

In Gedenken an Herrn Professor Bruhn

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bruhn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frey

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juli 2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 27.07.2011

gez.: Prof. Dr. Dr. Cascorbi
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Aus der Klinik für Allgemeine Innere Medizin
(Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber)
Im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel,
an der Christian Albrechts Universität zu Kiel

Die Malayische Grubenotter, *Calloselasma rhodostoma*,
ihr Gift und dessen Wirkung auf die menschliche
Blutgerinnung

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian Albrechts Universität zu Kiel

vorgelegt von
Christian von Möllendorff
aus Jesteburg

Kiel 2010

1.	Einleitung	S.1
1.1	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	S.6
2.	Material und Methodik	S.7
2.1	Material	S.7
	a) Das Gift der <i>Calloselasma rhodostoma</i>	S.7
	b) Trennmedien, Lösungen und Chemikalien	S.7
2.1.2	Chromatographische Verfahren	S.7
2.1.2.1	Geräte	S.7
2.1.2.2	Methoden	S.8
	a) Gelfiltrationschromatographie	S.8
	b) Kationenaustauschchromatographie	S.9
2.2	Aufbereitung des Rohgiftes der <i>Calloselasma rhodostoma</i> für chromatographische Untersuchungen	S.10
2.2.1	Trennung des Rohgiftes der <i>Calloselasma rhodostoma</i> durch Gelfiltration	S.10
2.2.1.1	Material und Geräte, Gelfiltration 3g Rohtoxin der <i>Calloselasma rhodostoma</i>	S.11
2.3	Trennung der an Sephadex G-75 gewonnenen Unterfraktionen der <i>Calloselasma rhodostoma</i> am Kationenaustauscher SP Sepharose HP	S.11
2.3.1	Material und Geräte, Kationenaustauschchromatographie, gewonnene gerinnungsaktive Unterfraktionen des Rohgiftes der <i>Calloselasma rhodostoma</i>	S.12
2.3.2	Methode	S.13
2.4	Gerinnungsanalysen	S.13
2.4.1	Theoretische Voraussetzungen der Blutstillung (Hämostase)	S.13
2.5	Gerinnungstests an den Schlangengiftfraktionen der <i>Calloselasma rhodostoma</i>	S.16
2.5.1	Herstellung des humanen Normalplasmas für Gerinnungsanalysen	S.17
2.5.2	Herstellung der Probenverdünnungen	S.17
2.5.3	Behring Coagulation System (BCS)	S.18
2.5.4	Material für die Gerinnungstests	S.19
2.5.5	Methode	S.20
2.5.6	Bestimmung des Quickwertes (Thromboplastinzeit)	S.20

2.5.7	Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT)	S.22
2.5.8	Einzelfaktorenanalyse	S.23
2.5.8.1	Einzelfaktorenanalyse des exogenen Gerinnungssystems	S.23
2.5.8.2	Einzelfaktorenanalyse des endogenen Gerinnungssystems	S.24
3.	Ergebnisse	S.25
3.1	Proteinauftrennung mittels Gelfiltrationschromatographie	S.26
3.2	Proteinauftrennung mittels Kationenaustauschchromatographie	
3.3	Gerinnungstests	S.29
3.3.1	Ergebnis der globalen Gerinnungsuntersuchungen der Hauptfraktionen	
	Gerinnungsanalysen	S.29
3.3.2	Ergebnis der Einzelfaktorenanalyse der Hauptfraktionen	S.30
3.3.3	Ergebnis der Einzelfaktorenanalyse der durch	
	Kationenaustauschchromatographie weiter unterteilten Hauptfraktionen	S.31
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Globaltests (Quick-Wert und PTT)	
	und der Einzelfaktorenanalyse betreffend das	
	Gift der <i>Calloselasma rhodostoma</i>	S.32
3.3.4.1	Die globalen Gerinnungstests	S.32
3.3.4.2	Die Einzelfaktorenanalyse	S.32
4.	Diskussion	S.34
5.	Zusammenfassung	S.39
6.	Literaturverzeichnis	S.40
7.	Danksagung	S.45
8.	Curriculum vitae	S.45

1. Einleitung

Die Malayische Mokassinotter, *Calloselasma rhodostoma*, ist eine Giftschlange. Sie kommt vor allem in Südostasien vor, dort insbesondere in Kambodscha, Laos, Thailand und Vietnam. Sie gehört zur Familie der Viperidae und zur monotypischen Gattung der Mokassin-Grubenottern.

Die nachtaktiven Tiere erreichen eine Größe zwischen 70-145 cm. Die Körperoberseite ist je nach Herkunft hell-, mittel-, dunkel-, rot- oder graubraun. Der gesamte Körper und Schwanz ist von paarig oder versetzt liegenden dunkelbraunen, eckigen Flecken besetzt. Die Bauchseite ist einfarbig gelblich oder graubraun gefleckt.

Die *Calloselasma rhodostoma* ist ein bodenbewohnender Ansitzjäger, der baum- und buschbestandene Flächen wie Wälder, Parks und Plantagen im Flachland bevorzugt. Oft leben die Tiere in unmittelbarer Umgebung menschlicher Siedlungen. Bei Regen nähern sich die Tiere auch menschlichen Siedlungen und dringen bis in Wohnungen vor. Aufgrund ihrer braunen Färbung und Zeichnung sind die Tiere hervorragend getarnt und werden daher leicht übersehen. Die Schlange beißt bei Störungen häufig ohne Vorwarnung heftig und wiederholt zu. Ohne Zuführung eines Antiserums können die für den Menschen sehr schmerzvollen Bisse gefährlich sein und auch zum Tode führen.

Als Nahrung werden kleine Nager, Vögel, Echsen und Frösche bevorzugt.

Im Rahmen der Fortpflanzung legen die Weibchen je nach Größe zwischen 10-35 teilweise miteinander verklebte Eier pro Gelege ab. Um diese legen sie sich herum und verteidigen sie bis zum Schlupf der Jungen. Frisch geschlüpfte Jungtiere weisen eine Länge von 140-200mm auf.

Durch die Giftigkeit und insbesondere durch die Häufigkeit der Bisse der *Calloselasma rhodostoma* weckte die Schlange schon frühzeitig das Interesse der Forscher.

Als Erstbeschreiber gilt nach neuesten Erkenntnissen der Zoologe H. Kuhl, der 1824 die Schlangenart *Trigonocephalus rhodostoma* beschrieb. Die noch heute Verwendung findende Bezeichnung der Gattung der *Calloselasma rhodostoma* wurde 1860 von Cope eingeführt. (Gumprecht et al. 1998)

Die Untersuchungen zur Häufigkeit von Schlangenbissen bei Menschen in Thailand zeigten, dass von der durchschnittlichen Gesamtzahl der Bisse pro Jahr (1145) ca. 38% auf die *Calloselasma rhodostoma* entfallen (Viravan et al. 1992).

Die Opfer tragen eine obligate Gewebsschwellung davon. Weiterhin treten in 11% der Fälle eine lokale Nekrose und in 15% ein klinisch imponierendes hämorrhagisches Syndrom auf. Glücklicherweise zeigte sich bei den Menschen, dass nur ca. 10% aller Bisse eine schwere Vergiftung nach sich zogen und die Todesrate bei weniger als 2% liegt. Bei Mäusen wurde eine LD50/g von 6,1mg/kg KG für das Rohgift der *Calloselasma rhodostoma* festgestellt. Die Letalität (Giftigkeit) ist damit nicht besonders hoch (Sawai et al.1972; Imkhieo et al. 2009). Die nach dem *Calloselasma rhodostoma* Biss auftretende, auffallende Blutungsneigung verursacht durch Defibrinierung und Thrombozytopenie hat im Jahre 1963 den schottischen Mediziner Dr. Hugh Alistair Reid zur Erkenntnis gebracht, dass für dieses Phänomen eine in dem Gift befindliche gerinnungshemmende Substanz verantwortlich sein muss (Reid 1963a, Reid 1963b).

Dies geht zurück auf die Beobachtung des Falles einer jungen, im 8. Monat schwangeren malaysischen Frau, deren Blut nach dem Biss durch eine *Calloselasma rhodostoma* über längere Zeit gerinnungsgehemmt war, die sich jedoch nach kurzem stationärem Aufenthalt bester Gesundheit erfreute und vier Wochen später einen gesunden Jungen gebar. Der Fall der jungen Frau führte bei Reid zu Überlegungen, dass das Gift der *Calloselasma rhodostoma* durch seine anhaltende gerinnungshemmende Wirkung möglicherweise therapeutisch nutzbar sein könnte (Reid et al. 1963b; Reid und Chan 1968, Hawgood 1997).

Dieses Ziel verfolgende Studien führten bald danach zur Isolierung einer Thrombin aktiven Serinprotease aus dem Rohgift, dem Ancrod (oder Arvin) (Esnouf und Tunnah 1967), das im Gegensatz zu Thrombin in der Lage war in vivo das Fibrinogen so zu spalten, dass dabei sich keine Thromben bildeten und Thromben die bereits vorhanden waren, sich leicht durch reaktive Fibrinolyse auflösten (Reid und Chan 1968).

Wegen der außerordentlich wichtigen medizinischen Relevanz dieses Giftes wurden zahlreiche Studien dem Gift der *Calloselasma rhodostoma* gewidmet (Chan et al. 1965, Regoeczi et al. 1966, Ashford et al. 1968, Marshall und Esnouf 1968, Denson 1969, Regoeczi und Bell 1969, Collins und Jones 1972, Hatton 1973, Ouyang et al. 1983, Ho et al. 1986a, Tan et al. 1986, Cole und Bormanis 1988, Ponnudurai et al 1993, Dambisye et al. 1994 Daltry et al. 1996, Tan et al. 1997, Oliva et al. 2007).

Das Ancrod (auch: Arvin) macht ca. 7% des Gewichtes des Rohgiftes aus (Esnouf und Tunnah, 1967). Diese so genannten SVTLE (SnakeVenomThrombinLikeEnzymes) wirken antikoagulatorisch durch eine Umwandlung von Fibrinogen in eine nicht quervernetzende

Form („crosslinked“) des Fibrin, dessen Reste anschließend durch verschiedene enzymatische Prozesse, insbesondere durch eine rasch eintretende reaktive Fibrinolyse, abgebaut werden. Bei Einbringen des Ancrod in Mensch oder Tier kommt es zu einer kontinuierlichen Mikrokoagulation des Fibrinogen, die allerdings in instabilen und fast gleichzeitig wieder durch Plasmin im Abbau begriffenen Fibrinnetzen mündet.

Aus diesem Grunde führt Ancrod, obwohl es *in vitro* koagulatorisch wirkt, *in vivo* zu einer Blutgerinnungsstörung durch den kontinuierlichen Verbrauch von Fibrinogen.

Ancrod wurde in vielen Studien hinsichtlich seiner möglichen therapeutischen Indikationen untersucht. Als Einsatzgebiet wird zum heutigen Zeitpunkt die Therapie von heparinassozierten Thrombozytopenien und Thrombosen gesehen.

Im Rahmen der Studien STAT und ESTAT bei Schlaganfallpatienten verlief nach ersten ermutigenden Ergebnissen eine Verabreichung von Ancrod hingegen enttäuschend (Sherman et al. 2000, Hennerici et al. 2006), da das Medikament zur Behandlung eines akuten ischämischen Schlaganfalles nach Ablauf von mehr als 3h nicht empfohlen werden konnte. Statistische Auswertungen, wonach sich durch eine Modifikation des Therapieregimes sowohl die Effektivität steigern als auch die Komplikationsrate senken lassen sollten (Levy et al. 2009), bestätigten sich leider nicht. Im Gegenteil traten, trotz der erwünschten schnellen Defibrinierung und Vermeidung eines prolongierten erniedrigten Fibrinogenlevels, gehäuft intracranielle Blutungen auf (del Zoppo et al. 2009).

Eine zweite hämostatisch aktive Gruppe des Giftes der *Calloselasma rhodostoma* stellen die Hämorrhagine dar. Das Gift der *Calloselasma rhodostoma* enthält davon mindestens fünf verschiedene (Tan und Kanthimathi 1989).

Die Hämorrhagine sind Metalloproteasen und führen zu einer Destruktion der Gefäßwand. Die enzymatischen Angriffspunkte sind vermutlich die kollagenartige Basalmembran und weitere kollagene Strukturen am Blutgefäß (Ohsaka 1979).

Das Haupt-Hämorrhagin der *Calloselasma rhodostoma* heißt Rhodostoxin.

Es handelt sich um eine Zink-Metalloprotease, welche stark hämorrhagisch und ödembildend wirkt (Ponnudurai et al. 1993). Ebenfalls lässt sich eine anti-thrombozytäre Aktivität von Rhodostoxin nachweisen (Huang et al. 1993).

Als eine weitere wichtige Gruppe der hämatologisch wirksamen Proteine des Rohgiftes gelang es die Induktoren der Thrombozytenaggregation mit ihrem wichtigsten Vertreter, dem Rhodycetin, zu isolieren (Ouyang et al. 1986, Shin und Morita 1998). Die Wirkung des Rhodycetins an den Thrombozyten tritt dabei unabhängig von den bekannten Rezeptoren,

welche durch Kollagen induziert werden, auf (Bergmeier et al. 2001). Mittlerweile fand sich als Signalweg der CLEC-2 Rezeptor (C-Type Lectin Receptor) auf der Thrombozytenoberfläche, welcher den Angriffspunkt für Rhodocytin darstellt. Über diesen wird eine Signalkette in Gang gesetzt, welche in der Plättchenaktivierung und schließlich der Aggregation mündet (Suzuki-Inoue et al. 2006, Watson et al. 2008).

Das Rhodocetin spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer Thrombozytopenie nach Schlangenbiss.

Ebenfalls konnten auch die Inhibitoren der Thrombozytenaggregation, die so genannten Desintegrine (Proteine) aus dem Gift der *Calloselasma rhodostoma* isoliert werden (Teng und Huang 1991, Huang et al. 1987, Ouyang et al. 1983)

Das älteste bekannte Desintegrin ist das Rhodostomin (auch: Kistrin). Es verhindert die Anlagerung von Fibrinogen durch Bindung an das Integrin α IIb β 3 (Rezeptor) der Thrombozyten.

Nach der Entdeckung der Metalloprotease Kistomin im Rohgift der *Calloselasma rhodostoma* (Huang et al. 1993) gelang erst kürzlich zusätzlich zum schon gelungenen Nachweis der Blockierung des Glykoprotein Ib Rezeptors auch der wissenschaftliche Beleg einer destruktiven Wirkung des Kistomins auf den Glykoprotein VI Rezeptor.

Die Unterbindung der Interaktion zwischen den Thrombozyten und der bei Gefäßverletzung freigelegten Matrix (Kollagen) führt zu einer Blutgerinnungshemmung, welche potenziell einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen kann (Hsu et al. 2008).

Die Gruppe der L-Aminosäureoxidasen stellt mit ca. 30% einen Hauptanteil im getrockneten Schlangenrohgift. Bei dem Enzym handelt es sich um ein saures Glykoprotein (Geyer et al. 2001). In Ratten konnte eine starke ödembildende Wirkung nachgewiesen werden. Zudem schwächt es die Plättchenaggregation und entfaltet so seine Wirkung auf die Hämostase. Abschließend seien noch die im Gift der *Calloselasma rhodostoma* beschriebenen „basic Proteins“, welche eine leichte Ödembildung hervorrufen, die Phospholipase A2 Enzyme und die Arginin Ester Hydrolasen zu erwähnen (Tan 1984).

Trotz der sehr großen Zahl der intensiven wissenschaftlichen Studien, die der Erforschung der biologisch aktiven Bestandteile des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* gewidmet sind, findet man erstaunlicherweise in der Literatur nur sporadisch gut reproduzierbare biochemische Methoden beschrieben (e.g. Esnouf und Tunnah 1967), mit Hilfe derer ein benannter Wirkstoff isoliert und rein dargestellt werden kann.

Aus diesem Grunde wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein leicht durchführbares einfaches chromatographisches Verfahren ausgearbeitet, das in einem Arbeitsgang die

Gesamtheit der Proteine des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* aufgetrennt zu erfassen gestattet.

Dies und die gerinnungsphysiologische Untersuchung der auf diese Weise gewonnenen Proteine sind das Thema dieser Dissertation.



Abb.1 Die Schlange *Calloselamsa rhodostoma*

1.1 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Wegen der Wichtigkeit der Bereitstellung einiger reiner Proteine des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* in der hämostaseologischen Forschung und der Tatsache, dass in der Literatur kein Standardverfahren beschrieben worden ist, mit welchem sämtliche Proteine des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* in einem Arbeitsgang gereinigt werden können, bestand erstmals die Notwendigkeit ein solches Verfahren zu entwickeln, welches weitgehend die Erfassung sämtlicher Proteine und Polypeptide des Rohgiftes gestattet.

Danach sollten die isolierten und gefriergetrockneten Fraktionen einzeln auf ihre Gerinnungswirksamkeit getestet werden, wonach ein Gesamtbild der gerinnungswirksamen Proteine und Polypeptidbestandteile des Giftes der *Calloselasma rhodostoma* entstehen kann. Die bei diesen Studien erhaltenen Ergebnisse mögen das Rückgrat dieser Arbeit bilden, die dann in den Diskussionen mit den Daten anderer Forscher verglichen werden sollen.

Im Einzelnen ergeben sich daraus für die Proteinaufreinigung und die anschließenden Gerinnungsanalysen folgende Fragestellungen:

1. Welche Methode ist am geeignetsten zur Erfassung sämtlicher Proteinfractionen des Giftes der *Calloselasma rhodostoma*?
2. Wie wirken sich die isolierten Peptidfraktionen des Rohgiftes auf das endogene und exogene System der humanen plasmatischen Blutgerinnung aus?
3. Lassen sich aus den Ergebnissen der Globaltests und der Einzelfaktorentests der menschlichen Blutgerinnung Schlüsse zur therapeutischen Verwendbarkeit der betreffenden Fraktionen ziehen?

2. Material und Methodik

2.1. a) Das Gift der *Calloselasma rhodostoma*

Das Rohgift der *Calloselasma rhodostoma* stammt aus den Ventoxin Laboratories (Frederick, MD., U.S.A.)

2.1. b) Trennmedien, Lösungen und Chemikalien

Sephadex G-75, Sephadex G-25 fine, SP Sepharose HP (Pharmacia Fine Chemical Co., Uppsala, Schweden/ GE Healthcare), Ammoniumacetat, Trifluoressigsäure (TFA), Eisessig (E.Merck, Darmstadt, Deutschland), Acetonitril gradient grade, α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure, L-Fucose (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), Acetonitril analytisch (J.T.Baker, V.A Deventer, Niederlande), deionisiertes, pyrogenfreies Wasser (Elga, Ubstadt-Weiher, Deutschland).

Alle Elutionsmittel wurden vor ihrer Anwendung mit einem 0,2 μ m Filter filtriert und im Vakuum entgast.

2.1.2 Chromatographische Verfahren

2.1.2.1 Geräte

Gelfiltrations- und Kationenaustauschchromatographen:

Elga-Maxima-Anlage (Elga, Ubstadt-Weiher, Deutschland), Vak.-Filtersystem (Millipore), Seitz K 1000-Filter (Seitz Filterwerke, Bad Kreuznach, Deutschland), Magnetrührer (Rührmotoren), Zentrifuge Sigma K 30, Rotor Nr. 12158, UV-Detektor (LKB-2138 Uvicord S, Pharmacia, Schweden), LF 521 Leitfähigkeitsmessgerät (WTW, Deutschland), Mikrodurchflusszelle LMD/S (WTW, Deutschland), Fraktionsammler (LKB Ultrac 7000,

Pharmacia, Schweden), Fallbügelschreiber (Colora Messtechnik, GmbH), Rotationsverdampfer Heidolph 0B 2001 (Schwalbach, Deutschland), Membranpumpe Büchi B-171, Vacobox (Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland), Kühlung (Kühlmobil, van der Heijden-Labortechnik GmbH, Dörentrup, Deutschland), Lyophilisator, Christ Alpha, 2-4, LOC 1, Gefriertrockner (Vacuubrand GmbH, Wertheim, Essen, Deutschland).

2.1.2.2 Methoden

2.1.2.2 a) Gelfiltration

Prinzip der Trennung

Die zu trennende Substanz, hier das aufbereitete Rohtoxin der *Calloselasma rhodostoma*, wird homogen gelöst auf die chromatographische Säule aufgebracht. In der Säule befindet sich ein Sephadex G-75 Gel, die so genannte stationäre Phase, welches kugelförmige poröse Polymere einer bestimmten Größe aufweist. Der Schwerkraft folgend durchläuft das Rohtoxin die Säule von oben nach unten. Kleine Proteine diffundieren aufgrund ihrer Größe durch die Poren in das Gel und wieder hinaus, wohingegen große Proteine die Säule schnell und ohne Interaktion mit der stationären Phase durchlaufen und sich in den ersten Fraktionen sammeln.

Unterstützt wird der Durchfluss durch die kontinuierliche Gabe von Laufmitteln, dem Elutionsmittel. Das Laufmittel bewirkt das Ausspülen aller Partikel aus den Poren.

Das Laufmittel 1 M Essigsäure wirkt der Assoziation von Proteinen entgegen, so dass dadurch das Auftreten von Artefakten minimiert wird.

2.1.2.2. b) Kationenaustauschchromatographie

Prinzip der Trennung

Bei der Kationenaustauschchromatographie werden die zuvor über Gerinnungstests ausgewählten Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie des *Calloselasma rhodostoma* Rohgiftes auf eine Säule, die mit einem Kationenaustauscher gefüllt wurde, aufgetragen.

In diesem Falle werden völlig anders als zuvor bei der Gelfiltration die unterschiedlichen Ladungsverhältnisse der in wässriger Lösung ionisiert vorliegenden Proteine und Polypeptide für die Trennung genutzt. Die stationäre Phase besteht aus einem quervernetzten Polysaccharid, an das beim Kationenaustausch kovalent gebundene, negativ geladene Gruppen vorliegen.

Beim Durchlauf der gelösten Giftfraktionen durch die Säule binden sich die basischen Proteine, die Kationen, in Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Konzentration des Pufferlaufmittels verschieden stark an das Harz. Je nach Ladung werden schwach oder stark basische Proteine unterschiedlich stark gebunden. Demzufolge werden die sauren, negativ geladenen, nicht gebundenen Proteine die Säule schnell durchlaufen und als erstes im Fraktionssammler aufgefangen.

Die gebundenen basischen Proteine werden je nach Stärke ihrer Ladung und damit Bindung an die stationäre Phase fortlaufend durch einen Salzgradienten mit steigender Konzentration und mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe von der Säule gelöst, so dass die stark basischen Proteine zuletzt den Kationenaustauscher verlassen und im Fraktionssammler aufgefangen werden.

Für die Weiterauftrennung mittels der Kationenaustauschchromatographie wurden diejenigen Fraktionen der Gelfiltration ausgewählt, die eine starke Wirkung auf die Blutgerinnung gezeigt haben.

2.2 Aufbereitung des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* für chromatographische Untersuchungen

2.2.1 Trennung des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* durch Gelfiltration

Als Säulenmatrix wurde der Gelbildner Sephadex G-75 gewählt. Das Trennmedium Sephadex ist ein quervernetztes Dextransderivat. Je nach Porengröße werden unterschiedliche Molekülgrößen erfasst. Der Trennbereich von Sephadex G-75 liegt zwischen 3.000 und 80.000 Dalton. Als Laufmittel wurde 1 M Essigsäure verwendet.

Während des Durchlaufs des Rohgiftes durch die Säule wurde die Detektion der Proteine bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm mit Hilfe des Photometers LKB-2138 Uvicord S durchgeführt. Die Leitfähigkeit des Elutionsmittels wurde mit WTW Leitfähigkeitsmessgeräten mit WTW Mikrodurchflusszellen LMD/S gemessen. Gesammelt wurden die Eluate von LKB Ultrorac 7000 Fraktionssammlern.

Die Chromatogramme wurden mit dem Fallbügelschreiber der Colora Messtechnik aufgezeichnet, auf Pergamentpapier übertragen, verkleinert und als Kopien bzw. Nachzeichnungen zur Dokumentation hinterlegt.

Das abgewogene Rohgift (3g) wurde in 60ml 10%iger Essigsäure gelöst und anschließend bei 16.000 RPM für eine Dauer von 5 Minuten zentrifugiert.

Der gelöste Überstand wurde in 12ml Portionen nacheinander auf eine mit 1M Essigsäure equilibrierte Gelfiltrationssäule, 4x70cm Sephadex G-75 aufgetragen; so ergaben sich nacheinander insgesamt fünf Trennläufe.

Nach dem Durchlauf des gesamten Rohgiftes durch die Gelfiltrationssäule wurden die entsprechenden Fraktionen gepoolt und unter Vakuum bei 12 Torr stark konzentriert, eingefroren und anschließend im Gefriertrocknungsgerät über 2-3 Tage lyophilisiert. Dadurch lagen die Fraktionen in pulverisierter Form vor und es konnten gut dosierbare Proben für die Gerinnungsanalysen aus dem Rohgift hergestellt werden. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels weiterer chromatographischer Verfahren weiter aufgetrennt.

2.2.1.1 Material und Geräte, Gelfiltration von 3g Rohtoxin der *Calloselasma rhodostoma*

Chromatographie von 3g des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* an Sephadex G-75 gelöst in 60ml 10% Essigsäure und aufgetrennt in 5x12ml Portionen:

Detektor	LKB 218 Uvicord S LKB Ultrorac 7000
Detektionslänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmessgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitsmesszelle	Mikrodurchflusszelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	Colora Messtechnik (Deutschland)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	4 x 70 cm
Säulenmaterial	Sephadex G-75
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min
Elutionsmittel	1 M Essigsäure

2.3 Trennung der an Sephadex G-75 gewonnenen Unterfraktionen der *Calloselasma rhodostoma* am Kationenaustauscher SP Sepharose HP

Für die Weiteraufreinigung mit der Kationenaustauschchromatographie an SP Sepharose HP (1,5 x 5,5 cm) wurden die isolierte Fraktionen 2 und 2b verwendet, weil diese in der ersten Gerinnungstestreihe in vitro eine hohe Gerinnungsaktivität am Blutplasmapräparat zeigten. Beim Säulenmaterial der stationären Phase handelt es sich um eine SP Sepharose HP, einem stark sauren Sepharosederivat. Die Bezeichnung SP steht für Sulfonylpropyl als stark saure Gruppe. Aus der Säule wurden die basischen Proteine und Polypeptide durch einen Ammoniumacetatpuffer mit einem Lineargradienten von 0,01 / 0,1 M bis 1M eluiert, um dann in gleicher Weise wie bei der Gelfiltration detektiert und von dem Fraktionssammler aufgefangen zu werden.

2.3.1 Material und Geräte, Kationenaustauschchromatographie, gewonnene gerinnungsaktive Unterfraktionen des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma*

Chromatographie der Unterfraktionen 2 und 2b an SP Sepharose HP, Ammoniumacetat pH 5,1.

Detektor	LKB 218 Uvicord S LKB Ultrorac 7000
Detektionslänge	$\lambda = 280 \text{ nm}$
Leitfähigkeitsmessgerät	LF 521 (WTW, Deutschland)
Leitfähigkeitsmesszelle	Mikrodurchflussszelle LMD/S (WTW, Deutschland)
Schreiber	Colora Messtechnik (Deutschland)
Fraktionssammler	LKB Ultrorac 7000 (Pharmacia, Schweden)
Säulendimension	1,5 x 5,5 cm
Säulenmaterial	SP Sepharose HP
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min
Elutionsmittel	Ammoniumacetat pH 5,1 0,01-1M

Die Elution wurde folgendermaßen durchgeführt:

0,01 M Ammoniumacetat pH 5,1
 Gradient 0,01-0,1 M Ammoniumacetat pH 5,1
 0,1 M Ammoniumacetat pH 5,1
 Gradient 0,1-0,3 M Ammoniumacetat pH 5,1
 0,3 M Ammoniumacetat pH 5,1
 Gradient 0,3-1,0 M Ammoniumacetat pH 5,1
 1,0 M Ammoniumacetat 5,1
 2 M Natriumchlorid
 H₂O
 Ammoniaklösung 5%
 1M NaOH

2.3.2 Methode

Zur Auftrennung wurden die an Sephadex G-75 aufgetrennten Untergruppen 2 und 2b in 50ml Wasser gelöst, mit 0,1 ml Essigsäure versetzt, 20 Minuten gerührt, 5 Min bei 16.000 RPM zentrifugiert und die Überstand auf die Säule aufgebracht. Eluiert wurde mit linearen Gradienten von 0,01 bis 1M Ammoniumacetat bei einem pH von 5,1 sowie danach stufenweise mit 2 M Natriumchlorid, destilliertes Wasser und verdünnte (5%) Ammoniaklösung am Ende. Die Säule wurde zum Schluss mit 1M NaOH gewaschen.

2.4. Gerinnungsanalysen

2.4.1 Theoretische Voraussetzungen der Blutstillung (Hämostase)

Zur Untersuchung der Wirkung der isolierten Protein – und Peptidfraktionen des Giftes der *Calloselasma rhodostoma* auf die menschliche Blutgerinnung soll zunächst der Mechanismus der Hämostase beschrieben werden.

Der Begriff „Hämostase“ entstammt den griechischen Wörtern für Blut und Stillstand und beschreibt den Prozess der Blutstillung.

Die menschliche Blutstillung folgt festen Abläufen, die sowohl parallel als auch zeitlich versetzt ablaufen. Das System beruht auf dem Zusammenspiel zwischen der Gefäßwand, den Plättchen, plasmatischer Gerinnung sowie dem fibrinolytischen System.

Die primäre Hämostase bezeichnet den ersten, ca. 1-3 Minuten dauernden Schritt der Blutgerinnung.

Wird ein Blutgefäß verletzt, die Endothelschicht zerstört und das subendotheliale Gewebe freigelegt, werden dadurch Bindungsstellen für so genannte Adhäsionsmoleküle präsentiert. Diese Adhäsionsproteine, der von-Willebrand-Faktor, das Fibrinogen und das Fibronectin, sind Brückenbildner zwischen dem subendothelialen Bindegewebe und den zirkulierenden Blutplättchen. Diese werden aktiviert, verändern ihre Form (shape change) und docken durch „kleine Füßchen“ (Filopodien) reversibel aneinander an. Dies führt durch weitere

Aktivierungsschritte und weitere Anlagerung von Plättchen zur Bildung eines Blutplättchenpfropfes, dem so genannten Plättchenthrombus.

Dieser stellt den primären Wundverschluss dar.

Parallel führt eine Anpassung der Oberflächenstruktur der Plättchen zu einer Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems. Das gemeinsame Endprodukt der primären und sekundären Hämostase ist das den Thrombozytenpfropf irreversibel stabilisierende Fibrin.

Die sekundäre Hämostase, oder auch plasmatische Blutgerinnung läuft über im Blut vorliegende Gerinnungsfaktoren ab.

Die Gerinnungsfaktoren werden in 4 funktionelle Klassen unterteilt:

1. Serinproteasen (FII, FVII, FIX, FX, FXII, Präkallikrein)
2. Kofaktoren (FV, FVIII, hochmolekulares Kininogen)
3. Katalysatoren (Kalziumionen, Phospholipide, FIII)
4. Substrat (FI, Fibrinogen)

Aktivierte übergeordnete Gerinnungsfaktoren mit Enzymaktivität überführen untergeordnete Gerinnungsfaktoren, welche als Proenzyme vorliegen, in ihre aktive Form.

Zusätzlich beschleunigen Kofaktoren diese Vorgänge.

Dieser kaskadenförmige Vorgang führt zur Fibringerinnungsbildung.

Der Ablauf der plasmatischen Gerinnung erfolgt auf dem intrinsischen oder extrinsischen Weg.

Das exogene System wird durch den Kontakt des Plasmas mit dem transmembranösen Protein Tissue Factor (TF) eingeleitet. Dieser TF wird nur von Zellen außerhalb des Gefäßbettes präsentiert, so dass erst bei einer substanziellen Verletzung des Blutgefäßes ein Kontakt mit dem Blut stattfindet und die Gerinnung eingeleitet wird.

Der TF hat eine hochaffine Bindungsstelle für den Faktor VII/VIIa. Der Faktor VIIa liegt als Einziger in aktivierter Form in einer hohen Konzentration (ca. 1%) im Plasma vor. Daher beginnt diese Form der Gerinnung über die Bildung des TF-FVIIa-Komplexes.

Dieser regt die Gerinnungskaskade über 2 Wege an:

- er überführt direkt den FX durch enzymatische Spaltung in seine aktive Form (FXa)
- er aktiviert den Faktor IX, welcher als Faktor IXa mit seinem Co-Faktor VIIIa den FIXa-VIIIa-Komplex bildet und ebenfalls die Konversion von FX zu FXa katalysiert (so genannte Josso Schleife / Barthels und von Depka 2003)

Das endogene System beginnt mit der Aktivierung von FXII (Hagemann Faktor) durch Kontakt zu unphysiologischen Oberflächen (z.B. die neg. Ladung freiliegenden Kollagens).

Nacheinander erfolgt die Aktivierung von Plasmathromboplastin (FXI), dem antihämophilen Globulin B (Faktor IX), dem antihämophilen Globulin A (Faktor VIII) und schließlich wieder des Stuart-Power-Faktors (Faktor X).

Der Faktor Xa als gemeinsame Endstrecke des endogenen und exogenen Gerinnungssystems vermag Prothrombin (Faktor II) in proteolytisch wirksames Thrombin (Faktor IIa) umzuwandeln. Thrombin ist das zentrale Gerinnungsenzym. Es spaltet Fibrinopeptide aus dem Fibrinogen ab und kann zudem FV, FVIII, FXI und Thrombozyten aktivieren. Die Fibrinopeptide bilden zunächst reversible, wasserlösliche Bindungen, bevor durch den Faktor XIII eine mechanische Stabilisierung des Fibrin-Thrombozyten-Gerinnsels sowie eine feste Verankerung an der extrazellulären Matrix erreicht wird.

Die Regulation der Gerinnselbildung erfolgt wie hiermit beschrieben:

Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) neutralisiert die enzymatische Aktivität von FXa und des extrinsischen Aktivierungskomplexes. Die Inaktivierung erfolgt durch direkte Bindung des TFPI an den Faktor Xa. In einem nachfolgenden Schritt kann der TFPI-FXa Komplex die Aktivität des extrinsischen Gerinnungsweges durch direkte Bindung an den TF-FaktorVIIa Komplex vermindern.

Das in der Leber synthetisierte Antithrombin bindet kovalent an Faktor IIa (Thrombin) und FXa und unterdrückt so die Gerinnung. Die Zugabe von Heparin steigert die Wirkung des Antithrombin auf das ca. 200-fache.

Das Protein C System kontrolliert die Thrombinbildung über eine negative Rückkopplung. Wenn Thrombin an in der Zellmembran von Endothelzellen verankertem Thrombomodulin andockt, verändert es seine Substratspezifität. Es verliert die Fähigkeit Fibrinogen, FV, FVIII, FXI und Thrombozyten zu aktivieren, überführt dann jedoch Protein C in aktiviertes Protein C (APC). APC bindet an seinen Kofaktor Protein S und gemeinsam inaktivieren diese die Faktoren VIIa und Va.

Die physiologische Auflösung des Thrombus, die Fibrinolyse, erfolgt durch das proteolytische Enzym Plasmin. Der Gewebeplasminaktivator des exogenen Systems („tissue-type plasminogen activator“, t-PA) und Urokinase („urokinase type plasminogen activator“, u-PA) aktivieren das Proenzym Plasminogen zu seiner aktiven Form Plasmin.

2.5.1 Herstellung des humanen Normalplasmas für Gerinnungsanalysen

Die Gerinnungsaktivität der Giftfraktionen der *Calloselasma rhodostoma* wurde an gesundem Humanplasma getestet.

Um während der Blutabnahme eine physiologische Gerinnung zu verhindern, wird dem Venenblut 0,1 molares Natriumcitrat im Verhältnis eins plus neun hinzugefügt. Bei der Blutentnahme werden mit Citrat versehene Blutabnahmeröhrchen des Sarstedt-Monovettensystems benutzt: mit 0,5 ml Citratlösung (0,106 mol/l) gefüllte 5-Millimeter-Monovette und einer 0,8 x 33mm Kanüle der Firma Sarstedt. Zur Vermeidung einer Gerinnungsaktivierung wird das Blut schaumfrei entnommen und der erste, potentiell das exogene Gerinnungssystem anstoßende Gewebefaktor enthaltende Tropfen, verworfen.

Die Trennung der Blutzellen vom Plasma erfolgt durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen pro Minute. Dadurch wird das Austreten gerinnungsaktiver Substanzen aus den Erythrozyten während der laufenden Analysen verhindert. Das Plasma wird bis zu 4h im Kühlschrank aufbewahrt, darüber hinaus wird es zur längeren Verwendbarkeit bei -20 Grad Celsius tiefgefroren.

Um das gewonnene Normalplasma jetzt für Gerinnungsanalysen im Rahmen der hier durchgeführten Analysen zu nutzen, wird ein Mischplasma von mindestens zehn Proben zu gleichen Teilen hergestellt. Hieraus werden die benötigten Plasmamengen für die jeweiligen Gerinnungsanalysen entnommen.

2.5.2 Herstellung der Probenverdünnungen

Die gefriergetrockneten Fraktionen des Schlangengiftes der *Calloselasma rhodostoma* werden in Eppendorfgläser eingewogen. Die Schlangengiftfraktionen werden in 0,9%iger NaCl Lösung auf eine Konzentration von 1mg/ml verdünnt, um eine Endkonzentration im Testansatz von 0,1mg/ml zu erreichen.

Hierfür werden 900µl gepooltes Normalplasma mit 100µl Schlangengift der Konzentration 1mg/ml gemischt.

Pro Messserie wird ein Leerwert (LW) mitgeführt. Der Leerwert setzt sich aus 900µl Normalplasma und 100µl physiologischer Kochsalzlösung zusammen.

2.5.3 Behring Coagulation System (BCS)

Das für die Untersuchung verwendete BCS ist ein vollautomatisiertes, hochflexibles Analysegerät in der Gerinnungsanalytik. Die zwei Abschnitte des Gerätes sind zum einen die Rackstation, welche die Proben und Reagenzien beherbergt, andererseits der Messteil, in dem die Auswertung stattfindet. Nach der Bestückung des Gerätes mit den Reagenzien und Proben werden diese in den Arbeitsbereich eingefahren. Eine eindeutige Zuordnung und Identifikation eines Probenracks findet durch Barcodes statt. Dadurch kann die Software die zugehörigen Daten, wie z.B. Sollwerte von Kontrollen oder Bezugskurven zuweisen.

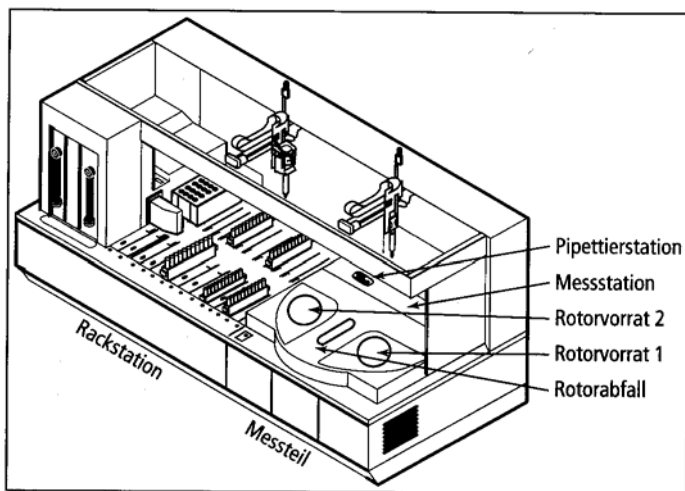


Abb.3: Rackstation des BCS-Gerätes der Firma Dade Behring (Marburg); mit freundlicher Genehmigung aus H.D. Bruhn, U.R. Fölsch, H. Schäfer, Lehrbuch der Labormedizin 2008, S. 496

Das Messteil besteht aus einem Rotorhandler, dem Messphotometer und fünf Positionen für die Rotoren. Aufgabe des Rotorhandlers ist es, die Küvettenrotoren in die angestrebte Position zu bringen.

Der Küvettenrotor setzt sich aus 20 Reaktions- und Messküvetten zusammen. Zu jeder Küvette gehören drei Pipettierpositionen und zwei Vorverdünnungskammern. Automatisch gelangen die Proben in die Pipettierkammern. Die Reaktion wird durch Zentrifugalmischen gestartet. Dabei vermischen sich die Proben und Reagenzien in der Vorverdünnungskammer und die Gerinnung wird gestartet.

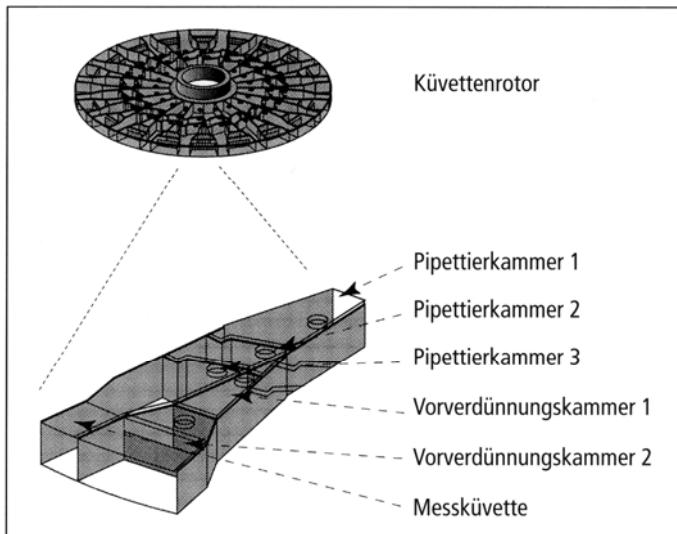


Abb.4: Küvettenrotor des BCS-Gerätes der Firma Dade Behring (Marburg); mit freundlicher Genehmigung aus H.D. Bruhn, U.R. Fölsch, H. Schäfer, Lehrbuch der Labormedizin 2008, S. 495

Bei den Gerinnungstests muss eine Zeit ermittelt werden, zu der der Ansatz gerinnt. Durch die Fibrinbildung und die damit verbundene Viskositäts-erhöhung respektive Eintrübung der Probe kann ein durch die „fixed absorbance“ Methode des BCS festgelegter Schwellenwert gemessen und ausgewertet werden.

2.5.4 Material für die Gerinnungstests

Reagenzien zur Bestimmung der Thromboplastinzeit (Quicktest)

- Thromboplastinreagenz Thromborel S (Dade Behring, Marburg)
- Physiologische Kochsalzlösung
- Gepooltes Normalplasma
- Behring Coagulation System
- Sarstedt-Monovettensystem : 5 ml Monovetten gefüllt mit 0,5 ml Citratlösung
- (0,0106 mol/l), 0,8 x 33mm Kanülen (Sarstedt)

Reagenzien zur Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT)

- Pathrombin SL (Dade Behring, Marburg): Siliziumoxid und pflanzliche Phospholipide
- Kalziumchloridlösung 0,025 mol/l (Dade Behring, Marburg)
- gepooltes Normalplasma
- Plastikteströhrchen (Firma Sarstedt)
- Behring Coagulation System
- Sarstedt-Monovettensystem: 5 ml Monovetten gefüllt mit 0,5 ml Citratlösung
- (0,0106 mol/l), 0,8 x 33mm Kanülen (Sarstedt)

Reagenzien zur Bestimmung der einzelnen Faktoren der Blutgerinnung:

- Faktorenmangelplasma
- Reagenzien für Quick-Wert und PTT

2.5.5 Methode

Am Rohgift und an ausgewählten Fraktionen wurden der Quick-Wert und die partielle Thromboplastinzeit (PTT) bestimmt. Durch die Einzelfaktorenanalyse konnte gezeigt werden, welche Blutgerinnungsfaktoren den Quick-Wert und die PTT beeinflussen können.

2.5.6 Bestimmung des Quick-Wertes (Thromboplastinzeit)

Bei der Bestimmung der Thromboplastinzeit handelt es sich um einen globalen Gerinnungstest der die Faktoren II, V, VII und X und damit das gesamte exogene Gerinnungssystem erfasst.

Für die Bestimmung des Quick Wertes wird dem Citratplasma kalziumionenhaltiges Thromborel (Gewebethromboplastin aus der humanen Plazenta) hinzugefügt.

Das Gewebethromboplastin aktiviert den Faktor VII, welcher in Gegenwart von Kalziumionen und Phospholipiden den Faktor X aktiviert. Dieser wiederum führt im Zusammenspiel mit

Faktor V, Phospholipiden und Kalziumionen zur Freisetzung von Thrombin aus Prothrombin, das seinerseits Fibrinogen in Fibrin umwandelt.

Die Bildung von Fibrin führt zu einer Eintrübung des Reagenz. Diese voreingestellte Schwellentrübung wird durch eine photometrische Messung erfasst und als Thromboplastinzeit oder Quick Wert bezeichnet.

Die Auswertung der gewonnen Daten erfolgt über eine Bezugskurve, da die Daten von dem jeweilig eingesetzten Thromboplastinreagenz abhängig sind. Daher wird für jede Charge zunächst eine Bezugskurve erstellt und vom BCS für die Auswertung automatisch herangezogen.

Durchführung:

1. Teströhrchen auf 37°C erwärmen
2. 100 µl Normalplasma in Teströhrchen
3. eine Minute bei 37,0°C inkubieren
4. 200 µl Thromborel S Reagenz 30 Minuten auf 37°C temperieren

Bei Zugabe Thromborel S Reagenz beginnt automatisiert die Trübungsmessung im BCS.

Die Aktivität des exogenen Gerinnungssystems wird in unterschiedlichen Maßeinheiten angegeben:

1. Der Quick-Wert wird in Prozenten angegeben und mit einem Normwert verglichen. Der Quick-Wert ist jedoch vom Thromboplastinreagenz abhängig und daher bei verschiedenen Reagenzien oft nicht vergleichbar.
2. Die Prothrombin-Ratio (PR) misst den Quotienten aus der Reaktionszeit der Probe und der Reaktionszeit des Normalplasmas.
3. Die INR (International Normalized Ratio) ermöglicht unter Einbeziehung einer Berechnungsgröße für das jeweiligen charakteristischen Eigenschaften eines Reagenz, dem internationalen Sensitivitäts Index (ISI): $INR = PR \text{ hoch } ISI$, eine international einheitliche und vergleichbare Größe.

2.5.7 Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (PTT)

Bei der Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit handelt es sich um einen globalen Gerinnungstest, der das gesamte endogene Gerinnungssystem erfasst.

Er erfasst die Faktoren VIII, IX, XI, XII, High Molecular Weight Kininogen (HMWK) und Präkallikrein.

Zudem werden überlappend zum exogenen Gerinnungssystem die Faktoren II und V überprüft.

Zur Bestimmung der PTT wird das Citratplasma mit Phospholipiden (Pathrombin SL) und einem Oberflächenaktivator (Siliziumpartikel) versetzt und nach Zugabe der 0,025 molaren Kalziumchloridlösung die endogene Gerinnung gestartet.

Die an ihrer Oberfläche negativ geladenen Siliziumpartikel binden an Kontaktfaktoren (Präkallikrein, Kininogen) und aktivieren die Faktoren XI und XII. Diese aktivieren den Faktor IX, welcher, in einem Komplex mit Kalziumionen, Phospholipiden und Faktor VIII, den Faktor X aktiviert und wie auf schon oben beschriebenem Wege zur Bildung von Fibrin führt.

Das Normalplasma und Pathrombin SL werden im BCS zunächst 2 Minuten inkubiert und dann mit Kalziumchloridlösung versetzt. Wie bei der Quick Wert Messung wird die Trübung automatisch photometrisch gemessen.

Durchführung:

1. 100µl gepooltes Normalplasma
2. 100µl Pathrombin SL
3. 2 Minuten bei 37°C inkubieren
4. 100µl Kalziumchlorid

Im Moment der Zugabe des Kalziumchlorid beginnt automatisch die photometrische Trübungsmessung durch das BCS Gerät.

2.5.8 Einzelfaktorenanalyse

Unabhängig von den globalen Gerinnungstests wird in einer Einzelfaktorenanalyse genauer untersucht, welche Faktoren im Einzelnen Angriffspunkt für das Gift der *Calloselasma rhodostoma* sind.

Für diese Untersuchung werden Mangelplasmen verwendet. Diese Plasmen enthalten alle Gerinnungsfaktoren bis auf den zu untersuchenden Faktor im Überfluss.

2.5.8.1 Einzelfaktorenanalyse des exogenen Gerinnungssystems

Es werden die Faktoren II, V, VII und X bestimmt. Hierzu werden 900µl Normalplasma mit 100µl einer der aus dem Rohgift isolierten Fraktionen der *Calloselasma rhodostoma* (gelöst in 0,9% Natriumchlorid) versetzt und anschließend gut durchmischt. Aus dieser Mischung werden 100µl abpipettiert und dann zu 100µl des jeweiligen Mangelplasmas der zu untersuchenden Faktoren hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei 37°C wird die Gerinnung durch Zugabe von 200µl Thromborel S (Reagenz für die Bestimmung des Quick-Wertes) gestartet und die Gerinnungszeit durch das BCS Gerät bestimmt.

Da das Mangelplasma den zu untersuchenden Faktor nicht enthält, wird über diesen maßgeblich der Gerinnungsablauf bestimmt. Die entstandene Messung wird mit einer Bezugskurve verglichen und die Aktivität des Faktors in Prozent des Normwertes angegeben.

Durchführung:

100µl Normalplasma / Schlangengiftgemisch
+100µl Mangelplasma des zu untersuchenden Faktors
zusammen eine Minute bei 37°C inkubieren
+200µl Thromborel S

2.5.8.2 Einzelfaktorenanalyse des endogenen Gerinnungssystems

Es werden die Faktoren VIII, IX, XI und XII bestimmt. Hierzu werden 900µl Normalplasma mit 100µl einer der isolierten Fraktionen der *Calloselasma rhodostoma* (gelöst in 0,9% Natriumchlorid) versetzt und anschließend gut durchmischt. Aus dieser Mischung werden 100µl abpipettiert und dann zu 100µl des jeweiligen Mangelplasmas der zu untersuchenden Faktoren hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei 37°C wird die Gerinnung durch Zugabe von 100µl Pathrombin SL (Reagenz für die Bestimmung der PTT) gestartet und die Gerinnungszeit durch das BCS Gerät bestimmt.

Da das Mangelplasma den zu untersuchenden Faktor nicht enthält, wird über diesen maßgeblich der Gerinnungsablauf bestimmt. Die entstandene Messung wird mit einer Bezugskurve verglichen und die Aktivität des Faktors in Prozent des Normwertes angegeben.

100µl Normalplasma / Schlangengiftgemisch
+100µl Mangelplasma des zu untersuchenden Faktors
+100µl Pathrombin SL
zusammen zwei Minuten bei 37°C inkubieren
+100µl Kalziumchloridlösung 0,025 mol/l

3. Ergebnisse

3.1 Proteinauftrennung mittels Gelfiltrationschromatographie

Um sich eine Übersicht über die molekulare Größenordnung der einzelnen Fraktionen des Giftes der *Calloselasma rhodostoma* zu verschaffen, erfolgte die Auftrennung durch Gelfiltration an einer Sephadex G-75 Säule. Das Rohgift (3g) ließ sich gelchromatographisch in insgesamt fünf relevante unterschiedliche Fraktionen auftrennen.

Primär konnten folgende Fraktionen isoliert werden:

Fraktion 1 → 866mg

Fraktion 2 → 715mg

Fraktion 2b → 279mg

Fraktion 3 → 143mg

Fraktion 4 → 504mg

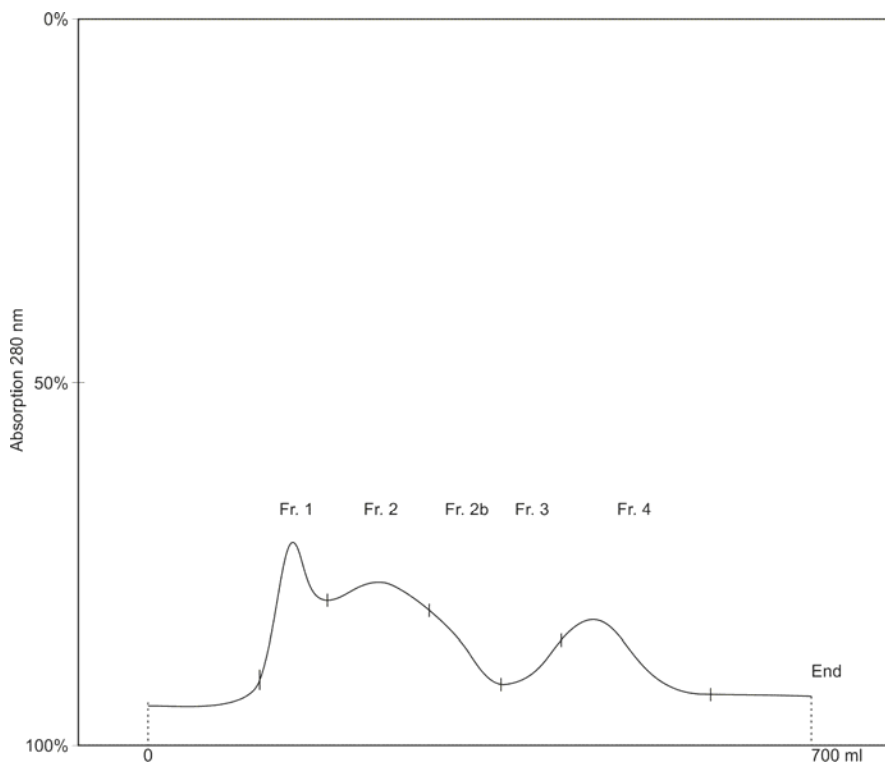


Abb.5: Gelfiltration von 12ml Rohgiftlösung (600mg) an Sephadex G-75. Säule: 4x70cm, Laufmittel: 1M Essigsäure, Laufzeit: 2ml/min, Temperatur: 20° C.

3.2 Proteinauftrennung mittels Kationenaustauschchromatographie

Die gerinnungsaktiven Substanzen der Gelfiltrationskurve (Abb.5, Fraktionen 2 / 2b) konzentrieren sich im mittelmolekularen Bereich. Aus diesem Grunde wurden diese beiden Fraktionen getrennt und mit der Kationenaustauschchromatographie weiter fraktioniert, die sich als vorzüglich geeignet zur Trennung dieser Fraktionen erwiesen hat (siehe Abb.6 und 7).

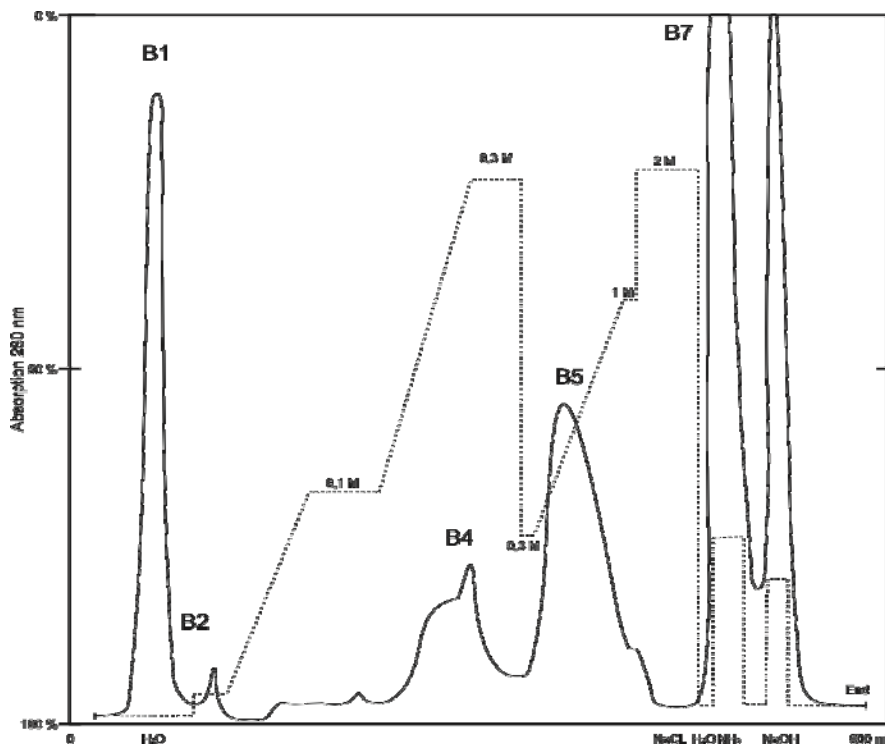


Abb.6: Fraktionen Bx: Ionenaustauschchromatographie von Abb.1 Fraktion 2 an SP-Sepharose HP, Säule 1,5x5cm. Puffer: Ammoniumacetat pH 5,1 Lineargradient mit Stufen 0-1M: 2M NaCl, H₂O, NH₃ verdünnt, 1M NaOH.

Wie Abb.6 zeigt, hat sich die stark blutgerinnungswirksame Fraktion 2 der Gelfiltration an Sephadex G-75 (Abb.5, Fraktion 2) am Kationenaustauscher SP-Sepharose HP mit Gradientenelution mit Ammoniumacetatpuffer linear steigenden Konzentrationen vorzüglich in voneinander getrennte Fraktionen auftrennen lassen. Wegen der Vollständigkeit der Trennung wurde der lineare Gradient abschnittsweise mit Elutionspassagen, in denen der Puffer isokratisch zugeführt wurde, unterbrochen. So hatten einige Proteine noch die weitere Chance auch unter den optimalen „gleichgewichtschromatographischen Bedingungen“ sich von anderen zu trennen. Neben einer „sauren“ Proteinfraktion (Abb.6, Fraktion 1), die schon in wässriger Lösung den stark sauren Kationenaustauscher SP Sepharose HP durchlief, ist eindeutig feststellbar, dass mengenmäßig die basischen bzw. stark basischen Proteine, die ab 0,3 M Pufferkonzentration aus der Säule sich eluieren lassen, in diesem Proteinbereich

dominieren. Auf die mengenmäßig dominierenden, stark basischen Proteinfractionen bei Elution mit NH_3 und NaOH sei hier hingewiesen.

Die Entsalzung der einzelnen Fraktionen erfolgte jeweils durch Gelfiltration an Sephadex G-25 in 1M Essigsäure als Laufmittel. Nach Konzentration bei vermindertem Druck wurden die Fraktionen gesammelt, gefriergetrocknet und den Gerinnungstests unterworfen.

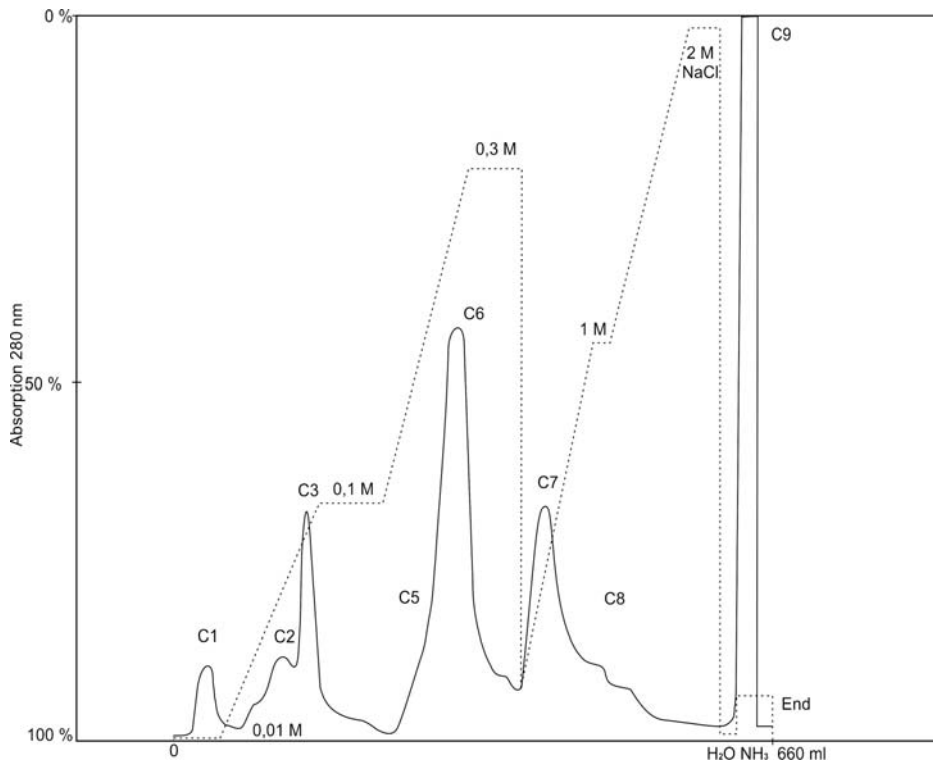


Abb.7; Fraktionen Cx: Ionenaustauschchromatographie von Abb.1 Fraktion 2b an SP-Sepharose HP, Säule 1,5x5cm. Puffer: Ammoniumacetat pH 5,1 Lineargradient mit Stufen 0-1M: 2M NaCl, H_2O , NH_3 verdünnt.

Der Verlauf der zweiten Kationenaustauschchromatographie (Abb.7), die an der Fraktion 2b der Gelfiltration an Sephadex G-75 (Abb.5, Fraktion 2b) unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde, zeigte zum ersten Lauf (Abb.6) sehr große Analogien.

Dies mag in der unvollständigen Trennung von Fraktion 2 und Fraktion 2b der Gelfiltration an Sephadex G-75 liegen, die dadurch herrührt, dass im Rahmen dieser Arbeit eine Fraktion „vorsichtshalber“ willkürlich in zwei Unterbereiche unterteilt worden ist (Abb.5, Fraktionen 2/2b). Die Entsalzung der Fraktionen der Abb.7 erfolgte auch vor der Gefrier Trocknung an Sephadex G-25. Es sei anzumerken, dass wegen den einander identischen chromatographischen Bedingungen die Fraktionen Abb.6, Fraktion 4 und Abb.7, Fraktion 6, sowie Abb.6, Fraktion 5 und Abb.7, Fraktion 7 auch identische Polypeptide enthalten müssten. Es müssten einander weiterhin identisch sein die Fraktionen Abb.6, Fraktion 7 und Abb.7, Fraktion 9, die jeweils aus den Säulen mit verdünntem NH_3 eluiert worden sind. Das mit NaOH erhaltene Eluat Abb.6, Fraktion 8, wurde verworfen. Dies passierte auch mit dem NaOH

Eluat der zweiten Ionenaustauschchromatographie (Abb.7), die nach der Elution mit NH_3 (Abb.7, Fraktion 9) erfolgte und danach nicht mehr registriert wurde.

Erstaunlicherweise erwiesen sich alle isolierten basischen Giftfraktionen im Gerinnungstest (Tab.3) als *in vitro* blutgerinnungsfördernd. Demgegenüber zeigte bemerkenswerter Weise eine saure Proteinfraktion (Abb.6, Fraktion 1) eine gerinnungshemmende Wirkung (Tab.3).

3.3 Gerinnungstests

Die Ergebnisse des Quick-Wertes und der einzelnen Gerinnungsfaktoren werden in Prozent des Normwertes angegeben. Der Normalwert für den Quick-Wert liegt bei 70-100%.

Die Normwerte der PTT liegen zwischen 26 und 36 Sekunden (siehe Herstellerangaben im Beipackzettel Pathrombin SL).

Es wurde für die Versuchsreihe als Referenz eine Leerwertmessung mit gepooltem Normalplasma und physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt.

Der Quick-Wert beträgt dabei 91%, die PTT liegt bei 35 Sekunden.

Diese Werte wurden gleich 100% gesetzt und die dazugehörigen Ergebnisse wurden prozentual in Beziehung gesetzt.

Alle Ergebnisse, die 30% oder mehr von der Norm abweichen, sind farbig in den Tabellen hervorgehoben.

3.3.1 Ergebnis der globalen Gerinnungsuntersuchungen der Hauptfraktionen der Gelfiltration an Sephadex G-75 (Abb.5)

Es wird im Folgenden die Wirkung der an Sephadex G-75 gelchromatographisch isolierten Hauptfraktionen untersucht. Dies geschieht anhand der Globaltests der Gerinnung, dem Quick-Test und der PTT.

Die mehr als 30% von der Norm abweichenden Ergebnisse sind farbig unterlegt.

	Komplett gelöst ja/nein	Quick %	PTT Sec
LW		91	35
Cal rh Fraktion 1	Nein	85	36,1
Cal rh Fraktion 2	Nein	<5	>120
Cal rh Fraktion 2b	Nein	<5	>120
Cal rh Fraktion 3	Ja	87	36,1
Cal rh Fraktion 4	Ja	83	39,3

Tab.1: Wirkung der gelchromatographisch isolierten Hauptfraktionen (Abb.5) der *Calloselasma rhodostoma* auf die PTT und den Quick-Wert am BCS

Der Quick-Wert der Fraktionen 2 und 2b ist deutlich erniedrigt (<5). Ebenso ist die PTT in beiden Fraktionen deutlich erhöht (>120).

Zudem führten die betreffenden Fraktionen 2 und 2b während der Analytik zur Nachgerinnung.

Die Fraktionen wurden daraufhin mit einer Plasmakonzentration des Schlangengiftes von 0,05mg/ml erneut analysiert. Das Ergebnis blieb gleich.

3.3.2 Ergebnis der Einzelfaktorenanalyse der Hauptfraktionen der Gelfiltration an Sephadex G-75 (Abb.5)

Um die Angriffspunkte der Hauptfraktionen des Giftes der *Calloselasma rhodostoma* im endogenen und im exogenen Gerinnungssystem genauer zu bestimmen, erfolgte die Einzelfaktorenanalyse.

Hierbei wurde zunächst die Wirkung der isolierten Fraktionen auf die Faktoren der Blutgerinnung mit Hilfe eines Mangelplasmas bestimmt.

Die mehr als 30% von der Norm abweichenden Ergebnisse sind farblich unterlegt.

	Komplett gelöst ja/nein	FII %	FV %	FVII %	FVIII %	FIX %	FX %	FXI %	FXII %
LW		102	107	102	90	110	95	101	99
Cal rh 1	Nein	103	109	110	99	123	103	99	94
Cal rh 2	Nein	<5	37	<5	<10	<10	<10	99	6
Cal rh 2b	Nein	<5	40	7	27	<10	21	94	6
Cal rh 3	Ja	106	113	110	102	119	105	99	103
Cal rh 4	Ja	100	111	103	96	124	100	102	102

Tab.2: Wirkung der gelchromatographisch isolierten Hauptfraktionen der *Calloselasma rhodostoma* (Abb.5) auf die einzelnen Blutgerinnungsfaktoren

In den Fraktionen 2 und 2b zeigte sich eine Erniedrigung der Faktoren II, V, VII, VIII, IX, X und XII.

Der Faktor XI blieb bei beiden Fraktionen unverändert.

3.3.3 Ergebnis der Einzelfaktorenanalyse der durch Kationenaustauschchromatographie weiter unterteilten Hauptfraktionen

Die in der Gelfiltrationschromatographie isolierten und sich in der ersten Untersuchungen als besonders gerinnungswirksam zeigenden Hauptfraktionen 2 (hier Fraktionen Bx) und 2b (hier Fraktionen Cx) wurden in der Folge weiter nach Ihrer Ladung an einem Kationenaustauschchromatographen unterteilt und die Wirkung der so gewonnenen Unterfraktionen auf die menschliche Blutgerinnung ebenfalls untersucht.

	Gelöst ja/nein	Quick %	PTT Sec	F II %	F V %	F VII %	FVIII %	F IX %	F X %	F XI %	F XII %
NaCl		96	26,9	93	108	99	117	117	98	86	108
Frakt. B1	Nein	<7	29,1	149	138	22	105	43	101	47	<5
Frakt. B2	Ja	96	25,6	118	143	142	123	120	135	119	107
Frakt. C2	Ja	73	27,8	>213	183	176	125	140	195	>208	125
Frakt. C3	Ja	82	27,6	>213	160	138	147	132	183	>208	119
Frakt. C9	Nein	95	25,6	164	173	126	187	122	132	123	109
NaCl		82	34,8	99	93	108	104	113	93	109	96
Frakt. B4	Ja	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger
Frakt. B5	Ja	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger
Frakt. B7*	Ja	<5	46,0	<5	<5	6,3	<10	71	26	6	<5
NaCl		80	34,2	111	98	105	105	110	97	108	100
Frakt. C1	Nein	71	34	108	93	117	118	118	92	135	135
Frakt. C5	Ja	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger
Frakt. C6	Ja	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger	Ger
Frakt. C7*	Ja	34	43,7	6	8	7,6	<10	11	13	9	<5
Frakt. C8*	Nein	58	36,4	<5	31	28	<10	<10	61	14	<5

Tab.3: Einzelfaktorenanalysen der in der Kationenaustauschchromatographie gewonnenen Frakt. Bx und Cx (Abb. 6 und 7) der gelchromatographisch isolierten Hauptfraktionen 2 und 2b (Abb.5).

Ger = spontan geronnen nach Zugabe der Schlangengiftfraktion. Die mit * gekennzeichneten Fraktionen sind während der Analytik nachgeronnen.

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Globaltests (Quick-Wert und PTT) und der Einzelfaktorenanalyse betreffend das Gift der *Calloselasma rhodostoma*

3.3.4.1 Die globalen Gerinnungstests

Ergebnisse des Quick-Wertes:

Insgesamt zeigte sich der Quick-Wert 9x um mehr als 10% durch das Gift erniedrigt.

Eine Erniedrigung von mehr als 50% gab es 5x. Der Quick-Wert ist in den Hauptfraktionen 2 und 2b sehr stark erniedrigt (<5). Das gleiche Ergebnis kam durch die Wirkung der Fraktion B7 zu Stande. Eine ebenfalls sehr starke Erniedrigung des Quick-Wertes (<7) bewirkte Fraktion B1.

Ergebnisse der PTT:

Die PTT zeigte sich insgesamt in 11 Fraktionen durch das Gift verlängert. Besonders stark in den Fraktionen 2 und 2b.

3.3.4.2 Die Einzelfaktorenanalyse

Um jetzt die genauen Angriffspunkte des Giftes der *Calloselasma rhodostoma* auf den endogenen und exogenen Ablauf der Gerinnung zu bestimmen, wurde eine Einzelfaktorenanalyse durchgeführt.

Um eine Tendenz der Gerinnungsaktivität aufzuzeigen wurden, auch schwach von der Norm abweichende Werte ab 10% einbezogen.

Faktor II: der Faktor II ist 5x um mehr als 10% erniedrigt. 3x davon sehr stark auf unter 10% des Ausgangswertes. Eine Erhöhung findet sich in 5 Fällen, bei ebenfalls 10% Toleranz.

Faktor V: der Faktor V ist 6x um mehr als 10% erniedrigt. 2x davon sehr stark auf unter 10% des Ausgangswertes. Zudem 3x um mehr als 50%. Eine Erhöhung findet sich in 5 Fällen, bei ebenfalls 10% Toleranz.

Faktor VII: der Faktor VII ist 6x um mehr als 10% erniedrigt. 4x davon sehr stark auf unter 10% des Ausgangswertes. Eine Erhöhung findet sich in 5 Fällen, bei ebenfalls 10% Toleranz.

Faktor VIII: der Faktor VIII ist 5x um mehr als 10% erniedrigt. 4x davon sehr stark auf unter 10% des Ausgangswertes. Eine Erhöhung findet sich in 5 Fällen, bei ebenfalls 10% Toleranz.

Faktor IX: der Faktor IX ist 6x um mehr als 10% erniedrigt. 4x davon sehr stark auf unter 10% des Ausgangswertes. Zudem 1x um mehr als 50%. Eine Erhöhung findet sich in 4 Fällen, bei ebenfalls 10% Toleranz.

Faktor X: der Faktor X ist 5x um mehr als 10% erniedrigt. 3x davon sehr stark auf unter 30% des Ausgangswertes. Eine Erhöhung findet sich in 5 Fällen, bei ebenfalls 10% Toleranz.

Faktor XI: der Faktor XI ist 4x um mehr als 10% erniedrigt. 2x davon sehr stark auf unter 10% des Ausgangswertes. Zudem 1x um mehr als 50%. Eine Erhöhung findet sich in 6 Fällen, bei ebenfalls 10% Toleranz.

Faktor XII: der Faktor XII ist 6x um mehr als 10% erniedrigt. 6x davon sehr stark auf unter 10% des Ausgangswertes. Eine Erhöhung findet sich in 3 Fällen, bei ebenfalls 10% Toleranz.

Zudem trat bei 3 Tests eine Nachgerinnung auf. Die spontan geronnenen Fraktionen wurden in einer verdünnten Endkonzentration von 0,05mg/ml erneut untersucht. Das Ergebnis blieb gleich.

4. Diskussion

Die von Reid et al. (1963a,b) erstmals beschriebene „systemische“ Blutung, charakterisiert durch Defibrinierung und Thrombozytopenie als Folge von Bissen der *Calloselasma rhodostoma* am Menschen, erweckte das Interesse der Forscher nach den materiellen Ursachen zu suchen, die dieses Phänomen erklären konnten.

Bald danach wurde mit der Auftrennung des Rohgiftes dieser Schlange in ihre Proteinbestandteile begonnen (Esnouf und Tunnah 1967), wobei sich herausstellte, dass das Rohgift sehr reich an Proteasen mit thrombin-ähnlicher Aktivität war. Das Hauptenzym (Arvin, Ancrod) wurde gereinigt und seine Wirkung auf das Fibrinogen quantitativ untersucht (Ewart et al. 1970). Dabei zeigte sich, dass das Arvin das Fibrinogen nur bei Abspaltung der Fibrinopeptide A, Ab und A γ abbaut, Peptide die nicht in der Lage sind die für die Thrombusbildung unerlässliche Quervernetzung („crosslinking“) zu bewerkstelligen. So wird durch das Arvin zwar Fibrinogen enzymatisch gespalten, aber die daraus entstehenden instabilen Fibrinnetze werden im Rahmen der Fibrinolyse schnell durch Plasmin abgebaut. Damit wurde in dem Arvin eine Substanz gefunden, die neben ihrer in vitro koagulatorischen Aktivität in vivo antikoagulatorische, thrombolytische Eigenschaften vorweist. Diese medizinisch hochrelevante Entdeckung machte das Rohgift der *Calloselasma rhodostoma* zu einem sehr begehrten Forschungsobjekt, aus dem in der Folge zahlreiche weitere biologisch aktive Bestandteile wie z.B. Haemorrhagine, die Plättchenaggregation hemmende, die Plättchenaggregation fördernde Substanzen und diverse Enzyme (Tan et al. 1986) isoliert wurden.

Die Bibliographie über wissenschaftliche Arbeiten am Gift der *Calloselasma rhodostoma* ist, wie dies in der Einleitung dieser Dissertation zusammengefasst wurde, sehr umfangreich und sie zu kommentieren reicht weit über die Fragestellung der vorliegenden Dissertation hinaus. Die bisher zur Anwendung gekommenen Isolierungsmethoden zur Erfassung haemostaseologisch wirksamer Proteinfraktionen aus dem Rohgift der *Calloselasma rhodostoma*, wie die

1. Präperative Elektrophorese (Daltry et al.1996)
2. Gelfiltration an Sephadex G-200 mit anschließender Ionenaustauschchromatographie (Ponnodurai et al. 1993)
3. Gelfiltration an Sephadex G-75 mit anschließender Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration an Allenyl-Superose HR 5/5 (Wang et al. 1999)

4. Anionenaustauschchromatographie an DEAE Sephacel (Tan et al. 1986)
5. Auftrennung an Sephadex G-75 mit anschließender Chromatographie an SP Sephadex C-50 und Gelfiltration an Sephacryl S-300 (Ouang et al. 1986)
6. Auftrennung an Fractogel mit anschließender Chromatographie an HPLC (Navdaev et al. 2001)

fürten zwar vereinzelt zur Isolierung von gewünschten haemostaseologisch aktiven Produkten aus dem Rohgift; zur schnellen Isolierung eines zum Testen geeigneten Proteinspektrums aus dem Rohgift schien aber keine von denen geeignet zu sein.

Deshalb wurde der Zielsetzung der Dissertation folgend hier, unabhängig von vorangegangenen Veröffentlichungen, nach der Ausarbeitung einer einfach durchführbaren Schlangengiftreinigungsmethode gestrebt, die generell alle Proteinbestandteile des Rohgiftes im Rahmen eines Aufarbeitungsverfahrens zu erfassen gestattet, was prinzipiell zu einer Gelfiltration an Sephadex G-75 mit nachfolgender Kationenaustauschchromatographie der so gewonnenen Fraktionen an SP-Sepharose HP führte und gelang.

Ausnahme bildeten lediglich die im Rohgift in reichlichen Mengen vorkommenden hochmolekularen, schwer löslichen Glykoproteine (Abb.5 Fraktion 1), die der Kationenaustauschchromatographie nicht zugänglich waren, und nur über Gelfiltration an Sephacryl 400-S in verdünntem NH_3 als Laufmittel weiter getrennt werden konnten. Diese hochmolekulare Proteinfraktion war gerinnungsphysiologisch inaktiv (Tab.1 und 2), weshalb sie nicht weiter untersucht wurde.

So ein Verfahren wurde bisher nur für das Gift der Klapperschlange *Crotalus atrox* von Gresch, B. im Jahre 2009 beschrieben.

Die nach dieser standardisierten, gut reproduzierbaren Methode hergestellten Proteinfractionen konnten nunmehr den Gerinnungstests unterworfen werden (Abb.5, 6 und 7).

Der Befund, dass die durch den Test festgestellte blutgerinnungsfördernde Aktivität des Rohgiftes auf die Fraktion 2 (bzw. Fraktion 2b) der Gelfiltration an Sephadex G-75 sich konzentrierte (Abb.5, 6 und 7), wies auf ein Molekulargewicht des Proteins von ca. 50.000 Dalton hin.

Glücklicherweise, da dieses verhältnismäßig stabil war, konnte die gerinnungsfördernde biologische Aktivität auch nach der Weiterreinigung an SP Sepharose HP, nach Isolierung der betreffenden Fraktionen, weiter verfolgt werden (Abb.6 und 7).

Dass die aktiven Hauptfraktionen in der Kationenaustauschchromatographie sich erst ab 0,1M bzw. 0,3M Ammoniumacetat Pufferkonzentration aus der Säule eluieren ließen, wies auf einen

stark basischen Charakter der Wirkstoffe hin, unter denen mindestens in einer Fraktion das Enzym Arvin vermutet wird (Abb.6 und 7).

Bemerkenswert ist aber auch die festgestellte antikoagulierende Wirkung zweier weiterer stark basischer Fraktionen der oben genannten Kationenaustauschchromatographien (Abb.6 und 7). Diese Fraktionen konnten aus den beiden Katex Säulen erst mit verdünntem NH_3 eluiert werden.

Über die chemische Natur diese Fraktion kann man erst nach Erhalt weiterer analytischer Daten Vermutungen anstellen.

Auf die Proteinanalytik konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation mangels weiterer experimenteller Möglichkeiten nicht näher eingegangen werden.

Im Mittelpunkt des Interesses der Medizin steht die Frage, ob sich aus den erarbeiteten Ergebnissen ein therapeutischer Nutzen ziehen lässt.

Ist das Zusammenspiel der komplexen Wechselwirkungen zwischen Blutplättchen, Gefäßwand, plasmatischer Gerinnung und Fibrinbildung gestört, führt dies entweder zur Thrombose oder zur Blutungsneigung.

In dieser Arbeit konnte die antikoagulatorische Wirkung des Giftes der *Calloselasma rhodostoma* auf das plasmatische Gerinnungssystem nachgewiesen und damit die Forschung über bereits bekannte hämorrhagische Wirkungen auf Gefäßwand, Blutplättchen und Fibrinbildung fortgeführt werden.

Ein großer Teil der wissenschaftlichen Arbeiten zu gerinnungsspezifischen Tests über das Gift der *Calloselasma rhodostoma* befassen sich mit der primären Hämostase und beschreiben die Wirkung auf die Blutplättchen und die Gefäßwand.

Um verwertbare Aussagen über die therapeutische Verwendbarkeit der isolierten Fraktionen auf die bisher noch nicht geprüfte, plasmatische Gerinnung machen zu können, wurden neben den Bestimmungen ihrer Quick- und PTT-Werte auch die Gerinnungswerte der wichtigsten Blutgerinnungsfaktoren bestimmt und vergleichend ausgewertet.

Hierfür wurde das Behring-Coagulation-System eingesetzt.

Durch den gelungenen Nachweis einer Hemmung der Blutgerinnungsfaktoren F II, V, VII, VIII, IX, X, XI und XII kann nun eine breite antikoagulatorische Wirkung auf plasmatischer Ebene für das Gift der *Calloselasma rhodostoma* als bewiesen angesehen werden.

Das Schlangengift hemmt Gerinnungsfaktoren sowohl des endogenen als auch des exogenen Systems. Die Hemmung der einzelnen Faktoren beträgt bis zu über 90% und beeinflusst damit

maßgeblich die Aktivierung des Faktors X und damit des zentralen Gerinnungsenzyms Thrombin, des Faktors IIa (Tab.3).

Auch der Faktor V, der als Kofaktor wirkt und so die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin auf das 1000-fache beschleunigt, wird durch das Gift der *Calloselasma rhodostoma* zu über 90% gehemmt. Durch die Angriffspunkte an den Faktoren X und V ist eine antithrombotische Therapie durch das Gift denkbar.

Ein prophylaktischer oder therapeutischer Nutzen kann auch die Hemmung des Faktors VII von über 90% sein, der im Rahmen der Josso-Schleife den Faktor IX aktiviert und so die beiden Gerinnungssysteme schon vor dem gemeinsamen Endpunkt Faktor X verbindet.

Der als Beschleuniger des Gerinnungsvorganges eingreifende Faktor VIIIa, kann durch das Gift schon als Faktor VIII zu über 90% gehemmt werden, so dass der Gerinnungsablauf blockiert wird.

Die Proenzyme II, VII, XI und X sind aufgrund ihrer Größe von weniger als 70.000 Dalton in der Lage unabhängig von einer Gefäßverletzung zwischen dem Intra- und Extravasalraum hin- und herzuwechseln. Diese Proenzyme beschleunigen den Gerinnungsvorgang und werden ebenfalls durch das Gift der *Calloselasma rhodostoma* gehemmt.

Angesichts der Tatsache, dass die Gerinnungsfaktoren vor der eigentlichen Thrombusbildung gehemmt werden, könnte der medizinische Nutzen in der Vermeidung der Thrombusbildung und damit im therapeutischen Einsatz liegen.

Die Ergebnisse zeigten zudem die schon bekannte koagulatorische Wirkung der isolierten Fraktionen in vitro, welche sich in vivo zu einer Blutgerinnungsstörung durch den kontinuierlichen Verbrauch von Fibrinogen verkehrt.

Die in einigen Proben aufgetretene Nachgerinnung in vitro, welche auch in der Verdünnung konstant blieb, lässt auf eine thrombinartige Wirkung und damit auf einen starken Einfluss auf die Blutgerinnung schließen. Daraus ergibt sich im menschlichen Körper appliziert eine starke Beeinflussung der Blutgerinnung.

Damit wird der Grundstein für weitere Forschung zur Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Prävention thrombotischer Ereignisse gelegt, die potenziell in der Verfügbarkeit eines oralen oder parenteralen applizierbaren Medikamentes enden könnte.

Was die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit betrifft, ist diese damit erfüllt worden, dass hier ein neues, standardisiertes und einfach zu reproduzierendes Verfahren zur Fraktionierung des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* erarbeitet wurde, wobei durch die Auswertung der

partiell gereinigten Proben neue Informationen zur Entdeckung weiterer gerinnungsrelevanter Substanzen gewonnen werden konnten.

5. Zusammenfassung

Anhand der Ergebnisse lässt sich eindeutig eine breite Wirkung des Giftes *Calloselasma rhodostoma* auf die Blutgerinnung des Menschen in vitro und in vivo nachweisen. Es lässt sich eine Hemmung sämtlicher hier geprüfter Blutgerinnungsfaktoren nachweisen.

Das Gift der *Calloselasma rhodostoma* wirkt hemmend auf die Gerinnungsfaktoren F II, V, VII, VIII, IX, X, XI und XII.

Der Quick-Wert wird gesenkt und die PTT verlängert.

Die Auftrennung des Schlangengiftes durch Gelfiltration an Sephadex G-75 und die anschließende Ionenaustauschchromatographie an SP Sepharose HP erwies sich als aussagekräftiges Proteintrennverfahren für die Herstellung von Proben, mit denen die Wirkung des Giftes der *Calloselasma rhodostoma* auf die humane Blutgerinnung geprüft werden kann.

Erstmals konnten durch das angewendete Verfahren systematisch alle haemostaseologisch aktiven Proteine des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* isoliert und ihre Wirkung auf die plasmatische Gerinnung beschrieben werden.

Die hier beschriebenen einzelnen gerinnungswirksamen Fraktionen des Rohgiftes der *Calloselasma rhodostoma* sollten aus unserer Sicht in weiteren Untersuchungen und Analysen hinsichtlich ihrer potenziellen Verwendbarkeit in der Antikoagulantientherapie betroffener Patienten Beachtung finden.

6. Literaturverzeichnis

- Ashford, A.**, Ross, J.W., Southgate, P. (1968): Pharmacology and Toxicology of a Defibrinating Substance from Malayan Pit Viper Venom. *Lancet* 1(7541),486-9.
- Bartels, M.**, von Depka, M. (2003): Gerinnungsanalysen, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Bergmeier, W.**, Daniel Bouvard, Johannes A. Eble, Rabée Mokhtari-Nejad, Valerie Schulte, Hubert Zirngibl, Cord Brakebusch, Reinhard Fässler and Bernhard Nieswandt (2001): Rhodocytin (Aggretin) Activates Platelets Lacking $\alpha_2\beta_1$ Integrin, Glycoprotein VI, and the Ligand-binding Domain of Glycoprotein Ib α . *The Journal of Biological Chemistry* 276, 25121-25126.
- Bruhn, H.D.**, U.R. Fölsch, H. Schäfer (2008): Lehrbuch der Labormedizin, Schattauer Verlag, S. 495-496.
- Bruhn, H.D.**, V. Hach-Wunderle, C.M. Schambeck, R.E. Scharf (2011): Hämostaseologie für die Praxis, Schattauer Verlag, 2.Auflage, S. 13.
- Chan K.E.**, Rizza, C.R., Henderson, M.P. (1965): A Study of the Coagulant Properties of Malayan Pit-Viper Venom. *Br. J. Haematol.* 11(6), 646-53.
- Cole, C.W.**, Bormanis, J. (1988): Ancrod: A Practical Alternative to Heparin. *J. Vasc. Surg.* 8(1),59-63.
- Collins, J.P.**, Jones, J.G. (1972): Studies on the Active Site of IRC-50 Arvin, the Purified Coagulant Enzyme From Agkistrodon Rhodostoma Venom. *Eur. J. Biochem.* 26(4), 510-7.
- Daltry, J.C.**, Ponnudurai, G., Shin, C.K., Tan, N.H., Thorpe, R.S., Wüster, W. (1996): Electrophoretic Profiles and Biological Activities: Intraspecific Variation in the Venom of the Malayan Pit Viper (C.R.) *Toxicon* 34, 67-97.
- Dambisya, Y.M.**, Lee, T.L., Gopalakrishnakone, P. (1994): Action of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan Pit Viper) Venom on Human Blood Coagulation and Fibrinolysis Using Computerized Thromboelastography (CTEG). *Toxicon* 32,1619-26.
- Denson, K.W.** (1969): Coagulant and Anticoagulant Action of Snake Venoms. *Toxicon* 7,5-11.
- Esnouf, M.P.** and Tunnah, G.W. (1967): The Isolation and Properties of the Thrombin-like Activity from Ancistrodon rhodostoma Venom. *Brit.J.Haemat.*,13,81.
- Ewart, M.R.**, Hatton, M.W., Basford, J.M., Dodgson, K.S. (1970): The Proteolytic Action of Arvin on Human Fibrinogen. *Biochem J.* 118(4),603-9.

- Geyer, A.**, Fitzpatrick, T.B., Pawelek, P.D., Kitzing, K., Vrieling, A., Ghisla, S., Macheroux, P. (2001): Structure and Characterization of the Glycan Moiety of L-Amino-Acid Oxidase from the Malayan Pit Viper *Calloselasma rhodostoma*. Eur. J. Biochem. 268(14),4044-53.
- Gresch, B.** (2009): Die Texas Klapperschlange, *Crotalus atrox*, ihr Gift und dessen Wirkung auf die Blutgerinnung. Inauguraldissertation, Med. Fakultät. Universität Kiel.
- Gumprecht, A., F. Tillack, N. L. Orlov, A. Captain & S. Ryabov** (2004): Asian Pitvipers. – GeitjeBooks, Berlin, 368 S.
- Hatton, M.W.** (1973): Studies on the Coagulant Enzyme From Agkistrodon Rhodostoma Venom. Isolation and Some Properties of the Enzyme. Biochem J.131(4),799-807.
- Hawgood, B.J.** (1997): Hugh Alistair Reid OBR MD: Investigation and Treatment of Snake Bite. Toxicon 36,431-446.
- Hennerici, M.G.,** Kay, R., Bogousslavsky, J., Lenzi, G.L., Verstraete, M., Orgogozo, J.M.; ESTAT investigators (2006): Intravenous Ancrod for Acute Ischaemic Stroke in the European Stroke Treatment with Ancrod Trial: a Randomised Controlled Trial. Lancet 368(9550),1871-8.
- Ho, M.,** Warrell, D.A., Looareesuwan, S., Phillips, R.E., Chanthavanich, P., Karbwang, J., Supanaranond, W., Viravan, C., Hutton, R.A., Vejcho, S. (1986): Clinical Significance of Venom Antigen Levels in Patients Envenomed by the Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*). Am. J. Trop. Med. Hyg. 35(3),579-87.
- Hsu, C.C.,** Wu, W.B. und Huang T.F (2008): A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions Journal Thromb. Haemost. 6(9),1578-85.
- Huang, T.F.,** Wu, Y.J. und Ouyang, C. (1987): Characterization of a Platelet Aggregation Inhibitor from Agkistrodon Rhodostoma Snake Venom. Biochimica et Biophysica Acta 925, 248-257.
- Huang, T.F.,** Cahng, M.C., und Teng, C.M. (1993): Antiplatelet Protease, Kistomin, Selectively Cleaves Human Platelet Glycoprotein Ib. Biophys. Acta 1158, 293.
- Imkhieo, S.,** Nakthong, C., Kespichayawattana, W., Sirimujalin, R., Suwannaprapha, P., Ratanabanangkoon, K. (2009): Pig as an Experimental Model for the Study of Snake Venom Induced Local Tissue Necrosis. Toxicon 53,317-22.
- Kuhl, H.** (1824): Sur les reptiles de Java. Extract d'une lettre adressée de Java en Hollande, par M. Kuhl, datée de Pjihorjavor au pied du Pangerango, le 18 julliet 1821 – Bull. Sci. Nat. Géol., Paris (Férussac), 2,79-83 [80].

- Levy, D.E.**, Trammel, J., Wasiewski, W.W.; Ancrod Stroke Program (ASP) Study Team (2009): Ancrod for Acute Ischemic Stroke: a New Dosing Regimen Derived from Analysis of Prior Ancrod Stroke Studies. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 18(1),23-7.
- Levy, D.E.**, del Zoppo, G.J., Demaerschalk B.M., Demchuk A.M., Diener H.C., Howard G., Kaste M., Pancioli A.M., Ringelstein E.B., Spatareanu C., Wasiewski W.W. (2009): Ancrod in Acute Ischemic Stroke: Results of 500 Subjects Beginning Treatment Within 6 Hours of Stroke Onset in the Ancrod Stroke Program. *Stroke* 40(12),3796-803.
- Marshall, R.**, Esnouf, M.P. (1968): The Effect of Ancistrodon Rhodostoma Venom in the Dog. *Clin. Sci.* 35(2),251-9.
- Navdaev, A.**, Clemetson, J.M., Polgar, J., Kehrel, B.E., Glauner, M., Magnenat, E., Wells, T.N., Clemetson, K.J. (2001): Aggretin, a Heterodimeric C-type Lectin from *Calloselasma rhodostoma* (Malayan Pit Viper), Stimulates Platelets by Binding to $\alpha\beta_1$ Integrin and Glycoprotein Ib, Activating Syk and phospholipase C γ_2 , but Does not Involve the Glycoprotein VI/Fc Receptor γ Chain Collagen Receptor. *J. Biol. Chem.* 276(24),20882-20889.
- Ohsaka, A.** (1979) Hemorrhagic, Necrotizing and Edema-Forming Effects of Snake Venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol 52, 481-546.
- Oliva, I.B.**, Coelho R.M., Barcellos, G.G., Saldanha-Gama, R., Wermelinger, L.S., Marcinkiewicz, C., Benedeta Zingali, R., Barja-Fidalgo, C. (2007): Effect of RGD-Disintegrins on Melanoma Cell Growth and Metastasis: Involvement of the Actin Cytoskeleton, FAK and c-Fos. *Toxicon* 50,1053-63.
- Ouyang, C.**, Hwang, L.J. und Huang, T.F. (1983): A-Fibrinogenase from Agkistrodon Rhodostoma Snake Venom. *Toxicon* 21,25-33.
- Ouyang, C.**, Yeh, H.I. und Huang, T.F. (1986): Purification and Characterization of a Platelet Aggregation Inducer from *Calloselasma rhodostoma* Snake Venom. *Toxicon* 24,633-644.
- Ponnudurai, G.**, Chung, M.C.M. and Tan, N.H. (1993): Isolation and Characterization of a Hemorrhagin from the Venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan Pit Viper). *Toxicon* 31, 997-1005.
- Regoeczi, E.**, Gergely, J., McFarlane, A.S. (1966): In Vivo Effects of Agkistrodon Rhodostoma Venom: Studies with Fibrinogen-131I. *J. Clin. Invest.* 45(7),1202-12.
- Regoeczi, E.**, Bell, W.R. (1969): In Vivo Behaviour of the Coagulant Enzyme from Agkistrodon Rhodostoma Venom: Studies Using 131-I-'Arvin'. *Br. J. Haematol.* 16(6),573-87.
- Reid, H.A.**, Thean, P.C., Chan, K.E. und Baharom, A.R. (1963a): Clinical Effects of Bites by Malayan Viper. *Lancet* 23,617-621.
- Reid, H.A.**, Chan, K.E., Thean, P.C. (1963b): Prolonged Coagulation Defect (Defibrination Syndrome) in Malayan Viper Bite. *Lancet* 1(7282),621-6.

- Reid, H.A.**, Chan, K.E., (1968): The Paradox in Therapeutic Defibrination. *Lancet* I, 485-486.
- Sawai, Y.**, Koba, K., Okonogi, T., Mishima, S., Kawamura, Y., Chinzei, H., Ibrahim, A.B., Devaraj, T., Phong-Aksara, S., Puranananda, C., Salafranca, E.S., Sumpaico, J.S., Tseng, C.S. Taylor, J.F., Wu, C.S. und Kuo, T.P. (1972): An Epidemiological Study of Snakebites in the Southeast Asia. *Japan Journal of Experimental Medicine* 42,283-307.
- Sherman, D.G.**, Atkinson, R.P., Chippendale, T., Levin, K.A., Ng, K., Futrell, N., Hsu, C.Y., Levy, D.E. (2000): Intravenous Ancrod for Treatment of Acute Ischemic Stroke: The STAT Study: a Randomized Controlled Trial. *Stroke Treatment with Ancrod Trial*. *JAMA* 283(18),2395-403.
- Shin, Y.**, Morita, T. (1998): Rhodocytin, a Functional Novel Platelet Agonist Belonging to the Heterodimeric C-type Lectin Family, Induces Platelet Aggregation Independently of Glycoprotein Ib. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245,741-745.
- Suzuki-Inoue, K.**, Fuller, G.L., García, A., Eble, J.A., Pöhlmann, S., Inoue, O., Gartner, T.K., Hughan, S.C., Pearce, A.C., Laing, G.D., Theakston, R.D., Schweighoffer, E., Zitzmann, N., Morita, T., Tybulewicz V.L., Ozaki, Y., Watson, S.P. (2006): A novel Syk-dependent Mechanism of Platelet Activation by the C-type Lectin Receptor CLEC-2. *Blood* 107(2),542-9.
- Tan, N.H.** (1984): Isolation of the Major Arginine Amidase from the Venom of the Malayan Pit Viper (*Agkistridon rhodostoma*). *Proceedings of the 6th European Symposium on Animal, Plant and Microbial Toxins*, 126.
- Tan, N.H.**, Kanthimathi, M.S. und Tan, C.S. (1986): Enzymatic Activities of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan Pit Viper) Venom. *Toxicon* 24,626-630.
- Tan, N.H.** and Kanthimathi, M.S. (1989): Hemorrhagic, Phospholipase A, Arginine Ester Hydrolase and Clotting Enzyme Activities of Malayan Pit Viper (*Calloselasma rhodostoma*) Venom. *Proceedings of the 14th Malaysian Biochemical Society Annual Conference* 14,122-124.
- Tan, N.H.**, Ponnudurai, G., Chung, M.C. (1997): Proteolytic Specificity of Rhodostoxin, the Major Hemorrhagin of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan Pit Viper) Venom. *Toxicon* 35(6),979-84.
- Teng, C.M.** und Huang, T.F. (1991): Snake Venom Constituents that Effect Platelet Function Platelets, Volume 2, Issue 2 June,77-87.
- Viravan C.**, Looareesuwan S, Kosakarn W, Wuthiekanun V, McCarthy CJ, Stimson AF, Bunnag D, Harinasuta T, Warrell DA (1992): A National Hospital-Based Survey of Snakes Responsible for Bites in Thailand. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 86(1),100-6.

Wang, R., Kini, R.M., Chung, M.C. (1999): Rhodocetin, a Novel Platelet Aggregation Inhibitor from the Venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan Pit Viper): Synergistic and Noncovalent Interaction Between its Subunits. *Biochemistry* 38(23),7584-93.

Watson, A.A., Eble, J.A., O'Callaghan, C.A.(2008): Crystal structure of rhodocytin, a ligand for the platelet-activating receptor CLEC-2. *Protein Sci.*17(9),1611-6.

Yamada, D., Sekiya, F., Morita, T. (1997): Prothrombin and Factor X Activator Activities in the Venoms of Viperidae Snakes. *Toxicon* 35,1581-1589.

Zoppo, G.J. del, Levy, D.E., Wasiewski, W.W., Pancioli, A.M., Demchuk, A.M., Trammel, J., Demaerschalk, B.M., Kaste, M., Albers, G.W., Ringelstein, E.B. (2009): Hyperfibrinogenemia and Functional Outcome from Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 40(5),1687-91.

7. Danksagung

Ein großer Dank geht an Herrn Professor Dr. med. Hans Dietrich Bruhn für das Überlassen des Themas, für die wissenschaftliche Betreuung während der Arbeit, für die Durchsicht des Manuskriptes sowie für die Bereitstellung des Gerinnungslabors.

Frau Birgit Kallsen danke ich für die Einweisung in die Gerinnungsanalysen und die damit verbundene schnelle und hilfreiche Herstellung der Gerinnungsproben.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Herrn Professor Dr. rer. nat. Lászlo Béress. Für seine aufopfernde Unterstützung, seine schier unerschöpfliche Kenntnis der Proteintrennung und Schlangengifte und seine ansteckende Begeisterung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Wolf Georg Forssmann für seine Großzügigkeit die Untersuchungsgerätschaften des Pharis Biotec GmbH Peptidlabores nutzen zu dürfen.

Ein Dank geht an Herrn Carsten-Munk Pedersen und Herrn Ralf Fellmer für die Unterstützung in allen Fragen der EDV.

8. Curriculum vitae

Am 01.11.1975 wurde ich, Christian Friedrich Wichard von Möllendorff, als Sohn des Realschullehrers Hartwig von Möllendorff und der Realschullehrerin Brigitte von Möllendorff in Buchholz in der Nordheide geboren.

Nach dem Abitur am Albert Einstein Gymnasium in Buchholz i.d.N. im Jahre 1996 begann ich nach der Ableistung des Grundwehrdienstes im Wintersemester 1997/98 das Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Dieses beendete ich im Jahre 2005 mit dem 3. Staatsexamen.

Momentan befinde ich mich in der Ausbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin.

Diese Dissertation wurde in den Jahren 2009 bis 2010 fertiggestellt.