AUS DEN ZENTRALLABORATORIEN DES
KANTONSSPITALS BASEL

(Leiter: Prof. Dr. med. H. Reber)

GERINNUNGS- UND FIBRINOLYSE-
LABORATORIEN
(Leiter: Prof. Dr. ès Sc. F. Duckert)

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. ès Sc. F. Duckert)

AKTIVIERUNG VON GERINNUNGSFAKTOR XIII MIT DEN AUS SCHLANGENGIFTEN GEREINIGTEN DEFIBRINIERUNGS-ENZYMEN ANCROD UND BATROXOBIN

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Heilkunde
vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

von

Martin WALTER

Mümliswil-Ramiswil SO

Von der Medizinischen Fakultät der
Universität Basel genehmigt auf Antrag
von Prof. Dr. F. Duckert

Tag der Promotion: 6. Dezember 1976

AKTIVIERUNG VON GERINNUNGSFAKTOR XIII MIT DEN AUS SCHLANGENGIFTEN GEREINIGTEN DEFIBRINIERUNGS - ENZYMEN ANCROD UND BATROXOBIN

EINLEITUNG

Im Jahre 1944 unterschied Robbins zwischen in verdünnten Säuren und Basen löslichem und unlöslichem Fibrin (1). Bei Fibrinbildung ohne Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen, sowie bei Verwendung von gereinigtem Fibrinogen zur Fibrinbildung in Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen erhielt er ein in o,o3 prozentiger HCl lösliches Fibrin, während Fibrin aus weniger reinem Fibrinogen, geronnen in Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen, und Fibrin aus reinerem Fibrinogen mit Zusatz von Serum und in Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen in o,o3 prozentiger HCl unlöslich war.

1948 beschrieben Laki und Lorand (2) einen Faktor, der für eine normale Gerinnselbildung unerlässlich ist. Sie wiesen ihn im Serum und im Plasma nach. Gereinigtes Fibrinogen, geronnen in Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen, gab in 5M Urea und in 1 prozentiger Monochloressigsäure lösliche Gerinnsel. Durch Zugabe von Serum oder Plasma zu solch reinem Fibrinogen oder durch Verwendung von weniger reinem Fibrinogen konnten in 5 M Urea oder 1 prozentiger Monochloressigsäure unlösliche Gerinnsel hergestellt werden, sofern Ca^{++}-Ionen bei der Gerinnung anwesend waren.

Später fanden Loewy und Edsall (3), Loewy, Venziale und Forman (4) und Lorand und Jacobsen (5), dass die Unlöslichkeit von Gerinnseln in 5 M Urea einem Globulin zu verdanken ist, das nun fibrinstabilisierender Faktor (FSF) genannt wurde.

1957 fand Lüscher (6) einen Faktor mit gleicher Wirkung in den Thrombozyten.

Von den Medizinern wurde die Wichtigkeit dieses Faktors

bezweifelt, bis Duckert, Jung und Shmerling (7) 1960 eine klinisch, genetisch und gerinnungsphysiologisch noch nicht eingeordnete haemorrhagische Diathese bei einer Familie beschrieben. Alle damals untersuchbaren Gerinnungsparameter waren normal bei zwei Patienten, es drängte sich daher den Autoren die Hypothese eines FSF-Mangels auf und sie fanden denn auch, dass aus Oxalatplasma durch Rekalzifizierung gebildete Gerinnsel in 5 M Urea löslich waren.

Dieser ersten Publikation folgten bald weitere. Bis 1972 war Duckert (8) über insgesamt 75 Fälle orientiert.

Klinisch auffällig ist beim angeborenen FSF-Mangel, dass kurze Zeit nach Geburt eine Nabelschnurblutung mit grösster Wahrscheinlichkeit auftritt. Von 75 bekannten Patienten hatten 88 Prozent eine Nabelschnurblutung, 4 Prozent hatten früh und vor Auftreten einer Blutung eine Transfusion erhalten, bei 6,7 Prozent konnte kein anamnestischer Hinweis für eine Blutung gefunden werden, bei 1,3 Prozent fehlt die Information. Zweithäufigste vitale Blutung ist beim FSF-Mangel die intracranielle Blutung. 26,6 Prozent der Patienten , die bis 1972 beobachtet wurden, hatten eine intracranielle Blutung, die nicht letal war, 5,3 Prozent hatten eine ebensolche letale Blutung.
Bei Frauen mit FSF-Mangel besteht eine Infertilität, die mit FSF-Substitution während der Schwangerschaft behoben werden kann.
20-25 Prozent der FSF-Mangelpatienten haben eine gestörte Wundheilung.

Der FSF oder Faktor XIII ist in seiner aktiven Form (Faktor XIIIa) eine Aminoacyltransferase, die kovalente, "isopetidische" Bindungen zwischen Glutamyl- und Lysylresten der verschiedenen Fibrinmonomere katalysiert. Das "Isopeptid" ε-(γ-glutamyl)lysin (Abb. 1) wurde verschiedentlich identifiziert und isoliert (Lorand, Downey, Gotoh, Jacobsen und Tokura 1968, Matacic und Loewy 1968, Pisano,Finlayson und Peyton 1968) (9,10,11). Diese kovalenten Bindungen machen Fibrin in 5 M Urea

unlöslich. Die einzelnen Fibrinmonomere sind dabei so orientiert, dass carboxyterminales und N-terminales Ende je nebeneinander zu liegen kommen (Abb. 2). In diese Bindungen sind nur die γ-Ketten und die α-Ketten des Fibrinmonomers involviert (12,13). Die Bindungen sind intermolekular (14). Es werden je 2 γ-Ketten zu γ-γ-Dimeren mit zwei solchen "Isopeptid"-Bindungen an der vom C-terminalen Ende her gezählten sechsten (LYS) und vierzehnten (GLN) Aminosäure einerseits miteinander verknüpft (Abb. 2), andrerseits finden sich α-Di-, α-Tri- und α-Polymere, wobei die Lokalisation dieser gleichartigen intermolekularen Bindungen noch unsicher ist (15).

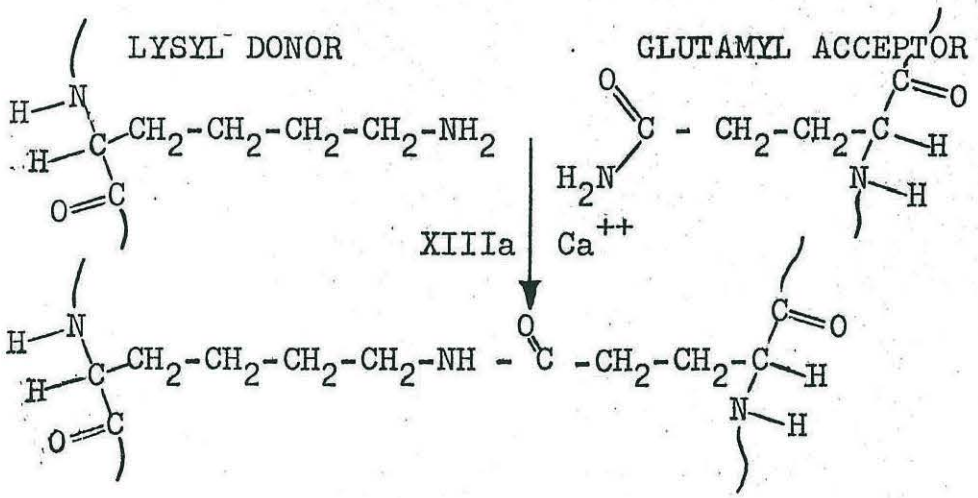


Abb 1 Entstehung des 'Isopeptids' ε-(γ-glutamyl)lysin unter Einwirkung von Faktor XIIIa in Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen auf Fibrin.

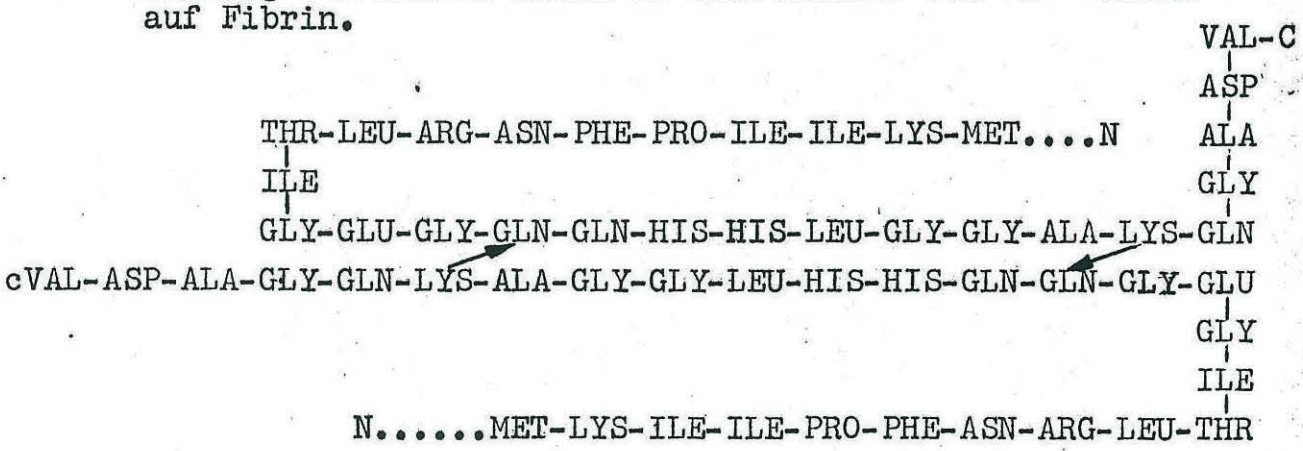


Abb 2 Aminosäuresequenz der carboxyterminalen Segmente von γ-Kette von menschlichem Fibrin(ogen). Die intermolekularen Bindungsstellen der antiparallel angeordneten Molekeln sind mit Pfeilen bezeichnet.

Im zeitlichen Ablauf kommt es bei der Einwirkung von Faktor XIIIa auf Fibrin zuerst zur Bindung der γ-Ketten, gefolgt von der Polymerisierung der α-Ketten.

Der im Plasma enthaltene Faktor XIII besteht aus zwei Paaren von Polypeptidketten, nämlich aus zwei b-Ketten, die zusammen ein Molekulargewicht von 156 000 und zwei a-Ketten, die zusammen ein Molekulargewicht von 176 000 haben (a_2b_2)(16).
Für den FSF aus menschlicher Placenta und Thrombozyten ist bekannt, dass dieser aus zwei a-Ketten besteht (a_2), die höchstwahrscheinlich identisch sind mit den a-Ketten des Plasma-Faktor XIII.

Die Aktivierung des FSF erfolgt durch proteolytische Abspaltung eines kleinen Peptides von der inaktiven Form. Diese Abspaltung findet an der a-Kette statt und ist gefolgt von der Dissoziation des Eiweisses in zwei a'-Ketten und zwei b-Ketten. Die a'-Ketten sind der aktive Teil des Enzymes.

Der physiologische Aktivator des Faktor XIII ist das Thrombin. Diskutiert wird auch Faktor Xa als langsamer Aktivator (16). Chymotrypsin, Trypsin und Papain sind ebenfalls Aktivatoren, die physiologisch kaum von Bedeutung sein dürften.

Für spezielle klinische Zwecke (Antikoagulation durch Defibrinierung) und für präparative Zwecke im Laboratorium wäre es interessant, ein thrombinähnliches Enzym zu besitzen, das imstande ist, Fibrinogen zur Gerinnung zu bringen, ohne dabei gleichzeitig Faktor XIII zu aktivieren.
Von Ancrod, dem gereinigten Gift der Schlange Agkistrodon rhodostoma und von Batroxobin marajoensis, dem gereinigten Gift der Schlange Bothrops atrox marajoensis, wurde bislang angenommen, dass sie zur Gerinnung führen, ohne Faktor XIII zu aktivieren.
Batroxobin moojeni aktiviert Faktor XIII bekanntermeise.
Mit der vorliegenden Untersuchung soll abgeklärt werden, ob auch eine langsame Aktivierung von Faktor XIII durch Ancrod und Batroxobin marajoensis ausgeschlossen ist.

Material

Ancrod F1623 (Twyford-Laboratories, Fa Knoll, Liestal)
Ancrod A-38414 (Abbott-Laboratories, Chicago)
Batroxobin marajoensis o637 (Pentapharm, Aesch)
Batroxobin marajoensis und moojeni-Gemisch oo641 (Pentapharm,Aesch)
Batroxobin marajoensis mit Elastase behandelt (Pentapharm, Aesch)
Thrombin (Hoffmann-LaRoche AG, Basel)
Liquemin-Roche (Hoffmann-LaRoche AG, Basel)
Hirudin (Pentapharm, Aesch) (1500 AT-E/mg nach Markwardt)
Macrodex (6% in physiologischer NaCl-Lösung, Pharmacia,Uppsala)

Plasma

Alle Blutentnahmen wurden mit Flügelnadeln in silikonisiertes Glas gemacht. Von verschiedenen Antikoagulantien wurde immer 1 Teil für 9 Teile Blut vorpipettiert.
Folgende Antikoagulantien wurden verwendet

- 3,8% Trinatriumcitrat 2 H_2O
- 0,1M Dinatrium-EDTA
- Heparinlösung 208 USP U/ml
- 0,1M Natriumoxalat

Das Blut wurde sofort nach Entnahme während 20 min bei 2500 g zentrifugiert, und mit silikonisierten Pipetten das plättchenarme Plasma (PPP) gewonnen und in silikonisierten Glasröhrchen bis zum Gebrauch aufbewahrt. Für jedes Experiment wurde frisches Plasma gewonnen und sofort verarbeitet. Alle Blutentnahmen wurden bei gesunden Spendern gemacht. Im Citratplasma betrug der Quick zwischen 80-100 %, das Fibrinogen 200-350 mg %, das Prothrombin 80-100 %, der Faktor XIII nach Lorand et al (17) 95-120 %.

Methoden

Bestimmung von Faktor XIII nach Lorand et al modifiziert nach Mc Donagh et al (17)

Bestimmung des Fibrinogens nach Clauss (18)
Bestimmung des Prothrombins nach Koller et al (19)

Bestimmung der Gerinnungsaktivitaet der verschiedenen Enzyme
0,2 ml normales Citratplasma werden bei 37°30 sec inkubiert und 0,1 ml Enzymlösung zugegeben. Die Gerinnungszeit wird mit dem Platinhäkchen gemessen.

Polyacrylamidgelelektrophorese nach Mc Kee et al (13)
Alle Untersuchungen wurden mit verschieden behandeltem PPP gemacht.

0,1 ml Macrodexpuffer (1 Teil Macrodex
1 Teil o,o5 M Tris-HCl-Puffer
pH 7,4 enthaltend o,1 M $CaCl_2$)
+ 0,1 ml Enzymlösung
+ 0,2 ml PPP

wurden während zwei Stunden bei 37° inkubiert und das entstandene Gerinnsel in eiskalter Waschlösung (o,o1 M Na_2-EDTA-o,85 % NaCl) suspendiert, zentrifugiert und die überstehende Waschlösung abgegossen. Der Vorgang wurde mindestens zweimal wiederholt und das gewaschene Gerinnsel anschliessend während 15 Stunden bei Zimmertemperatur in o,1 ml 2-Mercaptoaethanol-SDS-Urea (o,2 M-1 %-4 M) inkubiert und nach sicherer makroskopischer Auflösung mit o,3 ml o,o1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 enthaltend o,1 % SDS verdünnt und davon 25 µl gemischt mit 10 µl Glycerin und 2 µl Bromphenolblaulösung, und 6.5 µl vom Gemisch auf die Polyacrylamidgele aufgetragen.
Es wurden 1,25 mm dicke, flache 7,5 % Polyacrylamidgele gebraucht. Als Trenn- und Elektrodenpuffer wurde ein o,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 enthaltend o,1 % SDS verwendet.
Die Trennung wurde bei einer Spannung von 120 Volt für 20 Proben während zwei Stunden durchgeführt. Die Gele wurden dann in einer Coomassieblaulösung (o,5 %(w/v) Coomassiebrillantblau, 60 %(v/v) Aethanol, 10 %(v/v) Eisessig, 30 %(v/v) Aqua dest.) während 45 min bei Zimmertemperatur gefärbt und anschliessend während 2-3 Tagen in 7,5 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol in wässriger Lösung entfärbt.

Für quantitative Untersuchungen wurden ein Teil der Gele bei

560 nm mit einem Clifford Densi Comp (Modell 445) gescannt und die Flächenabschnitte automatisch integriert (Abb 3).

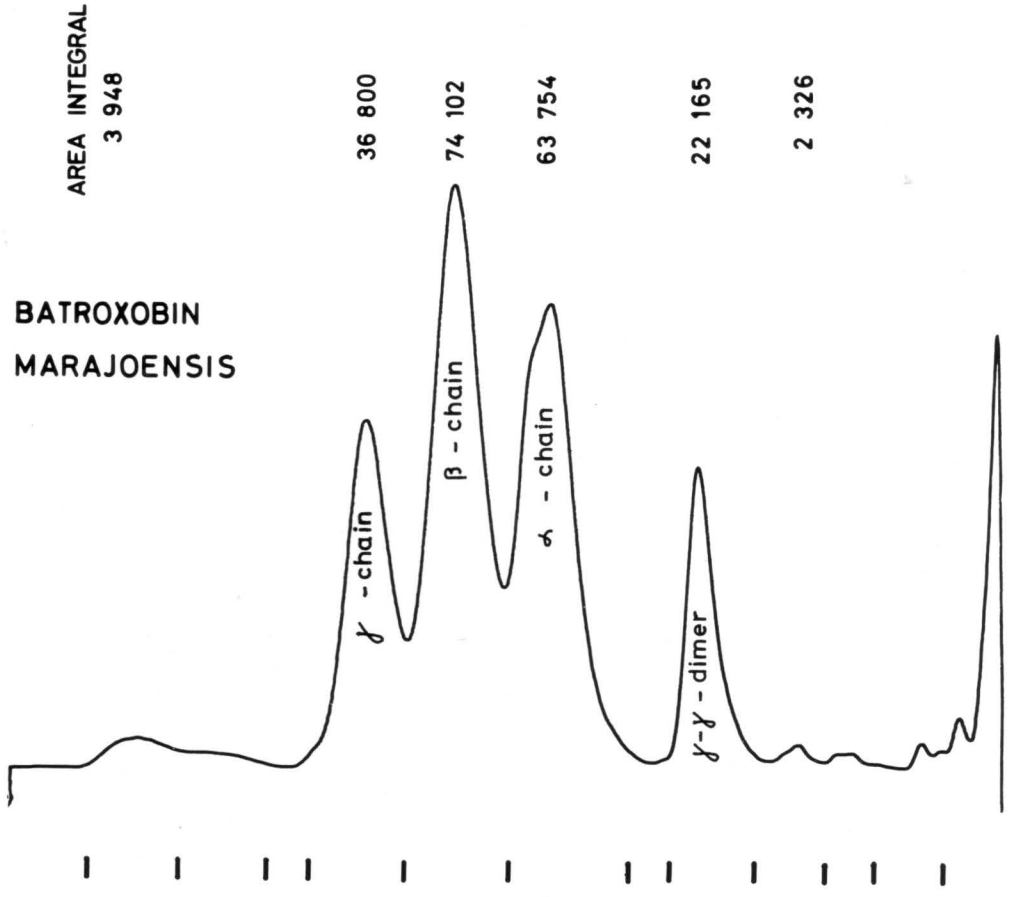


Abb 3 Scan einer Elektrophorese von B.marajoensis-Fibrin. Rechts ist der Startpunkt der Elektrophorese, der hohe schmale Peak entspricht genau der Auftragstelle. Die Zahlen geben die Flächenintegrale in willkürlichen Einheiten an, die proportional den relativen Konzentrationen der entsprechenden Polypeptide sind.

Werden Eiweisse, die zuvor in SDS inkubiert worden sind, in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt, ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit nur noch abhängig vom Molekulargewicht und unabhängig von ihrer ursprünglichen elektrischen Ladung, die durch SDS-Beladung der Moleküloberfläche für die verschiedenen Moleküle egalisiert wird. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekular-

gewichtes der zu trennenden Proteine oder Polypeptide.

Das Fibrinogen ist ein Eiweissmolekül, das aus sechs Polypeptidketten besteht. Zwei Aα-Ketten, zwei Bβ-Ketten und zwei γ-Ketten sind am N-terminalen Ende durch Disulfidbrücken aneinander gebunden ($A\alpha_2B\beta_2\gamma_2$). Die Ketten können deshalb nicht in einer SDS-Urea-Lösung dissoziieren, wohl aber nach Einwirkung von 2-Mercaptoaethanol, der die -S-S-Brücken in -SH-Gruppen zu reduzieren vermag. Die Molekulargewichte sind für die Aα-Kette um 70 000, für die Bβ-Kette um 60 000, für die γ-Kette um 50 000 (20).
Durch Einwirkung von Thrombin auf das Fibrinogenmolekül kommt es zur Abspaltung von Fibrinopeptid A von der Aα-Kette und von Fibrinopeptid B von der Bβ-Kette, das so entstandene weniger negativ geladene Fibrinmonomer beginnt zu polymerisieren, d.h. es assoziiert mit andern Fibrinmonomeren zum hochpolymeren Fibrin ($[\alpha_2\beta_2\gamma_2]$ n). Die abgespaltenen Fibrinopeptide sind kleine Peptide mit einem Molekulargewicht von 1806(Fibrinopeptid A) und 1804(Fibrinopeptid B) (21).

Die Einwirkung von Faktor XIIIa auf Fibrin bewirkt in Anwesenheit von Ca^{++}-Ionen eine γ-γ-Dimerisierung und eine α-Di-, α-Tri- und α-Polymerisierung durch auf 2-Mercaptoaethanol nicht empfindliche "Isopeptid"-Bindungen. In der Elektrophorese wandern diese Di-, Tri- und Polymere entsprechend ihrem Molekulargewicht langsamer (Abb 3 und 4). Die β-Ketten werden durch Faktor XIIIa nicht beeinflusst (siehe auch Einführung).

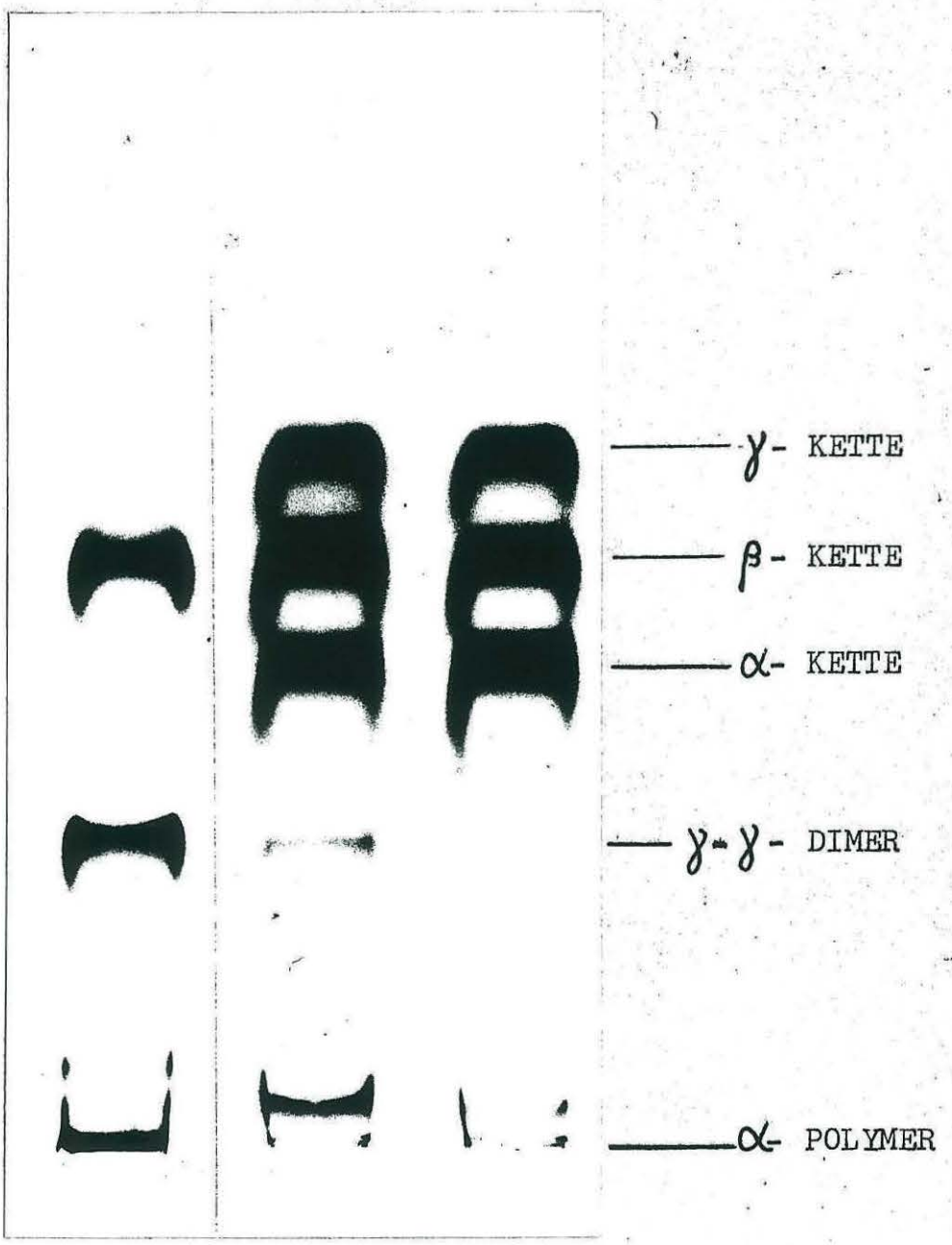


Abb 4 Elektrophoresen von verschiedenen reduzierten Fibrinen: a vollständig stabilisiertes Thrombinfibrin. Die γ-Kette ist vollständig in γ-γ-Dimer umgewandelt, die α-Kette vollständig polymerisiert in α-Polymer. b und c Batroxobin marajoensis-Fibrin. Es findet sich hier ein schwaches γ-γ-Dimerband in beiden Elektrophoresen als Zeichen der F XIII Wirkung. Die β-Ketten sind bei allen drei Elektrophoresen intakt. Bei a ist das β-Kettenband schwächer, da die aufgetragene Eiweissmenge geringer ist.

Resultate

Von Ancrod F 1623, Batroxobin marajoensis und Thrombin wurden Verdünnungsreihen gemacht und die Gerinnungsaktivitaet doppellogarithmisch aufgetragen in Funktion der Enzymkonzentration (Abb 5).

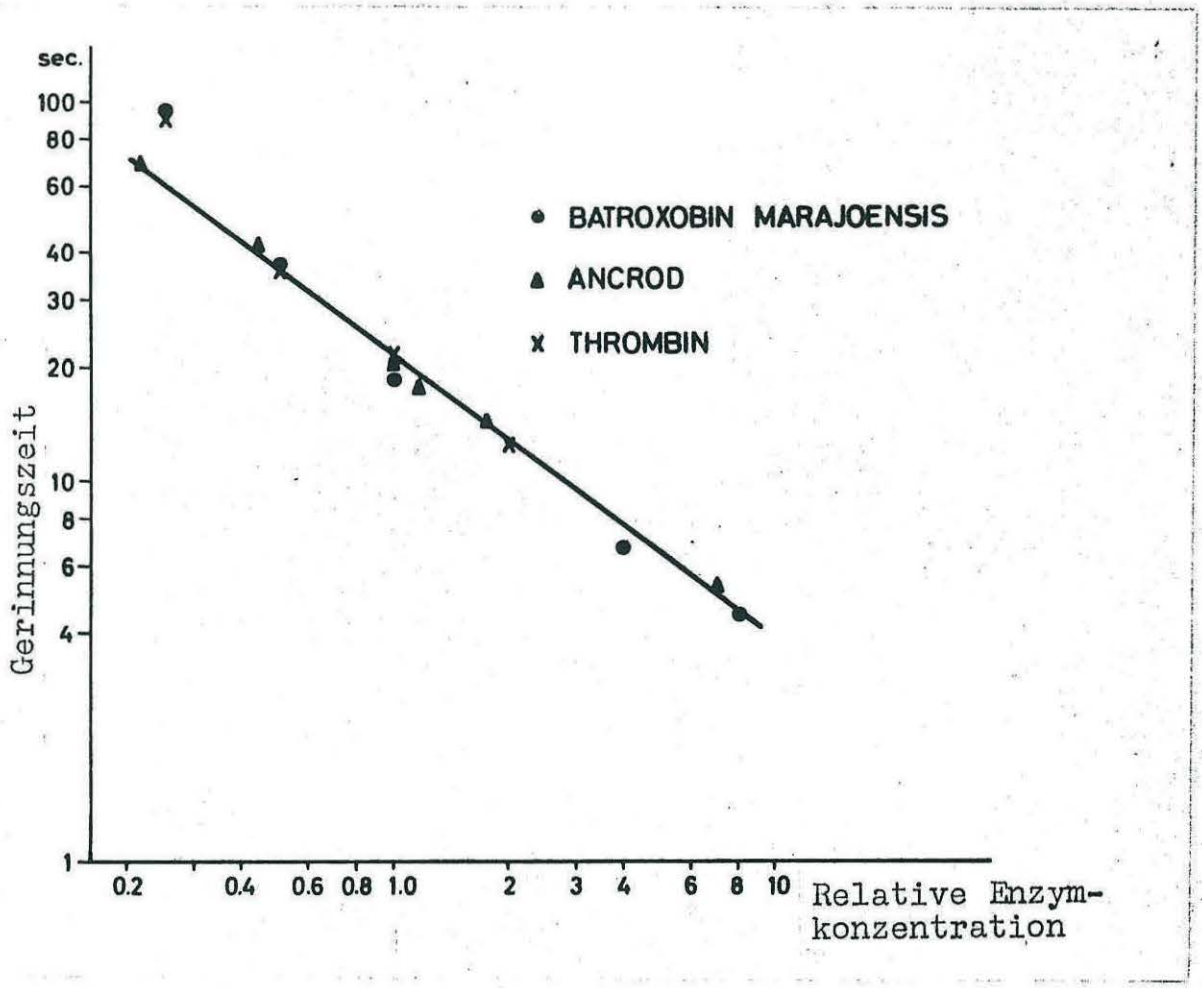


Abb 5 Gerinnungszeit in Funktion der Enzymkonzentration. Die Enzymkonzentration ist in willkürlichen Einheiten angegeben. 1 bedeutet diejenige Konzentration, die eine Gerinnungszeit von 20 sec gibt.

Für die folgenden drei Versuchsanordnungen bedeutet die Konzentration 1 diejenige Enzymkonzentration, die im obigen Ansatz eine Gerinnungszeit von 20 sec gibt (siehe Methoden).

Die mit Thrombin gewonnenen Gerinnsel wurden nach Reduktion mit 2-Mercaptoaethanol elektrophoretisch getrennt (Abb 6). Als Substrat für das Thrombin diente bariumsulfatadsorbiertes Oxalatplasma ohne Zusatz von Heparin. Verarbeitung siehe unter Methoden.
Entsprechend der abnehmenden Konzentration von Thrombin finden sich immer kleinere Gerinnsel. Deutlich sichtbar ist das Fehlen der γ-Kette bei allen Gerinnseln. Gleichzeitig erscheint ein neues Proteinband mit dem Molekulargewicht, das dem des γ-γ-Dimers entspricht. Die α-Kette ist schwächer als die β-Kette, entsprechend finden sich unten im Bild, d.h. am Start der Elektrophorese Polymere der α-Kette. Die β-Kette ist intakt geblieben. Diese Elektrophoresen sind charakteristisch für in Stabilisierung begriffenes Fibrin, d.h. für die Einwirkung von Faktor XIIIa in Anwesenheit von Ca^{++} auf Fibrin.
Werden die Elektrophoresen gescannt, und bildet man einen Quotienten aus der relativen Konzentration der α-Kette und der β-Kette, also α-Kette/β-Kette, so findet sich, semilogarithmisch aufgetragen eine lineare Abnahme dieses Quotienten mit zunehmender Enzymkonzentration (Abb 7), was der Polymerisierung der α-Kette entspricht.

Abbildung 8 zeigt die Elektrophoresen von reduziertem Ancrodfibrin. Substrat war bariumsulfatadsorbiertes Oxalatplasma, das zusätzlich durch Zugabe von 24 μl Heparin zu 4 ml Plasma heparinisiert wurde. Die Konzentrationsangaben unter den Elektrophoresen sind Mehrfache der Enzymkonzentration, die eine Gerinnungszeit von 20 sec gibt (siehe Methoden). Die Konzentration 3,5 wurde zusätzlich in Anwesenheit von 625 AT-E/ml (Endkonzentration) Hirudin inkubiert. Heparin hemmt die Bildung und Wirkung von Thrombin und Faktor Xa, Hirudin hemmt Thrombin.
Ausser α-, β- und γ-Ketten, γ-γ-Dimeren und α-Polymeren findet sich ein Eiweissband bei einem Molekulargewicht von um 40 000. Die γ-Kette ist nicht vollständig in γ-γ-Dimer umgewandelt. Es findet sich aber eine quantitative Abhängigkeit der Umwandlung

von der Enzymkonzentration. Die α-Kette nimmt mit zunehmender Enzymkonzentration ab. Das Eiweissband mit einem Molekulargewicht von 40 000 ist ein Bruchstück der α-Kette, die von Ancrod proteolytisch gespalten wird (22).
Werden die Elektrophoresen gescannt und in gleicher Weise ein Quotient aus der Konzentration der α-Kette und der β-Kette gebildet und semilogarithmisch aufgetragen, kommt es zur linearen Abnahme dieses Quotienten mit zunehmender Enzymkonzentration. Der Quotient γ-γ-Dimer/β-Kette nimmt mit zunehmender Enzymkonzentration zu. Dass die Zunahme hier nicht linear ist, erklärt sich aus der Kompetition mit der α-Kette und dem zunehmenden Substratmangel (Abb 7).

In Abbildung 9 findet sich das analoge für Batroxobin marajoensis: γ-γ-Dimerbildung und Abnahme der Konzentration der α-Kette. Es erscheint auch hier ein Proteinband bei einem Molekulargewicht von 40 000, nur ist seine Konzentration viel schwächer als bei der Einwirkung von Ancrod auf Fibrin(ogen) (Abb 7 und 8).

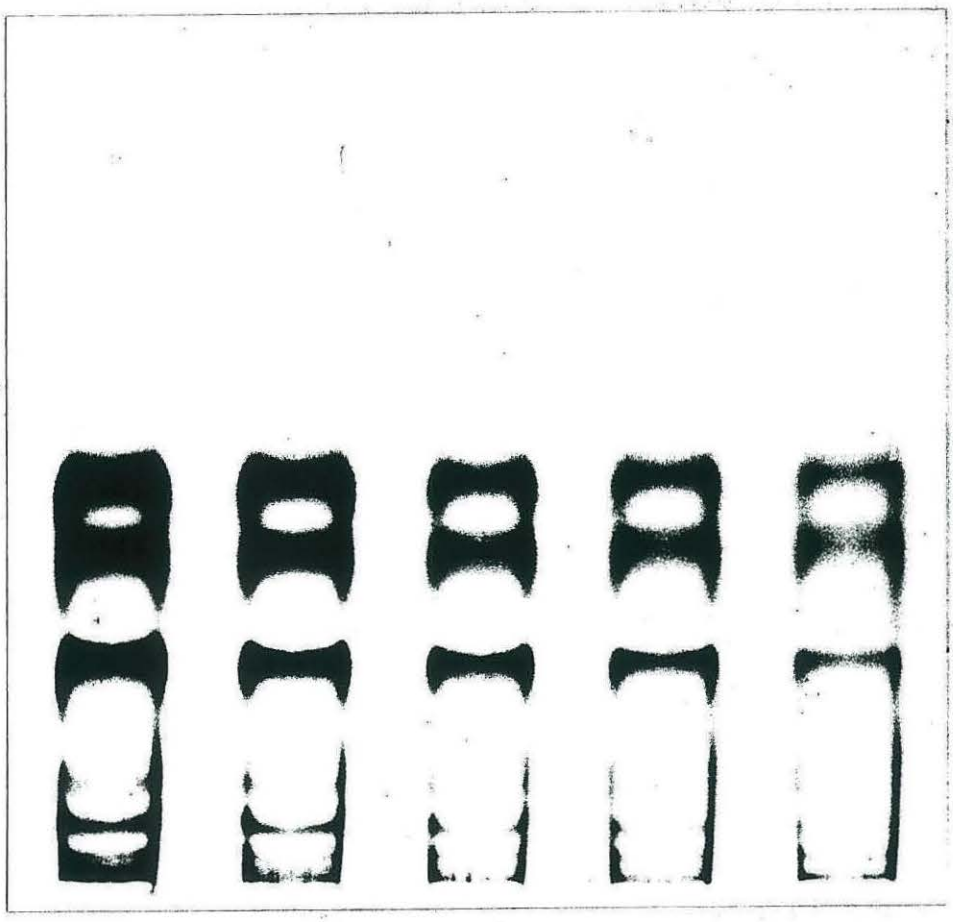


Abb 6 Elektrophoresen von reduziertem Thrombinfibrin
Die Zahlen unter den einzelnen Elektrophoresen geben die relativen Enzymkonzentrationen an.
1 bedeutet die Konzentration, die in Normalplasma eine Gerinnungszeit von 20 sec gibt (siehe Methoden).

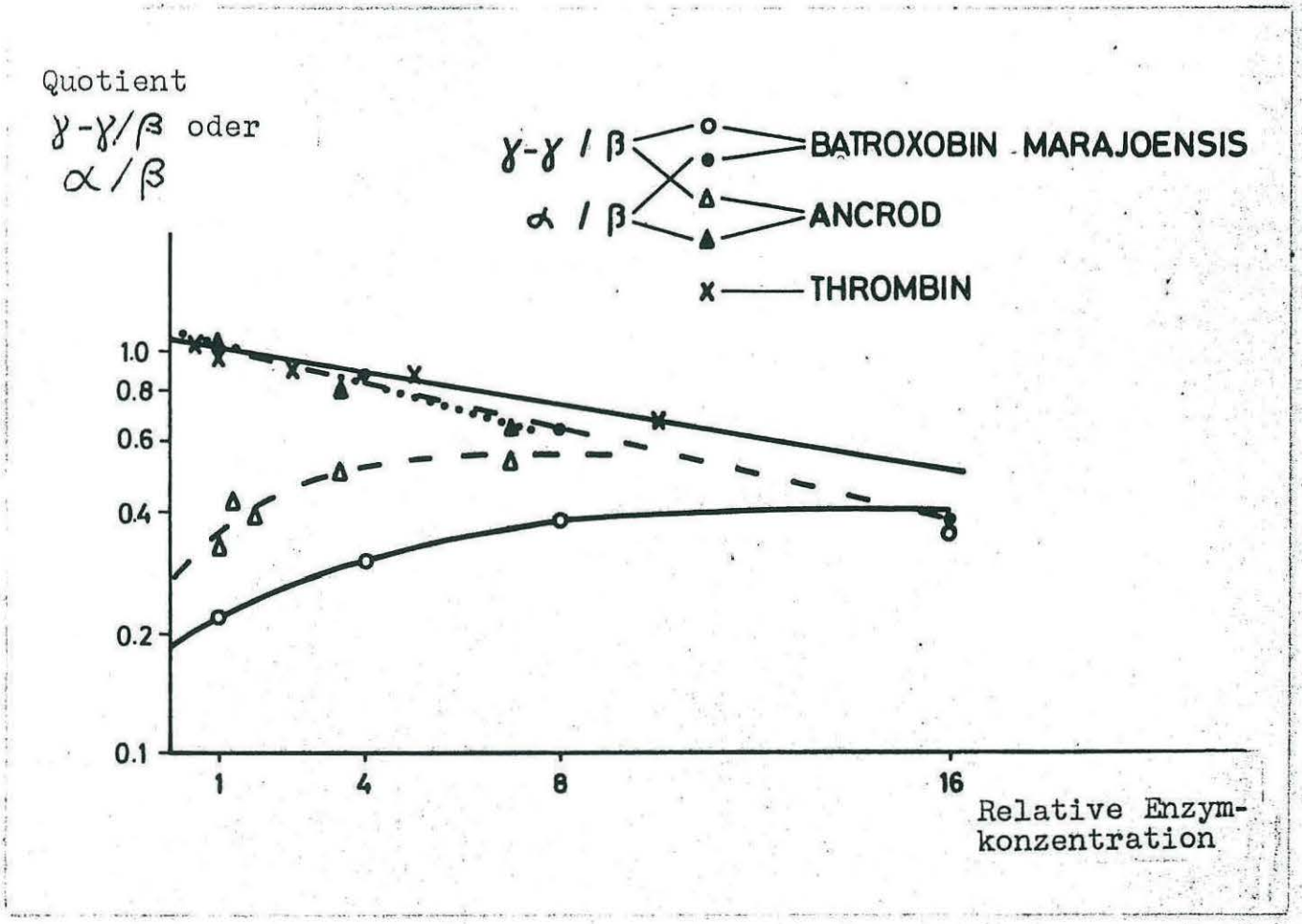


Abb 7 Die Quotienten γ-γ-Dimer/β-Kette und α-Kette/β-Kette sind semilogarithmisch in Relation zur verwendeten Enzymkonzentration abgebildet. Für Thrombin ist der Quotient α-Kette/β-Kette multipliziert mit dem Faktor 10.

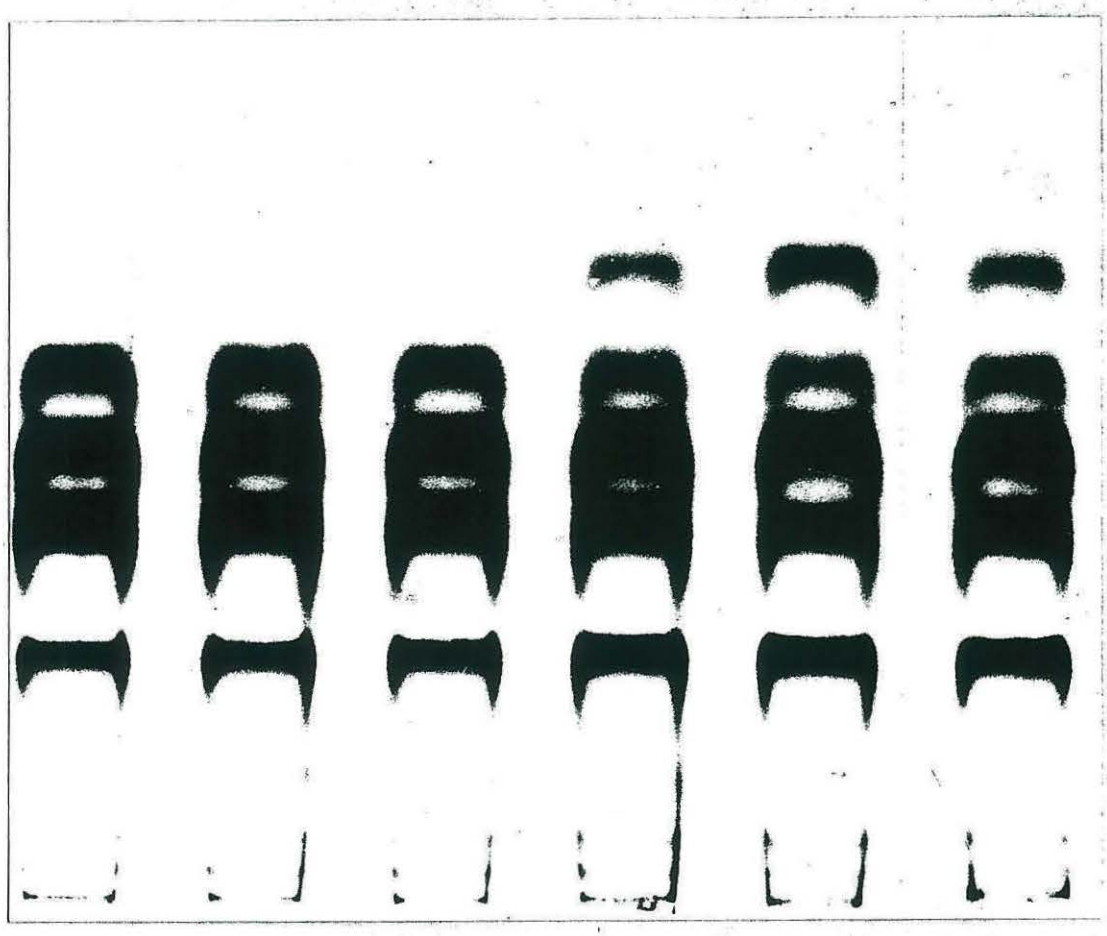


Abb 8 Elektrophoresen von reduziertem Ancrodfibrin
Die Zahlen unter den einzelnen Elektrophoresen geben die relativen Enzymkonzentrationen an. 1 bedeutet die Konzentration, die in Normalplasma eine Gerinnungszeit von 20 sec gibt (siehe Methoden).

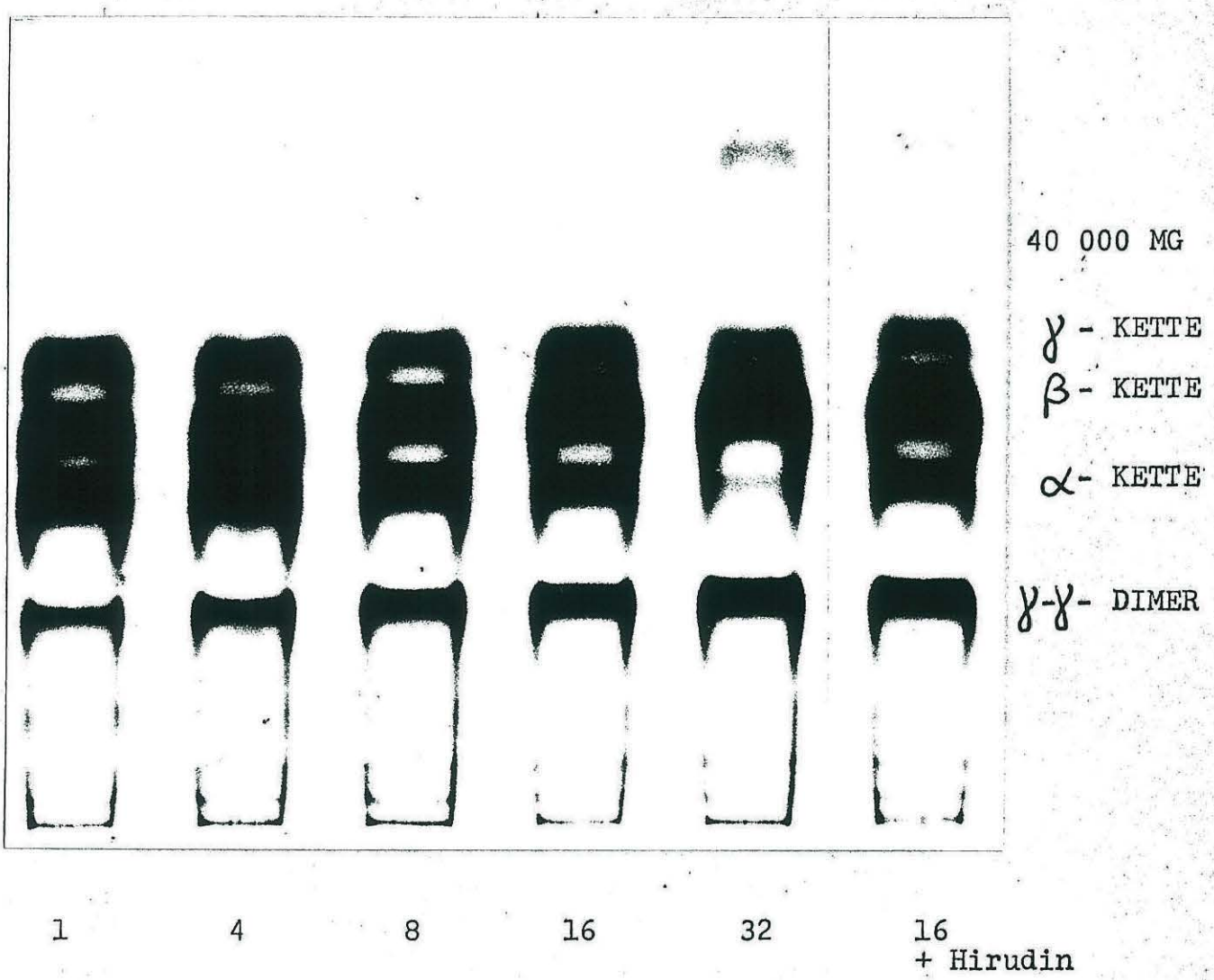


Abb 9 Elektrophoresen von reduziertem Batroxobin marajoensis-Fibrin
Die Zahlen unter den einzelnen Elektrophoresen geben die relativen Enzymkonzentrationen an. 1 bedeutet die Konzentration, die in Normalplasma eine Gerinnungszeit von 20 sec gibt (siehe Methoden). Das Eiweissband von um 40 000 MG ist sehr fein und in der Photoreproduktion der Elektrophoresen nur in der Konzentration 32 schwach sichtbar. Die Geloriginale zeigen es hingegen eindeutig auch in andern Konzentrationen.

In den folgenden Abbildungen sind die Enzymkonzentrationen so gewählt, dass die 1:10-Verdünnung der auf den Abbildungen mit 1 bezeichneten Enzymkonzentrationen die in Tabelle 1 angegebenen Gerinnungszeiten gaben.

Tab 1

Batroxobin maraj. unverändert	20 sec
Batroxobin maraj. mit Jodacetamid beh.	27 sec
Batroxobin maraj. mit Elastase beh.	18 sec
Batroxobin maraj. und mooj.-Gemisch	33 sec
Batroxobin maraj. und mooj.-Gemisch mit Jodacetamid behandelt	52 sec
Ancrod F 1623	21 sec
Ancrod A-38414	19 sec

(Bestimmung der Gerinnungszeit siehe Methoden)

Das Substrat für die folgenden Elektrophoresen ist immer Heparinplasma, der Macrodexpuffer wurde ohne Zugabe von $CaCl_2$ verwendet, die Ca^{++}-Ionenendkonzentration beträgt also nur annähernd die Hälfte der physiologischen. Das übrige Vorgehen ist wie bei den vorhergehenden Analysen.

Abbildung 10 zeigt die elektrophoretische Trennung der verschiedenen Ketten des Ancrodfibrins der zwei verschiedenen Ancrodchargen (siehe Material). Bei beiden Chargen werden γ-Ketten in γ-γ-Dimere umgewandelt, Zusatz von EDTA verhindert die Dimerisierung vollständig.

Aus Abbildung 11 wird ersichtlich, dass eine Mischung von Batroxobin marajoensis und Batroxobin moojeni fähig ist, Faktor XIII auch nach Behandlung mit 2-Jodacetamid zu aktivieren. Geprüft mit einem Urealöslichkeitstest (7) sollte die Aktivierung von Faktor XIII nach 2-Jodacetamidbehandlung von Batroxobin moojeni-Enzym mit demselben nicht mehr möglich sein (23). Die vollständige Umwandlung der γ-Ketten in γ-γ-Dimere und die fast vollständige Umwandlung der α-Ketten in α-Polymere zeigt, dass die Faktor XIII-Aktivierungskapazitaet unter der Einwirkung von 2 Jodacetamid nicht leidet.

Wenn Batroxobin moojeni mit Elastase behandelt wird, verliert es quantitativ seine Gerinnungsaktivitaet (23). Zum Ausschluss einer Kontamination von Batroxobin marajoensis mit Batroxobin moojeni zum Beispiel beim Melken einer Serie von Schlangen wurde Batroxobin marajoensis mit Elastase behandelt. Auch dieses Enzym kann, wie die feinen γ-γ-Dimerlinien in Abbildung 12 zeigen, auch nach Behandlung mit Elastase und nach Behandlung mit 2-Jodacetamid Faktor XIII aktivieren. Eine Kontamination scheint ausgeschlossen in dieser Hinsicht.

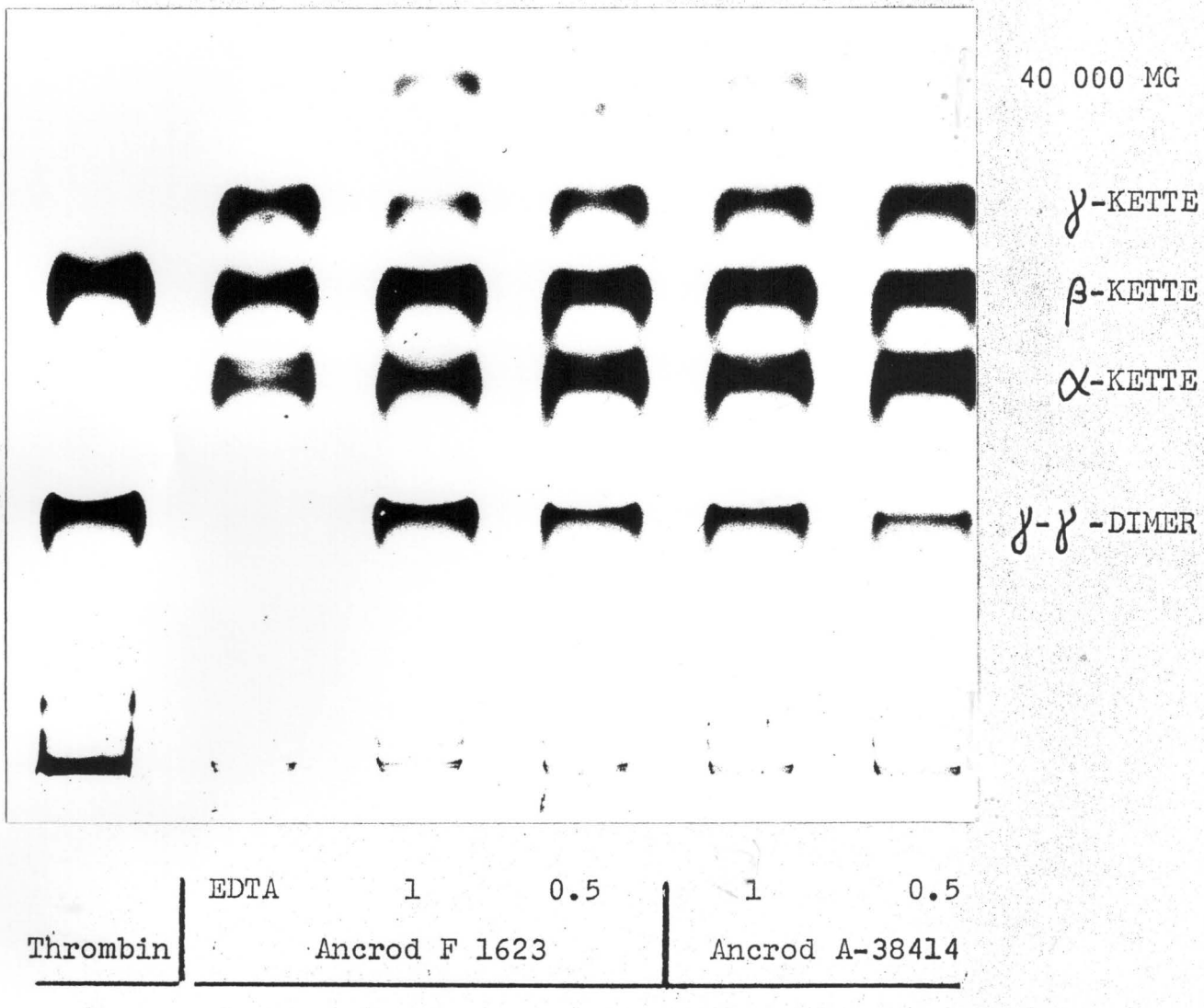


Abb 10 Elektrophoresen von reduziertem Ancrodfibrin zweier Chargen. Die Zahlen unter den einzelnen Elektrophoresen geben die relativen Enzymkonzentrationen an (Definition siehe Tab 1 und Text Seite 17).

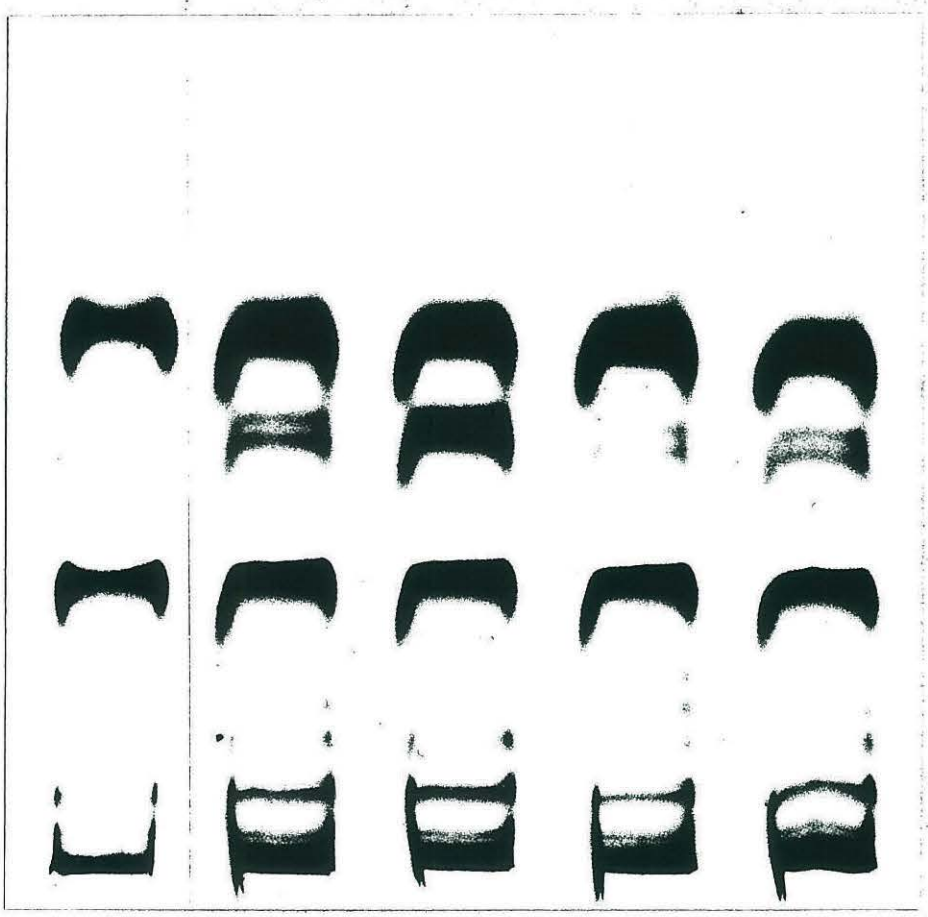
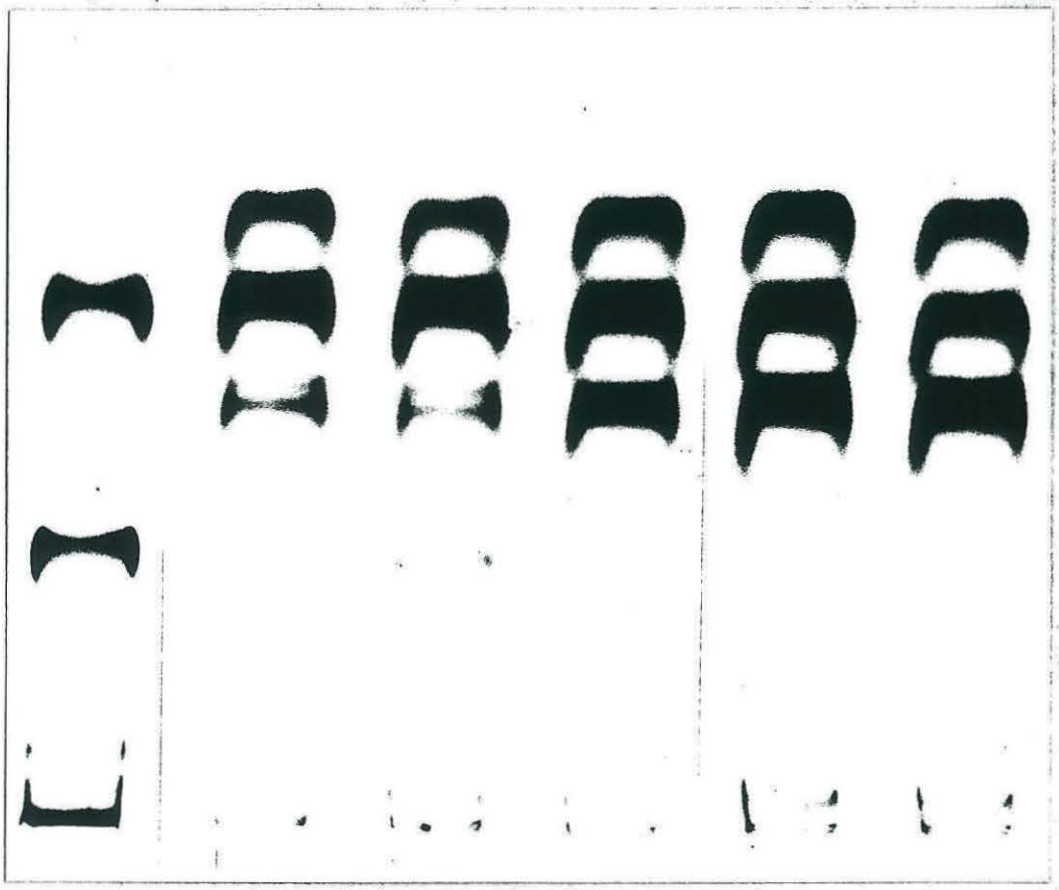


Abb 11 Elektrophoresen von reduziertem Fibrin aus Batroxobin marajoensis und Batroxobin moojeni-Gemisch vor und nach 2-Jodacetamidbehandlung. Enzymkonzentrationen siehe Tab 1 und Text Seite 17.



	EDTA	1	0.5	1	0.5
	behandelt mit Elastase			behandelt mit 2-Jodacetamid	
Thrombin	B a t r o x o b i n marajoensis				

Abb 12 Elektrophoresen von reduziertem Fibrin aus mit Elastase und 2-Jodacetamid behandeltem Batroxobin marajoensis. Enzymkonzentrationen siehe Tab 1 und Text Seite 17.

Die Faktor-XIII-Aktivierung kann auch mit der Faktor-XIII-Bestimmungsmethode nach Lorand et al (17) nachgewiesen werden. Dabei ist der Einbau des im UV-Licht fluorescierenden Amins Monodansylcadaverin in Casein abhängig von der Konzentration von Faktor XIIIa.

Anstelle von Thrombin in verschiedenen Konzentrationen wurde Ancrod oder Batroxobin marajoensis im Bestimmungssystem eingesetzt. Die Aktivierungszeit von Faktor XIII von 20 min wurde auf 45 min verlängert.
Als Enzymkonzentrationen wurden die in Tabelle 2 angegebenen verwendet. Faktor XIII-Quelle war aluminiumhydroxydadsorbiertes Citratplasma.

Tabelle 2

Enzym	Endkonzentration pro ml Aktivierungsgemisch	Einbau von Monodansylcadaverin
Thrombin	23	100 % per def.
Thrombin	2.3	131 %
Thrombin	0.23	30 %
Batroxobin maraj.	0.335	4.8 %
Ancrod F 1623	0.35	4.1 %
Leerwert	------	5.0 %

Die Konzentration ist angegeben in Mehrfachen oder Bruchteilen derjenigen Enzymkonzentration, die in normalem Citratplasma eine Gerinnungszeit von 20 sec gibt. Die Ca^{++}-Ionenkonzentration ist konstant in allen Systemen.

Zur Beantwortung der Frage, ob Faktor-XIII-Aktivitaet durch die proteolytische Aktivitaet von Ancrod oder Batroxobin marajoensis zerstört wird, wurden die beiden Enzyme aluminiumhydroxydadsorbiertem und hitzedefibriniertem Citratplasma zugegeben und aus dem Gemisch über zwei Stunden die Faktor XIII-Aktivitaet mit der Lorandschen Methode bestimmt (Abb 13). Die Endkonzentration / ml Gemisch betrug für Batroxobin marajoensis 4,4 mal, für Ancrod 1 mal die Konzentration, die in Normalplasma eine

Gerinnungszeit von 20 sec gibt (siehe Methoden).
Die Faktor-XIII-Aktivierbarkeit sank dabei um 25 % vom Ausgangswert für Ancrod F 1623, um 20 % für Batroxobin marajoensis und um 10 % mit Puffer als Kontrolle. Bei Zugabe von Puffer anstelle von Thrombin zum Zeitpunkt 0 min fand sich lediglich eine Aktivitaet von 2,0 % verglichen mit einem Normalplasmapool für beide Enzyme.

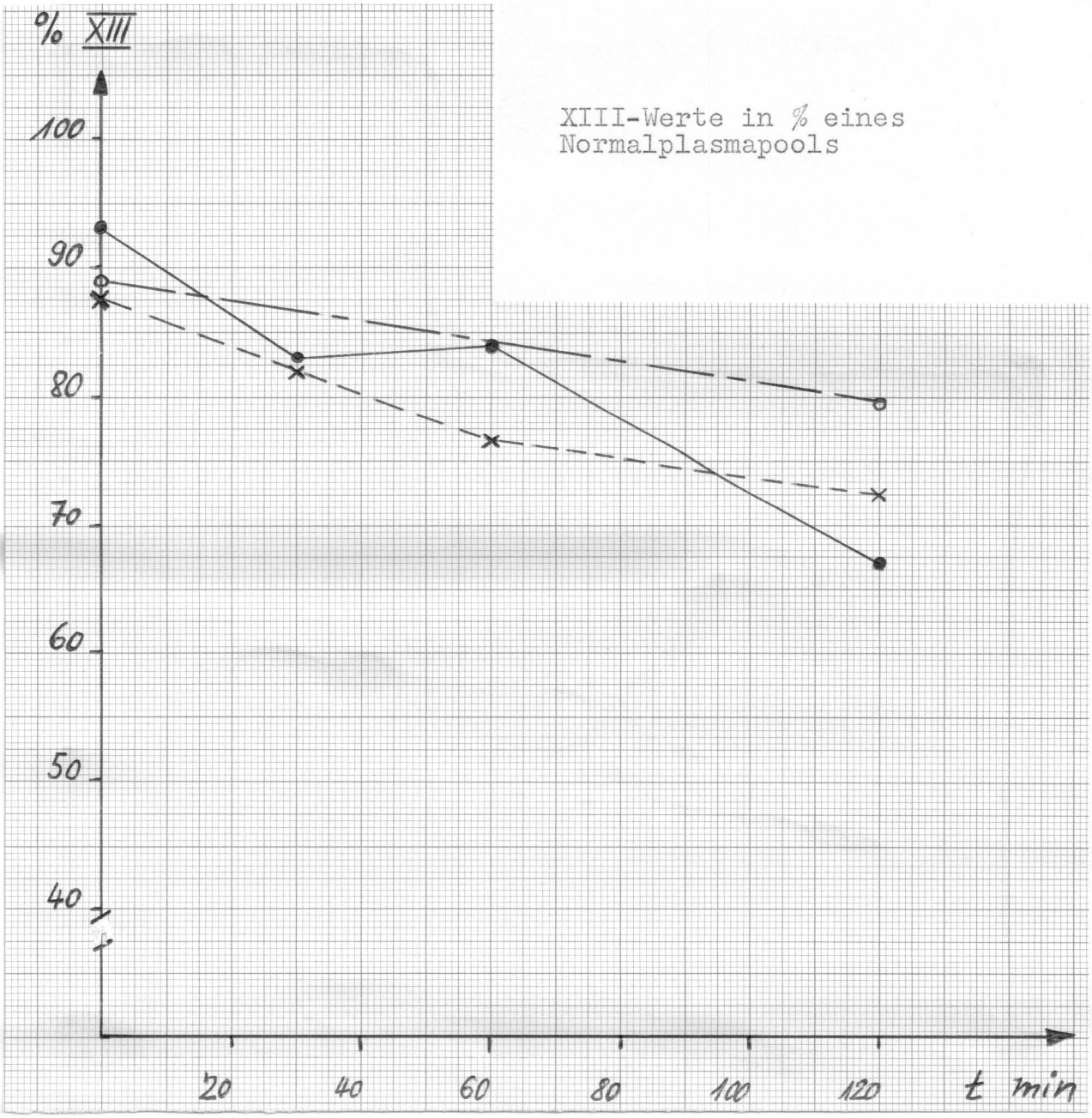


Abb 13 Faktor XIII-Aktivitaet nach Inkubation mit Batroxobin marajoensis (x----x), Ancrod (●——●) und Puffer.

DISKUSSION

Für beide Chargen von Ancrod, für Batroxobin marajoensis und für das Gemisch von Batroxobin marajoensis und Batroxobin moojeni konnte eine konzentrationsabhängige Faktor XIII-Aktivierung mit dem Nachweis von γ-γ-Dimer in reduziertem Fibrin gezeigt werden und das ungeachtet der verschiedenen Behandlungen einzelner Enzyme mit Elastase und 2-Jodacetamid. Bezüglich Ancrod stimmen die Resultate überein mit Untersuchungen von Gaffney (24). Von Batroxobin marajoensis wurde bisher angenommen, dass es Faktor XIII nicht aktivieren kann. Um eine Thrombinbildung auch in bariumsulfatadsorbiertem Plasma - und dadurch eine Aktivierung von Faktor XIII durch Spuren von Thrombin - zu verhindern, wurden alle Experimente mit Schlangenproteasen in zusätzlich heparinisiertem Plasma durchgeführt. Für Ancrod und für Batroxobin marajoensis wurde auch je ein Experiment mit sehr hohen Konzentrationen von Hirudin zusätzlich zur Heparinisierung durchgeführt, wobei Hirudin auch quantitativ keinen Einfluss auf die γ-γ-Dimerbildung und also auf die Faktor-XIII-Aktivierung hat.
Die γ-γ-Dimerisierung ist für die Faktor-XIII-Wirkung hochspezifisch, ebenso eine Polymerisierung der α-Kette.

Für quantitative Untersuchungen wurden relative Angaben der Konzentrationen der verschiedenen Ketten von Fibrin errechnet. Die gemessene Konzentration der α-Kette, der γ-Kette und des γ-γ-Dimers wurden immer bezogen auf die Konzentration der β-Kette. Somit ist die β-Kette für jedes Gerinnsel als Referenz eingebaut - die β-Kette wird durch Faktor XIIIa nicht beeinflusst - und sehr exakte quantitative Untersuchungen von Faktor XIII mit einem physiologischen Substrat, nämlich dem Fibrin sind möglich. Voraussetzung ist dabei, dass das Fibrinogen eine konstante Zusammensetzung der Ketten hat, was für unsere Untersuchungen angenommen wurde und dass zu prüfende Proteasen keine direkte proteolytische Wirkung auf einzelne Fibrinketten oder jedenfalls nicht auf die β-Kette oder auf α-Kette und γ-Kette zusammen haben.

Ursprünglich wurde der Quotient aus α-Kette und β-Kette als Mass für die Faktor XIII-Wirkung genommen. Mit Sicherheit ist er jedoch nur für Thrombin zu verwenden. Bei Ancrod und Batroxobin marajoensis findet sich α-Polymer nicht entsprechend dem Verschwinden der α-Kette. Erst die α-Polymerisierung darf aber als Faktor-XIII-Wirkung interpretiert werden, wie auch beim Verschwinden der γ-Kette nur eine γ-γ-Dimerisierung für Faktor-XIII-Wirkung beweisend ist.
Dass die α-Kette mit zunehmender Konzentration von Ancrod und Batroxobin marajoensis verschwindet, ohne dass entsprechend viel α-Polymer gebildet wird, muss mit einer direkten Einwirkung dieser Enzyme auf die α-Kette erklärt werden. Für Ancrod ist diese Wirkung nachgewiesen (22). Ausserdem ist bekannt, dass das Bruchstück, das abgespalten wird, ein MG von 30 000 hat und aus dem carboxyterminalen Ende der α-Kette des Fibrin(ogen)s stammt, das nicht mit Disulfidbrücken an die andern Ketten des Moleküls gebunden ist und also nach proteolytischer Spaltung nicht mehr im Gerinnsel festgehalten wird. Weiter ist bekannt, dass die durch Faktor XIIIa katalysierten Bindungen für die α-Ketten in diesem Stück sitzen. Dass eine α-Polymerisierung aus diesen Gründen nicht quantitativ zustande kommt, ist also verständlich. Analog zu dieser Tatsache kann vermutet werden, dass die Verhältnisse für Batroxobin marajoensis ähnlich liegen. Dies muss aber noch untersucht werden. Weiter kann gesagt werden, dass Löslichkeitsteste für solche Untersuchungen untauglich sind, da für die Unlöslichkeit von Fibrin die Stabilisierung soweit fortgeschritten sein muss, dass eine erhebliche α-Polymerisierung - und dies ist für Ancrod und Batroxobin marajoensis nicht möglich - schon vorhanden ist. Ein Fibrin, das nur γ-γ-Dimer enthält, ist in 5 M Urea nicht unlöslich (25).

Mit der Faktor-XIII-Bestimmungsmethode nach Lorand et al (17) können, was die Aktivierungsversuche anbelangt, keine eindeutigen Resultate erreicht werden. Möglicherweise ist diese Methode zu wenig empfindlich. Eine andere Möglichkeit ist,

dass Faktor XIII durch Ancrod und Batroxobin marajoensis anders aktiviert wird als durch Thrombin und dass er so im nicht physiologischen Lorandschen Bestimmungssystem aktivitaetsmässig nicht mehr erfasst wird, hingegen sehr wohl in physiologischen Systemen noch wirksam ist. Batroxobin moojeni wurde im Lorandschen System nicht untersucht, da es bekannterweise eine messbare XIII-Aktivierung hier provozieren kann (16).

Der Nachweis, dass die untersuchten Enzyme Ancrod und Batroxobin marajoensis Faktor XIII so zu verändern vermögen, dass er durch Thrombin schlechter aktivierbar ist (Abb 13), legt, natürlich neben der Fähigkeit der Faktor-XIII-Aktivierung, nahe, dass die untersuchten Enzyme für die Isolierung (Trennung von Faktor XIII von Fibrinogen durch Gerinnung) des Faktor-XIII-Eiweisses nicht gebraucht werden können.

Eine Faktor-XIII-Aktivierung bei Verwendung der Schlangenproteasen Ancrod und Batroxobin marajoensis in vivo zur Antikoagulation dürfte so minim sein, dass die Substanzen in den bisherige Dosierungen weiter gebraucht werden dürften.

ZUSAMMENFASSUNG

Faktor XIII wird physiologischerweise durch limitierte proteolytische Spaltung durch Thrombin und wahrscheinlich Faktor Xa aktiviert.
Von den thrombinähnlichen Enzymen, gereinigt aus den Schlangengiften der Schlangen Bothrops atrox marajoensis (Batroxobin marajoensis), Bothrops atrox moojeni (Batroxobin moojeni) und Agkistrodon rhodostoma (Ancrod) sind zum Teil widersprüchliche Angaben über ihre Fähigkeit, Faktor XIII zu aktivieren, vorhanden.
Die Faktor XIII-Aktivierung wurde mit zwei Methoden verfolgt, nämlich der Elektrophorese von reduziertem Fibrin in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen und dem Nachweis von Dimeren der γ-Kette oder Polymeren der α-Kette von Fibrin einerseits und der Lorandschen Methode, mit welcher ein Einbau von Monodansylcadaverin in Casein durch Faktor XIIIa gemessen wird, andrerseits.
Mit Hilfe der Elektrophorese wurde eine Aktivierung von Faktor XIII durch alle Enzyme - auch nach deren Behandlung mit Elastase und 2-Jodacetamid - eindeutig nachgewiesen.
Mit der Lorandschen Methode ist dies nur für das Batroxobin moojeni möglich.
Die α-Kette von Fibrin(ogen) wird durch Ancrod und Batroxobin marajoensis derart proteolytisch gespalten, dass eine α-Polmerisierung - wenn überhaupt - nur sehr begrenzt möglich ist.
Aufgrund von Resultaten aus der Lorandschen Methode kann gesagt werden, dass die Proteolyse von Faktor XIII durch die Enzyme Ancrod und Batroxobin marajoensis höchstwahrscheinlich nicht auf die Aktivierung limitiert ist, sondern weitergeht und den Faktor XIII langsam inaktiviert.

BIBLIOGRAPHIE

1. Robbins K.C.: A Study on the Conversion of Fibrinogen to Fibrin. Am.J.Physiol. 142,581 (1944)
2. Laki K. and Lorand L.: On the Solubility of Fibrin Clots. Science 108, 280 (1948)
3. Loewy A.G. and Edsall J.T.: Studies on the Formation of Urea-Insoluble Fibrin. J.biol. Chem. 211, 829 (1954)
4. Loewy A.G. Venziale C. and Forman M.: Purification of the Factor Involved in the Formation of Urea-Insoluble Fibrin. Biochim. biophys. Acta 26,670 (1957)
5. Lorand L. and Jacobsen A.: Studies on the Polymerization of Fibrin. The Role of the Globulin: Fibrin Stabilizing Factor. J. biol. Chem. 230,421 (1958)
6. Lüscher E.F.: Ein fibrinstabilisierender Faktor aus Thrombozyten. Schweiz. med. Wsch. 87, 1220 (1957)
7. Duckert F., Jung E. and Shmerling D.H.: A Hitherto Undescribed Congenital Haemorrhagic Diathesis Probably Due to Fibrin Stabilizing Factor Deficiency. Thrombos. Diathes. haemorrh. 5, 179 (1960)
8. Duckert F.: The Fibrin Stabilizing Factor, Factor XIII. Blut, Zeitschr. f. die ges. Blutforschung 26, 177 (1973)
9. Lorand L., Downey J., Gotoh T., Jacobsen A. and Tokura S.: The Transpeptidase System which Crosslinks Fibrin by γ-glutamyl-ε-lysine Bonds. Biochem. biophys. Res. Commun. 31, 222 (1968)
10. Matacic S. and Loewy A.G.: The Identification of Isopeptide Crosslinks in Insoluble Fibrin. Biochem. biophys. Res. Commun. 30, 356 (1968)
11. Pisano J.J., Finlayson J.S. and Peyton M.M.: Cross-link in Fibrin Polymerized by Factor XIII: ε-(γ-glutamyl)lysine. Science 160, 892 (1968)
12. Chen R. and Doolittle R.F.: Identification of the Polypeptide Chains Involved in the Cross-linking of Fibrin Proc. nat. Acad. Sci. 63, 420 (1969)
13. McKee P.A., Mattock P. and Hill R.L.: Subunit Structure of Human Fibrinogen, Soluble Fibrin and Cross-linked in-Insoluble Fibrin. Proc. nat. Acad. Sci. 66, 738 (1970)
14. Doolittle R.F., Chen R. and Lau F.: Hybrid Fibrin: Proof of Intermolecular Nature of γ-γ Cross-linking Units. Biochem. biophys. Res. Commun. 44, 94 (1971)
15. Doolittle R.F.: Structural Details of Fibrin Stabilization: Implications for Fibrinogen Structure and Initial Fibrin Formation. Thrombos. Diathes. haemorrh. Suppl. 54,155 (1973)
16. McDonagh J. and McDonah R.P.: Alternative Pathways for the Activation of Factor XIII. Br.J. Haematology 30, 465 (1975)
17. Lorand L., Uruyama T., de Kiewiet J.W.C. and Nossel H.L.: Diagnostic and Genetic Studies on Fibrinogen-Stabilizing-Factor with a New Assay Based on Amine Incorporation. J.clin. Invest. 48,1054 (1969)
18. Clauss A.: Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol. 6,1 (1951)

19. Koller F., Loeliger A., and Duckert F.: Experiments on a New Clotting Factor (Factor VII). Acta Haematol.6, 1 (1951)
20. Finlayson J.S., Morton R.O.: Gel Electrophoresis for Assessing Fibrin Crosslinking: a Precaution.Clin. Chim. Acta 36, 254 (1972)
21. Gladner J.A.: The Action of Thrombin on Fibrinogen. Laki K.: Fibrinogen (Dekker, New York) Chapt 5,87 (1968)
22. Edgar W. and Prentice C.R.M.: The Proteolytic Action of Ancrod on Human Fibrinogen and its Polypeptide Chains. Thromb. Res. 2, 85 (1973)
23. Stocker H.: Persönliche Mitteilung (1975)
24. Gaffney P.J. and Brasher M.: Mode of Action of Ancrod as a Defibrinating Agent. Nature 251, 53,(1974)
25. Schwartz M.L.,Pizzo S.V., Hill R.L. and McKee P.A.: The Effect of Fibrin-Stabilizing Factor on the Subunit Structure of Human Fibrin. J. Clin. Invest 50,1506 (1971)

CURRICULUM VITAE

Martin Walter, geboren in Aarau am 6. Mai 1945 als Bürger von Mümliswil-Ramiswil/SO.
Besuch der Primarschule in Stüsslingen /SO während 6 Jahren. Anschliessend 5 Jahre Progymnasium in Olten und zweieinhalb Jahre Gymnasium in Solothurn.
Matura Typus A in Solothurn.
1965 bis 1972 Studium der Medizin an der Universitaet Basel. Abschluss des Studiums Ende 1972 durch das Staatsexamen ebenda.
Februar 1973 bis März 1974 Arbeit als Assistenzarzt auf der medizinischen Abteilung des Spitals Herzogenbuchsee/BE.
Ab Juni 1974 Arbeit als Assistenzarzt an den Gerinnungs- und Fibrinolyselaboratorien der Medizinischen Universitaetsklinik Basel.