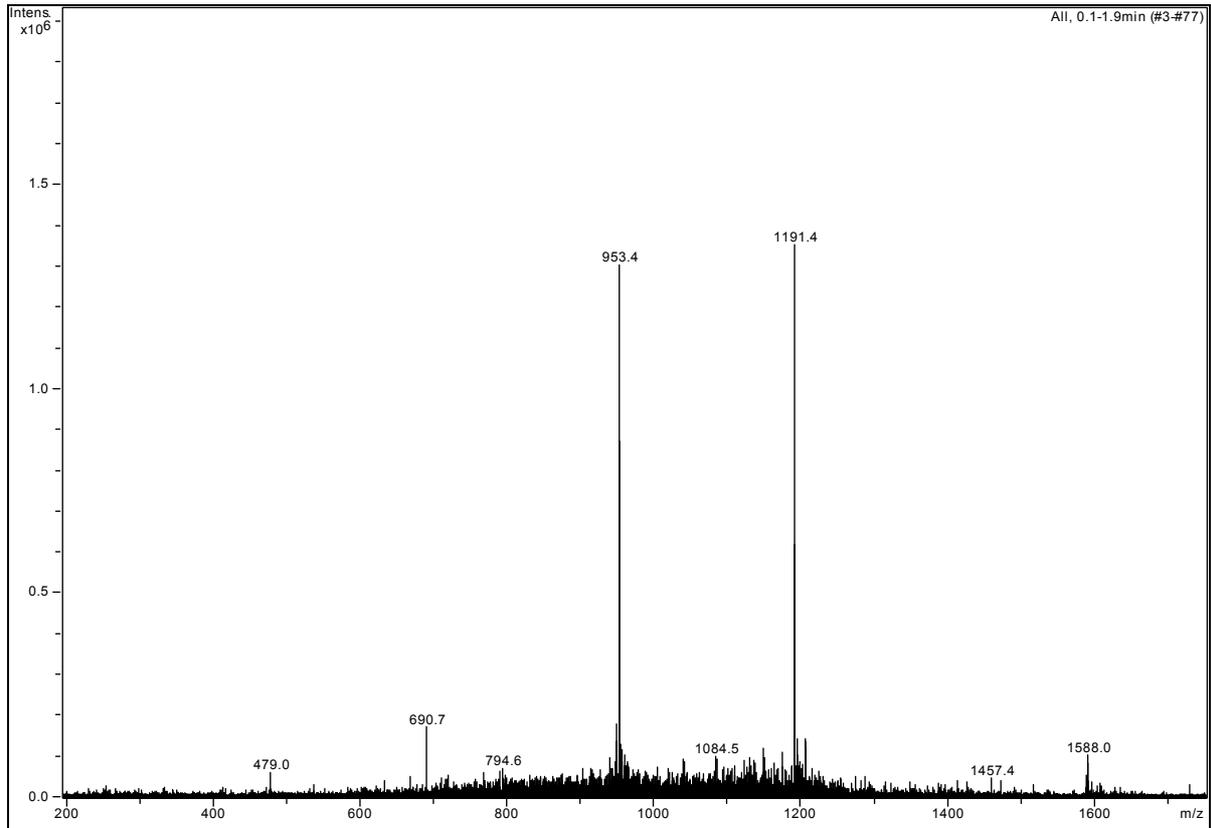
MS 5 (01 AS 600)

Abb. 96: Massenspektrum der Probe **01AS600**;

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

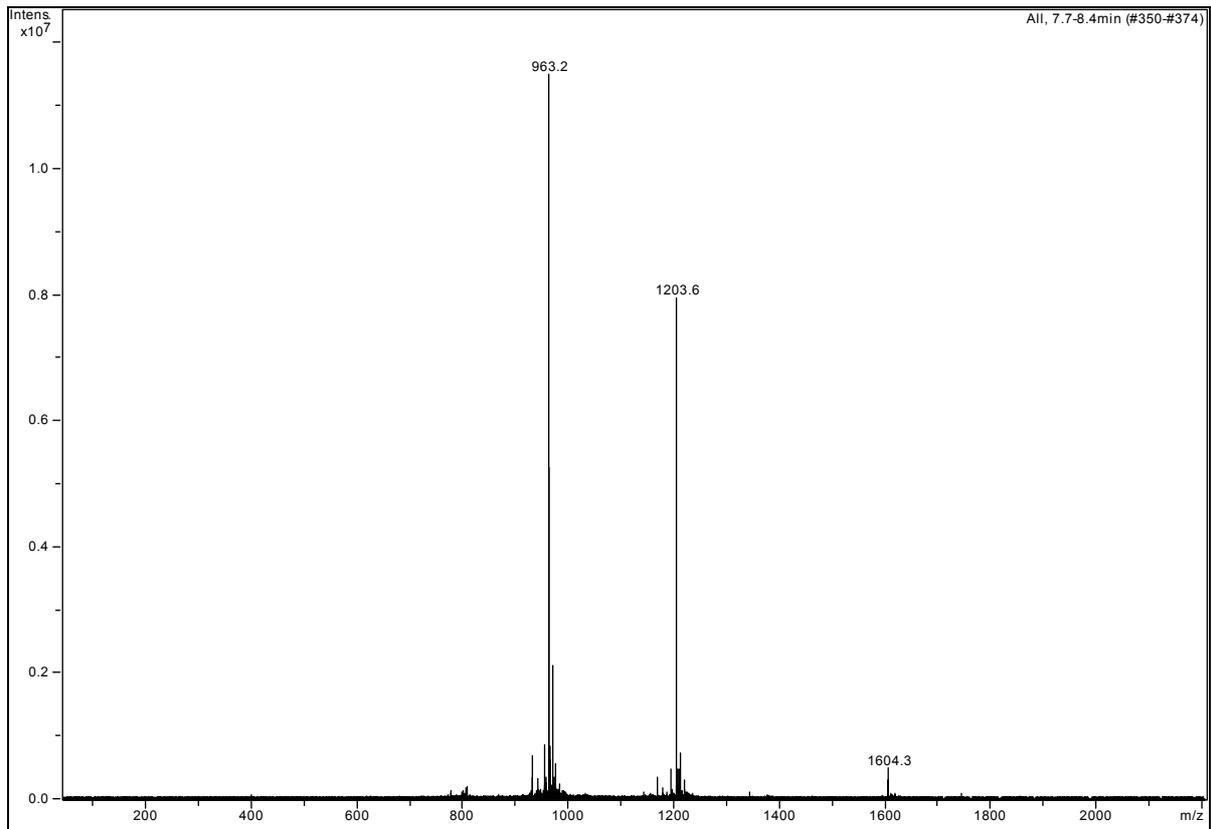
MS 6 (02 AS 199)

Abb. 97: Massenspektrum der Probe **02AS199**;

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

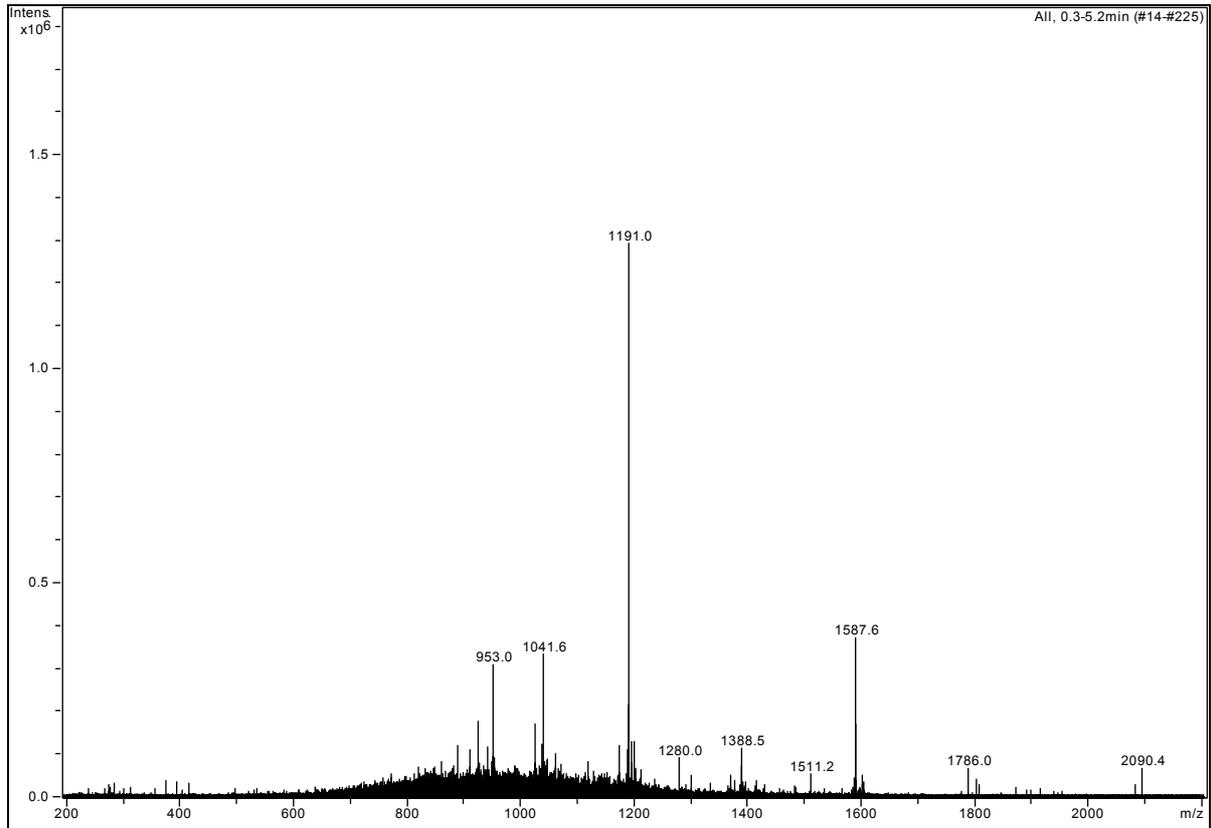
MS 7 (01 AS 952)

Abb. 98: Massenspektrum der Probe **01AS952**

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

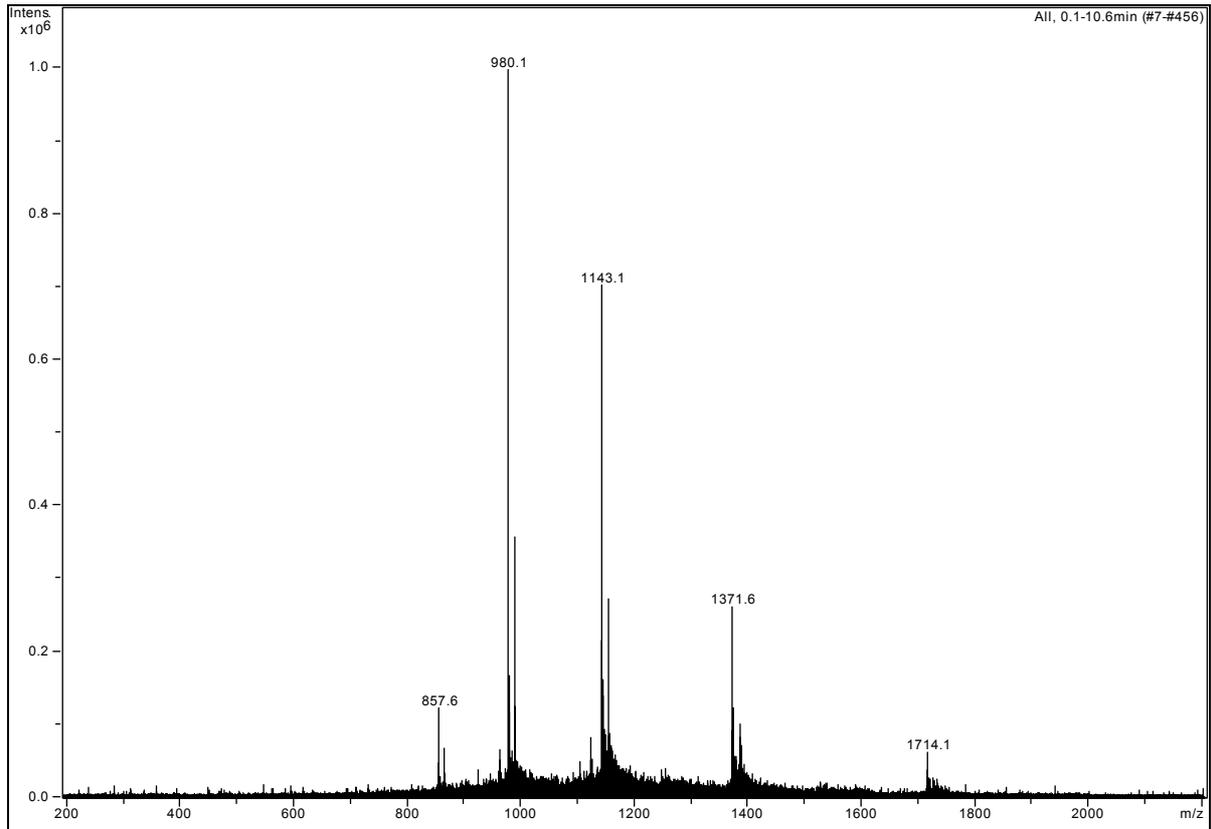
MS 8 (01 AS 610)

Abb. 99: Massenspektrum der Probe **01AS610**

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

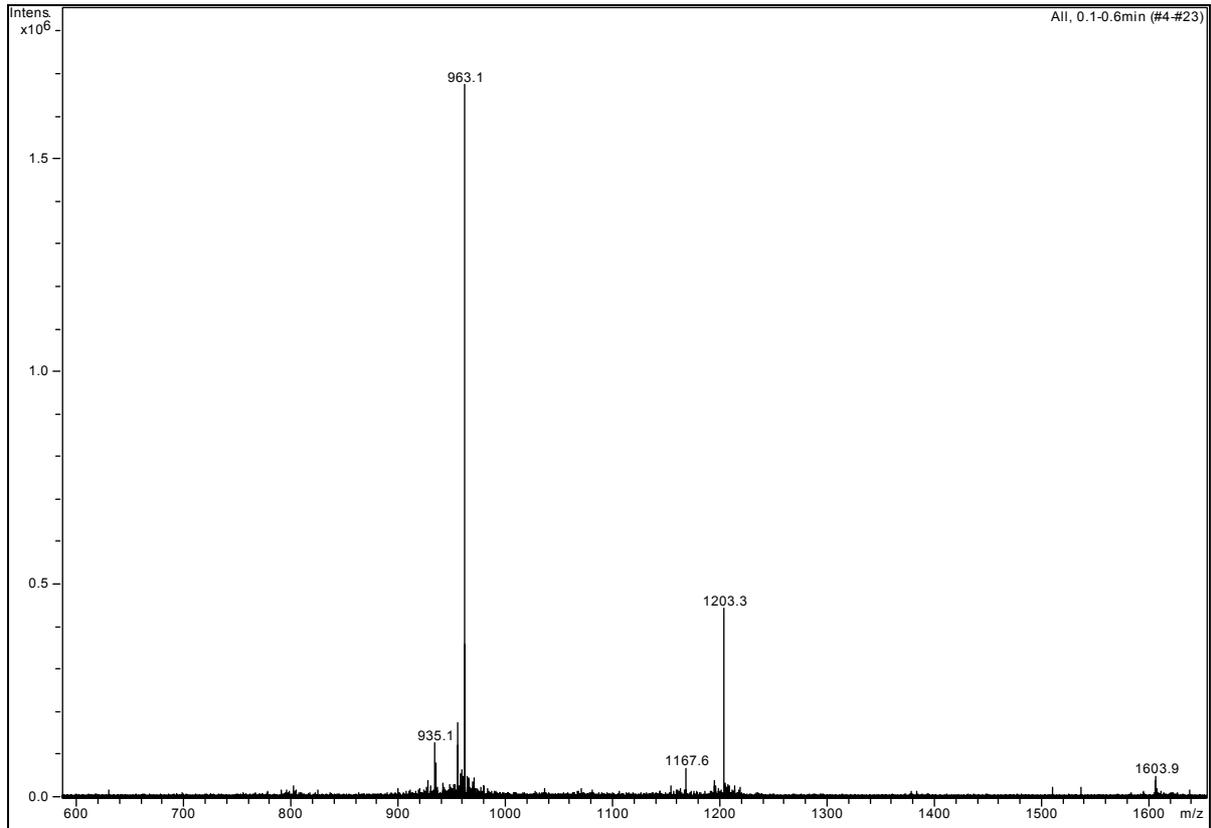
MS 9 (01 AS 608)

Abb. 100: Massenspektrum der Probe **01AS608**

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

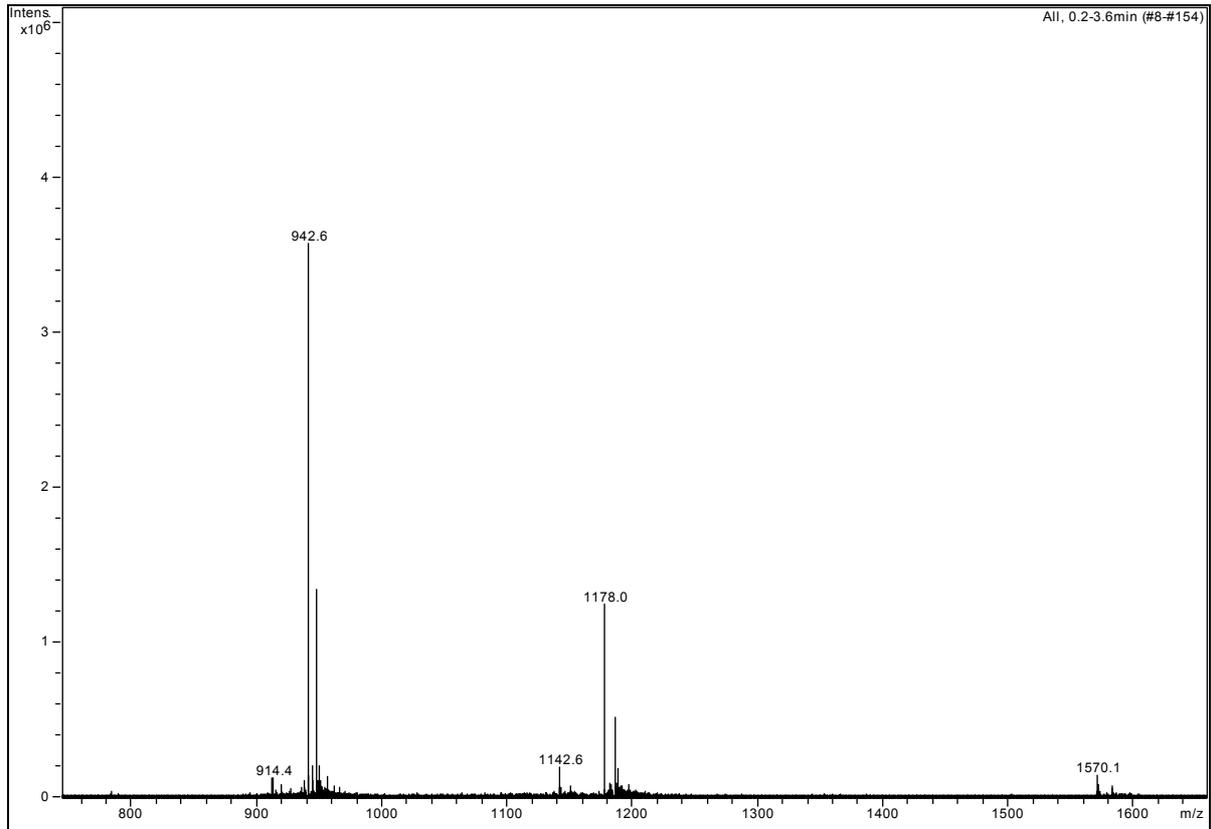
MS 10 (01 AS 609)

Abb. 101: Massenspektrum der Probe **01AS609**

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

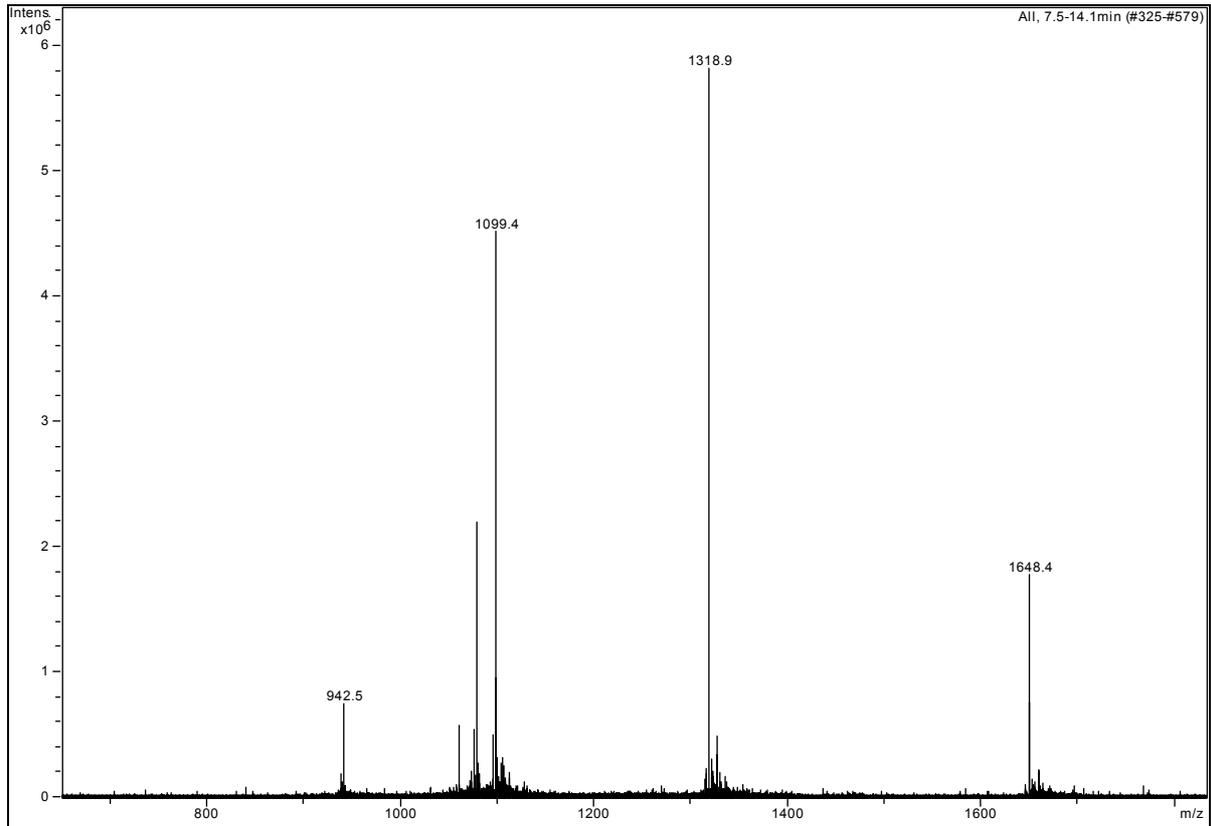
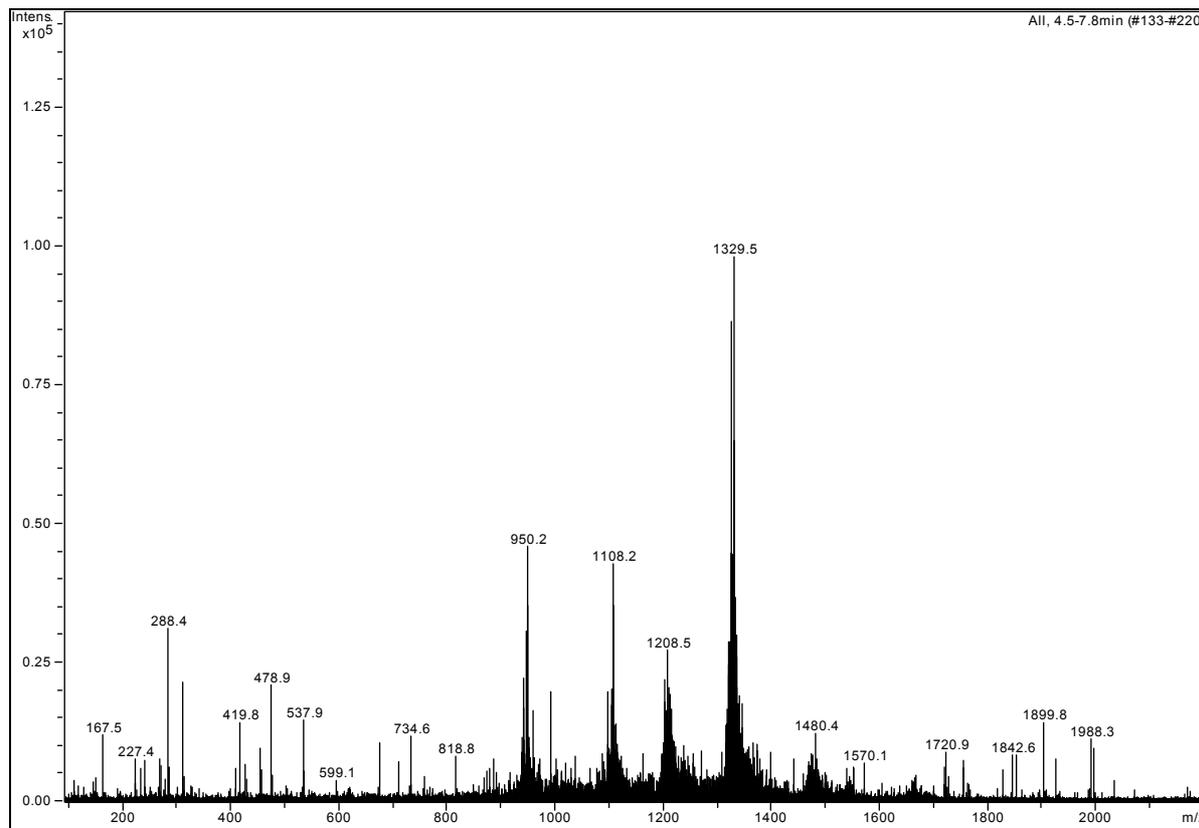
MS 11 (02 AS 505)

Abb. 102: Massenspektrum der Probe **02AS505**

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

MS 12 (02 AS 509)Abb. 103: Massenspektrogramm der Probe **02AS509**

0,1 µg Probe - gelöst in je 100 µl Aqua dest. und Acetonitril mit einem Zusatz von 10 µl Essigsäure - wird mit einer Flußrate von 100 µl/h mittels Electrospray-Methode in die Gasphase überführt und mit Hilfe des Esquire LC-Massenspektrometers (Firma Bruker, Bremen) vermessen

3.3.6 ermittelte Molekulargewichte der untersuchten Proben

Bei der Berechnung der Molekulargewichte der untersuchten Seanemonenfraktionen ergeben sich folgende Werte:

Tab. 39: Ergebnisse der massenspektrometrischen Molekulargewichtsbestimmung

MS-Nummer	Proben-Nummer	mittleres Molekulargewicht [Da]
MS 1	02 AS 479	2933
MS 2	02 AS 205	6850
MS 3	02 AS 480	2931
MS 4	01 AS 607	4778
MS 5	01 AS 600	4762
MS 6	02 AS 199	4810
MS 7	01 AS 952	4760
MS 8	01 AS 610	6853
MS 9	01 AS 608	4809
MS 10	01 AS 609	4708
MS 11	02 AS 505	6590
MS 12	02 AS 509	13285

4. Diskussion

Mit den hier vorgelegten Untersuchungen wurde angestrebt, verschiedene biologisch aktive Inhaltsstoffe der Seeanemone *Anemonia sulcata* zu isolieren und diese anschließend auf ihre neurotoxischen Wirkungen einerseits und auf ihre Effekte auf das menschliche Gerinnungs- und Fibrinolyse-System andererseits zu untersuchen.

Die Isolierung bestimmter wirksamer Polypeptide aus dem Extrakt eines Gewebehomogenats, in dem eine Vielzahl verschiedener wasserlöslicher organischer und anorganischer Verbindungen nebeneinander vorhanden sind, ist nach wie vor ein schwieriges Unterfangen. So hat es in den vergangenen Jahrzehnten nicht an Versuchen gefehlt, durch ständige Verbesserung der Isolationsmethoden die wertvollen Inhaltsstoffe der Seeanemone *Anemonia sulcata* (z. B. Proteinaseinhibitoren, Toxine, BDS-Peptide) zu isolieren (Béress et al., 1971; Béress et al., 1975; Béress et al., 1985; Sanchez-Rodriguez et al., 1996; Wachter et al., 1997).

In der Weiterführung dieser Bestrebungen wurde im Rahmen dieser Dissertation ein Isolationsverfahren ausgearbeitet, welches einerseits bezüglich des Materialaufwandes eine verhältnismäßig einfache Möglichkeit der schnellen Anreicherung biologisch aktiver Polypeptide bietet, andererseits jedoch auch die Problematik und die Komplexität dieser Isolierungsarbeiten widerspiegelt.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, eine schnelle und effiziente simultane Isolierung der Toxine und Proteinaseinhibitoren der Seeanemone *Anemonia sulcata* zu erreichen. Um beurteilen zu können, ob das abgesteckte Ziel erlangt wurde, muß man die Verteilung der biologischen Aktivitäten (Wirkung auf die Gerinnungsparameter und toxische Wirkung auf die Strandkrabbe) über die Fraktionen genauer betrachten.

Die ersten biologischen Aktivitätstests wurden nach der Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2 und der Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50 durchgeführt. Bei diesen Tests handelte es sich zum einen um die Gerinnungstests. Um nun erkennen zu können, ob die Seeanemonenfraktionen einen deutlichen Einfluß auf das Gerinnungsgeschehen haben, erscheint es zweckmäßig, sich die Ergebnisse der globalen Gerinnungstests vor Augen zu führen.

Bezüglich des Quickwertes bleibt festzustellen, daß keine der untersuchten Fraktionen eine bemerkenswerte Erhöhung oder Erniedrigung desselbigen bewirkt (Abschnitt 2.4.8, S. 67-68 und Abschnitt 3.3.2, S. 133-137). Daher läßt sich die Aussage treffen, daß bei keiner der Fraktionen eine Aktivität gegenüber dem exogenen Gerinnungssystem zu finden ist.

Im Gegensatz hierzu kommt es bei der aPTT-Bestimmung zu interessanten Ergebnissen im Sinne einer Wirkung auf das endogene Gerinnungssystem (Abschnitt 2.4.9, S. 68-69 und Abschnitt 3.3.2, S. 133-137). So ist bei zwei Sephadex-G-50-Folgefraktionen der Serdolit-Fraktion 3 (ASI 3b und ASI 3c, siehe Abschnitt 3.4.2, S. 60-62 zur Erläuterung der Kürzel) eine Verlängerung der aPTT zu erkennen. Eine noch deutlichere Verlängerung der aPTT jedoch zeigt sich in zwei Sephadex-G-50-Folgefraktionen der Serdolit-AD-2-Fraktion 4, nämlich in ASI 4d und ASI 4e. Bei den Folgefraktionen der Serdolit-AD-2-Fraktionen 6/1, 6/2 und 6/3 läßt sich hingegen keine deutliche Verlängerung oder Verkürzung der aPTT konstatieren. Für die Folgefraktionen der Serdolit-AD-2-Fraktion 5 wiederum ist eine geringe Verlängerung der aPTT in den Fraktionen ASI 5d und ASI 5e zu verzeichnen, die allerdings im Vergleich zu dem Effekt der Fraktionen ASI 3b, 3c, 4d und 4e vernachlässigt werden kann.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß eine deutlich hemmende Wirkung auf das endogene Gerinnungssystem durch einige der Seeanemonenfraktionen erfolgt, welche sich in einer

aPTT-Verlängerung äußert. Am ausgeprägtesten zeigt sich diese in den Folgefraktionen der Serdolit-Fraktion 4. Aufgrund dieser Tatsache kann man von einer Aufkonzentrierung der gerinnungsaktiven Substanzen in der Serdolit-AD-2-Fraktion 4 sprechen. Diese gerinnungsaktive Wirkung ist höchstwahrscheinlich auf die Proteinaseinhibitoren der Seeanemone zurückzuführen. So haben H. D. Bruhn und L. Béress bereits 1978 die Wirkung der Proteinaseinhibitoren auf den endogenen Ast der plasmatischen Gerinnung beschrieben, welche sich in einer Verlängerung der aPTT niederschlägt. Demnach sammeln sich die Proteinaseinhibitoren vor allem in der Serdolit-Fraktion 4 an (Chromatogramm der Serdolit-Chromatographie siehe Abschnitt 3.1.1, Abb. 7, S. 90).

Der andere Teil der biologischen Aktivitätstests bestand in der Untersuchung der Toxizität der Seeanemonenfraktionen auf die Strandkrabbe (Abschnitt 2.5, S. 86 und Abschnitt 3.4, ab S. 152). Hierbei ergab sich, daß bei der Strandkrabbe durch die Sephadex-G-50-Folgefraktionen der Serdolit-Fraktionen 3 und 4 keine tetanischen Krämpfe ausgelöst werden konnten. Das gleiche gilt für die Folgefraktionen der Serdolit-Fraktion 6/3. Die sehr geringe Toxizitätswirkung auf die Strandkrabbe der Fraktionen ASI 6/2b, ASI 6/1c und 6/1d ist im Vergleich zu der Toxizität der Fraktionen ASI 5d und 5e zu vernachlässigen. Vielmehr kann sie auf geringfügige Verschleppung der Toxine in die erwähnten Fraktionen zurückgeführt werden. Alles in allem findet eine fast hundert prozentige Akkumulation der auf die Strandkrabbe toxisch wirkenden Substanzen in der Serdolit-Fraktion 5 statt. Es ist bekannt, daß die toxische Wirkung auf einer Verzögerung der Inaktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle beruht, die durch die Toxine I bis IV der *Anemonia sulcata* bedingt wird. Demnach bewirkt die Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2 eine Anhäufung der Toxine in der Serdolit-Fraktion 5 (Chromatogramm der Serdolit-Chromatographie siehe Abschnitt 3.1.1, Abb. 7, S. 90).

Unter Berücksichtigung des oben Gesagten bleibt festzustellen, daß bereits der erste Chromatographieschritt der gewählten Methode, nämlich die Adsorptionschromatographie an Serdolit AD-2, eine weitestgehende Trennung der beiden Zielsubstanzgruppen Toxine und Proteinaseinhibitoren auf eine einfache und schnelle Art und Weise erlaubt. Diese Abtrennung ist ein wichtiger Schritt in der Isolierung der beiden Substanzgruppen.

Nun sind beide Substanzgruppen zwar grob voneinander getrennt, aber von wirklichem Nutzen sind sie nur im Reinzustand. Wie schnell gelingt es mittels der angewendeten Methode, diesen Zustand herbeizuführen? Diese Fragestellung wird im folgenden anhand der Ergebnisse der HPLC- und Massenspektrometrieanalysen eingehend beleuchtet werden.

Über den Reinheitszustand der Fraktionen geben die HPLC-Analysen Aufschluß. Hier sollen zunächst die vermeintlichen Proteinaseinhibitoren betrachtet werden. Der Abschnitt 3.2.1 a) (S. 122) belegt, daß nach der ersten Ionenaustauschchromatographie der Fraktion XAD₂-Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b an SP Sephadex C-25 und anschließender Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50 die Reinheit der gewonnenen Fraktionen noch zu wünschen übrig läßt und keine von ihnen für eine massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung geeignet ist (Abschnitt 3.2.2 a), S. 125 bis 126, Abbildungen 62 bis 66). Aus diesem Grunde mußten diese Proben erneut an Kationenaustauschern (SP Sephadex C-25 oder Bio Rad Macro-Prep® High S Support) rechromatographiert werden, um massenspektrometrisch gut definierbare Inhibitorproben zu erhalten. In zwei Fällen ist dieses Unterfangen gelungen, nämlich bei den Fraktionen 02 AS 505 und 02 AS 509 (siehe Übersicht über HPLC-Nummerierung in Übersichtsabbildungen 45 bis 53, S. 117 -121 und im Anhang). Sie weisen nach der weiteren Aufreinigung Chromatogramme in den HPLC-Analysen auf, die auf einen hohen Reinheitsgrad schließen lassen (siehe Abschnitt 3.2.3 a), S. 128, Abb. 73 u. 74). Die Vorfraktionen der Fraktionen 02 AS 505 und 02 AS 509 zeigten in den Gerinnungsanalysen eine deutliche Verlängerung der aPTT. Daher ist zu vermuten, daß sich hinter diesen Fraktionen Proteinaseinhibitoren verbergen könnten. Über die

Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* weiß man, daß ihr Molekulargewicht circa zwischen 6000 und 6500 Dalton liegt. Das ermittelte Molekulargewicht der Fraktion 02 AS 505 liegt mit 6590 Dalton knapp außerhalb dieses Bereichs. Aufgrund der Eigenschaften in den Gerinnungstests liegt aber trotzdem die Vermutung nahe, daß es sich um einen Proteinaseinhibitor handelt. Bekannterweise existieren von diesen Proteinaseinhibitoren aus der *Anemonia sulcata* verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen Molekulargewichten, daher ist es möglich, daß die Substanz mit dem mittleren Molekulargewicht von 6590 Dalton ein Proteinaseinhibitor ist. Das Molekulargewicht der Substanz 02 AS 509 liegt bei 13285 Dalton und damit deutlich über dem Molekulargewicht der Proteinaseinhibitoren. Allerdings ist auffällig, daß die Substanz 02 AS 509 ein in etwa verdoppeltes Molekulargewicht im Vergleich zu den Proteinaseinhibitoren aufweist. Denkbar wäre demnach, daß es zwischen zwei Proteinaseinhibitormolekülen zu einer Dimerisierung gekommen ist. Ein derartiges Verhalten dieser Substanzgruppe ist jedoch noch nie in der Literatur beschrieben worden. Eine weitere Möglichkeit wäre das Vorliegen von Phospholipasen, die in diesem Molekulargewichtsbereich liegen und ebenfalls gerinnungsaktiv sind (Lill, 1999). Bisher wurde noch nicht über das Vorkommen von Phospholipasen in der Seeanemone *Anemonia sulcata* berichtet.

Ein wenig anders gestaltet sich das Bild bei den HPLC-Analysen der vermeintlichen Toxinfraktionen. So ist hier sowohl bei den Folgefraktionen der Fraktion XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a als auch bei den Folgefraktionen der Fraktion XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b bereits durch die erste Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25 und die anschließende Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50 gelungen, Fraktionen mit geeignetem Reinheitsgrad für eine massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung zu gewinnen (siehe Abschnitt 3.2.1 b und c), S. 122 bis 124, Abb. 54-56 und 57-61). Hierbei handelt es sich um die Fraktionen 01 AS 952, 02 AS 199 und 02 AS 205 als Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a und um 01 AS 600, 607 und 608 als Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b.

Der besseren Übersichtlichkeit halber seien hier erneut die ermittelten Molekulargewichte dieser Fraktionen aufgeführt:

01 AS 952: 4760 Da
 02 AS 199: 4810 Da
 02 AS 205: 6850 Da

 01 AS 600: 4762 Da
 01 AS 607: 4778 Da
 01 AS 608: 4809 Da

Die Literaturwerte für die Molekulargewichte der Toxine aus *Anemonia sulcata* lauten (Quelle: L. Béress, Habil., 1979):

ATX I : 4702 Da
 ATX II: 4770 Da
 ATX III: 2933 Da

Den massenspektrometrischen Untersuchungen kann man entnehmen, daß keines der ermittelten Molekulargewichte mit denen der Toxine übereinstimmt. Die Fraktion 01 AS 952 zeigte jedoch eine toxische Wirkung auf die Strandkrabbe (Abschnitt 3.4.2 a), S. 155, Tab. 37). Mit einem Molekulargewicht von 4760 Dalton könnte es sich dabei eventuell um ein Isotoxin von ATX II handeln.

Die Fraktion 01 AS 600, die mit einem Molekulargewicht von 4762 Dalton ebenfalls in diesem Bereich liegt, weist hingegen keine toxische Wirkung auf die Strandkrabbe aus. Es läßt sich

also mit Bestimmtheit sagen, daß es sich um keines der oben aufgeführten Toxine handelt. Diese Substanz läßt sich mittels der gesammelten Informationen nicht genauer bestimmen.

Gleiches trifft auf die Fraktionen 02 AS 199 und 02 AS 205 zu, welche weder eine toxische Wirkung auf die Strandkrabbe aufweisen, noch von dem Molekulargewicht einem der Toxine zuzuordnen sind. Trotz der geringfügigen toxischen Wirkung der Fraktion 01 AS 608 bleibt zu vermuten, daß es sich auch hier um kein Natriumkanal-wirksames Toxin handelt, zumal diese Substanz ein Molekulargewicht von 4809 Dalton aufweist. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß es sich um die identische Substanz wie in Fraktion 01 AS 199 handelt, welche ein Molekulargewicht von 4810 Dalton besitzt. Eine weitere Identifizierung mittels der Datenlage dieser Arbeit ist nicht möglich.

Unter den Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a bzw. 4b gab es zudem noch eine Reihe von Substanzen, die nach der ersten Ionenaustauschchromatographie an SP Sephadex C-25 und der anschließenden Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-50 noch nicht hinreichend rein für eine massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung sind (Abschnitt 3.2.2 b) und c), S. 126-128, Abb. 67-68 bzw. 69-72). Deshalb mußte auch bei diesen Fraktionen eine verfeinerte Rechromatographie an einem Kationenaustauscher angeschlossen werden. Anhand der HPLC-Ergebnisse ist zu ersehen, daß im Falle der Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a keine Aufreinigung zu massenspektrometrisch reinen Fraktionen gelingt (Abschnitt 3.2.3 b) u. Abschnitt 3.2.4 b), S. 129 und 131, Abb. 80-82). Aus der weiteren Aufreinigung der Folgefraktionen von XAD₂-Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b gehen hingegen zwei sehr reine Fraktionen hervor, nämlich 02 AS 479 und 480 (Abschnitt 3.2.3 c), S. 129, Abb. 75-76).

Die Zuordnung der beiden Substanzen 02 AS 479 und 02 AS 480 fällt leicht. So liegt ihr ermitteltes Molekulargewicht bei 2933 bzw. 2931 Dalton (siehe Abschnitt 3.5.5, S. 162-163 und Abschnitt 3.5.6, Tab. 39, S. 172). Sie entstammen beide der gleichen Vorfraktion, die im Krabbentest starke Toxinwirkung auf die Versuchstiere zeigte. Das Molekulargewicht des Seeanemonentoxins ATX III beträgt 2933 Dalton und stimmt somit genau mit dem ermittelten Molekulargewicht von 02 AS 479 überein. Es drängt sich nun die Vermutung auf, daß die Substanz 02 AS 480 ebenfalls mit ATX III identisch ist. Damit ist es gelungen, ein Toxin der *Anemonia sulcata* zu isolieren. Erfreulich dabei ist, daß es sich um das ATX III handelt, da sich vormals die Isolierung eben dieses Toxins als besonders schwierig erwiesen hat. So sind die Elutionseigenschaften von ATX III bei einer Ionenaustauschchromatographie mittels Puffergradienten nicht eindeutig vorhersagbar im Gegensatz zu denen von ATX I und II.

Das massenspektrometrisch bestimmte Molekulargewicht von der Fraktion 01 AS 607 (4778 Dalton) stimmt fast genau überein mit dem Molekulargewicht des kaliumkanalblockierenden *Anemonia-Sulcata*-Peptids BDS II, welches ein Molekulargewicht von knapp 4777 Dalton aufweist. Zudem verhält sich die Fraktion in den Toxizitätstests an der Krabbe kaum toxisch. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß es sich bei dieser Fraktion tatsächlich um den Kaliumkanalblocker BDS II in reiner Form handelt.

Relativ eindeutig ist die Lage bei der Fraktion 01 AS 609. Hier stimmt das ermittelte Molekulargewicht der Substanz (4708 Dalton) genau überein mit dem Literaturwert des Molekulargewichts des Kaliumkanalblockers BDS I. Außerdem ist in den Toxizitätstests an der Krabbe keinerlei toxische Wirkung der betreffenden Fraktion zu beobachten gewesen. Aus diesen Tatsachen kann der Schluß gezogen werden, daß die Fraktion 01 AS 609 identisch ist mit BDS I.

Die übrigen zuvor genannten Fraktionen sind mittels der Daten, die die biologischen Aktivitätsuntersuchungen, die HPLC-Analysen und die Massenspektrometrie lieferten, nicht

eindeutig zu identifizieren. Es wäre sicherlich interessant, die reinen Fraktionen zusätzlichen Aktivitätstests zu unterwerfen (beispielsweise genaue Ionenkanaluntersuchungen).

Als Fazit aus diesen Untersuchungen läßt sich ziehen, daß es mit Hilfe der gewählten Methode gelungen ist, die Zielsubstanzgruppen Toxine und Proteinaseinhibitoren der Seeanemone *Anemonia sulcata* voneinander zu trennen und in reiner Form zu erhalten. So liegt mit der Fraktion 02 AS 505 ein Proteinaseinhibitor und mit den Fraktionen 02 AS 479 und 480 das Toxin ATX III in reiner Form vor. Zusätzlich ist es gelungen, die kaliumkanalblockierenden Substanzen BDS I (Fraktion 01 AS 609) und II (Fraktion 01 AS 607) in reiner Form zu gewinnen. Dies ist insofern von Interesse, da Substanzen mit Wirkung auf Kaliumkanäle sich derzeit besonderer Aufmerksamkeit in der medizinisch-pharmazeutischen Forschung erfreuen.

Aus der obigen Darstellung ist zu folgern, daß die in dieser Dissertation beschriebene Methode sich durchaus dazu eignet, verschiedene biologisch aktive Substanzen aus der Seeanemone *Anemonia sulcata* in wenigen Arbeitsschritten und mit relativ geringem Geräteaufwand simultan zu isolieren. Damit ist das erste abgesteckte Ziel der Arbeit erreicht.

Das zweite Ziel bestand darin, mit den vorliegenden Untersuchungen Anstöße für weitere Therapieprinzipien in der Hämostase-Therapie zu liefern. Zu diesem Zwecke wurden die im entsprechenden Kapitel aufgeführten umfangreichen Gerinnungsanalysen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4 ab S. 55 und Abschnitt 3.3 ab S. 133). Wie bereits weiter oben erwähnt, konnte bei keiner der Fraktionen ein Einfluß auf den Quick-Test und somit auf das exogene Gerinnungssystem beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.3.2, S. 133-137).

Ganz anders liegt der Fall bei der aPTT-Bestimmung (siehe Abschnitt 3.3.2, S. 133-137). Neben den Messungen an den Sephadex-G-50-Fraktionen der Serdolit-Fraktionen, bei denen sich die Fraktionen ASI 3b, 3c, 4d und 4e als besonders wirksam bezüglich der aPTT-Verlängerung erwiesen, wurden auch noch weiter aufgereinigte Fraktionen auf eine aPTT-Verlängerung hin untersucht. Besonders taten sich dabei die Fraktionen ASI GP 9, 10, 11, 13 und 14 hervor (siehe Abschnitt 2.4 ab S. 55 und 3.3 ab S. 133). Diese zuletzt aufgezählten Fraktionen bewirkten je mindestens eine Verdopplung der aPTT im Vergleich zum Nullwert. Da mit der aPTT-Bestimmung die gesamten Abläufe des endogenen Gerinnungssystems überwacht werden, mußte eine Einzelfaktorenanalyse durchgeführt werden, um detektieren zu können, wo die Seeanemonenfraktionen genau ihren Angriffspunkt haben. Bei der Einzelfaktorenanalyse ergab sich, daß vor allem die Aktivität der Gerinnungsfaktoren XIIa und XIa herabgesetzt wird. Besonders deutlich wird dieses Phänomen bei den Fraktionen ASI GP 9, 10 und 11. Auch der Gerinnungsfaktor IXa wird in seiner Aktivität gemindert, was bei den Fraktionen ASI GP 9 und 10 ersichtlich wird. Bei den Faktoren XIIa, XIa und IXa handelt es sich um Serinproteinasen. Demzufolge ist es wahrscheinlich, daß ihre Hemmung auf Proteinaseinhibitoren aus den Seeanemonenfraktionen zurückzuführen ist (für Details siehe Abschnitt 3.3.2, Tab. 16-18, S. 136-138). Einsetzbar könnten diese Substanzen bei Patienten mit erhöhter Thromboseneigung sein, welche auf eine erhöhte Aktivität der eben genannten Gerinnungsfaktoren zurückgeht.

Eine weitere mögliche Erklärung für die deutliche aPTT-Verlängerung durch die Fraktionen ASI 4d und 4e ist der Einfluß auf das Präkallikrein, bei dem es sich um einen Kontaktfaktor im endogenen Gerinnungssystem handelt. Bei der Präkallikreinbestimmung wird das enzymatisch inaktive Präkallikrein in das proteolytisch aktive Kallikrein überführt, welches wiederum ein chromogenes Substrat umsetzt. Die beiden aufgeführten Fraktionen erniedrigen die Kallikreinaktivität, wodurch die Aktivierung des Faktors XII vermindert wird. Da es sich bei dem Kallikrein um eine Proteinase handelt, dürften für diesen Effekt ebenfalls die

Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* verantwortlich sein. Allerdings ist zu vermuten, daß die Kallikreinhemmung von untergeordneter Bedeutung ist, da es selbst bei Patienten mit ausgeprägtem Faktor-XII-Mangel zu keiner nennenswert erhöhten Blutungsneigung kommt.

Bis zu diesem Punkt stehen die Gerinnungsergebnisse im Einklang mit den bereits zuvor erwähnten Untersuchungen von H. D. Bruhn und L. Béress. In den damaligen Untersuchungen ergab sich jedoch kein Einfluß auf den Faktor VIIIa. Die Ergebnisse dieser Arbeit hingegen weisen eindeutig auf einen Einfluß auf Faktor VIIIa hin, der zwar weniger stark ausgeprägt ist als der Einfluß auf die Faktoren XIIa, XIa und IXa, aber dennoch ohne Zweifel vorhanden ist, wie die Ergebnisse der Fraktionen ASI GP 9 und 10 belegen. Diese Tatsache ist durchaus von Belang, da der Faktor VIIIa als Cofaktor eine Beschleunigung der Gerinnungsabläufe um das Tausendfache bewirken kann. Somit hätte die Hemmung dieses Cofaktors starke Auswirkungen auf den Gerinnungsvorgang. Die Wirkung des Faktors VIIIa beruht auf katalytischer Verstärkung der Faktor-IXa-Aktivität. Es handelt sich bei dem Faktor VIIIa demnach nicht um eine Serinproteinase, weswegen die Hemmwirkung nicht den Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* zuzuschreiben ist. Aus dieser Tatsache ist die Schlußfolgerung zu ziehen, daß eine bisher noch nicht identifizierte Substanz in der Seeanemone enthalten sein muß, welche einen hemmenden Einfluß auf den Faktor VIIIa ausübt. Ein potentielles Einsatzgebiet einer Substanz mit hemmender Wirkung auf den Gerinnungsfaktor VIIIa wären Patienten mit einer erhöhten Thromboseneigung, die mit einer abnorm hohen Faktor-VIIIa-Aktivität einhergeht.

Bei der Thrombinzeit- bzw. Fibrinogenbestimmung wurde kein meßbarer Einfluß der Seeanemonenfraktionen ersichtlich. Diese Tatsache ist bemerkenswert, da diese Bestimmung auf der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin beruht, welche durch Thrombin (Faktor IIa) katalysiert wird. Obwohl es sich bei dem Thrombin um eine Proteinase handelt, ist kein hemmender Einfluß der Proteinaseinhibitoren aus *Anemonia sulcata* auf die Umwandlungsreaktion festzustellen. Die Erklärung könnte in der relativ hohen Konzentration an Thrombin, welches dem Testansatz im Überschuß zugefügt wird, zu finden sein. Aus den vorliegenden Ergebnissen läßt sich folgern, daß bei den vorliegenden Konzentrationsverhältnissen kein Hemmeffekt der Proteinaseinhibitoren auf Thrombin zu beobachten ist. Ferner kann festgestellt werden, daß keine der untersuchten Fraktionen einen Einfluß auf das Fibrinogen bzw. Fibrin ausübt.

Innerhalb der Fraktionen sind nicht nur gerinnungshemmende und somit antikoagulatorische Wirkungen zu verzeichnen. Vielmehr wirken sich einige der untersuchten Fraktionen auf die fibrinolytischen Vorgänge aus. So kommt es unter dem Einfluß der entsprechenden Seeanemonenfraktionen zu einer verminderten Bestimmbarkeit von Plasminogen (Abschnitt 3.3.7, S. 144-145). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Fraktionen die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin, beziehungsweise direkt die Plasminaktivität hemmen. Besonders ausgeprägt ist dieser Hemmeffekt genau bei den Fraktionen, bei denen zuvor eine stark verlängerte aPTT gemessen wurde, als da wären ASI 3b, 3c, 4d und 4e. Außerdem sind die Effekte auch bei den Fraktionen ASI 5d und 5e zu beobachten, durch die ebenfalls eine geringfügige Verlängerung der aPTT erzielt werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.2, S. 133-137).

In dieses Bild passen die Ergebnisse der t-PA-Bestimmungen der entsprechenden Fraktionen (siehe Abschnitt 3.3.8, S. 145-146). So wird der Fibrinolyseaktivator unter der Einwirkung der Seeanemonenfraktionen gehemmt. Auch diese Wirkung ist bei den zuvor aufgezählten Fraktionen am deutlichsten zu erkennen.

Ein weiterer Grund für die verminderte Bestimmbarkeit von Plasminogen dürfte in der erhöhten PAI-Aktivität begründet sein, die sich ebenfalls besonders ausgeprägt bei den Fraktionen ASI 4c, 4d und 4e sowie bei ASI 5d und 5e äußert (Abschnitt 3.3.9, S. 146-148).

Es ist nicht verwunderlich, daß eben genau die Fraktionen, die eine deutliche aPTT-Verlängerung bewirken, gleichzeitig eine verminderte Plasmin- und damit auch eine geringere Fibrinolyseaktivität herbeiführen. Weiter oben in der Diskussion wurde der Schluß gezogen, daß die aPTT-Verlängerung vor allem durch die Proteinaseinhibitoren begründet ist. Bei dem Plasmin und dem t-PA handelt es sich nun ebenfalls um Serinproteinasen. Aus dieser Tatsache wird ersichtlich, daß die Hemmung derselbigen auch auf die angesprochenen Proteinaseinhibitoren aus den Seeanemonenextrakten zurückzuführen ist. Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) ist seineszeichens ein Proteinaseinhibitor. Demzufolge ist seine erhöhte Aktivität vermutlich die Folge eines synergetischen Zusammenwirkens der beiden Proteinaseinhibitorarten verschiedenen Ursprungs. Die PAI-Inaktivierung erfolgt in vivo mittels verschiedener Proteinasen, zu denen unter anderem das Protein C zählt. Demnach wäre es denkbar, daß durch die Proteinaseinhibitoren aus *Anemonia sulcata* dieser Inaktivierungsvorgang unterbunden wird. Die Ergebnisse aus der Protein-C-Bestimmung stützen diese Vermutung (siehe weiter unten). Die vorliegenden Untersuchungen klären somit den Wirkmechanismus der damals von Bruhn und Béress angenommenen erniedrigten Fibrinolyseaktivität auf. Erstmals konnte mit der hier vorliegenden Arbeit der Einfluß von Seeanemonenextrakten auf t-PA und PAI gezeigt werden. Alle diese zuletzt aufgezählten Wirkungen der Seeanemonenextrakte bewirken eine verminderte Plasminaktivität und somit auch eine verminderte Fibrinolysetätigkeit. Denkbar wäre der Einsatz eines derartigen Wirkstoffs bei Patienten mit unerwünscht hoher Fibrinolyseaktivität (beispielsweise bei unerwünscht hoher Blutungsneigung während einer Fibrinolysetherapie).

Eine Untersuchung, die ebenfalls erstmals in dieser Dissertation durchgeführt wurde, ist die Protein C-Bestimmung (siehe Kapitel 2.4.13, S. 74-75 und Kapitel 3.3.5, S. 141-142). Bei dieser ergaben sich in den vorliegenden Untersuchungen auch interessante Einflüsse. So kam es gerade in den immer wieder erwähnten Fraktionen (v. a. ASI 3c, 4d, 4e und 5d) zu einer verminderten Meßbarkeit der Protein-C-Aktivität. Beim dem aktivierten Protein C (APC) handelt es sich um eine Serinproteinase. Somit wäre die Hemmung der APC-Aktivität durchaus mit einem Einwirken der Proteinaseinhibitoren aus *Anemonia sulcata* erklärbar. Das Resultat dieser Hemmwirkung ist der Wegfall eines auf den Gerinnungsablauf drosselnd einwirkenden Prinzips, wodurch sich eine prokoagulatorische Wirkung ergibt. Im Klinikalltag treten ausgeprägte Protein-C-Spiegelerhöhungen eher selten auf und sind zudem meistens nicht lebensbedrohlich. Aus therapeutischer Sicht könnte ein Einsatz Protein-C-hemmender Substanzen allerdings bei der Überdosierung von Protein-C-Konzentraten unter einer Protein-C-Mangel-Therapie von Interesse sein.

Im Rahmen der Gerinnungsanalysen wurde auch der Einfluß dreier ausgewählter Fraktionen mit besonders ausgeprägter aPTT-Verlängerung (ASI 4c, 4d und 4e) auf die Thrombocytenaggregation untersucht. Zu diesem Zwecke wurden zwei unterschiedliche Agenzien zur Induzierung der Plättchenaggregation eingesetzt, nämlich Kollagen und ADP. Die Induzierung mit Kollagen spiegelt die physiologischen Verhältnisse wider, bei denen die Thrombocyten durch das im verletzten Endothel freigelegte Kollagen für die Aggregation aktiviert werden, worauf diese unter anderem mit einer Ausschüttung von ADP reagieren. Diese ADP-Ausschüttung treibt dann die Plättchenaggregation weiter voran. In den Untersuchungen ergab sich unter dem Einfluß der Fraktionen ASI 4c, 4d und 4e bei der Messung mit Kollagen eine verminderte Plättchenaggregation. Auf die ADP-induzierte Thrombocytenaggregation vermögen die drei untersuchten Fraktionen hingegen keinen hemmenden Einfluß auszuüben. Es bleibt zu vermuten, daß hier im Vergleich zu der Kollagen-induzierten Aggregation ein anderer Mechanismus zugrunde liegt, der nicht durch die Inhaltsstoffe der Seeanemonenfraktionen beeinflusst wird. Da, wie erwähnt, in vivo der erste Schritt der Plättchenaggregation durch Kollagen eingeleitet wird, wäre es unter Umständen möglich, mit der entsprechenden Substanz aus *Anemonia sulcata* eine

Verminderung der Plättchenaggregation zu erzielen. Die Tatsache, daß es sich bei den untersuchten Fraktionen ASI 4c, d und e um die Fraktionen handelt, welche die ausgeprägten Proteinaseinhibitorwirkungen aufwiesen, legt die Vermutung nahe, daß die Hemmung der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation ebenfalls durch die Proteinaseinhibitoren erfolgt. Unter therapeutischen Gesichtspunkten wäre dieser Effekt beispielsweise im Sinne einer Reinfarktprophylaxe einsetzbar. Zudem könnte es sich als durchaus positiv erweisen, daß die ADP-induzierte Plättchenaggregation weitestgehend unbeeinflusst bleibt, weil auf diese Weise eventuell eine zu stark ausgeprägte Blutungsneigung verhindert werden könnte. Es bliebe in erweiterten Studien abzuklären, ob die Ausprägung der bewirkten Thrombocytenaggregationshemmung groß genug ist, um für derlei therapeutische Zwecke eingesetzt werden zu können.

Um die Wirkungen der Proteinaseinhibitoren aus *Anemonia sulcata* zusammenzufassen, bleibt festzustellen, daß sie über ein breites Wirkungsspektrum verfügen. So wirken sie einerseits antikoagulatorisch, andererseits aber ebenso prokoagulatorisch sowie antifibrinolytisch. Zum Zwecke eines möglichen therapeutischen Einsatzes der Proteinaseinhibitoren erscheint es zunächst notwendig, in weiteren Studien zu untersuchen, ob sich die unterschiedlichen Wirkungen (aPTT-Verlängerung, Plättchenaggregations-, Fibrinolyse- und APC-Hemmung) voneinander trennen lassen, oder ob die eine Wirkung stets mit den anderen gekoppelt auftritt. Im Falle einer permanenten Coexistenz der aufgezählten Wirkungen könnte eben diese Vielfältigkeit der Proteinaseinhibitoren sich in der Therapie sowohl als Fluch als auch als Hoffnung erweisen. Zum einen könnten sich bei einer beabsichtigten antithrombotischen Therapie unerwünschterweise die prokoagulatorischen, antifibrinolytischen Fähigkeiten der Wirksubstanz bemerkbar machen, wodurch es zu einem erneuten thromboembolischen Ereignis kommen kann. Zum anderen könnte auch das Gegenteil der Fall sein: Möglicherweise könnten die prokoagulatorischen Eigenschaften der Proteinaseinhibitoren in einer antithrombotischen Therapie die unerwünschte erhöhte Blutungsneigung des Patienten abfangen und somit das Nebenwirkungspotential mindern. Derartige Möglichkeiten sind jedoch zu diesem Zeitpunkt noch Spekulationen. Die potentielle Einsetzbarkeit als Arzneistoff müßte in weiteren, ausführlichen klinischen Studien abgeklärt werden.

Jedoch nicht alle beobachteten Wirkungen der Seeanemonenfraktionen auf das menschliche Gerinnungssystem lassen sich zwanglos den Proteinaseinhibitoren zuschreiben, so beispielsweise die weiter oben im Zusammenhang mit der aPTT-Verlängerung bereits erwähnte Faktor-VIIIa-Hemmung. Ebenso sieht es mit der durch einige Fraktionen erhöhten t-PA-Aktivität aus, die im Gegensatz zu der vermutlich durch die Proteinaseinhibitoren verursachten t-PA-Hemmung steht (Kapitel 3.3.8, S. 145-146). Die Eigenschaft der t-PA-Aktivitätserhöhung trifft auf die Fraktionen ASI 3d, 5b, 5c 6/2e und 6/3a zu. Dieser Einfluß kann wahrscheinlich nicht auf die Proteinaseinhibitoren zurückgeführt werden, zumal es unter Einwirkung dieser Fraktionen zu keiner Verlängerung der aPTT kommt. Demzufolge müßten sich hinter diesem Phänomen andere Wirkprinzipien verbergen. Es wäre interessant, diese Wirkprinzipien zu isolieren und deren Aminosäuresequenz aufzuklären, um anschließend detaillierte Studien über ihre Wirkung bezüglich der Auflösung von Blutgerinnseln durchzuführen. Die entsprechende Substanz bzw. die entsprechenden Substanzen könnten sich bei der Fibrinolysetherapie beispielsweise von Patienten mit frischem Herzinfarkt als sehr wertvoll erweisen.

Es ist davon auszugehen, daß es sich bei allen untersuchten Substanzen um Polypeptide handelt. Dies ist durch den ersten Chromatographieschritt an Serdolit AD-2 gewährleistet (Kapitel 2.2.2, S. 25-26). Prinzipiell gestaltet sich die Verwendung eines Peptids zu therapeutischen Zwecken beim Menschen als schwierig. Zum einen liegt das an möglichen Abwehrreaktionen des Organismus gegen körperfremde Eiweißstoffe, zum anderen sind

Peptide relativ empfindliche Verbindungen, die bei oraler Gabe in der Regel im Magen durch das dort vorliegende saure Milieu inaktiviert werden. Allerdings wäre es denkbar, die Substanz nur als Modell für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zu nehmen, indem man die für die Wirksamkeit verantwortlichen Strukturmerkmale ausfindig macht und dementsprechend neue Verbindungen synthetisiert. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Umsetzung dieses Konzepts sind die Toxine der Kegelschnecke. So dienten diese als Vorbild für die Entwicklung schmerzstillender Wirkstoffe (S. Frings, 1997; J. Hendry, 2004).

Das Resultat der in dieser Arbeit angewendeten Gerinnungsanalysen ist die Aufdeckung etlicher bisher unbekannter Aspekte der Wirkung von *Anemonia-Sulcata*-Inhaltsstoffen auf die Blutgerinnung: Senkung der Fibrinolyseaktivität durch Plasmin- und t-PA-Hemmung einerseits t-PA-Aktivitätserhöhung andererseits; Protein-C-Hemmung; Faktor-VIIIa-Hemmung; Plättchenaggregationshemmung. Damit bietet die *Anemonia sulcata* auf der einen Seite potentielle Wirkstoffe für eine gerinnungshemmende Therapie bei Thromboseneigung und auf der anderen Seite potentielle Wirkstoffe für eine gerinnungsaktivierende Therapie bei erhöhter Blutungsneigung. Diese neuen Erkenntnisse sollten Anlaß zur weiteren Erforschung bezüglich der pharmazeutischen Wirkstoffgewinnung aus *Anemonia sulcata* geben.

Hiermit ist auch das zweite Ziel dieser Dissertation erreicht. Es bleibt abzuwarten, ob sich in Zukunft therapeutische Einsatzmöglichkeiten für die Seeanemoneninhaltsstoffe ergeben werden. Auf alle Fälle ist diese Arbeit ein erneuter Beweis dafür, daß sich durchaus viele sehr interessante, hochwirksame Substanzklassen in marinen Organismen verbergen, die der Mensch sich therapeutisch zunutze machen kann.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde durch Fortentwicklung einer bereits veröffentlichten Methode (Sánchez-Rodríguez et al., 1997) zur Isolierung der Toxine aus der Seeanemone *Anemonia sulcata* eine simultane Isolierung verschiedener biologisch aktiver Substanzen (gerinnungsaktive Proteinaseinhibitoren, Toxine mit Wirkung auf die spannungsabhängigen Natriumkanäle, Kaliumkanalblocker) erreicht. Dabei gelang es, mit vergleichsweise geringem Material- und Geräteaufwand einen gerinnungsaktiven Proteinaseinhibitor, das Toxin ATX III und die blutdrucksenkenden Kaliumkanalblocker BDS I und II in reiner Form zu gewinnen. Da *Anemonia sulcata* eine Vielzahl von biologisch aktiven Inhaltsstoffen enthält, die für die pharmazeutische Forschung von hohem Interesse sein dürften, bietet die in der vorliegenden Dissertation erarbeitete Isolationsmethode eine neue Möglichkeit zur weiteren Erforschung und anschließenden ökonomischen Nutzung dieser Inhaltsstoffe.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die detaillierte Analyse der Wirkung der gerinnungsaktiven Substanzen aus *Anemonia sulcata* auf das Gerinnungs- sowie auf das Fibrinolyse-System. Zunächst wurden die globalen Gerinnungstests durchgeführt (Quickwert-Bestimmung und aPTT). Dabei ergab sich bei keiner Seeanemonenfraktion ein Einfluß auf den Quick-Wert, womit eine Wirkung der Seeanemoneninhaltsstoffe auf das exogene Gerinnungssystem ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz hierzu konnte unter dem Einfluß etlicher der Seeanemonenfraktionen eine starke Verlängerung der aPTT beobachtet werden. Ein Großteil der Gerinnungswirkung ist den polyvalenten Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* zuzuschreiben. Dabei greifen diese an den unterschiedlichsten Orten in das Hämostasesystem ein, woraus eine Vielzahl verschiedenartiger Wirkungen resultiert. Zum einen ist eine antikoagulatorische Wirkung zu verzeichnen, welche auf einer Hemmung der Gerinnungsfaktoren XIIa, XIa und IXa durch die Proteinaseinhibitoren beruht, die maßgeblich an der ausgeprägten aPTT-Verlängerung beteiligt ist. Außerdem konnte eine Hemmwirkung auf das Kallikrein beobachtet werden, die auch ihren Beitrag zu der aPTT-Verlängerung leisten dürfte. Zum anderen bewirken die Proteinaseinhibitoren eine Hemmung von Protein C, über welche bisher in der Literatur noch nicht berichtet worden ist, und besitzen folglich einen prokoagulatorischen Effekt. Hinzu kommt eine antifibrinolytische Wirkung durch eine Hemmung von Plasmin und t-PA mittels der Proteinaseinhibitoren. Unter dem Einfluß der Seeanemonenproteinaseinhibitoren ist außerdem eine erhöhte PAI-Aktivität meßbar, die vermutlich nicht durch eine direkte Einwirkung der Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* zu erklären ist. Allerdings wird PAI in vivo durch verschiedene Proteinase inaktiviert, zu nennen wäre z. B. das aktivierte Protein C. Eben auf dieses APC üben laut der Ergebnisse dieser Arbeit (wie bereits weiter oben erwähnt) die Proteinaseinhibitoren der Seeanemone eine inhibierende Wirkung aus, und genau diese Hemmwirkung wirkt sich wiederum förderlich auf die Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (PAI) aus.

Ein weiterer Aspekt der facettenreichen Wirkungen der *Anemonia-Sulcata*-Inhaltsstoffe ist die Plättchenaggregationshemmung. So konnte auf die Plättchenaggregation unter Kollagen-Einfluß eine hemmende Einwirkung der untersuchten Seeanemonenfraktionen gemessen werden, während bei der Plättchenaggregation unter ADP-Einfluß kein nennenswerter Effekt sichtbar wurde. Es gibt Hinweise dafür, daß auch diese Wirkung durch die Proteinaseinhibitoren aus der *Anemonia sulcata* vermittelt wird.

Desweiteren wurden in den durchgeführten Gerinnungsanalysen auch Wirkungen auf Gerinnungsvorgänge gefunden, an denen nicht unmittelbar Serinproteinase beteiligt sind. Dies legt die Vermutung nahe, daß neben den Proteinaseinhibitoren noch andere gerinnungsaktive Substanzen in der *Anemonia sulcata* enthalten sind.

Dies trifft auf die Hemmung des Cofaktors VIIIa zu, welcher als Akzelerator die Geschwindigkeit des Gerinnungsvorganges erheblich vervielfacht. Der Wegfall dieser Beschleunigung läßt daher einen deutlichen, hemmenden Einfluß auf das endogene Gerinnungssystem vermuten, welcher sich in einer aPTT-Verlängerung niederschlägt. Da es sich bei dem Faktor VIIIa nicht um eine Proteinase handelt, bleibt zu vermuten, daß die Hemmwirkung nicht von den Proteinaseinhibitoren ausgeht, sondern Ausdruck einer Fibrinolyseaktivierung durch noch nicht weiter identifizierte Substanzen ist.

Interessanterweise wurde durch das Einwirken einiger anderer Seeanemonenfraktionen bei der t-PA-Bestimmung eine Erhöhung der gemessenen Aktivität herbeigeführt. Aufgrund der Tatsache, daß sich bei den besagten Fraktionen keine Verlängerung der aPTT finden ließ, ist die t-PA-Aktivitätserhöhung vermutlich nicht auf die polyvalenten Proteinaseinhibitoren der *Anemonia sulcata* zurückzuführen.

Es bleibt weiteren Untersuchungen - gegebenenfalls zunächst in Tierversuchen - vorbehalten, im Detail abzuklären, inwiefern sich die beschriebenen gerinnungsaktiven Substanzen als Wirkstoffe in der Hämostasetherapie eignen. Zu diesem Zwecke müßte untersucht werden, ob sich die unterschiedlichen Wirkungen der Proteinaseinhibitoren voneinander trennen lassen, ohne dabei einen Wirkungsverlust herbeizuführen. Gelingt dieses Vorhaben, so könnten wertvolle Wirkstoffe sowohl zur Thromboseprophylaxe (durch Hemmung der Faktoren XIIa, XIa und IXa) als auch als Antidot bei erhöhter Blutungsneigung unter einer Fibrinolysetherapie gewonnen werden. Auch in der Plättchenaggregationshemmung könnten die Proteinaseinhibitoren potentielle Wirkstoffe darstellen. Das Einsatzgebiet der Plättchenaggregationshemmung ist von besonderem Belang, weil diese als fester Bestandteil der Herzinfarkt- und Schlaganfallprophylaxe gilt. In Anbetracht der Tatsache, daß die Verstopfung eines coronaren bzw. craniellen Gefäßes durch einen abgelösten Blutpfropf die häufigste Todesursache in den Industrienationen darstellt, wird der Stellenwert zuverlässiger Therapieprinzipien auf diesem Gebiet ersichtlich. Ein wichtiges Standbein dieser Thrombocytenaggregationshemmungstherapie ist die Acetylsalicylsäure. Der Fachpresse war allerdings kürzlich zu entnehmen, daß neben dem lange bekannten Nebenwirkungsspektrum (wie beispielsweise Magenblutungen bis hin zum Magengeschwür) neuerdings eine erhöhte Inzidenz von Pankreaskarzinomen bei weiblichen Patienten unter langfristiger Acetylsalicylsäureeinnahme diskutiert wird (DAZ, Jahrgang 144, 15.01.2004). Es bleibt abzuwarten, ob sich eine eindeutige Korrelation zwischen der ASS-Einnahme und der erhöhten Krebskrankungsrate belegen läßt. Auf jeden Fall zeigt dieses Beispiel, daß bisher keineswegs eine nebenwirkungsarme Therapie auf diesem Gebiet existiert und somit noch Forschungsbedarf nach weiteren Therapieprinzipien vorhanden ist.

Weiterhin erscheint es lohnenswert, diejenigen Substanzen, welche eine Faktor-VIIIa-Hemmung und eine t-PA-Aktivitätserhöhung bewirken, zu isolieren, zu identifizieren und auf entsprechende Einsatzmöglichkeiten wie z. B. Antikoagulation und Fibrinolysetherapie zu untersuchen. Zur Auflösung unerwünschter Blutgerinnsel (beispielsweise bei Thrombosen oder auch bei Herzinfarkt) werden Medikamente verabreicht, welche die Fibrinolyse erhöhen. Eben hier könnten die Fraktionen aus der *Anemonia sulcata* von Belang sein, welche eine t-PA-Aktivitätserhöhung bewirken.

Alles in allem konnten in dieser Dissertation eine Reihe interessanter, verschiedenartiger Wirkungen der untersuchten Seeanemonenextrakte auf das Gerinnungssystem aufgezeigt werden. Es erscheint lohnenswert, diese Ergebnisse in spätere Untersuchungen einzubeziehen mit dem Ziel, neue Therapeutika für die Einsatzgebiete der Thromboseprophylaxe, Plättchenaggregationshemmung bzw. der Antifibrinolysetherapie durch die Fibrinolyse-

hemmenden Fraktionen, aber auch der Fibrinolysetherapie durch die Fibrinolyse-aktivierenden Fraktionen zu entwickeln.

Referenzen

- D. Ackermann (1953): Über das Vorkommen von Homarin, Trigonellin und einer neuen Base Anemonin in der Anthozoa *Anemonia sulcata*. Z. physiol. Chem. **295**:1-9
- S. Alban (1993): Synthese und physiologische Testung neuartiger Heparinoide. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg
- C. Alsen (1975): Cardiotoxic effect of two toxins isolated from the sea anemone. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **295**: 55-62
- C. Alsen, L. Béress, K. Fischer, D. Proppe, Reinberg, R. W. Sattler (1976): The action of a toxin from the sea anemone *Anemonia sulcata* upon mammalian heart muscles. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **278**: 105
- C. Alsen, T. Peters, E. Scheufler(1982): Studies on mechanisms of the positive inotropic effect of ATX II (*Anemonia sulcata*) on isolated guinea pig atria. J. Cardiovasc. Pharmacol. **4**: 63- 69
- M. Barthels, M. von Depka (2003): Das Gerinnungskompodium. Thieme-Verlag, Stuttgart
- Bergmann et al. (1976): Decreased rate of sodium conduction inactivation in the node of Ranvier induced by a polypeptide toxin from sea anemone. Biochem. Biophys. Acta **455**: 173-184,
- L. Béress, R. Béress (1971): Reinigung zweier krabbenlähmender Toxine aus der Seeanemone *Anemonia sulcata*. In: Kieler Meeresforschungen, Institut für Meereskunde an der Universität Kiel, Band XXVII, Heft 1, Kommissionsverlag Walter G. Mühlau, Kiel; S. 117-127
- Béress L, Béress R, Wunderer G (1975), Isolation and characterisation of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*. FEBS Lett. **50**: 311-314
- L. Béress, R. Béress, G. Wunderer (1976): Purification and characterization of four polypeptides with neurotoxic activity from *Condylactis aurantica*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **357**: 409-414
- L. Béress, G. Wunderer, E. Wachter (1977): Amino acid sequence of toxin III from *Anemonia sulcata*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem **357**: 409-414
- L. Béress: Biologisch Aktive Polypeptide Aus Den Seeanemonen *Anemonia Sulcata*, *Condylactis Aurantiaca* Und *Bolocera Tuediae*. Habilitationsschrift am Institut für Meereskunde, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian Albrechts Universität zu Kiel, 1979
- L. Béress, J. Zwick (1980): Purification of two crab-paralysing polypeptides from the sea anemone *Bolocera tuediae*. Marine Chem. **8**: 333-338
- L. Béress (1982): Biologically active compounds from coelenterates. Pure Appl. Chem. **54**, 1981-1994
- L. Béress, I. S. Doppelfeld, E. Etschenberg, E. Graf, A. Henschen-Edmann und J. Zwick (1985): Polypeptide, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung als blutdrucksenkende Wirkstoffe. Deutsches Patentamt. Offenlegungsschrift DE 3324689 A1

- L. Béress et al. (1988): Phylum Coelenterata (Cnidaria). Chemistry. In: Poisonous and Venomous Marine Animals of the World, 2. Auflage, S. 152-161 (Herausgeber: B. W. Halstead), Princeton, NJ: Darwin Press
- L. Béress, T. Bruhn, J. Sánchez-Rodríguez, E. Wachter, H. Schweitz (2000): Sea Anemone Toxins, Acting on Na⁺ Channels and K⁺ Channels: Isolation and Characterization, In: Methods and Tools in Biosciences and Medicine, Animal Toxins (Herausgeber: H. Rochat, M.-F. Martin-Eauclaire), BirkhäuserVerlag Basel/Schweiz; S. 31-56
- C. Bergmann, J. M. Dubois, E. Rojas, W. Rathmayer (1976): Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by polypeptide toxin from sea anemone. *Biochem. Biophys. Acta* **455**; 173-184
- J. C. Bodmer, H. P. Schnebli (1984): Plasma proteinase inhibitors. *Schweiz. Med. Wschr.* **114**: 1359-1363
- G. J. Broze, L. A. Warren, W. F. Novotny, D. A. Higuchi, J. J. Girard, J. P. Miletich (1988): The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: Insight into its possible mechanism of action. *Blood* **71**: 335-343
- H. D. Bruhn, U. R. Fölsch (1999): Lehrbuch der Labormedizin. Schattauer Verlag, Stuttgart; S. 436-441
- H. D. Bruhn, L. Béress (1978): Polyvalent Proteinase Inhibitors from the Sea Anemone *Anemonia sulcata*: Effect on Coagulation and Fibrinolysis. In: Thrombosis and Haemostasis (Herausgeber: R. Biggs), Vol. **39**, Nr. 2, S. 552-553, Schattauer Verlag, Stuttgart
- T. Bruhn (2001/2002): Abschlußbericht des BMBF-Projektes F0261
- U. Budde (2002): Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. *J Lab Med* **26** (11/12): 564-571
- W. A. Caterall, L. Béress (1978): Sea anemone and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore. *J. Biol. Chem.*: 7404-7409
- Deutsche Apothekerzeitung (DAZ), 144. Jahrgang, 15.01.2004, Nr. 3, S. 38-39
- C. E. Dempfle, S. Zips, H. Ergül, D. L. Heene (2001): The fibrin assay comparison trial. *Thromb. Haemost.* **85**: 671-678
- S. Diochot, H. Schweitz, L. Béress, M. Lazdunski (1998): Sea Anemone Peptides with a Specific Blocking Activity against the Fast Inactivating Potassium Channel Kv3.4, *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. **273**, Nr. 12, S. 6744-6749
- P. Eisenberg, J. Siegel, D. Abendschein, J. Miletich (1993): Importance of factor Xa in determining the procoagulant activity of whole blood clots. *J. Clin. Invest.* **91**: 1877-83
- V. Ellis, M. F. Scully, V. V. Kakkar (1984): Inhibition of prothrombinase complex by plasma proteinase inhibitors. *Biochemistry* **23**: 5882-5887
- F. Espana, V. Vincente, D. Tabernero, I. Scharrer, J. H. Griffin (1990): Determination of plasma protein c inhibitor and two activated protein c inhibitors-complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb. Res.* **59**: 593-608
- S. Frings (1997): Conotoxine- Lähmen und Lernen mit Schnecken Gift. B.I.F. Futura Vol. 12, S. 77-86
- H. Fritz, B. Brey, L. Béress (1972): Polyvalente Isoinhibitoren für Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, und Kallikrein aus Seeanemonen (*Anemonia sulcata*), Isolierung, Hemmverhalten und Aminosäurezusammensetzung. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**: 19-30

- D. Gailani (1994): Advances and dilemmas in factor XI. *Curr. Opin. Hematol.* **1**, 347-353
- M. Gawaz (2001): *Blood platelets*. Thieme-Verlag, Stuttgart
- H. C. Hemker, H. Kessels (1991): Feedback mechanisms in coagulation. *Haemostasis* **21**: 189-196
- H. C. Hemker, H. Poliwoda (1998): Theoretische Voraussetzungen. Der Mechanismus der Hämostase. In: *Gerinnungsanalysen. Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen*. Herausgeber: M. Barthels, H. Poliwoda; 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 1-20
- J. Hendry (2004): Intrathecal Ziconotide in the Treatment of Refractory Pain in Patients with Cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 991: 63-70
- H. Kolkenbrock, H. Tschesche (1987): A new inhibitor of elastase from the sea anemone (*Anemonia sulcata*). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 368, 93-99
- S. Kubalek (2000): *Untersuchungen zur Blutgerinnung beim Grünen Leguan*, Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- K. Lechner (1982): *Blutgerinnungsstörungen*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York
- W. D. Lehmann (1996): *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin Oxford
- A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox (1994): Kapitel 6: Proteine: Eine Einführung; aus: *Prinzipien der Biochemie*. Herausgeber: H. Tschesche; 2. Auflage, Spektrum Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford; S. 147-175
- J. Lill (1999): *Vergleichende biochemische und hämatologische Untersuchungen an den Giften der Vipern: Bitis gabonica rhinoceros, Bitis nasicornis, Echis carinatus sochureki, Vipera russelli russelli*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- K. G. Mann, L. Lorand (1993): Introduction: Blood coagulation. In: L. Lorand, K. G. Mann (Herausgeber): *Methods in Enzymology*, Vol. 222; Proteolytic enzymes in coagulation, fibrinolysis, and complement activation; Part A: Mammalian Blood Coagulation Factors and Inhibitors. Academic Press Inc., San Diego, S. 1-10
- D. Mebs (1989): *Gifte im Riff*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- G. Motta, R. Roikjaer, A. A. Hasan, D. B. Cines, , A. H. Schmaier (1998): High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: A novel mechanism for contact activation. *Blood* **91**: 516-528
- R. S. Norton (1991): Structure and Structure-Function Relationships Of Sea Anemone Proteins That Interact With The Sodium Channel. *Toxicon*. **29**: 1051-1084
- R. S. Norton, L. Béress, S. Stob, R. Boelens, R. Kaptein (1986): Photochemically induced dynamic nuclear polarisation NMR study of the aromatic residues of sea anemone polypeptide cardiac stimulants, *Eur. J. Biochem.* **157**: 343-346
- U. Ravens (1976): Electromechanical study of an *Anemonia sulcata* toxin in mammalian cardiac muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **296**: 73-78
- C. Richet (1903): Des poisons continue dans les tentacles des actinies (Congestine et Thalassine). *Compt. Rend. Soc. Biol.* **55**: 701-707

- W. Rick (1990): Lehrbuch der klinischen Chemie und Mikroskopie. Springer-Verlag (6. Auflage), Berlin/Heidelberg/New York; S. 153-185
- R. Roikjaer, A. A. Hasan, G. Motta, I. Schousboe, A. H. Schmaier (1998): Factor XII does not initiate prekallikrein activation on endothelial cells. *Thromb. Haemost.* **80**: 74-81
- Romey et al. (1976): Sea anemone toxin: a tool to study molecular mechanisms of nerve conduction and excitation-secretion coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 4055-4059
- G. S. Salvesen, S. V. Pizzo (1994): Proteinase inhibitors. In: R. W. Colman, J. Hirsh, V. J. Marder, E. W. Salzman (Herausgeber): *Haemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice*. 3. Auflage, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, S. 241-258)
- Sánchez-Rodríguez J (1997): Isolation And Characterization Of Biologically Active Polypeptides From The Pacific Sea Anemone *Anthopleura Elegantissima*. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- J. Sanchez-Rodriguez, T. Bruhn, A. Aneiros, E. Wachter, L. Béress (1996): A Simple Biochemical Method In The Search For Bioactive Polypeptides In A Sea Anemone (*Anemonia Sulcata*). *Toxicon* Vol. **34**, Nr. 11/12: 1361-1366
- P. M. Sandset, U. Abildgaard (1991): Extrinsic pathway inhibitor – The key to feedback control of blood coagulation initiated by tissue thromboplastin. *Haemostasis* **21**: 219-239
- A. H. Schmaier (1997): Contact activation: A revision. *Thromb. Haemost.* **78**: 101-107
- H. Schweitz, T. Bruhn, E. Guillemare, D. Moinier, J. M. Lancellin, L. Béress, M. Lazdunski (1995): Kalicludines and Kaliseptine: Two different classes of sea anemone toxins for voltage-sensitive K⁺ channels. *J. Biol. Chem* **270**, 25121-25126
- R. Sonderhoff (1936): Über das Gift der Seeanemonen, Ein Beitrag zur Kenntnis der Nesselgifte. *Ann. Chem.* **525**(2-3): 138-150
- H. Tschesche, H. Kolkenbrock, W. Bode (1987): The covalent structure of the elastase inhibitor from *Anemonia sulcata* – a „non-classical“ Kazal-type protein. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.* **368**(10): 1297-1304
- W. Ulbricht, J. Schmidtmayer (1981): Modification of sodium channels in myelinated nerve by *Anemonia sulcata* toxin II. *J. Physiol.* **77**: 1103-1111
- Wachter, Klostermann, Binder und Béress (1987): Isolation of Isotoxins from the Sea Anemone *Anemonia Sulcata* by HPLC-Chromatography in: *Receptors and Ion Channels*, deGruyter-Verlag, S. 313-322 (Herausgeber: Y. A. Orchinikov und F. Hucho)
- J. Weitz, M. Hudoba, D. Massel, J. Maraganore, J. Hirsh (1990): Clot bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J. Clin. Invest.*, **86**: 385-91
- W. A. Wuillemin, C. E. Hack, W. K. Bleeker, B. J. Biemond, M. Levi, H. Ten Caie (1996): Inactivation of factor XI in vivo: Studies in chimpanzees and in humans. *Thromb. Haemost.* **76**: 549-555
- G. Wunderer, W. Machleidt, E. Wachter (1976): Toxin II from *Anemonia sulcata*- the first sequence of a coelenterate toxin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**: 239-240
- G. Wunderer (1978): Die Disulfidbrücken von Toxin II aus *Anemonia sulcata*. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1193-1212

G. Wunderer, M. Eulitz (1978): Amino acid sequence of toxin I of *Anemonia sulcata*. *Eur. J. Biochem.* **89**, 11-17

Anhang

HPLC-Nummer	Kürzel / MS-Nummer	Fraktionsgewinnung
01 AS 588		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 1 / Seph. G-50 Fr. 1a
01 AS 589		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 2 / Seph. G-50 Fr. 1a
01 AS 590		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 3 / Seph. G-50 Fr. 1a
01 AS 591		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 592		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 593		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 594		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 3
01 AS 595		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4 / Seph. G-25 Fr. 2b
01 AS 596		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 597		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 598		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 3
01 AS 599		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 600	MS 5	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 8 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 601		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 9 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 602		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1

HPLC-Nummer	Kürzel / MS-Nummer	Fractions-gewinnung
01 AS 603		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 2a
01 AS 604		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 5
01 AS 605		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 607	MS 4	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 608	MS 9	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 13 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 609	MS 10	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 15 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 610	MS 8	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 936		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 1 / Seph. G-50 Fr. 1a
01 AS 937		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 1 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 938		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 1 / Seph. G-50 Fr. 1b
01 AS 939		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 2 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 940		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 2 / Seph. G-50 Fr. 3
01 AS 941		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 3 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 942		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 2 / Seph. G-50 Fr. 3
01 AS 943		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 1a
01 AS 944		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 1

HPLC-Nummer	Kürzel / MS-Nummer	Fractions-gewinnung
01 AS 945		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 1a
01 AS 946		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 947		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 948		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 6 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 949		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 7 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 950		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 7 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 951		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 8 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 952	MS 7	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 8 / Seph. G-50 Fr. 2
01 AS 953		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 9 / Seph. G-50 Fr. 1
01 AS 954		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph. G-50 Fr. 1a
01 AS 955		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 173	ASI GP 1	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 9 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 174	ASI GP 2	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 175	ASI GP 3	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 176	ASI GP 4	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 177	ASI GP 5	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 2

HPLC-Nummer	Kürzel / MS-Nummer	Fractionsgewinnung
02 AS 178	ASI GP 6	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 13 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 179	ASI GP 7	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 13 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 180	ASI GP 8	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 13 / Seph. G-50 Fr. 3
02 AS 181	ASI 6	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 15 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 182	ASI GP 9	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 183	ASI GP 10	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 3+4
02 AS 184	ASI GP 11	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 185	ASI GP 12	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 19 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 186	ASI GP 13	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 20 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 187	ASI GP 14	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 20 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 188	ASI GP 15	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 25 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 189	ASI GP 16	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 25 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 190	ASIC 7	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 191	ASIC 8	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 192		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 193		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 2

HPLC-Nummer	Kürzel / MS-Nummer	Fraktionsgewinnung
02 AS 194		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 14 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 195		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 14 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 196		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 14 / Seph. G-50 Fr. 3
02 AS 197		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 15 / Seph. G-50 Fr. 1a
02 AS 198	ASIC 16	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 15 / Seph. G-50 Fr. 1b
02 AS 199	ASIC 17/ MS 6	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 15 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 200	ASIC 18	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 201	ASIC 19	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr. 3
02 AS 202		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 18 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 203		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 19 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 204	ASIC 22	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 20 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 205	MS 2	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 21 / Seph. G-50 Fr. 2
02 AS 206		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 21 / Seph. G-50 Fr. 2b
02 AS 522		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4a / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr. 1
02 AS 479	MS 1	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr.5 / Seph. G-25 Fr. 1

HPLC-Nummer	Kürzel / MS-Nummer	Fraktionsgewinnung
02 AS 480	MS 3	XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr.5 / Seph. G-25 Fr. 2
02 AS 490		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 2/ Fractogel Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1
02 AS 491		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 2/ Fractogel Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1
02 AS 492		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 12 / Seph. G-50 Fr. 2/ Fractogel Fr. 3 / Seph. G-25 Fr. 1
02 AS 495		XAD ₂ -Fr. 5 / Seph. G-50 Fr. 4b / SP Seph. C-25 Fr. 11 / Seph. G-50 Fr. 1/ Fractogel Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1
02 AS 497		XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1/ Bio Rad Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1
02 AS 498		XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1/ Bio Rad Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1
02 AS 499		XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 10 / Seph. G-50 Fr. 1/ Bio Rad Fr. 2b / Seph. G-25 Fr. 1
02 AS 505	MS 11	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 17 / Seph. G-50 Fr.2 / Bio Rad Fr. 1 / Seph. G-25 Fr. 1
02 AS 509	MS 12	XAD ₂ -Fr. 4 / Seph. G-50 Fr. 3+3b / SP Seph. C-25 Fr. 16 / Seph. G-50 Fr.2 / SP Seph. Fr. 2 / Seph. G-25 Fr. 1

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Blaschek für die Übernahme der Gutachterrolle bei der Dissertation und dem Rigorosum herzlich danken.

Einganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. D. Bruhn für das Überlassen des Themas und die gute Betreuung während der gesamten Arbeit, insbesondere wenn es um gerinnungstechnische Fragestellungen ging.

Ein weiterer ganz spezieller Dank geht an Herrn Professor Dr. Lászlo Béress, der mich in seinem Labor unter die Fittiche nahm und mich in die Geheimnisse der Peptidisolierung einweihte. Dank seiner Hilfe gelang es mir, trotz bisweilen widriger Umstände (während der Arbeiten mußte das Labor aus baulichen Gründen geräumt werden und Ersatzräume konnten nicht bereit gestellt werden), die Isolierungsarbeiten abzuschließen.

Zum Gelingen der gerinnungsphysiologischen Untersuchungen hat Frau Birgit Kallsen aus dem Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins entscheidend beigetragen. Sie stand mir während der Arbeiten stets mit Rat und Tat zur Seite, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

An dieser Stelle sei Frau Dr. Ewa Draus ganz herzlich für die Unterstützung bei den HPLC-Untersuchungen und für die nette Zusammenarbeit gedankt.

Herr Dr. Ulrich Girreser ermöglichte mir die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen am Pharmazeutischen Institut und war mir eine große Hilfe bei der Diskussion der Massenspektren. Vielen Dank dafür!

Ein ganz persönliches Dankeschön möchte ich an meine Eltern richten, die mich stets unterstützt haben und immer für mich da waren. Ohne Euch wäre mir dies so nicht möglich gewesen!

Abschließend möchte ich mich noch bei einem für mich ganz besonderen Menschen dafür bedanken, daß er für mich da war und im „Notfall“ immer genügend aufbauende Worte parat hatte. Vielen Dank, Ingo!

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

- Name: Imke Bodendiek
- geboren am 24.03.1977 in Kiel
- Familienstand: ledig, keine Kinder
- Vater: Prof. Dr. Rainer Bodendiek, Mathematikprofessor an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Mutter: Marita Bodendiek, geb. Braun, Apothekerin
- Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

- Grundschule am Heidenberger Teich in Kiel vom Sommer 1983 bis Frühjahr 1987
- Gymnasium im Bildungszentrum Mettenhof in Kiel:
Fachhochschulreife im Frühjahr 1995
Abitur im Frühjahr 1996

Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel:

- Beginn zum Wintersemester 1996/1997
- Bestehen des ersten Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung im März 1999
- Bestehen des zweiten Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung im November 2000

Praktisches Jahr:

- 1. Hälfte von Januar bis Juni 2001 in der Abteilung Pharmazeutische Entwicklung der Firma Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG
- 2. Hälfte von Juli bis Dezember 2001 in der Einhorn Apotheke in Hamburg-Altona
- Bestehen des dritten Abschnitts der Pharmazeutischen Prüfung im Januar 2002
- Erhalt der Approbation am 25. Januar 2002

Promotion an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel:

- Beginn: März 2002
- Fach: Pharmazeutische Biologie
- Referenten: Prof. Dr. Blaschek (Pharmazeutische Biologie) und Prof. Dr. Bruhn (Leiter des Zentrallabors des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein)
- Tag des Bestehen des Rigorosums: 08. Juli 2004

Berufserfahrung:

- 2,5 Jahre eine Halbtagsstelle als approbierte Apothekerin in der Einhorn Apotheke in Hamburg-Altona

Kiel, den 17.09.2004

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation - abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie hat weder ganz oder zum Teil schon an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen, noch ist sie veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht worden.