

**Untersuchung zur immunmodulierenden Wirkung
von Milchsaft aus *Euphorbia mauritanica* L. auf
humane Hautzellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl. Pharm. Florian Günther
aus Berlin

2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2015 bis Dezember 2018 unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Harshadrai Rawel

Disputation am: 26.03.2019

Experience is what you get when you didn't get what you wanted.

- Randy Pausch „*The Last Lecture*” •

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	7
1.1 <i>Euphorbiaceae</i>	7
1.1.1 <i>Euphorbia mauritanica</i>	10
1.2 Latices	11
1.3 Entzündungen	12
1.4 Die Haut	15
1.4.1 Epidermis	15
1.4.2 Dermis	16
1.4.3 Subkutis	16
1.5 Proteasen	17
1.5.1 Proteasen allgemein	17
1.5.2 Serinproteasen	19
1.6 Protease-aktivierte Rezeptoren	20
1.7 Diterpene	26
1.8 Zielstellung	29
2. Material und Methoden	30
2.1 Material	30
2.1.1 Allgemeine Geräte	30
2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	31
2.1.3 Chemikalien	32
2.1.3.1 Zellkultur	34
2.1.3.2 Kits	35
2.1.3.3 Primer	36
2.1.4 Software	36
2.1.5 Verwendete Zellen	37
2.1.5.1 HaCaT-Keratinocyten	37
2.1.5.2 Primäre Fibroblasten	37

2.2 Methoden	39
2.2.1 Probengewinnung	39
2.2.2 Proteinanalytik	40
2.2.2.1 Acetonfällung	40
2.2.2.2 Proteinquantifizierung	40
2.2.2.3 Ionenaustauschchromatographie	42
2.2.2.4 Bestimmung der Proteaseaktivität	43
2.2.2.5 Größenausschlusschromatographie	44
2.2.2.6 Elektrophorese	44
2.2.2.6.1 SDS-PAGE	44
2.2.2.6.2 Kolloidale Coomassie Färbung	46
2.2.2.6.3 Silberfärbung	47
2.2.2.7 Tryptischer <i>In-Gel</i> Verdau	48
2.2.2.8 Deglykosylierung von Mauritanicin	48
2.2.2.9 <i>de-novo</i> -Proteinsequenzierung	49
2.2.2.9.1 MALDI-TOF-MS/MS	50
2.2.2.9.2 ISD-MALDI-TOF-MS	52
2.2.2.10 <i>In silico</i> Homologiemodell von Mauritanicin	53
2.2.2.11 Molekulares Dynamik Modell von Mauritanicin	53
2.2.2.12 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	54
2.2.2.13 Durchflusszytometrie	55
2.2.3 Gentechnische Untersuchungen	56
2.2.3.1 Isolierung von RNA aus <i>E. mauritanica</i>	56
2.2.3.2 Isolierung von RNA aus humanen adhärenen Zellen	57
2.2.3.3 Quantifizierung von RNA	57
2.2.3.4 Quantifizierung von DNA	58
2.2.3.5 Reverse Transkription	58
2.2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
2.2.3.6.1 RACE-PCR	60
2.2.3.7 Modulierung degenerierter Primer	61
2.2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese	62
2.2.3.9 Isolation von PCR-Produkten aus dem Agarose-Gel	62
2.2.3.10 DNA-Sequenzierung	63
2.2.4 Zellbiologische Methoden	64
2.2.4.1 Hautmodelle	64
2.2.4.2 Zytokinsekretion von adhärenen Zellen	65
2.2.4.3 Bestimmung von dsDNA in adhärenen Zellen	65
2.2.4.4 Immunhistochemische Färbung von PAR2	66

3. Ergebnisse und Diskussion	67
3.1 Untersuchung zur immunmodulierenden- und histologischen Wirkung von Milchsft aus <i>E. mauritanica</i> auf humane Hautmodelle	67
3.2 Strukturaufklärung von Mauritanicain	71
3.2.1 Isolation von Mauritanicain	71
3.2.1.1 Untersuchung der Ionenaustauschfraktionen mittels MALDI-TOF-MS	73
3.2.2 <i>De-Novo</i> -Proteinsequenzierung von Mauritanicain	77
3.2.3 Isolierung von RNA aus <i>E. mauritanica</i>	84
3.2.4 Gensequenzierung von Mauritanicain	85
3.2.5 <i>In silico</i> Homologiemodell von Mauritanicain	96
3.2.6 Massenbestimmung von Mauritanicain	102
3.3 Nachweis von PAR2 in HaCaT-Keratinocyten und humanen dermalen Fibroblasten	104
3.3.1 PAR2 -PCR	104
3.3.2 Immunhistochemische Färbung von PAR2-Rezeptoren	105
3.4 Proliferation von HaCaT- Keratinocyten	108
3.5 Bestimmung von IL-8 in HaCaT- Keratinocyten und primären humanen dermalen Fibroblasten mittels ELISA	110
4. Zusammenfassung / Summary	116
Literaturverzeichnis	120
Tabellenverzeichnis	134
Abbildungsverzeichnis	136
Publikationsverzeichnis	139
Lebenslauf	142
Danksagung	143
Eidesstattliche Erklärung	143

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonsäure)
ACN	Acetonitril
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>Bicinchonic Acid</i>
BSA	bovines Serum Albumin
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
DAG	Diacylglycerol
1,5-DAN	1,5-Diaminonaphthalen
DAPI	2-(4-Amidinophenyl)-1H-indol-6-carboxamidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	2'-Desoxynucleotidtriphosphaten
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleotidtriphosphaten
dsDNA	doppelstrang <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECL-2	<i>Second Extracellular Loop</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	fötales bovines Serum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FU	Fluoreszenzeinheiten
g	Erdbeschleunigung ($\approx 9,81 \text{ m/s}^2$)
gDNA	<i>Genomic Deoxyribonucleic Acid</i>
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
h	Stunden
HaCaT	<i>Human adult low Calcium high Temperature (Keratinocytes)</i>
IEC	<i>Ion-Exchange Chromatography</i>
IL	Interleukin
INF	Interferon
ISD	<i>in-source decay</i>
m	Meter
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometrie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NK	Negativkontrolle
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAR	Protease aktivierte Rezeptoren
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	<i>Phosphate Buffered Ssaline</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA-ends</i>
RMSF	<i>Root-Mean-Square Fluctuation of Atomic Position</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel Electrophoresis</i>
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i>
SPC	<i>Simple point-charge</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TOF	<i>Time of Flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan

Aminosäurebezeichnung 3-buchstaben-Code (und IUPAC)

Alanin	Ala (A)	Leucin	Leu (L)
Arginin	Arg (R)	Lysin	Lys (K)
Asparagin	Asn (N)	Methionin	Met (M)
Asparaginsäure	Asp (D)	Phenylalanin	Phe (F)
Cystein	Cys (C)	Prolin	Pro (P)
Glutamin	Gln (Q)	Serin	Ser (S)
Glutaminsäure	Glu (E)	Threonin	Thr (T)
Glycin	Gly (G)	Tryptophan	Trp (W)
Histidin	His (H)	Tyrosin	Tyr (Y)
Isoleucin	Ile (I)	Valin	Val (V)

Nukleotidbezeichnung nach IUPAC

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
R	Adenin/Guanin
Y	Cytosin/Thymin
S	Guanin/Cytosin
W	Adenin/Thymin
K	Guanin/Thymin
M	Adenin/Cytosin
B	Cytosin/Guanin/Thymin
D	Adenin/Guanin/Thymin
H	Adenin/Cytosin/Thymin
V	Adenin/Cytosin/Guanin
N	Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin

1. Einleitung

Die Milchsäfte der Pflanzenfamilie *Euphorbiaceae* JUSS. gehören zu den am stärksten entzündungsauslösenden Pflanzensäften im gesamten Pflanzenreich. Entzündliche Haut- und Augenreaktionen nach dem Kontakt mit Milchsäften einiger *Euphorbiaceae*, wie dem von *Hippomane mancinella* L., sind ein starkes Problem für Menschen, die in unmittelbarer Nähe zu diesen Bäumen leben. Immer wieder kommt es zu entzündlichen Hautreaktionen. Da die Ursachen der starken Reaktionen auf die Milchsäfte bisher nicht geklärt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit der Milchsaft von *Euphorbia mauritanica* L. (*Euphorbiaceae*) auf seine immunmodulierende Wirkung an humanen Hautzellen untersucht.

1.1 *Euphorbiaceae*

Die Pflanzenfamilie *Euphorbiaceae* (Wolfsmilchgewächse) ist mit ca. 6.300 Arten und 246 Gattungen die viertgrößte Pflanzenfamilie der Angiospermen. Sie werden in die vier Unterfamilien *Cheilosioideae* K. WURDACK & PETRA HOFFMANN, *Acalyphoideae* KOSTEL., *Crotonoideae* L. und *Euphorbioideae* BURNETT [1-4] unterteilt. Die Unterfamilie *Euphorbioideae* unterteilt sich in den Tribus *Euphorbieae* mit dem Subtribus *Euphorbiinae*. Zu diesem Subtribus gehört die Gattung *Euphorbia* L.. Offiziell botanisch wurde die Gattung *Euphorbia* 1753 in dem ersten von Carl von Linné veröffentlichten Buch *Species Plantarum*. Der Name der Gattung geht vermutlich auf Plinius der Ältere (23-79 n. Chr.) zurück. Plinius war Student der Botanik, welcher beschreibt, dass König Juba II. von Mauretanien den geronnenen Milchsaft als Arzneimittel gegen Schlangenbisse einsetzte. Der Milchsaft stammte aus einer Pflanze des Atlas Hochgebirges und war vermutlich der Milchsaft von *Euphorbia resinifera* BERG.. Der Name *Euphorbia* leitet sich vermutlich von dem Namen des griechischen Leibarztes von König Juba II., welcher Euphorbus genannt wurde, ab [5]. Der englische Name der „spurges“ leitet sich aus dem lateinischen „expurgare“ bzw. dem englischen „purge“ oder altfranzösischen „espurgier“ ab, was soviel wie „reinigen“ bedeutet, da die Blätter als Laxans angewendet wurden.

Die Pflanzen der Unterfamilie *Euphorbioideae* führen meistens weißen, z.T. gelben Milchsaft (Abbildung 1). Andere *Euphorbiaceae* wie z.B. *Ricinus communis* L. führen keinen Milchsaft.



Abbildung 1. Ausfließender Milchsaft aus milchführenden Leitbahnen von *E. mauritanica*.

Der vielseitige Habitus von *Euphorbiaceae* reicht von einjährigen krautigen Pflanzen über Sukkulente bis hin zu Bäumen. Die sukkulent wachsenden *Euphorbiaceae* entstammen in der Vielzahl der Unterfamilie *Euphorbioideae* [3]. Diese Pflanzen kommen in vielen Teilen der Welt, wie z.B. im tropischen und subtropischen Afrika, auf den Kanarischen Inseln, Indien, Madagaskar, Europa und Amerika vor (Abbildung 2) [3]. Die Blüten der Gattung *Euphorbia* bilden ein Cyathium, welches aus einem langgestielten, dreikarpelligen Fruchtknoten besteht. Das Cyathium weist oft eine weibliche und mehrere männliche Blüten auf. Die männlichen Blüten stehen in Achseln aus einer Hülle und fünf Hochblättern. Die weibliche Blüte bildet den Fruchtknoten mit dreiteiliger Narbe. In der Regel sind *Euphorbiaceae* monözisch, wobei auch diözische Arten zu finden sind. Die meisten *Euphorbiaceae* weisen wechselständige Blätter und Stipel auf. Als Fruchtform kommen in der Regel Spaltfrüchte vor [1].

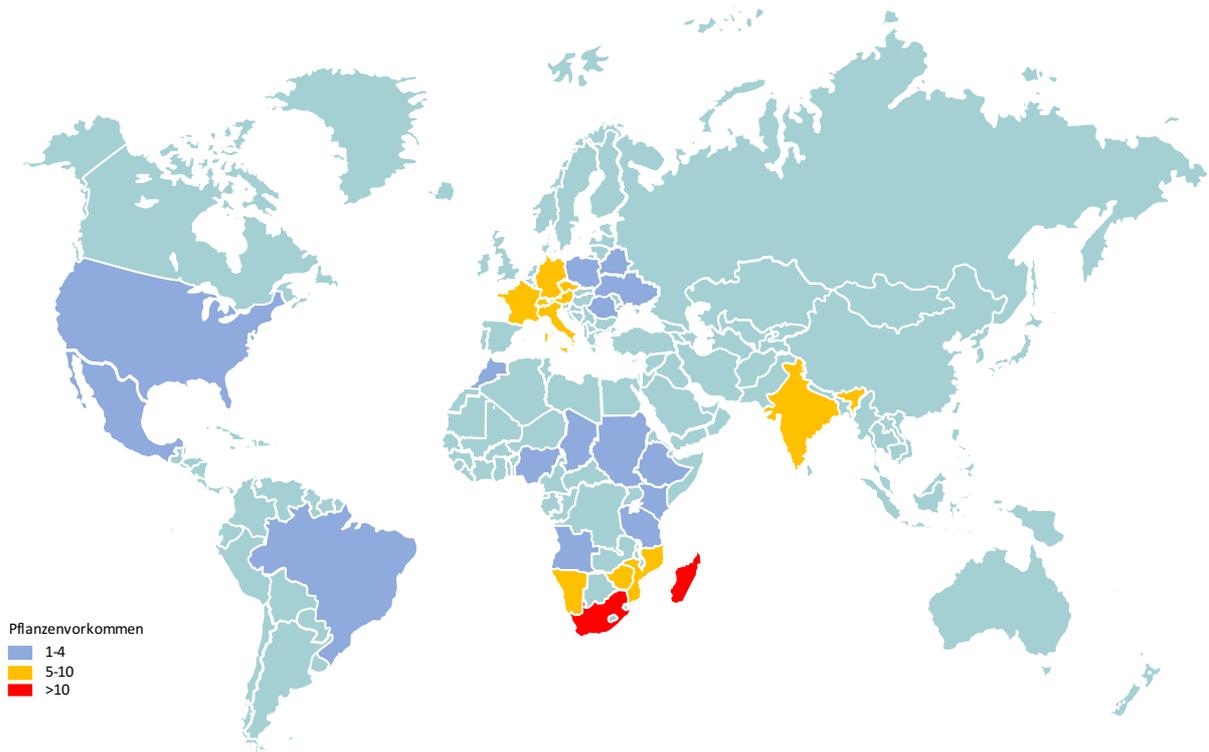


Abbildung 2. Pflanzenvorkommen der Euphorbiaceen, Gattung *Euphorbia*, des Botanischen Gartens der FU-Berlin

Im Januar 2013 wurde das *Euphorbiaceae*-basierte Arzneimittel Picato[®] von Leo Pharma GmbH zur Behandlung der aktinischen Keratose mit dem zytotoxischen Wirkstoff Ingenolmebutat, einem Diterpen aus *Euphorbia peplus* L., zugelassen [6].

In der Homöopathie werden *Euphorbiaceae*-basierte Präparate wie z.B. Euphorbia-N-Oligoplex[®], Euphorbium comp. SN Tropfen[®] (Biologische Heilmittel Heel GmbH, Potenz: D3) oder Euphorbium comp. Nasentropfen SN[®] (Biologische Heilmittel Heel GmbH, Potenz: D4) zur Behandlung von Ekzemen, Entzündungen der Nasennebenhöhlen oder Erkältung eingesetzt.

1.1.1 *Euphorbia mauritanica*

Euphorbia mauritanica (Synonyme: Bleistift Milchbusch, *yellow milk bush*, *golden pencil milkbush* (Eng.); *geelmelkbos*, *beesmelkbos*, *gifmelkbos*, *kaalmelkbos*, *kleinmelkbos* (Afrikaans)) aus der Familie der *Euphorbiaceae* ist ein immergrüner, dicht verzweigter sukkulenter Strauch mit dünnen, zylindrisch glatten „bleistiftdünnen“ Sprossachsen, an deren Enden gelbe Cyathien sich befinden. Die jungen Sprossachsen weisen wechselständige silbergraue kleine Blätter auf. Typischerweise weist die Pflanze eine Höhe von ca. 1,5 m auf (Abbildung 3). Heimisch ist die Pflanze in trockenen Klimazonen, vor allem in Südafrika und Namibia, wo sie eine der am meisten verbreiteten sukkulenten Pflanzen ist. Die Blütezeit liegt im südafrikanischen Frühjahr zwischen August und Oktober. Alle Pflanzenteile sind bei Verschlucken giftig. Der Milchsaft kann Reizungen der Haut und Augen hervorrufen. Der Arname bezieht sich auf den Namen des Stammes der Mauren, ein Nordafrikanisches Volk in Mauretanien [7].



Abbildung 3. *Euphorbia mauritanica* Juss. [8]

1.2 Latices

Pflanzen der *Euphorbiaceae* – speziell der Gattung *Euphorbia* – führen in ihren Milchröhren Milchsaft, den sogenannten Latex. Der Milchsaft ist eine viskose Emulsion bzw. Suspension, die typischerweise weiß, aber auch z.B. gelb wie in *Chelidonium majus* L. gefärbt sein kann. Latex ist weit verbreitet und wird in ungefähr 40 Pflanzenfamilien, unter anderem in den Familien der *Papavaraceae* JUSS., *Asteraceae* BERCHT & PRESL oder *Apocyanaceae* JUSS., akkumuliert [9]. Als Inhaltsstoffe der Latices treten sowohl Proteine wie Proteasen, Lysozym und Chitinasen, als auch Diterpene, Zucker, Alkaloide oder Polyterpene auf [10-12]. Einer der giftigsten Milchsäfte aus der Familie der *Euphorbiaceae* beinhaltet der Manchinellabaum, *Hippomane mancinella* L. Regen lässt aus den Früchten den Latex austreten, welcher extrem reizend ist und bei Augenkontakt zu Blindheit führen kann. Der Verzehr der Früchte kann tödlich sein, weshalb der spanische Name auch „*Manzanilla de la muerte*“ („Äpfelchen des Todes“) lautet [13-15].

In der traditionellen Heilkunde wird Milchsaft vielseitig angewendet. So wurde vor ca. 300 Jahren der Milchsaft von *Euphorbia balsamifera* AITON und *Euphorbia canariensis* L. auf Gran Canaria als Hilfsmittel zum Fang von Fischen durch die Guanchen eingesetzt. Bei dieser Fischfangtechnik wurden Fische durch Peitschenschläge mit Zweigen auf das Wasser des Tümpels zwischen Meer und Strand getrieben und mit der toxischen Milchsaftmischung betäubt, sodass die Fische anschließend mit der Hand gefangen werden konnten. Bei der bis heute alljährlich am 11. September stattfindenden „Fiesta del Charco“ wird dieser alten Fischfangtechnik gedacht. Heutzutage werden die Fische immer noch mit der Hand oder dem Netz, jedoch ohne Einsatz des Milchsafts, gefangen[16].

In Namibia wurde der Milchsaft von *Euphorbia damarana* L.C.LEACH als Gift zur Jagd von Tieren wie Giraffen, Springböcken oder schwarzen Nashörnern genutzt. Dazu wurden die Tiere zuerst mit Pfeilen verwundet und anschließend der Milchsaft in die Wunde injiziert. Starke Entzündungsreaktionen und neurologische Ausfälle führten dann zum Tod. Todesfälle von Menschen werden lokal von Einheimischen berichtet [17].

1.3 Entzündungen

Unter einer Entzündung versteht man die lokale und systemische Reaktion eines biologischen Systems auf einen inneren oder äußeren Reiz, der die physiologischen Abläufe gefährdet. Das Ziel der Entzündung ist es, den schädigenden Reiz zu beseitigen und die Voraussetzungen für Reparaturvorgänge zu schaffen. Die Entzündung ist damit Ausdruck der Immunreaktion eines Organismus [18]. Unterschiedliche Reize wie Infektionen, Verletzungen des Gewebes oder Fehlfunktion und Stress des Gewebes (z.B. durch die Sonne) führen zur Auslösung von Entzündungsreaktionen, welche die Bekämpfung der Ursachen physiologisch unterstützt (Abbildung 4). Eine kontrollierte Entzündungsantwort ist pathophysiologisch dann von Nutzen, solange sie reguliert auftritt. Eine übermäßige Immunantwort (z.B. anaphylaktischer Schock) kann für den Organismus schädlich sein [19].

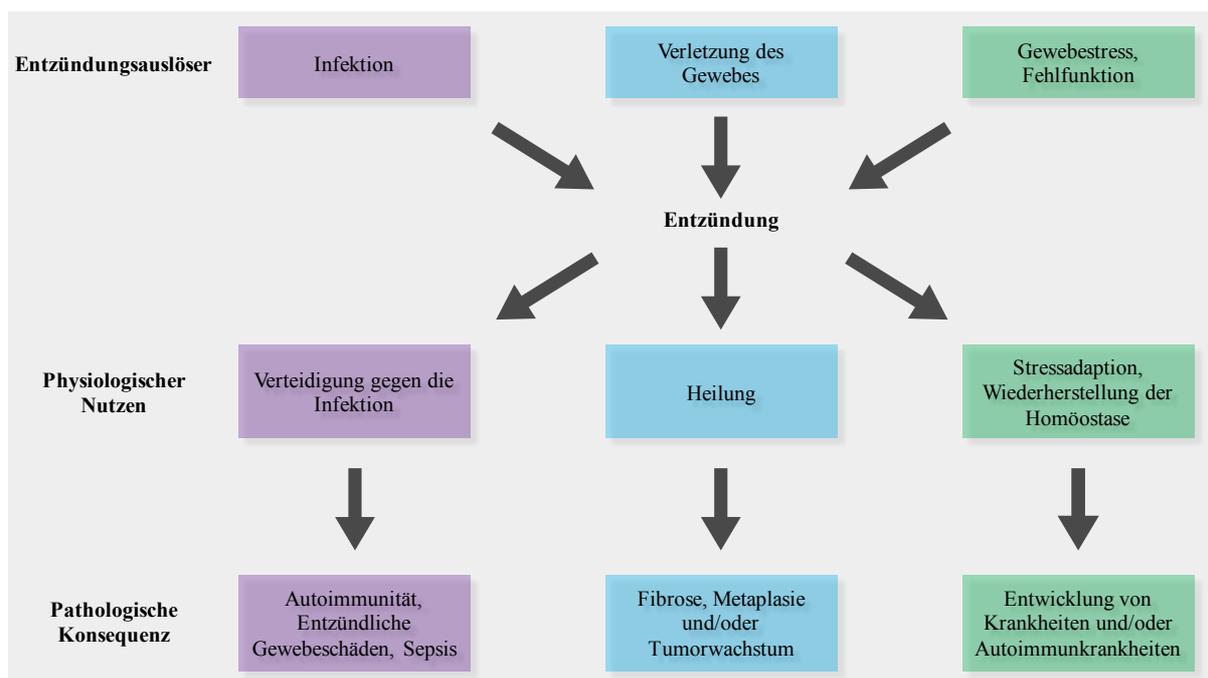


Abbildung 4. Ursachen, physiologische und pathologische Folgen der Entzündung [19].

Das Ziel einer akuten Entzündung, welche durch Infektionen oder Verletzung des Gewebes auftritt, ist die Regelung einer koordinierten Rekrutierung von z.B. Plasma, Leukozyten, Mastzellen, Makrophagen auf die Seite der Infektion bzw. Wunde, was am Beispiel von Infektionen mit Bakterien durch das angeborene Immunsystem, sowie *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) und NOD (*nucleotide-binding oligomerization-domain protein*)-like Rezeptoren realisiert wird [20]. Mastzellen und im Gewebe gebundene Makrophagen produzieren im weiteren Verlauf u.a. Chemokine und Cytokine. Die wichtigste und unmittelbarste Wirkung dieser Mediatoren besteht darin, eine entzündliche Kaskade lokal auszulösen: Plasmaproteine und Leukozyten (hauptsächlich Neutrophile), die normalerweise auf die Blutgefäße beschränkt sind, erhalten nun Zugang durch die postkapillaren Venolen zu den extravaskulären Geweben, wo die Infektion bzw. Verletzung lokalisiert ist [21]. Der Zustand eines Gewebes ist entscheidend für die immunologische Antwort des Organismus. Er beeinflusst die Art und Weise der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase oder der adaptiven Reaktion, die von in Geweben gebundene Makrophagen und Leukozyten ausgelöst wird. Gestresste Gewebe oder Gewebe mit Fehlfunktion unterliegen einer para-Entzündung. Para-Entzündungen sind Stoffwechselforgänge, die dem basalen physiologischen Zustand ähnlich sind, aber auch an der Grenze in einen Entzündungszustand agieren. Es wird vermutet, dass dysregulierte para-Entzündungen für chronische Entzündungszustände wie Typ-2-Diabetes und Atherosklerose verantwortlich sein könnten [19]. Abhängig von der Art und Weise der Schädigung des Organismus werden von unterschiedlichen Zellen sowohl autokrin, als auch parakrin und endokrin Cytokine und Chemokine sekretiert, die im weiteren pro- oder anti-inflammatorisch auf das Immunsystem einwirken (Tabelle 1).

Tabelle 1. Übersicht wichtiger Cytokine adaptiert nach Turner et al. [22].

	Cytokin	Hauptproduzent	Zielzellen	Hauptfunktion	
Interleukin	IL-1	Makrophagen, B-Zellen, DCs	B-Zellen, NK-Zellen, T-Zellen	Pyretisch, Proliferation und Diff., Knochenmarks Zellproliferation	Pro-inflammatorisch
	IL-2	T-Zellen	Aktivierte T- und B-Zellen, NK-Zellen	Proliferation und Aktivierung	Adaptive Immunität
	IL-3	T-Zellen, NK-Zellen	Stammzellen	Proliferation und Diff. von hämatopoetischen Vorläufern	Adaptive Immunität
	IL-4	TH-Zellen	B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen	Proliferation von B- und zytotoxischen T-Zellen verstärkt die MHC-Klasse-II-Expression, stimuliert die IgG- und IgE-Produktion	Adaptive Immunität
	IL-5	TH-Zellen	Eosinophile, B-Zellen	Proliferation und Reifung, stimuliert IgA und IgM Produktion	Adaptive Immunität
	IL-6	TH-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten	Aktivierte B-Zellen, Plasmazellen	Diff. in Plasmazellen, IgG-Produktion	Pro-inflammatorisch
	IL-7	KM-Stromazellen	Stammzellen	B- und T-Zell Wachstumsfaktor	
	IL-8	Makrophagen	Neutrophile	Chemotaxis	Pro-inflammatorisch
	IL-9	T-Zellen	T-Zellen	Wachstum und Proliferation	
	IL-10	T-Zellen	B-Zellen, Makrophagen	Hemmt die Cytokinproduktion und die mononukleäre Zellfunktion	Anti-inflammatorisch
	IL-11	KM-Stromazellen	B-Zellen	Diff. induziert Akute-Phase-Proteine	
	IL-12	T-Zellen	NK-Zellen	Aktiviert NK-Zellen	Anti-inflammatorisch
Tumor Nekrose Faktor	TNF α	Makrophagen	Makrophagen	Phagozyten-Aktivierung, endotoxischer Schock	Pro-inflammatorisch
		Monozyten	Tumorzellen	Tumor Zytotoxizität, Kachexie	
	TNF β	T-Zellen	Phagozyten, Tumorzellen	Chemotaktisch, Phagozytose, onkostatisch, induziert Cytokine	
Interferone	INF α	Leukozyten	Diverse	Antiviral	Pro-inflammatorisch
	INF β	Fibroblasten	Diverse	Antiviral, Antiproliferativ	Pro-inflammatorisch
	INF γ	T-Zellen	Diverse	Antiviral, Makrophagen-Aktivierung, erhöht die Neutrophilen- und Monozyten-Funktion, MHC-I und -II-Expression auf Zellen	Pro-inflammatorisch

NK: natürliche Killer-; KM: Knochenmark; Diff.: Differenzierung; TH: T-Helfer-

1.4 Die Haut

Als größtes Organ des Körpers umfasst die Haut einen Anteil von ca. 15% des gesamten Körpergewichtes und dient als primäre Verteidigungsstruktur des Körpers vor der Umwelt. Die Haut ist widerstandsfähig und somit in der Lage, den physikalischen und chemischen Traumata des Alltags zu widerstehen. Sie muss schädliche Mikroorganismen abwehren, gegen Infektionen schützen und den Körper vor Austrocknung schützen [23]. Die Verteidigungsfunktion der Haut basiert in erster Linie auf der Hornschicht (*Stratum Corneum*) und ihrer Wechselwirkungen mit den unterliegenden Hautschichten darunter [24]. Grundlegend ist die Haut in drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis aufgeteilt (Abbildung 5) [25, 26].

1.4.1 Epidermis

Die äußerste Hautschicht ist die Epidermis, die wiederum in fünf weitere Schichten unterteilt wird. Abhängig vom Körperareal hat die Epidermis eine Dicke von 0,04 mm (Augenlid) bis 5 mm (Fußsohlen). Die Hornschicht (*Stratum Corneum*) bildet die äußere Barriere der Haut zur Umwelt und besteht in Abhängigkeit des Körperareals aus ca. 20 Zellschichten abgestorbener Hornzellen. Direkt unter der Hornschicht befindet sich die dünne Glanzschicht (*Stratum Lucidum*), gefolgt von der Körnerzellenschicht (*Stratum Granulosum*). In dieser Schicht beginnt die Keratinisierung, wobei Keratinozyten zu Keratin und epidermalen Lipiden abgebaut werden. In der Stachelzellschicht (*Stratum Spinosum*) startet die Umwandlung der Keratinozyten. Durch die zunehmende Entfernung der Keratinozyten zur Basalmembran verändert sich ihre Morphologie und die Zellkerne werden pyknotisch. Im *Stratum Spinosum* sind zudem Langerhans-Zellen des lymphatischen Systems lokalisiert. Die Basalschicht (*Stratum Basale*) besteht aus Keratinozyten, Melanozyten und Merkel-Zellen. In dieser Schicht findet die Zellteilung statt, bevor die Zellen zur Keratinisierung in höhere Hautschichten gelangen [23, 25].

1.4.2 Dermis

Unter der Epidermis liegt die Dermis, welche eine dicke, elastische Schicht bildet. Sie dient der Versorgung der Haut mit Nährstoffen und repariert durch Fibroblasten und Mastzellen in der Haut entstandene Schäden. Zusätzlich zu protektiven und Versorgungsaufgaben beinhaltet die Dermis Haarfollikel, Lymphgefäße und sensorische Rezeptoren [27].

1.4.3 Subkutis

Als Subkutis bezeichnet man die Gewebsschicht, welche unter der Dermis lokalisiert ist. Sie ist aus Fett- und Bindegewebe aufgebaut, in der Blutgefäße und Nervenfasern verlaufen. Ihre Aufgabe ist die Regulierung des Wärmehaushalts durch Isolierung und Versorgung der Hautschichten mit Sauerstoff. Zudem dient die Subkutis als Fettspeicher, sowie als Verschiebeschicht zwischen Dermis und den untergelagerten Faszien.

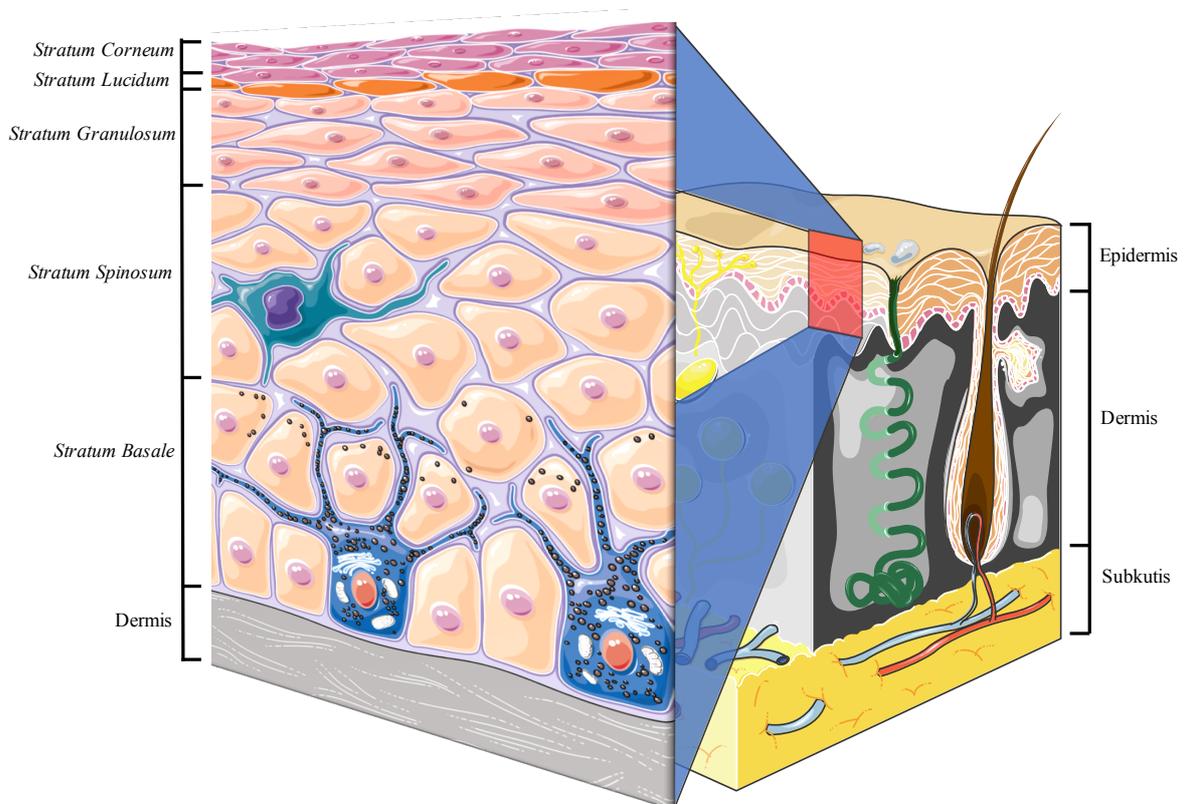


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Haut

Schematische Darstellung der Haut (rechts) mit einem schematisch vergrößerten Ausschnitt der Epidermis (links).

1.5 Proteasen

1.5.1 Proteasen allgemein

Proteasen gehören zu der Enzymklasse der Hydrolasen und sind nach der *Enzyme Commission* (EC) in Gruppe III eingeteilt. Wie alle Enzyme sind auch Proteasen, unter anderem die Endoproteasen, in verschiedene Untergruppen unterteilt. Endoproteasen werden in Serinproteasen (EC 3.4.23.-), Cysteinproteasen (EC 3.4.22.-), Aspartatproteasen (EC 3.4.23.-), Metallo-Proteasen (EC 3.4.24.-) und Threoninproteasen (EC 3.4.25.-) kategorisiert [28, 29]. Proteasen weisen als Bindungstaschen diverse verschiedene Varianten auf, wobei sich die Bindungstasche für die unterschiedlichen Substrate in acht verschiedene „*pocket-* oder *sidevallays*“ einteilen [30]. Diese *pocketvallays* definieren zugleich die Substratspezifität. Eingeteilt werden diese Taschen in S4 über S1, S1' bis S4', was in (Abbildung 7) anhand der Serinprotease Faktor Xa dargestellt ist [31]. Anhand der unterschiedlichen Bindungstaschen, lassen sich Spezifitäten für Substrate berechnen, die schematisch in (Abbildung 6) dargestellt sind. In dieser Abbildung lässt sich erkennen, ob eine Protease spezifisch oder unspezifisch mit den jeweiligen Substraten reagiert, was anhand von Akzeptanzen von verschiedenen Aminosäuren berechnet werden kann [30, 32].

Der weltweite Markt für industriell genutzte Enzyme wurde im Jahr 2013 auf ca. 3,3 Milliarden US Dollar mit einem Anstieg bis 2015 auf ca. 7 Milliarden US Dollar geschätzt. Ein Großteil dieser Enzyme sind Proteasen [33, 34]. Industriell werden Proteasen unter anderem in Waschmitteln, in der Lederindustrie, in der Nahrungsmittelindustrie und in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt [29, 35].

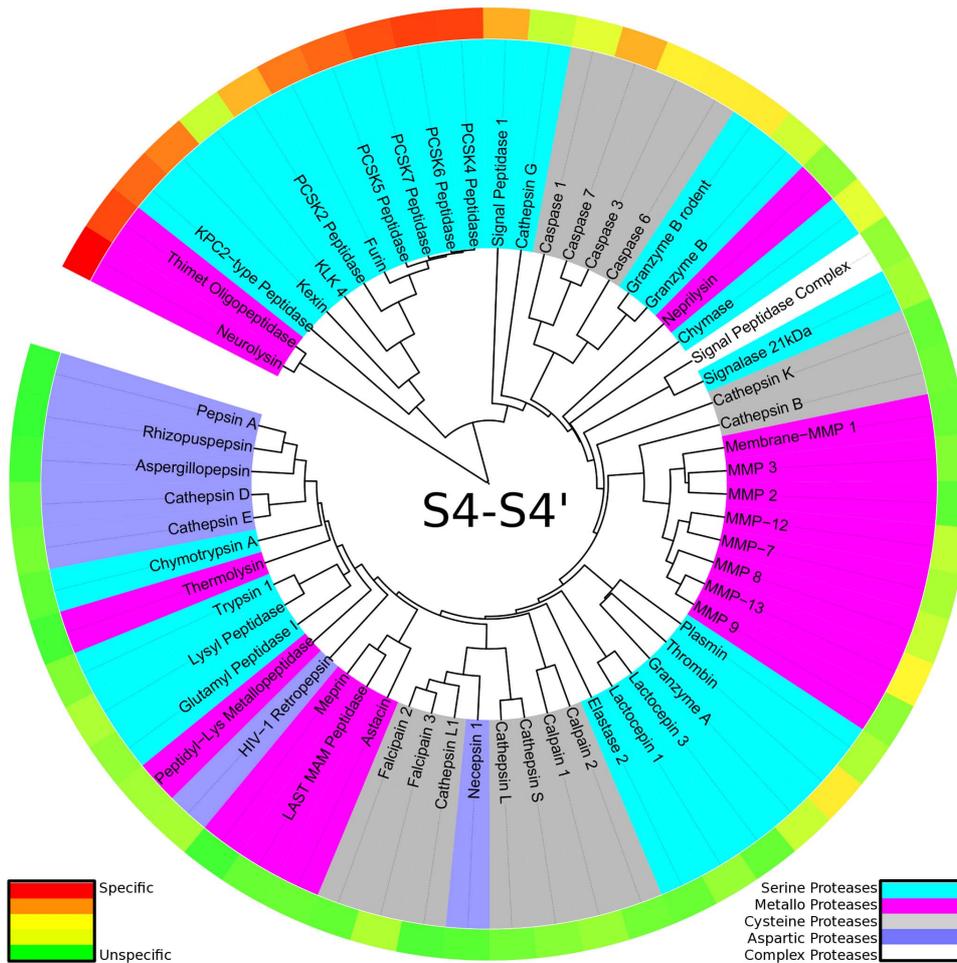


Abbildung 6. Stammbaum der Protease-Spezifität über die gesamte Bindungsregion [32].

Das Degradom, basierend auf der Substrat Ähnlichkeit über S4-S4', ist in einem Protease-Spezifität Stammbaum abgebildet. Proteasen sind farblich nach ihrer katalytischen Aktivität eingeteilt: Serinproteasen (cyan), Metalloproteasen (pink), Cysteinproteasen (grau), Aspartatproteasen (blau). Der äußere Ring zeigt die gesamten Spaltungsentropien in einem Farbspektrum von rot (spezifisch) über gelb bis grün (unspezifisch).

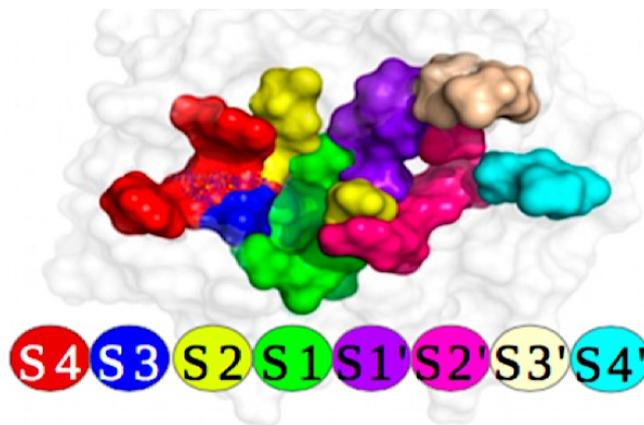


Abbildung 7. Bindungstaschendefinition von Proteasen am Beispiel von Faktor Xa [31].

1.5.2 Serinproteasen

Serinproteasen sind in unterschiedliche Clans wie z.B. Chymotrypsin (SA), Subtilisin (SB), Carboxypeptidase C (SC) und *Escherichia D-Ala-D-Ala-Peptidase A* (SE) unterteilt [29]. Die Spaltung der Peptide und Proteine geschieht im aktiven Zentrum der Enzyme, wo formal eine Peptidbindung hydrolytisch gespalten wird. Durch den –M-Effekt des Sauerstoffes in der Peptidbindung kann im ersten Schritt der Sauerstoff des deprotonierten Serins am Carbonylkohlenstoff angreifen und eine kovalente Bindung ausbilden. Das Proton des Histidins, welches zuvor vom Serin auf das Histidin übertragen wurde, kann im nächsten Schritt durch Umklappen einer Bindung zwischen dem negativ geladenen Sauerstoff und dem Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung an dem Amin binden, wodurch dieses abgespalten wird und als primäres Amin das aktive Zentrum verlässt. Der letzte Schritt dient der Reaktivierung des aktiven Zentrums. Dazu wird hydrolytisch der verbleibende Ester zwischen dem verbleibenden Rest und dem Serin gespalten. Das gespaltene Protein kann die Bindungstasche verlassen und das Serin ist regeneriert (Abbildung 8).

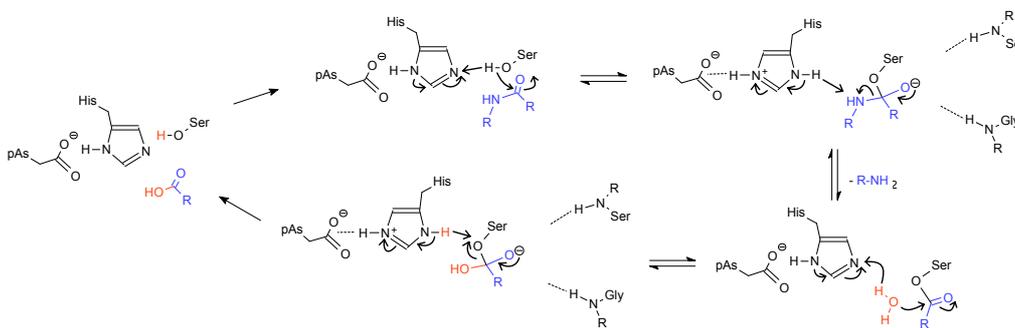


Abbildung 8. Katalytische Triade von Serinproteasen [36, 37]

In den letzten Jahren rückten Subtilisin-ähnliche Proteasen vermehrt in den Fokus der Forschung. Aktuell sind mehr als 200 subtilisin-ähnliche Proteasen bekannt. Sie sind zusammen mit chymotrypsin-ähnlichen Proteasen eine der größten Gruppe im Clan Serinproteasen [38]. Ursprünglich in Bakterien nachgewiesen, werden Subtilisin-ähnliche Proteasen auch in Pflanzen wie *Oryza sativa* L., *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH., *Curcumis melo* L. und *Solanum lycopersicum* L. beschrieben. Es wird berichtet, dass induzierter Pathogenbefall zur Expression von Subtilisin-ähnlichen Proteasen in *Lycopersicon esculentum* L. führt und es wurde gezeigt, dass diese Proteasen glykosyliert, sezerniert und in der extrazellulären Pflanzenmatrix akkumuliert werden [39-41].

1.6 Protease-aktivierte Rezeptoren

Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), gehören zu der Familie der Rhodopsin-ähnliche GPCRs (Abbildung 10) und werden in 4 Hauptgruppen (PAR1-4) unterteilt [42]. Im Gegensatz zu anderen GPCRs werden PARs hauptsächlich aufgrund von proteolytischer Spaltung des extrazellulären N-Terminus aktiviert. PARs sind in vielen Geweben wie z.B. Gehirn, Herz, Lunge, Magen, Kolon, Nieren oder Bauchspeicheldrüse, aber auch auf Zellen wie z.B. Monozyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Lymphozyten, Fibroblasten und andere exprimiert (Tabelle 2 und Tabelle 3) [42-50]. PARs wird in verschiedenen Krankheiten wie z.B. Morbus Alzheimer [46, 51], Morbus Parkinson [46], Ischämie [52-55] und Arthritis [56, 57], aber auch an physiologischen Prozessen wie z.B. Schmerzentstehung [58-61], Entzündungen [47, 62, 63] oder bei der Blutgerinnung [64-68] eine Beteiligung zugesprochen. Eine neue Behandlungsoption für die sekundäre Prophylaxe von Myokardinfarkten und peripherer arterieller Verschlusskrankheit stellt der PAR1 Antagonist Vorapaxar dar. Der Arzneistoff wurde im Jahr 2014 von der Food and Drug Administration (FDA) für diese Indikationsgebiete zugelassen. Vorapaxar hemmt PAR1 auf den Thrombozyten und führt dadurch zu Hemmung der Thrombozyten Aggregation. Vorapaxar hat somit keinen Einfluss auf die Spaltung von Fibrin zu Fibrinogen [69, 70].

Neben aktivierenden Proteasen gibt es eine Reihe von Peptiden, welche die Fähigkeit haben, als Agonist oder Antagonist an PARs zu wirken (Tabelle 2). Die Aktivierung durch Proteasen erfolgt an der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors (Abbildung 9). Durch irreversible Spaltung am extrazellulären N-Terminus der Rezeptoren durch Proteasen entsteht ein Propeptid [71]. PAR1 wird durch proteolytische Spaltung zwischen Arginin⁴¹ und Serin⁴² aktiviert. Das extrazelluläre SFLLR-NH₂ Propeptid fungiert als neuer Ligand, welcher an der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors eine Signaltransduktion verursachen kann. Der neue Ligand interagiert mit der Bindungsstelle durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem basischen Arginin aus dem Liganden und dem sauren Glutamat von der extrazellulären Schleife [46].

PAR1 und PAR3 haben eine extrazelluläre N-terminale Hirudin-ähnliche Domäne (DKYEPF) (gelbe Sequenzbox, Abbildung 9), die die kinetische Barriere für ein Thrombin/Rezeptor-Komplex reduziert, um bei niedrigen Thrombinkonzentrationen eine Aktivierung zu ermöglichen [48]. Demselben Mechanismus der Aktivierung von PAR1 und PAR2 folgen Peptidagonisten wie SFLLR-NH₂. Es ist beschrieben, dass PAR1 Peptidagonisten in N-terminaler Position eine freie Aminogruppe, eine kleine Aminosäure (beispielsweise Serin, Alanin, Prolin) in Position 1, eine aromatische Gruppe an der Position 2 und einen basischen Rest an Position 5 benötigen. Die Aktivierung durch einfache chemische Moleküle ist auch möglich [42, 45]. Die PAR1-Aktivierung führt zu einer G_{ai}, G_{aq} und G_{a12/13} gekoppelten Signalkaskade.

Die PAR2-Aktivierung wird durch eine Spaltung zwischen Arginin³⁶ und Serin³⁷ hervorgerufen. Die Rezeptoren PAR2 und PAR1 sind die einzigen, die durch Spaltung zwischen Arginin und Serin aktiviert werden.

PAR3 wird durch Spaltung zwischen Lysin³⁸ und Threonin³⁹ aktiviert und fungiert als Co-Faktor für die Aktivierung von PAR4, welcher durch Spaltung zwischen Arginine⁴⁷ und Glycin⁴⁸ aktiviert wird [72]. Nakanishi-Matsui et al. zeigen, dass PAR3 in Mäusen keine Funktion, bei Abwesenheit anderer PARs, haben [73]. Proteasen können abseits der Aktivierungssequenz durch irreversible Spaltung den Rezeptor inaktivieren (Abbildung 9).

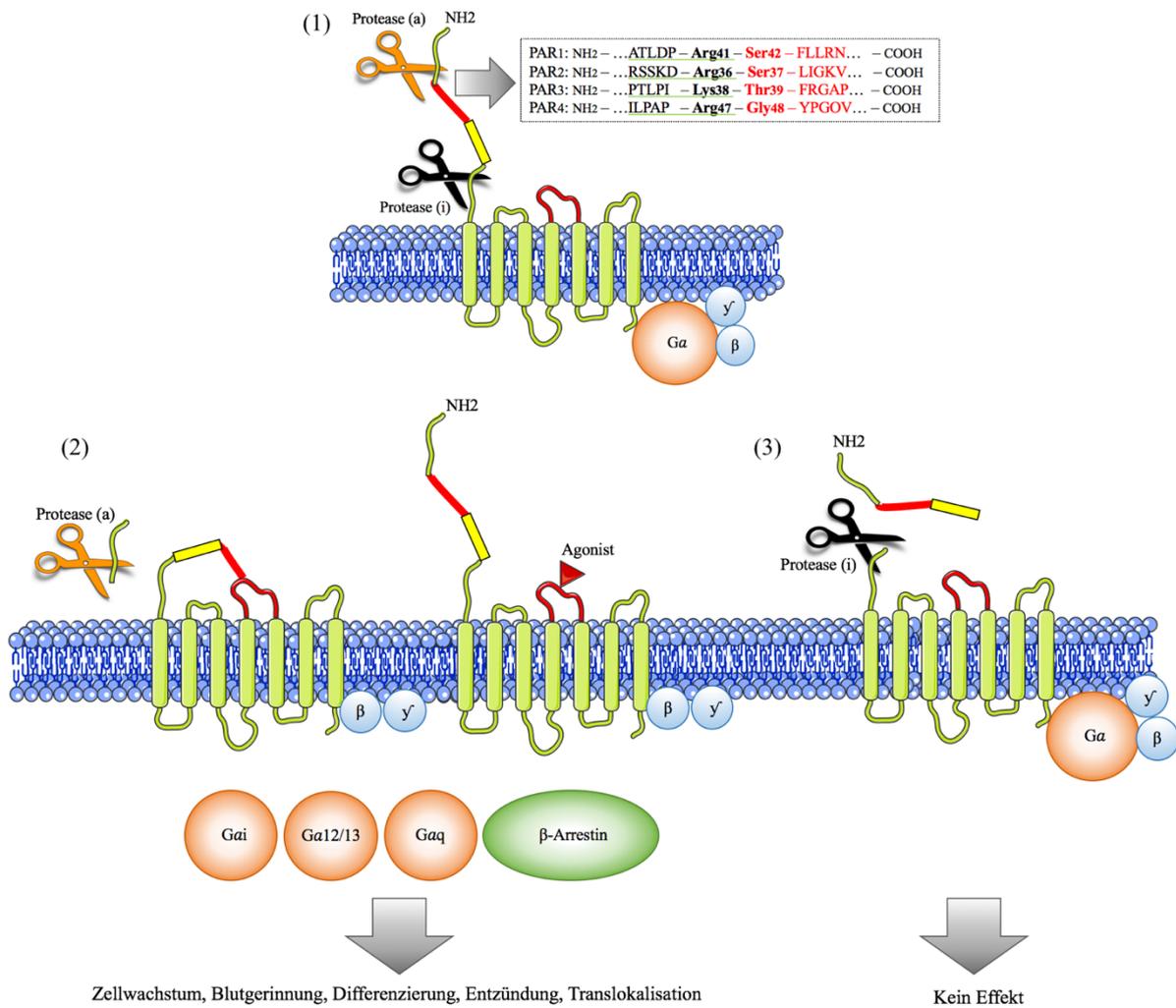


Abbildung 9. Schematische Darstellung der Aktivierung von Protease aktivierten Rezeptoren

Die abgewandelte Abbildung von Günther und Melzig [42, 48, 74] zeigt die Aktivierung von Protease aktivierten Rezeptoren (PAR)1-4 von aktivierenden Proteasen(a), chemischen Agonisten, sowie die Inaktivierung von PARs durch inaktivierende Proteasen(i). Die Position zur Spaltung und somit zur Aktivierung der PARs ist im extrazellulären N-terminus zwischen der in der Abbildung Rot und Grün markierten Position lokalisiert. Die gelbe Box stellt die Hirudin-ähnliche Bindungsstelle der PAR1 und PAR3 dar. Die Endsequenzen der Bindungsstellen sind für die jeweiligen Rezeptoren in der markierten Box dargestellt Die Aktivierung ist in (2), die Desaktivierung in (3) dargestellt.

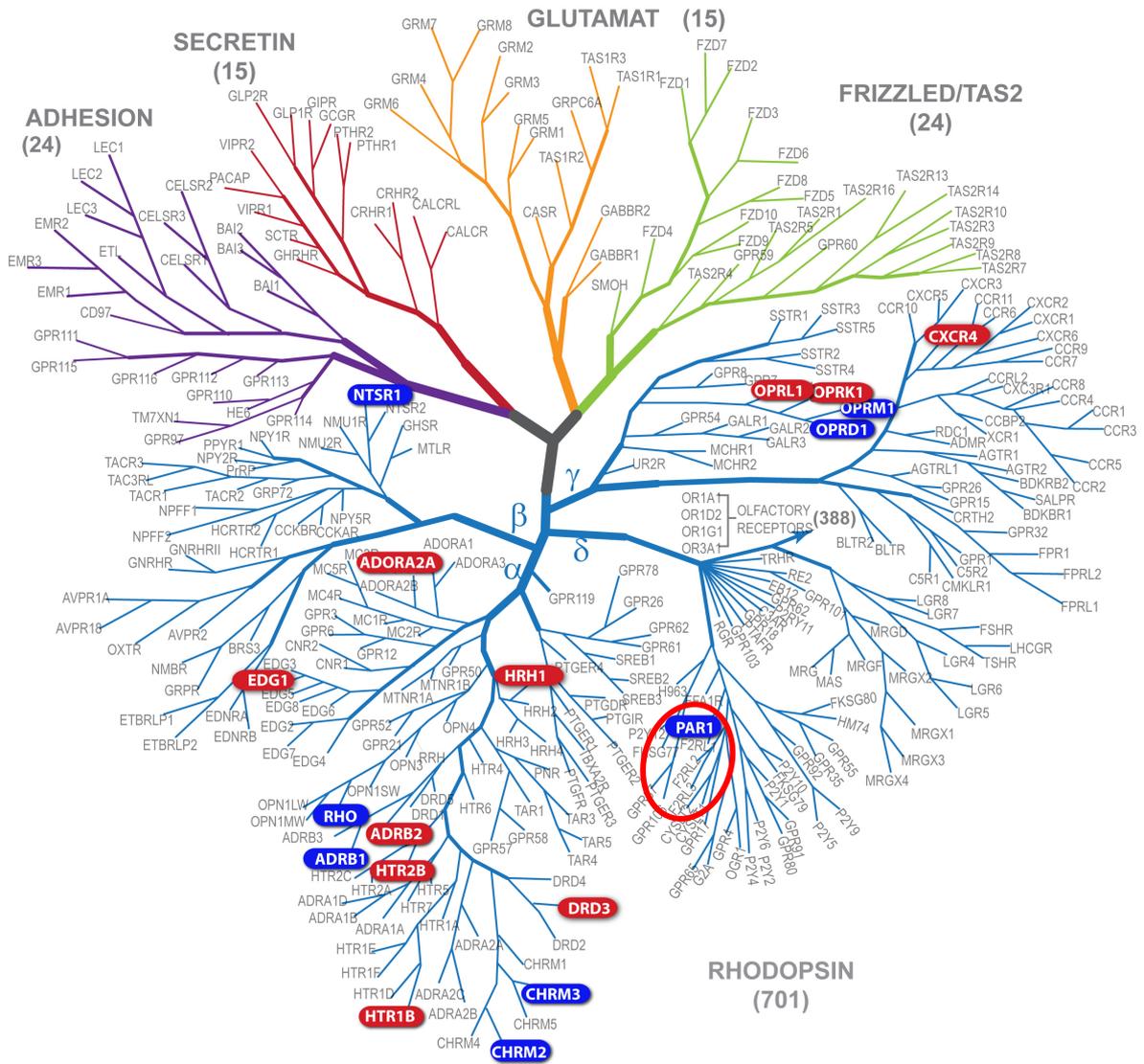


Abbildung 10. Stammbaum der G-Protein gekoppelten Rezeptoren nach University of Southern California – The Scripps Research Institute [75].

In der Abbildung sind die PARs mit den Abkürzungen F2RL1 (entspricht PAR1 und PAR2), F2RL2 (entspricht PAR3) und F2RL3 (entspricht PAR4) mit einem roten Kreis markiert.

EINLEITUNG

Tabelle 2. Übersicht Protease-aktivierter Rezeptoren [42, 43, 45, 46, 48, 50, 65, 76].

	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
Aminosäureanzahl (Mensch)	425	397	374	385
Gewebe	Gehirn, Lunge, Magen, Kolon, Niere, Hoden	Prostata, Dünndarm, Kolon, Leber, Niere, Pankreas, Trachea	Herz, Nieren, Pankreas, Thymus, Dünndarm, Magen, Lymphknoten, Trachea	Lunge, Pankreas, Schilddrüse, Plazenta, Lymphknoten, Nebenniere, Prostata, Uterus, Kolon
Zellen	Thrombozyten, Endothelzellen, glatte vesikuläre Muskelzellen, Leukozyten, GI-Endothel, Fibroblasten, Neuronen, Mastzellen, Kertinozyten	Endothelzellen, Leukozyten, GI- und Lungenendothel, Atem- und vesikuläre glatte Muskelzellen, Neuronen, Mastzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, renale tubular Zellen, Darmepithel	Atem- und vesikuläre glatte Muskelzellen, Thrombozyten, Astrozytom Zellen, Megakaryozyten	Thrombozyten, Megakaryozyten, Skelettmuskulatur
aktivierende Proteasen	Thrombin, APC, Meziorthrombin, Granzyme A, Plasmin, Trypsin IV, Tryptase, APC-EPCR, Factor Xa/VIIa, Kallikrein _{1/4/5/6/14} , MMP-1, Cathepsin G, Proatherocytin, Pen C 13, Gingipains	Trypsin, Mastzell-Tryptase, Proteinase-3, Factor Xa/ VIIa, Acrosien, Matriptase/MT-SP1, HAT, Trypsin IV, Granzyme A, TMPRSS2, Chitinase, P22, Kallikrein _{2/4/5/6/14} , Der P1/ P2/P3/P9	Thrombin	Thrombin, Trypsin, Cathepsin G, Trypsin IV, MASP-1, Plasmin, Faktor Xa/VIIa, Kallikrein _{1/14} , Gingipains
Peptid Agonisten	SFLLR-NH ₂ TFLLR-NH ₂ TRag TFRIFD	SFLLR-NH ₂ SLIGKV-NH ₂ SLIGRL-NH ₂ Trans-cinnamoyl-LIGRLO-NH ₂		GYPGQV-NH ₂ GFPGKP-NH ₂ GYPGKF-NH ₂ AYPGKF-NH ₂
desaktivierende Proteasen	Kallikrein _{1/14} , ADAM17, MMP, Protease 3, Trypsin, Cathepsin G, Elastase, Plasmin	Plasmin, Protease 3, Calpain, Cathepsin G, Elastase, Chymase	Cathepsin G	Kallikrein ₁₄
Hirudin-like domaine	Ja	Nein	Ja	Nein

APC, aktiviertes Protein C; GI, gastrointestinal; HAT, *human airway* trypsin-like Protease; MASP, Mannan-binding lectine Serinprotease; MMP, Metalloprotease; PAR, Protease aktivierter Rezeptor.

Tabelle 3. Übersicht von *in vivo* und *in vitro* Studien von Protease-aktivierter Rezeptoren und deren Effekt

Gewebe	Zelltyp	Effekt	Versuchsmodell	Quelle
PAR1				
Blut	Thrombozyten	Aggregation ↑	<i>in vitro</i> Mensch (Zellkultur (z))	[64, 77]
Zellen	Atemwegsepithel	IL-6, IL-8, PGE ₂ ↑	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[78]
	Fibroblasten	IL-8, ERK 1/2 ↑	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[79]
Gallenblase		Kontraktion ↑	<i>in vitro</i> Mensch, Meerschwein (Gewebe (g))	[80]
Knochengewebe	Osteoblasten	Proliferation ↑	<i>in vitro</i> Mensch, Ratte (z)	[79, 81]
Magen	Glatte Muskelzellen	Relaxation/Kontraktion	<i>in vitro</i> Maus, Meerschwein (z)	[82]
Uterus		Kontraktion ↑	<i>in vitro</i> Mensch (g)	[83]
PAR2				
Atemwegs- und Lungenparenchym	Fibroblasten	Fibroblasten-proliferation ↑	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[84]
	Atemwegsepithel	IL-6, IL-8, PGE ₂ ↑ Ca ²⁺ ↑ Prostanoid Freisetzung ↑ Lungenentzündung ↑	<i>in vitro</i> Mensch, Maus; (z) <i>in vivo</i> Maus	[62, 78, 85] [82, 86]
	Bronchialringe	Kontraktion ↑	<i>in vitro</i> Mensch (g)	[87]
		Lungenentzündung ↑	<i>in vivo</i> Maus	[88]
Kardiovaskuläres System	Vaskuläres Endothel	Vasodilatation	<i>in vivo</i> Ratte, Maus	[89, 90]
Zellen	Krebszellen (Brust, Lunge und Kolon)	Migration & Differenzierung ↓	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[91]
	Synoviale Mastzellen	Aktivierung ↑	<i>in vivo</i> Maus	[47]
Gallenblase		Kontraktion ↑	<i>in vitro</i> Mensch, Meerschwein (g)	[80]
Herz	Kardiomyozyten	pro-fibrotisches Chemokin MCP-1 ↑ hypertrophes Wachstum ↑	<i>in vivo</i> Maus	[92]
Nervensystem	Gliazellen	Formyl-peptid receptor-2 ↑ astrozytische IL-4 Expression ↓	<i>in vitro</i> Mensch (g)	[51]
Speicheldrüsen		Schleimsekretion ↑	<i>in vivo</i> Ratte	[93]
Haut	Keratinozyten	IL-8, MMP-2 ↑, Nrf2 ↑ NQO-1 ↑ Cathelicidin ↑	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[94-96]
Magen	Glatte Muskelzellen	Relaxation/Kontraktion	<i>in vitro</i> Maus, Meerschwein (g)	[97]
	Kolonepithel	Apoptose ↓	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[50]
Vagina	Epithel	ADAM10 ↑ → Barriere Funktion ↓	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[98]
PAR3				
Niere	HEK-293	ERK1/2 Phosphorylierung → IL-8 ↑	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[76]
Lunge	Epithel	IL-8 ↑	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[76]
PAR4				
Blut	Thrombozyten	Aggregation ↑, Ca ²⁺ ↑	<i>in vitro</i> Mensch (z); <i>in vivo</i> Maus	[66, 77, 99, 100]
Lunge	Atemwegsepithel	IL-6, IL-8, PGE ₂ ↑	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[78, 101]
		Tumor suppressiv in Lungenadenokarzinom	<i>in vitro</i> Mensch (z)	[102]
Nervensystem	Neuronen	Calcium Mobilisierung ↓ → nociceptive Schwelle ↑	<i>in vitro</i> Ratte (z)	[58]
Uterus	Myometrium	Antagonismus: schwach uterusrelaxierend	<i>in vitro</i> Mensch (g)	[83]

1.7 Diterpene

Diterpene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe aus der Gruppe der Terpene. Synthetisiert werden sie aus 4 Isopreneinheiten, welche durch Enzyme zu zyklischen Verbindungen zusammengesetzt werden [103]. Diterpene weisen in der Regel 20 Kohlenstoffatome auf, zu welchen unter anderem die pflanzlichen Phytohormone Gibberelline zählen [104-106].

Diterpene aus *Euphorbiaceae* sind wegen ihrer vielfältigen biologischen Aktivität, besonders ihrer antitumoralen, zytotoxischen, antiviralen und antiinflammatorischen Eigenschaften Gegenstand der Forschung [107, 108]. Diterpene aus *Euphorbiaceae* weisen eine hohe Strukturdiversität mit einer Vielzahl verschiedener Grundgerüste auf (Abbildung 12), welche mit aliphatischen und aromatischen Säuren verestert sein können [11, 109]. Es konnte gezeigt werden, dass Diterpene vom Tiglian-, Ingenan- und Daphan-Typ an Proteinkinase C (PKC) binden können und dadurch proinflammatorisch, apoptotisch, zelldifferenzierend und dadurch in der Folge auch hautreizend wirken [110]. Als endogene Cofaktoren für die PKC dienen Diacylglycerol (DAG) und Calcium, welche einen Einfluss auf das Zellwachstum, die Zellteilung und die Signaltransduktion haben [11, 111, 112]. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) wird durch Phospholipase C (PLC), welche zuvor durch G_a gekoppelte GPCRs aktiviert wird, in DAG und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) gespalten. IP₃ bewirkt am endoplasmatischen Retikulum eine Freisetzung von Calcium, DAG aktiviert die PKC direkt (Abbildung 11) [113].

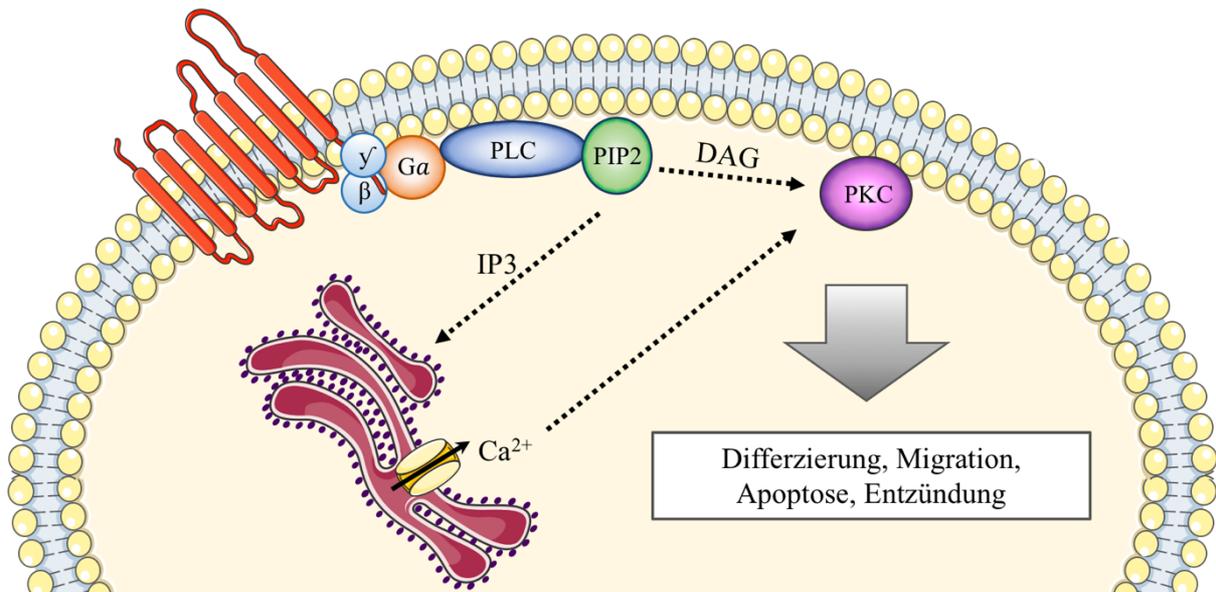


Abbildung 11. Aktivierungskaskade der Protein-Kinase C (PKC)

Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) wird durch Phospholipase C (PLC), welche zuvor durch Gα gekoppelte GPCRs aktiviert wird, in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) gespalten. IP3 bewirkt am endoplasmatischen Retikulum eine Freisetzung von Calcium; DAG aktiviert die PKC direkt.

Von großem Interesse ist das Diterpen Ingenolmebutat, welches Bestandteil des Arzneimittels Picato[®] ist. Picato[®] wird als Gel gegen aktinische Keratose eingesetzt [6]. In der klinischen Forschung befindet sich unter anderem das Diterpen Prostatin, welches ein Aktivator der latenten HIV1 Reservoirs ist. Dieser soll die Neuinfektion von CD4⁺ Zellen über Proteinkinase C abhängige NF κB Aktivierung vermeiden [114]. Weitere biologische Wirkungen von Diterpenen sind unter anderem wundheilende, antiproliferative, antivirale, antitumorale und antipyretisch-analgetische Aktivität [115-117].

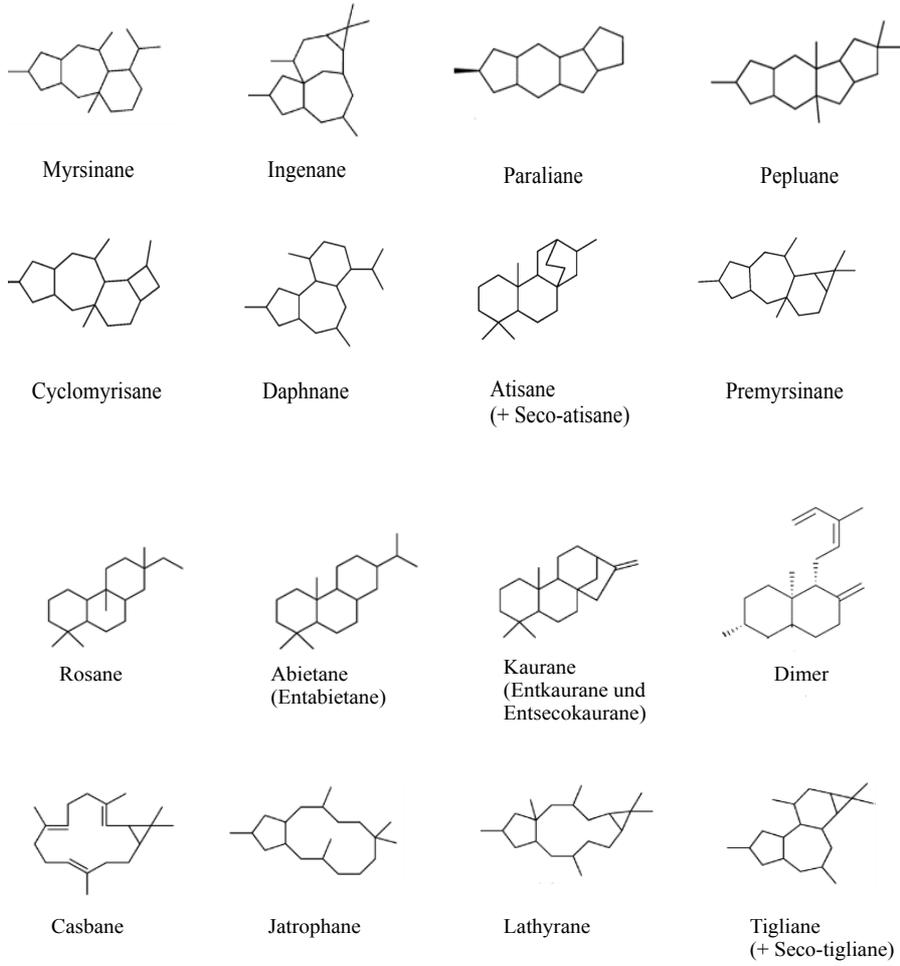


Abbildung 12. Aufbau verschiedener Grundstrukturen von Diterpenen

1.8 Zielstellung

Immer wieder kommt es zu entzündlichen Hautreaktionen nach dem Kontakt mit Milchsäften aus *Euphorbiaceae*. Da die Ursache der starken Reaktionen auf die Milchsäfte bisher nicht geklärt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit der Milchsaft von *Euphorbia mauritanica* L. (*Euphorbiaceae*) auf seine immunmodulierenden Wirkung an humanen Hautzellen untersucht werden.

Dazu sollte zunächst eine passende Methode entwickelt werden, um Daten über die immunmodulierende Wirkung des Milchsaftes von *E. mauritanica* zu erhalten.

Ferner sollte untersucht werden, ob es einen gemeinsamen Effekt in der Entzündungsmediation zwischen der Protease Mauritanicain und Diterpenen gibt. Dazu sollte an Keratinozyten und primären humanen Fibroblasten der Einfluss von Mauritanicain und Diterpenen getestet werden.

In der vorliegenden Dissertation sollte zudem genetischen Informationen sowie die Aminosäuresequenz von Mauritanicain entschlüsselt werden. Daraus folgend sollte ein *in-silico* Homologiemodell von Mauritanicain erstellt werden, um eine Visualisierung der Proteinstruktur zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Geräte

Tabelle 4. *Verwendete allgemeine Geräte*

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage BP211 D	Sartorius AG, Göttingen
Biologische Sicherheitswerkbank Klasse II, HERAsafe®	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
CO ₂ -Inkubator Mini Galaxy	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
D-7000 HPLC-System-Manager	Merck, Darmstadt
Einkanalpipetten (2-20 µL, 20-200 µL; 100-1000 µL; 500-5000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
HPLC PUMP 64	Knauer, Berlin
HPLC Pumpe L-6000	Merck Hitachi, Tokyo, Japan
Mikroplattenleser Tecan Infinte® 200	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
PCR <i>Thermocycler</i> TProfessional <i>Basic</i>	Biometra GmbH, Göttingen
pH-Meter 766	Knick, Berlin
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reinstwassersystem Laborstar UVZ	Siemens Water Technologie, Barsbüttel
Sartorius CO224S-OCE (Analysenwaage)	Sartorius AG, Göttingen
Sartorius portable (Präzisionswaage)	Sartorius AG, Göttingen
Sicherheitswerkbank Tecnoflow	Integra Bioscience, Fernwald
Tischmikroskop Wilovert S	Helmut Hund, Wetzlar
Ultraflex II TOF/TOF - MS/MS	Bruker Daltonic, Bremen
Ultraschallbad Sonorex TK 52	Bandelin electronic, Berlin
Vortex Genie-2	Scientific Industries, New York, USA
UV-VIS L-4250 Detektor	Merck Hitachi, Tokyo, Japan
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5. Verwendete allgemeine Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
AcroSep™ DEAE Ceramic HyperD F	Pall Corporation, Ann Arbor, USA
Cell culture inserts	Becton Dickinson, San Diego, USA
Cellstar Serological Pipette (5 mL, 10 mL, 25 mL, steril)	B. Braun Meslungen AG, Melsungen
Discovery BIO GFC (30 cm x 4.6 mm, 5 µm, 150 Å)	SUPELCO, Bellefonte, USA
Einfrierröhrchen Cryo's™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmal-Injektions-Kanülen Sterican® (0,8 x 120 mm 21G x 4 ¼)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
FP 30/0.2 CA Filter	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
GEloader Tips 0,5-20 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Hämacytometer-Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Mikrotiterplatten (96 Well, F-Boden, Immunoplatte MaxiSorp™)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Mikrotiterplatten (96 Well, F-Boden, schwarz)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Mikrotiterplatten Rotilabo® (96 Well, F-Boden, farblos)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Multi Safe Tubes (1,5 mL)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen epT.I.P.S. (2-200 µL; 50-1000 µL; 100-5000 µL)	Eppendorf AG, Hamburg
PP-Rundboden Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Protein LoBind Tubes (0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße Rotilabo®-PCR (0,2 mL)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
RNase AWAY®	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µL, steril, Celluloseacetat)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Vivaspin 500 Polyethersulfon 50.000 MWCO	Satorius Stedim, Göttingen
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² mit Filter, steril)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 6. *Verwendete Chemikalien*

Bezeichnung	Hersteller
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonsäure)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Furoyl-LIGRLO-Amid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Log DNA <i>Ladder</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Albumin <i>from bovine serum</i>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform	VWR Prolab, Leuven
Coomassie Brilliant Blue-G-250	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diethylpyrocarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>DNA Electrophoresis Sample Loading Dye (6x)</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol	VWR Prolab, Leuven
Ethidiumbromidlösung (0,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	VWR Prolab, Leuven
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Laemmli Proben Puffer (4x)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Methanol	VWR Prolab, Leuven
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PAR-2 Antikörper (SAM11): sc-13504	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
PBS-Puffer w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
Peptid Standard II	Bruker Daltonic, Bremen
Phorbol 12-myristat-13-acetat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Plant RNA Isolation Aid</i>	Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA
Protein-Größenmarker Roth®-Mark Standard	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Resolving Gel Buffer</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RNA <i>loading dye (2x)</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

Salzsäure 37 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
SDS-PAGE Protein <i>Standards, broad range</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SDS Lösung 10% (m/v)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Silver Reagent Concentrate</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Silver Stain Developer</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Silver Stain Oxidizer</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sodiumdodecylsulfat	VWR Prolab, Leuven
<i>Stacking Gel Buffer</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Subtilisin A	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TAE-Puffer (50x)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trifluoressigsäure	Acros Organics, Geel, Belgien
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt
TRIzol™ Reagent	Life Technologies™, Eugene, USA
Trypsin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.3.1 Zellkultur

Tabelle 7. *Verwendete Chemikalien für die Zellkultur*

Bezeichnung	Hersteller
DMEM-Flüssigmedium ohne Phenolrot (3,7 g/L NaHCO ₃ , 4,6 g/L D-Glucose)	Biochrom AG, Berlin
FBS Superior	Biochrom AG, Berlin
Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX(TM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS) (10X), liquid	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Human Epidermal Wachstumsfactor	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hydrocortison	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Keratinocyten Basal Medium	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
KGM SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
L-Alanyl-L-Glutamin Lösung (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
PBS-Puffer w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL /10,000 µg/mL)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
PureCol, Bovine Collagen, 3 mg/mL	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf
TrypLE™ Express Enzyme, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA

2.1.3.2 Kits

Tabelle 8. *Verwendete Kits*

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay - Pierce® Protein Research Products	Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA
BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit	Becton Dickinson, San Diego, USA
BD OptEIA™ Set Human IL-8	Becton Dickinson, San Diego, USA
EnzCheck® Protease Assay Kit, <i>green fluorescence</i>	Invitrogen™, Darmstadt
FirstChoice® RLM-RACE Kit	Invitrogen™, Darmstadt
FluoReporter® Blue <i>Fluorometric dsDNA Quantitation Kit</i>	Life Technologies™, Eugene, USA
In-Gel Tryptic Digestion Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Maxima H Minus <i>First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Phusion <i>High-Fidelity</i> PCR Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
PNGase A inkl. Pufferlösungen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RNAqueous® <i>Phenol-free total RNA Isolation</i>	Invitrogen™, Darmstadt
<i>Silver Stain Kit</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zymoclean™ <i>Gel DNA Recovery Kit</i>	Zymo Research Corporation, Freiburg

2.1.3.3 Primer

Tabelle 9. Verwendete Primer für die PCR

Gen-Name (Abk.)	Orientierung	Oligo Sequenz [5' nach 3']	Tm	Länge [bp]
Human-PAR2	Sense	CTGCATCTGTCCTCACTGGA	64,7°C	20
Human-PAR2	Antisense	ACAGAGAGGAGGTCAGCCAA	64,5°C	20
Mauritanicain (<i>Mau_1</i>)	Sense	TGGCCNGAYGGNGAYTAYGG	64,1°C	20
Mauritanicain (<i>Mau_2</i>)	Antisense	GCNGGRCTCCARTTNGGRTG	70,5°C	20
Mauritanicain (<i>Mau_3</i>)	Sense	CGGATTCACCAGCAGCTCCT	59,7°C	20
Mauritanicain (<i>Mau_4</i>)	Antisense	GACGCTGTATGAGTGCCGTG	63,0°C	20
Mauritanicain (<i>Mau_5</i>)	Antisense	ACGATAGAACGCTTTCGCGC	60,0°C	20
3'RACE Adapter	Antisense	GCGAGCACAGAATTAATACGACT ACTATAGGT ₍₁₂₎ VN	61,5°C	46
3'RACE outer Primer	Antisense	GCGAGCACAGAATTAATACGACT	55,1°C	23
5'RACE Adapter	Sense	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACU GCGUUUGCUGGCUUUGAUGAAA	68,4°C	45
5'RACE outer Primer	Sense	GCGAGCACAGAATTAATACGACT	55,1°C	23
5'RACE inner Primer	Sense	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGC TGGCTTTGATG	68,8°C	35

Die Herstellung der Primer, sofern nicht aus einem Kit verwendet, erfolgte durch die Firma Metabion International AG, Planegg.

2.1.4 Software

Tabelle 10. Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
BioTools, Version 3.2	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Desmond 5.1	Schrödinger, LLC, New York, USA
FCAP Array TM Software Version 3.0	Becton Dickinson, San Diego, USA
FlexAnalysis, Version 2.4	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
i-control 1.6	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
MacPyMOL: PyMOL v1.7.4.5 Edu Enhanced	Copyright © Schrödinger LLC
MOE 2015.10	Chemical Computing Group, Montreal, Canada
4peaks, Version 1.8, OSX 10.13.3	Online Software
Sequence Editor, Version 3.2	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
UCSF Chimera, Candidate Version 1.13.1	University of California, USA
Abbildungen: Servier medical Art	Les Laboratoires Servier, Suresnes Cedex, Frankreich

2.1.5 Verwendete Zellen

2.1.5.1 HaCaT-Keratinocyten

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten HaCaT-Keratinocyten wurden von dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Weindl, Institut für Pharmazie der Freien Universität, Königin-Luise Str. 2 +4, 14195 Berlin zur Verfügung gestellt. Die Abkürzung HaCaT steht für „*Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes*“. Bei der Zelllinie handelt es sich um eine permanente, epitheliale humane Zelllinie von Keratinocyten, die als phänotypisch spontan transformiert gelten [118]. Sie entstammt der Peripherie eines primären malignen Melanoms der oberen Rückenhaut eines 62 jährigen, männlichen Patienten und wurde von Fusenig und Boukamp generiert [119, 120]. Die HaCaT-Zellen wurden mit „Wachstumsmedium HaCaT“ (Tabelle 11) in 75 cm² Kultivierungsflaschen kultiviert. Nach dem Aussäen der Zellen wurde nach 24 Stunden und in der Folge alle 48 Stunden ein Wechsel des Mediums durchgeführt. Die Versuche wurden zwischen den Passagen 43 und 120 durchgeführt.

2.1.5.2 Primäre Fibroblasten

Primäre humane dermale Fibroblasten wurden von dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Weindl am Institut für Pharmazie der Freien Universität, Königin-Luise Str. 2 +4, 14195 Berlin aus juvenilen Vorhäuten isoliert und zur weiteren Untersuchung zur Verfügung gestellt. Das Gewebematerial für die Isolierung der primären Fibroblasten stammte aus der Charité Berlin. Der Antrag EA4/091/10 zum Forschungsvorhaben „Verwendung von Humanhaut zu Forschungszwecken“ wurde am 06.07.2010 von der Ethikkommission der Charité Berlin positiv bewertet. Alle Patientenproben wurden nach einer schriftlichen Einverständniserklärung erhalten. Für die Versuche wurden ausschließlich anonymisierte Proben verwendet.

Nach Auftauen der Passage 2 wurde diese zunächst mit „Wachstumsmedium primäre humane dermale Fibroblasten“ (Tabelle 11) in einer 75 cm² Kultivierungsflasche kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Mediums, so dass die Fibroblasten nach 96 h eine Konfluenz von ca. 90% besaßen. Alle Versuche wurden in Passage 3 durchgeführt.

Tabelle 11. *Verwendete Medien in der Zellkultur*

Bezeichnung	Zusammensetzung
Wachstumsmedium HaCaT	DMEM-Flüssigmedium (3,7 g/L Natriumhydrogencarbonat, 4,6 g/L D-Glucose) + 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin Lösung + 10 % FBS Superior
Serumfreies Basalmedium HaCaT	DMEM-Flüssigmedium (3,7 g/L Natriumhydrogencarbonat, 4,6 g/L D-Glucose) + 2 mM L-Alanyl-L-Glutamin Lösung
Wachstumsmedium primäre humane dermale Fibroblasten	DMEM-Flüssigmedium (3,7 g/L Natriumhydrogencarbonat, 4,6 g/L D-Glucose) + 10 % FBS Superior + 5 mM L-Alanyl-L-Glutamin Lösung + 1% Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL / 10.000 g/mL)
Serumfreies Basalmedium primäre humane dermale Fibroblasten	DMEM-Flüssigmedium (3,7 g/L Natriumhydrogencarbonat, 4,6 g/L D-Glucose) + 5 mM L-Alanyl-L-Glutamin Lösung + 1% Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL / 10.000 g/mL)

2.2 Methoden

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden mit doppel-demineralisiertem steril filtriertem Wasser (Reinstwassersystem Laborstar UVZ, 0,2 μm Sterilfilter, 25°C, 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$) durchgeführt.

2.2.1 Probengewinnung

Die Milchsftproben wurden aus den Pflanzen von *Euphorbia mauritanica* L. (Akzessionsnummer: 282-19-80-10) des Botanischen Gartens Berlin, Königin-Luise-Str. 6, 14195 Berlin, Deutschland, entnommen. Die Pflanzen wurden vom Personal des botanischen Gartens bestimmt und identifiziert.

Zur Entnahme der Latices wurden die Pflanzen mit einem Skalpell am Stamm, der Sprossachse, der Blattspreite oder an anderen geeigneten Stellen leicht angeritzt (Abbildung 13). Der ausfließende Milchsft wurde tropfenweise in 1,5 mL Eppendorf Protein-LoBind Reaktionsgefäße und in Abhängigkeit des Versuches in jeweils 1 mL *phosphate buffered saline* (PBS), 10 mM Phosphatpuffer oder 95 % (v/v) Methanol in Eppendorf LoBind® Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die gesammelten Proben wurden nach der Entnahme umgehend auf Eis gekühlt, um proteolytische Zersetzungsreaktionen durch enthaltene Proteasen zu verhindern.



Abbildung 13. Sammlung des austretenden Milchsftes nach Anritzen von *E. mauritanica*.

2.2.2 Proteinanalytik

2.2.2.1 Acetonfällung

Für die Acetonfällung wurde der Milchsaft wie in 2.2.1 in PBS gesammelt und anschließend 60 min. bei 4°C und 18.000 * g zentrifugiert. Der Überstand wurde im nächsten Schritt mit 20fachem Überschuss gekühltem Aceton (-20°C) vermischt und über Nacht bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C und 18.000 * g für 30 min. zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Rückstand wurde mit derselben Menge von auf -20°C gekühltem Aceton gewaschen und bei 4°C und 18.000* g für 30 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, der Rückstand bei Raumtemperatur getrocknet. Der erhaltene Rückstand wurde in PBS gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Proteinquantifizierung

In der folgenden Arbeit wurde für die Proteinbestimmung die Bicinchoninsäure-Methode (BCA) genutzt. Bei der BCA Methode handelt es sich um eine Kombination der Biuretreaktion und der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ im alkalischen Milieu durch die in den Proteinen enthaltenen Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin (Abbildung 14). Das Cu^+ kann dann mit der Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden. Die Absorption wurde nach Beendigung der Reaktion bei 540 nm gemessen [121-123].

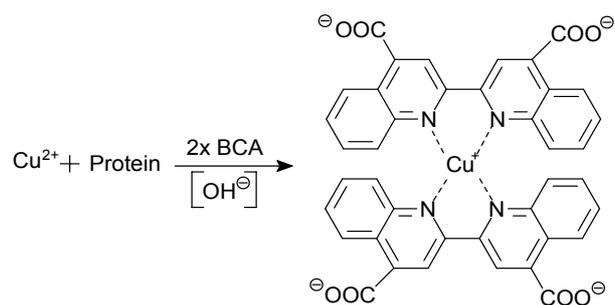


Abbildung 14. Bildung des BCA-Kupfer-Komplexes [121].

Tabelle 12. Verwendete Lösungen für die BCA-Proteinbestimmung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
BCA Reagenz A	Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid
BCA Reagenz B	4 % Kupfersulfat

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Pierce® BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Die Bestimmung wurde nach Herstellerinformationen durchgeführt. Tabelle 12 zeigt die verwendeten Reagenzien. Zur Proteinbestimmung wurden die Proben vor der Quantifizierung bei 4°C und 18.626 * g für 60 min. zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand 1:1 mit PBS verdünnt. Um einen individuellen Korrekturwert zu erhalten, wurden 25 µL Probe mit 200 µL PBS vermessen, um Effekte einer Trübung und Färbung durch Restbestandteile vom Latex zu detektieren. Die Messwerte wurden anschließend um den Korrekturwert korrigiert. Zur Referenz wurde *bovines Serum Albumin* (BSA) in einer Konzentration 2 mg*mL⁻¹ gelöst und bis zu einer Konzentration von 5 µg*mL⁻¹ verdünnt (Tabelle 13). Die Kalibriergerade folgte einer polynomischen Funktion zweiten Grades.

Nach der Präparation der Platten wurden diese für 30 min. bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 540 nm vermessen [123]. Jede zu messende Lösung wurde einer Dreifachbestimmung unterzogen.

Tabelle 13. Verdünnungsreihe des BCA Assay's adaptiert nach Thermo Scientific™ [123].

Nummer	Volumen PBS [µL]	Volumen [µL] (Nr.) der BSA Lösung	BSA Konzentration [µg*mL ⁻¹]
1			2.000
2	125	300 (1)	1.500
3	325	325 (1)	1.000
4	175	175 (2)	750
5	325	375 (3)	500
6	700	100 (1)	250
7	400	400 (6)	125
8	450	300 (7)	50
9	400	400 (8)	25
10	400	100 (9)	5
11	400		0 = Blindwert

2.2.2.3 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine Methode zur Aufreinigung von geladenen Molekülen in Lösungen, in diesem Fall von Proteinen. Das Prinzip beruht darauf, dass Ionen umso stärker an dem Ionenaustauscher binden, je kleiner ihr Radius und je höher ihre Ladung ist. Negative Proteine binden an die positiv geladene Säulenmatrix und werden dann durch Erhöhung eines NaCl Gradienten von der Matrix abgelöst und eluiert, da Cl⁻ eine höhere Bindungsaffinität zur Säulenmatrix als die Proteine hat. In der vorliegenden Arbeit wurde ein schwacher Anionenaustauscher mit einer stationären Phase aus Diethylaminoethyl-Keramik, einer Ionenaustauschkapazität von > 85mg/ml³, einer durchschnittlichen Porengröße von 50 μm und einem Arbeitsbereich zwischen pH 2-12 (AcroSep™ DEAE Ceramic HyperD F) eingesetzt. Zunächst wurde die Ionenaustauschsäule mit ausreichend Phosphatpuffer (10 mM) gespült, um die Säule zu aktivieren. Nach Auftragen der stark verdünnten Proteinprobe (1:5) wurden mit einer Durchflussrate von 1 mL/min. 15 Fraktionen je Gradient mit einem Volumen von jeweils 1,5 mL gesammelt (Tabelle 14).

Tabelle 14. Verwendete Pufferlösungen für die Ionenaustauschchromatographie.

Fraktion	Konzentration NaCl [in mol/L] in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0
0-15	0
16-30	0,05
31-45	0,1
46-60	0,15
61-75	0,2
76-90	0,4
91-105	1

2.2.2.4 Bestimmung der Proteaseaktivität

Zur Bestimmung der allgemeinen Proteaseaktivität wurde das EnzCheck® Protease Assay Kit genutzt. Die Bestimmung beruht auf dem Mechanismus, dass der Fluoreszenzfarbstoff BODIPY-FL (4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-S-indacen-3-propionsäure) an Casein gebunden ist. Vor der Umsetzung mit einer Protease liegt im Substrat eine Fluoreszenzlöschung vor. Nach Spaltung des Caseins mit der Protease wird die Fluoreszenz freigesetzt (Abbildung 15) [124].

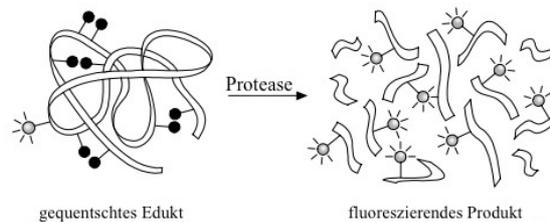


Abbildung 15. Schematisches Prinzip des EnzCheck® Protease Assay Kit [125].

Die Reagenzien wurden wie in der Herstelleranweisung hergestellt und 50 μL der zu untersuchende Probe mit 50 μL Reagenzlösung in einer schwarzen Mikrotiterplatte versetzt. Unter Lichtausschluss wurde die Probe dann 30 min. bei 37°C inkubiert und anschließend im Mikroplattenleser mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm vermessen. Alle Messungen wurden dreifach bestimmt, als Negativkontrolle diente das jeweilige Lösungsmittel ohne Probe.

Tabelle 15. Verwendete Lösungen zur Bestimmung der Proteaseaktivität.

Bezeichnung	Zusammensetzung
EnzCheck Protease Komponente A	Casein, BODIPY® FL Konjugat
EnzCheck Protease Komponente B	200 mM Tris; pH 7,8; 2 mM Natriumazid

2.2.2.5 Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (SEC) werden Analyten nach ihrer Größe aufgetrennt. Kleine Moleküle eluieren durch die stationäre Gelmatrix langsamer als größere, da sie tiefer in die Poren gelangen und somit eine längere Strecke durch die Matrix zurücklegen. Zur Auftrennung von Mauritanicain wurde eine Säule mit einer Matrix aus kugelförmigen porösen Kieselerdepartikeln ($5\mu\text{m}$) mit einem Porendurchmesser von 150 \AA (Discovery BIO GFC (30cm x 4.6mm)) genutzt. $50\ \mu\text{L}$ Probe wurde auf die Säule aufgetragen und mit einer konstanten Flussrate (Phosphatpuffer 10 mM, pH7,0) von $0,15\ \text{mL}/\text{min}$. aufgetrennt. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $210\ \text{nm}$. Nach positiver Detektion wurden Fraktionen sofort in Eppendorf LoBind Reaktionsgefäßen aufgefangen.

2.2.2.6 Elektrophorese

2.2.2.6.1 SDS-PAGE

Die *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld und stellt somit eine effiziente elektrophoretische Trennmethode zur Auftrennung komplexer Proteingemische dar. Bei der SDS-PAGE lagert sich *sodium dodecyl sulfate* (SDS) Mizellartig an die gelösten Proteine an und kompensiert deren Ladung [126, 127]. Alle Protein-SDS-Komplexe weisen dadurch eine gleiche negative Gesamtladung auf. Durch das Reduzieren der Disulfidbrücken mit Mercaptoethanol und der Anlagerung von SDS an die Proteine kommt es zu einer Denaturierung, wodurch diese ihre biologische Funktion verlieren. Die Trennung während der Elektrophorese wird aufgrund der Unterschiede der molaren Massen der verschiedenen Proteine ermöglicht und erfolgt in Richtung der Anode. Polyacrylamid-Gele bieten den Vorteil, dass definierte Porengrößen herstellbar sind, wodurch die Trennung maßgeblich beeinflusst werden kann. Die Polymerisation erfolgt radikalisch (Abbildung 16). Die Polyacrylamidgele in der vorliegenden Arbeit hatten eine Gelkonzentration von 10% - 15%. Die Mengen von Wasser, 1,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl- Trenngelpuffer und Acrylbisacrylamid sind in dargestellt (Tabelle 17).

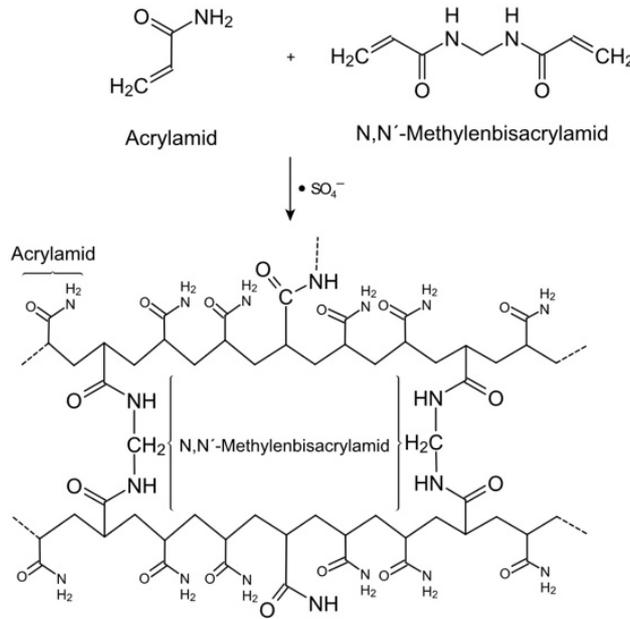


Abbildung 16. Polymerisation von Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid unter Zusatz von Ammoniumperoxidsulfat.

Tabelle 16. Verwendete Puffer in der Elektrophorese.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,9 in Wasser
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS in Wasser
Laemmli-Puffer (4x)	277.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 44.4 % (v/v) Glycerol 4.4 % N-Lauroylsarcosin, 0.02 % Bromophenol-blau
Fixierpuffer	Methanol 40 % (v/v), Essigsäure 10 % (v/v) in Wasser

Zum Start der Polymerisation wurden 50 μL TEMED-Lösung (10% (v/v)), 100 μL SDS (10% (m/v)) und 50 μL APS-Lösung (10% (m/v)) hinzugegeben. Nach dem Auspolymerisieren der Trenngelmatrix wurde die Sammelgelmatrix hergestellt. Hierzu wurden die einzelnen Bestandteile, wie in Tabelle 17 dargestellt, zusammen pipettiert. Die Elektrophorese wurde nach Laemmli durchgeführt [128].

Tabelle 17. Pipettierschema verschiedener SDS-Gel Konzentrationen.

Gel Konz. [in %]	Wasser [in mL]	Acryl-/ Bisacrylamid 30% (v/v) [in mL]	Trenngelpuffer [in mL]	SDS 10 % (v/v) [in mL]	APS 10 % (m/v) [in mL]	TEMED 10% (v/v) [in mL]
Trenngelmatrix						
10	4,10	3,30	2,50	0,10	0,05	0,05
12,5	3,29	4,17	2,50	0,10	0,05	0,05
15	2,40	5,00	2,50	0,10	0,05	0,05
Sammelgelmatrix						
5	1,45	0,425	Sammelgel- puffer [in mL] 0,625		0,025	0,025

Vor der Elektrophorese wurden die Proben 5 min. bei 95°C im Verhältnis 1:1 mit 2-Mercaptoethanol und Laemmli-Puffer erhitzt [128]. 30 µL Probe wurde in jede Geltasche aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 200 V bei ca. 8°C durchgeführt. Im Zwei-Kammer-System befanden sich Anodenpuffer und Kathodenpuffer räumlich voneinander getrennt. Fixiert wurden die Proteinbanden nach der Elektrophorese vier Stunden mit dem Fixierpuffer (Tabelle 16). Zur Größenbestimmung der detektierten Proteinbanden wurde ein Größenmarker in jedem Gel mit Proteinen unterschiedlicher Größe eingesetzt.

2.2.2.6.2 Kolloidale Coomassie Färbung

Die kolloidale Coomassie Färbung ist eine Methode zur Detektion von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen. Durchgeführt wurde die Färbung mit kolloidalem Coomassie nach V. Neuhoff et al. [129]. Hierzu wurden 80 mL Stock Solution A mit 20 mL Methanol und 2 mL Stock Solution B intensiv gemischt (Tabelle 18). Anschließend wurde das Gel in ca. 25 mL dieser Lösung 6 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel anschließend zunächst mit Wasser gewaschen und im Anschluss 1 min. mit 25 % (v/v) Methanol entfärbt.

Tabelle 18. Verwendete Lösungen für die kolloidale Coomassie Färbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Stock Solution A	10% (m/v) Ammoniumsulfat, 2% (v/v) Phosphorsäure in Wasser
Stock Solution B	5% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung in Wasser
Entfärbung	25% (v/v) Methanol in Wasser

2.2.2.6.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine Methode zur Detektion von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen. Die Silberfärbung ist 50-100fach sensitiver als die Proteinfärbung mit Coomassie Brilliantblau [130, 131]. Die Färbung erfolgte nach dem *Silver Stain* Kit Protokoll der Firma Bio-Rad [132]. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 19 dargestellt. Die einzelnen Arbeitsschritte mit Reaktionszeiten sind in der Tabelle 20 aufgelistet. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Gel in 5% Essigsäure (v/v) gelagert.

Tabelle 19. Verwendete Lösungen für die Silberfärbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Entwicklungslösung	Natriumcarbonat 2% (m/v), Paraformaldehyd in Wasser
Fixierlösung 1	Methanol 40% (v/v), Essigsäure 10% (v/v)
Fixierlösung 2	Ethanol 10% (v/v), Essigsäure 5% (v/v)
Oxidationspuffer	Kaliumdichromat, Salpetersäure in Wasser
Silberreagenz	Silbernitrat 0,1% (m/v)
Stopplösung	Essigsäure 5% (v/v)

Tabelle 20. Durchführungsprotokoll der Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen.

Arbeitsschritt	Reagenzien	Zeit
1. Fixierung	Fixierlösung 1	30 min.
	Fixierlösung 2	2 x 15 min.
2. Oxidation	Oxidationspuffer	5 min.
3. Waschen	Wasser	15 min.
4. Silberfärbung	Silberreagenz	20 min.
5. Waschen	Wasser	30 sek.
6. Entwicklung	Oxidierlösung	2 x 5 min.
7. Reaktionsstopp	Stopplösung	15 min.

2.2.2.7 Tryptischer *In-Gel* Verdau

Der tryptische *In-Gel* Verdau ist eine Methode zur Vorbereitung von Proteinen aus einem Elektrophorese-Gel für die Massenspektrometrie. Für den tryptischen Verdau wurde das *In-Gel Tryptic Digestion* Kit genutzt. Nach dem Ausschneiden der betreffenden Proteinbanden aus dem SDS-PAGE Gel mit einem Skalpell wurden die Gelstücke zunächst mit 200 μ L Waschpuffer zwei mal für 30 min. bei 37°C bis zur Entfärbung gewaschen. Anschließend werden die Disulfid-Brücken 10 min. bei 60°C mit 30 μ L Reduzierungspuffer reduziert und im Anschluss 60 min. unter Lichtausschluss mit 30 μ L Alkylierungspuffer alkyliert. Die Gelstücke werden nach 1 h zweimal für 15 min. bei 37°C mit 200 μ L Waschpuffer gewaschen, mit 50 μ L Acetonitril (ACN) für 15 min. geschrumpft, 10 min. bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit aktivierter Trypsinlösung für 12 h bei 30°C tryptisch verdaut. Zum Abstoppen der Reaktion wurde nach Entfernen der Trypsinlösung 10 μ L 1 % (v/v) Trifluoressigsäure genutzt (Tabelle 21). Die Überstände wurden vereinigt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 21. Verwendete Lösungen für den tryptischen *In-Gel* Verdau.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Alkylierungspuffer	45 mM Iodacetamid in Wasser
Reduzierungspuffer	50 mM Tris[2-carboxyethyl]phosphin (TCEP) in 25 mM Ammoniumbicarbonat
Aktivierter Trypsinlösung	10 ng modifiziertes Trypsin in 25 mM Ammoniumbicarbonat
Waschpuffer	80 mg Ammoniumcarbonat in 20 mL ACN + 20 mL Wasser

2.2.2.8 Deglykosylierung von Mauritanicin

Die Proteinglykosylierung ist eine essentielle posttranslationale Modifikation von Sekretorischen- und Membranproteinen mit Kohlenhydraten, welche in allen Eukaryoten stattfindet. Dabei können Oligosaccharide sowohl an Serin oder Threonin (O-Glykane), als auch an Asparagin (N-Glykane) stattfinden. Im Gegensatz zu Säugern und Hefen unterscheiden sich in Pflanzen die späten N-Glykan-Reifungsschritte am Golgi-Apparat signifikant. Proteine werden dort mit komplexen N-Glykanen mit β 1,2-verknüpfter Xylose-, α 1,3-verknüpfter Fucose glykosyliert [133].

Für die N-Deglykosylierung wurde die N-Glykosidase PNGase A von *New England Biolabs* genutzt. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellerprotokolls.

Abweichend zum Herstellerprotokoll wurde die Probe mit PNGase A 5h bei 37°C inkubiert (Tabelle 22). Die Proben wurden bei 4°C gelagert. Eine Einheit PNGase A (U/mL) ist definiert als die Menge an Enzym, die erforderlich ist, um mehr als 95% des 1 µg denaturiertes rekombinantes Avidin (aus Mais) in einer Stunde bei 37°C in einem Gesamtreaktionsvolumen von 10 µL zu deglykosylieren [134].

Tabelle 22. Verwendete Puffer für die Deglykosylierung von *Mauritanicin*.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Denaturierungspuffer (10x)	0,5% SDS, 40 mM DTT in Wasser
GlycoBuffer 3 (10X)	n.A.
NP-40	1% NP-40 in MilliQ-Wasser
Waschpuffer	80 mg Ammoniumcarbonat in 20 mL ACN + 20 mL Wasser

2.2.2.9 *de-novo*-Proteinsequenzierung

Die *de-novo*-Proteinsequenzierung (*de novo*: lat. von neuem) ist ein Verfahren zur Strukturaufklärung von Proteinen, ohne Informationen über Aminosäuresequenz und genetische Informationen zu besitzen. Bei der *de-novo*-Proteinsequenzierung erfolgt im ersten Schritt eine Zersetzung von Proteinen durch Trypsin in Peptidfragmente, welche dann mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen analysiert werden. Die erhaltenen Informationen über die Peptidsequenzen bilden dann die Grundlage für die Bildung unspezifischer (degenerierter) Primer, um das Protein auf genetischer Ebene zu entschlüsseln. Die Kombination aus gentechnischen und massenspektrometrischen Untersuchungen bildet für die *de-novo* Proteinsequenzierung die Grundlage der vorliegenden Arbeit.

2.2.2.9.1 MALDI-TOF-MS/MS

Die Methode der Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung – *time of flight* – Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS/MS), auch Tandem MS genannt, ist eine analytische Methode zur Charakterisierung von Peptiden und Proteinen [135, 136]. In der MALDI-TOF-MS/MS können die erhaltenen Peptidfragmente ein zweites Mal fragmentiert werden, um genauere Aufschlüsse über die Aminosäurezusammensetzung zu erhalten. Durch das erste Massenspektrometer werden die Ionen (Mutter-Ionen; Eltern-Ionen, *parent ions* oder Vorläufer-Ionen, *precursor-ions*) für die Fragmentierung isoliert. Durch Stöße mit einem Reaktandengas (Helium, Stickstoff) zerfallen sie in Fragment-Ionen (*fragment ions*; Tochter-Ionen), die dann von einem zweiten Massenspektrometer analysiert werden. Beim Fragmentieren der Peptide brechen diese an ihrer Amidbindung, es entstehen b- und y-Fragmente. Ein y-Fragment bezeichnet das Bruchstück, welches den C-Terminus besitzt und sich in einem neutralen Zustand befindet. Durch Hinzufügen von zwei Protonen erhält das Bruchstück eine positive Ladung, damit das Fragment im Massenspektrometer detektiert werden kann. Das erste y-Fragment einer Peptidsequenz trägt die Masse der jeweiligen Aminosäure inklusive der Masse von Wasser (18) und einem Proton ($m_{\text{ges}} = m_{\text{Aminosäure}} + m_{\text{H}_2\text{O}} + 1$). Fragmente, die den N-Terminus enthalten, werden als b-Fragmente bezeichnet. Das erste b-Fragment einer Peptidsequenz trägt die Masse der Aminosäure inklusive einem Proton ($m_{\text{ges}} = m_{\text{Aminosäure}} + 1$) (Abbildung 17). Aus den Differenzen der im Massenspektrum detektierten Signale lässt sich ableiten, welche Aminosäuren sich im Peptid befinden.

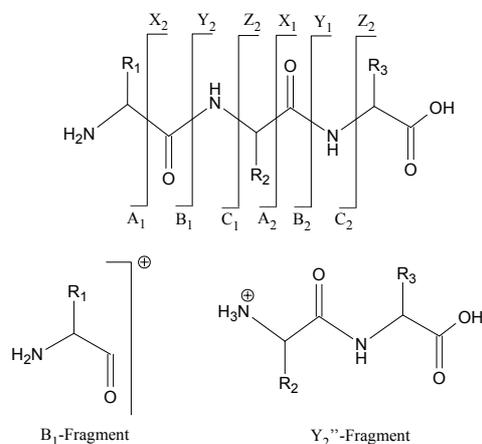


Abbildung 17. Nomenklatur für Sequenz-Ionen in der Massenspektrometrie von Peptiden nach Roepstorff und Fohlman [137].

Die Massenspektrometrie Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Weise vom Institut für Chemie und Biochemie der FU-Berlin durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Probe mit einem Festplattenlaser der Wellenlänge von 320 nm beschossen. Der Beschuss des Lasers führt zu einer schlagartigen Verdampfung der α -Cyano-4-hydroxymizinsäure und zur Ionisation der Peptide. Die entstandenen Peptide wurden in einem elektrischen Feld beschleunigt, reflektiert und gelangten zuletzt auf den Detektor, wo sie mit ihrem Aufschlag einen elektrischen Impuls auslösten. Im Detektor wurde der Quotient aus der Masse der ionisierten Peptide (m) und Ladung (z) nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) detektiert, indem sie zuvor durch ihre effektive Flugzeit in Abhängigkeit der Spannung sortiert wurden. Die Messung wurde mit einem Ultraflex-II TOF/TOF Massenspektrometer, ausgestattet mit einem Smart-beam[™]-Laser und einer Spannung von 20 kV im positiven Reflektor-Modus und einer effektiven Flugstrecke von 200 cm durchgeführt. Der Reflektor-Modus führte zu einer Verstärkung und Sensitivierung des Messsignals. Das Spektrometer wurde mit dem Peptid-Standard II kalibriert (Tabelle 23). Ausgewertet wurden die Spektren mit dem Programm FlexAnalysis (Version 2.4, Bruker Daltonik GmbH, Bremen). Zum Abgleich der erhaltenen Spektren wurden die Proteindatenbanken UniProt [138] und NCBIInr [139] genutzt. 1 μ L der Probe aus dem tryptischen Verdau (2.2.2.7) wurden mit 1 μ L gesättigter α -Cyano-4-hydroxymizinsäure-Lösung (gesättigt in Acetonitril, 0,1% TFA, 70:30, v/v) vermischt. 1 μ L Probelösung wurde per *dried-droplet*-Verfahren auf einer polierten Stahlplatte aufgetragen und analysiert. Die Spektren wurden im Massenbereich 800 – 4000 Da (MS und MS/MS) oder 3.000-100.000 Da (Massenbestimmung) im positiven Reflektormodus (RP_PepMix) aufgenommen. Jede Proteinbande wurde in zwei unabhängigen Versuchen aus der Gelmatrix ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels MALDI-TOF-MS/MS bestimmt. MS/MS-Spektren von ausgewählten tryptisch verdauten Peptiden wurden im LIFT-Modus gewonnen [140].

Tabelle 23. Peptide des Peptid-Standards II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen und deren Masse-zu-Ladungs-Verhältnis [141].

Peptid	[M+H ⁺]-m/z
Bradykinin (1-7)	757,39916
Angiotensin II	1.046,5418
Angiotensin I	1.296,7848
Substanz P	1.347,7354
Bombesin	1.619,8223
Renin-Substrat	1.758,93261
ACTH-clip (1-17)	2.093,0862
ACTH-clip (8-39)	2.465,1983
Somatostatin (28)	3.147,471

2.2.2.9.2 ISD-MALDI-TOF-MS

Eine Variante der MALDI-TOF-MS stellt die *In source decay (ISD)*-MALDI-TOF-MS dar. Voraussetzung für die ISD-MALDI-TOF-MS ist ein intaktes, isoliertes und aufgereinigtes Protein, welches in möglichst hoher Konzentration zur Verfügung steht. Diese Methode der MS basiert auf empirisch gestützten Versuchen und stellt eine Möglichkeit der Sequenzierung von C- und N-terminalen Enden eines Proteins dar. Bei dieser Methode ist es nicht vorauszusagen, ob und welcher Terminus bestimmt werden kann, da in der ISD-MALDI-TOF-MS bei jedem Protein abhängig der Disulfidbrücken und tertiären Strukturen unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden.

Zur Erzeugung der c- und (y+2) - Sequenz-Ionen wurde die Matrix 1,5-Diaminonaphthalen (1,5-DAN) verwendet (20 mg/ml 1,5-DAN in 50% Acetonitril / 0.1 % TFA). Die Proben wurden mittels *dried-droplet*-Methode aufgetragen. Die Spektren wurden im Massenbereich 800 – 4000 Da im positiven Reflektormodus (RP_PepMix) aufgenommen.

2.2.2.10 *In silico* Homologiemodell von Mauritanicain

Das Homologiemodell wurde in Zusammenarbeit mit Szymon Pach aus der Arbeitsgruppe „molekulares Wirkstoffdesign“ von Prof. Dr. G. Wolber (FU-Berlin, Abteilung für pharmazeutische Chemie) mit dem Swiss-Model Server erstellt [142]. Dazu wurde für das Homologiemodell von Mauritanicain die Subtilisin-ähnliche Protease aus der Tomate (*Solanum lycopersicum* L., *Solanaceae* Juss., pdb-Code: 3i74 [143]) und Cucumisins aus der Zuckermelone (*Cucumis melo* L., *Cucurbitaceae* Juss., pdb-Code: 3vta [41]) als Vorlage genutzt. Zur Bildung des finalen Homologiemodells wurde das Protein 3i74 genutzt.

2.2.2.11 Molekulares Dynamik Modell von Mauritanicain

In Zusammenarbeit mit Szymon Pach aus der Arbeitsgruppe „molekulares Wirkstoffdesign“ von Prof. Dr. G. Wolber (FU-Berlin, Abteilung für pharmazeutische Chemie) wurde ein molekulares Dynamik Modell von Mauritanicain angefertigt. Die Moleküldynamiksimulation wurde mit dem Programm Desmond 5.1 durchgeführt [144]. Das System wurde als isotherm-isobares *Ensemble* (NPT-*Ensemble*) aufgebaut, das Proteinwasserstoffbindungsnetzwerk wurde optimiert, eine kubische Box (Größe: 12 Å) gewählt, gefüllt mit SPC-Wasser (*Simple point-charge*) und neutralisiert durch Zugabe von Natriumionen [145]. Natriumchlorid mit einer Konzentration von 0,15 mol/L wurde zur Isotonisierung des Systems zugegeben. Die Temperatur wurde auf 300 K und der Druck auf 1,01325 bar eingestellt. Eine Equilibrierung des Systems wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Simulationen wurden unter Verwendung des OPLS-2005-Kraftfelds in dreifacher Ausführung mit periodischen Randbedingungen für 100 ns und 1000 Frames für jeden Lauf durchgeführt. Das Maestro Simulationsereignistool (Version 2017-3) wurde zur Berechnung der *root-mean-square fluctuation of atomic position* (RMSF) von C α -Atomen verwendet.

2.2.2.12 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Das *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist eine Methode zur Quantifizierung von Proteinen mittels Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. In einem Sandwich-ELISA kann durch die Bindung eines Analyten an einem in einer 96-well Platte gebundenen Fangantikörper ein weiterer mit Substrat gekoppelter Detektionsantikörper an dem Analyten binden, wodurch im letzten Schritt eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion realisiert werden kann. Die umgesetzte entstandene Farbtintensität ist proportional zur Menge an gebundenen Analyten und kann dadurch quantitativ ausgewertet werden [146].

In der vorliegenden Arbeit wurde das BD OptEIA™ Set *Human IL-8* der Firma Becton Dickinson genutzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Von jedem Analyten wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 24 aufgelistet. Abweichend zur empfohlenen Durchführung wurde für die Verdünnungsreihe serumfreies Basalmedium genutzt (Tabelle 11). Die Detektion erfolgte mittels Tecan® Mikroplattenleser bei einer Absorption von 450 nm und einer Korrektur von 570 nm vermessen [147].

Tabelle 24. Verwendete Lösungen im ELISA.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Assay Verdünnungspuffer	ProClin™-150
Coating Puffer	0,1 M Natriumcarbonat, pH 9,5
Stopp-Lösung	1 M Phosphorsäure
Substrat Reagenz A	Hydrogenperoxid (gepuffert)
Substrat Reagenz B	3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin (TMB) in organischem Lösungsmittel
Waschpuffer (20x)	ProClin™-150

2.2.2.13 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, welches ursprünglich zur Vermessung einzelner Zellen durch Hilfe einer elektrischen Spannung oder eines Lichtstrahls dient. Das *Cytometric Bead Array* (CBA) stellt ein Verfahren dar, welches es erlaubt, einen oder mehrere lösliche Analyten, in diesem Fall Cytokine bzw. Proteine, zu detektieren. Das Prinzip der Messung beim CBA mit Hilfe von Fänger-Kügelchen (*Capture Beads*) realisiert (Durchmesser: 7,5 μm). Diese Kügelchen sind mit spezifischen Bindungsantikörpern für unterschiedliche Proteine konjugiert. Für die Fluoreszenz der Kügelchen wird Allophycocyanin (APC) genutzt. Alle Cytokin-spezifischen Kügelchen haben eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität wodurch sie direkt dem jeweiligen Analyten zugeordnet werden können. Als Nachweisreagenz dienen mit Phycoerythrin (PE)-konjugierte Detektionsantikörper, welche ein Fluoreszenzsignal proportional zur gebundenen Menge des Analyten liefern [148]. Wenn die konjugierten Kügelchen mit einem Analyten reagieren, entsteht dabei ein Sandwich-Komplex (*Capture Bead – Analyt – Detektionsantikörper*). Diese Komplexe werden bei der Durchflusszytometrie einzeln vermessen und die Konzentration an gebundenen Analyten bestimmt (Abbildung 18). Durch diese Methode kann ein komplexes System mit bis zu 30 unterschiedlichen Parametern und einem geringen Probenvolumen (25-50 μL) vermessen werden [149, 150].

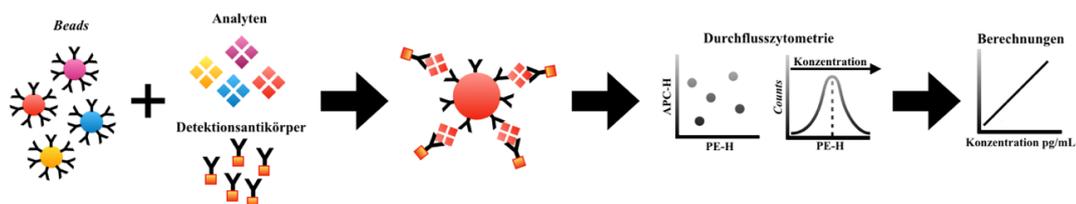


Abbildung 18. Schematische Darstellung des Cytometric Bead Array (CBA).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum Vermessen der Zellüberstände das CBA *human inflammatory cytokines* Kit der Firma Becton Dickinson genutzt. Mit diesem Kit kann IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70 und TNF α nachgewiesen werden. Die Durchführung wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt [148]. Die Verstärkung des APC-Signals betrug 100, die Verstärkung des PE-Signals 22. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ solange vermessen, bis 1800 Events detektiert wurden. Die Ergebnisse wurden mit der FCAP ArrayTM Software Version 3.0 von der Firma Becton Dickinson ausgewertet.

2.2.3 Gentechnische Untersuchungen

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus *E. mauritanica*

Zur Isolierung von RNA aus *E. mauritanica* wurde zunächst ein ca. 2 cm großes Stück Sprossachse aus frischen Seitentrieben mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Probe wurde anschließend in flüssigem Stickstoff fein gemörsert, so dass die sie zu keiner Zeit aufgetaut war. Anschließend wurden ca. 300 mg Probe in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß überführt und mit 1 mL TRIzol Reagent™ auf Eis gemischt und lysiert. Im nächsten Schritt wurden 0,2 mL Chloroform hinzugegeben, 30 sek. gemischt und 5 min. auf Eis ruhen gelassen. Im Anschluss wurde die Probe für 15 min. bei 4°C und 12.000 * g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µL 0,8 M Natriumcitrat und 1,2 M Natriumchlorid versetzt, vorsichtig vermischt und mit 250 µL 100% Isopropanol gut gemischt und 15 min. bei Raumtemperatur gelagert. Im Anschluss wurde erneut für 15 min. bei 4°C und 12.000 * g zentrifugiert. Der erhaltene Rückstand wurde zweimal mit 1 mL 75 % Ethanol (-20°C) gewaschen, der Ethanol entfernt und der Rückstand ca. 5 min. an der Luft getrocknet. Der Rückstand wurde in 10 µL DEPC Wasser gelöst und im nächsten Schritt mit dem RNAqueous® Isolation Kit aufgearbeitet [151]. Dazu wurde die erhaltene Lösung in 200 µL Lysis/Binding Puffer gelöst und im gleichen Verhältnis mit 64 % Ethanol gemischt. Die Proben wurden für 20 sek. bei 18.626 * g durch eine Filtereinheit zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die RNA, welche sich in der Filtereinheit befindet, wurde im nächsten Schritt mit 700 µL des Waschpuffers 1 gewaschen und für 20 sek. bei 18.626 * g zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen. Im Anschluss wurde noch zwei Mal mit dem Waschpuffer 2/3 gewaschen und erneut zentrifugiert. Die RNA wurde in zwei Schritten mit Elutionslösung (77°C) eluiert. Im ersten Elutionsschritt wurden zunächst 55 µL der Elutionslösung auf den Mittelpunkt der Filtereinheit gegeben und erneut für 20 sek. bei 18.626 * g zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurden 25 µL auf die Filtereinheit gegeben und für 20 sek. bei 18.626 * g zentrifugiert. Im Anschluss wurde die RNA mittels fotometrischer Quantifizierung auf Reinheit und Gehalt kontrolliert (2.2.3.3).

2.2.3.2 Isolierung von RNA aus humanen adhärennten Zellen

Für die Isolierung der RNA aus adhärennten Zellen wurde das *High Pure RNA Isolation Kit* der Firma Roche genutzt. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit 6 mL PBS gewaschen und mit 3 mL Trypsin/EDTA von der Kultivierflasche gelöst. Nach vollständigem Ablösen der Zellen von der Flaschenmatrix wurde die erhaltene Zellsuspension mit 7 mL DMEM vermischt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 10^6 Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde 5 min. bei $3.000 \times g$ zentrifugiert, der erhaltene Überstand abgenommen und verworfen. Der erhaltene Zellrückstand wurde in $200 \mu\text{L}$ PBS resuspendiert und mit $400 \mu\text{L}$ *Lysis/Binding*-Puffer versetzt. Nach 15 sek. intensivem Mischen wurde die erhaltene Lösung auf die im Kit erhaltene Filtereinheit gegeben und für 15 sek. bei $8.000 \times g$ zentrifugiert. Im Anschluss wurde die genomische DNA (gDNA) für 15 min. mittels DNase in Inkubationspuffer entfernt. Nach beendeter Reaktion wurden $500 \mu\text{L}$ Waschpuffer I auf die Filtereinheit pipettiert und erneut für 15 sek. bei $8.000 \times g$ zentrifugiert. Ein zweiter Waschschrift erfolgte mit zunächst $500 \mu\text{L}$ Waschpuffer II und Zentrifugation für 15 sek. bei $8.000 \times g$, gefolgt vom letzten Waschschrift mit $200 \mu\text{L}$ Waschpuffer II und einer Zentrifugation von 2 min. bei $13.000 \times g$. Von der Filtereinheit eluiert wurde die RNA im letzten Schritt durch Zugabe von $75 \mu\text{L}$ Elutionspuffer und einer Zentrifugation von 1 min. bei $8.000 \times g$. Die isolierte RNA befand sich im Eluat und wurde in ein $0,5 \text{ mL}$ LoBind Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3.3 Quantifizierung von RNA

RNA wurde mittels einer 1 mm Küvette durch Absorption bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm und einem Faktor von 40 bestimmt. Dabei wurde ein Absorptionsspektrum von 226 nm bis 350 nm aufgenommen. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} , sowie A_{260}/A_{230} musste für ausreichende Reinheit der RNA bei ca. 2,00 liegen.

2.2.3.4 Quantifizierung von DNA

DNA wurde mittels einer 1 mm Küvette durch Absorption bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm und einem Faktor von 50 bestimmt. Dabei wurde ein Absorptionsspektrum von 226 nm bis 350 nm aufgenommen. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} , sowie A_{260}/A_{230} muss bei sauberer DNA bei ca. 1,80 liegen.

2.2.3.5 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde das Maxima H Minus First Strand cDNA Synthese Kit genutzt. Für die Transkription wurden 0,8 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Mittels DNase wurde im ersten Schritt 2 min. bei 37°C gDNA eliminiert. Im zweiten Schritt wurde mRNA mit 100 pmol oligo (dt)₁₈Primer, 0,5 mM dNTP mix, Maxima H Minus Enzym Mix und Nuklease-freiem-Wasser in einem 20 μ L Ansatz zu cDNA umgeschrieben. Der Ansatz wurde zunächst für 30 min. bei 50°C und im Anschluss sofort für 5 min. auf 85°C erhitzt, um die Reaktion zu beenden. Die transkribierte cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine schnelle und sensitive Methode zur selektiven Amplifikation von DNA [152, 153]. Zur Vorbereitung einer PCR wird RNA aus Gewebe isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt (2.2.3.5), welche dann mittels DNA Polymerase in ihren spezifischen Abschnitten amplifiziert werden kann. Durch jeden Amplifizierungsschritt verdoppelt sich die Menge der DNA. Die drei wesentlichen Schritte einer PCR bestehen aus Denaturierung, Primerhybridisierung (*Annealing*) und Elongation [154]. Im ersten Schritt einer PCR wird die DNA bei 98°C denaturiert, um im nächsten Schritt bei primer-spezifischen Temperaturen die Primerhybridisierung durchzuführen. Im letzten Schritt der PCR findet die Elongation der offenliegenden DNA statt, welche bei 72°C erfolgt. Im Rahmen der angefertigten Doktorarbeit wurde das Phusion *High-Fidelity* DNA Polymerase Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) genutzt. Die Phusion Polymerase hat im Vergleich zur herkömmlichen *Taq* DNA Polymerase eine 50x niedrigere Fehlerrate in der Amplifikation. Ein zweiter Vorteil der Phusion Polymerase ist, dass sie sogenannte *blunt ends* produziert, welche für die weitere Sequenzierung von Vorteil sind [155].

Die eingesetzten Konzentrationen der Primer und Chemikalien richteten sich nach den Empfehlungen des Herstellers (Tabelle 25). In den folgenden Tabellen (Tabelle 26 und Tabelle 27) sind die zu den Versuchen verschiedenen PCR Protokolle aufgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 25. Zusammensetzung der 20 μ L PCR.

Komponente	Zielkonzentration
Wasser	ad 20,0 μ L
5x Phusion HF Puffer	1x
10 mM dNTPs	200 μ M pro Nukleotid
5'-Primer	0,5 μ M
3'-Primer	0,5 μ M
cDNA Probe	10%
Phusion DNA Polymerase	0,02 U/ μ L

Tabelle 26. PCR-Protokoll zur Amplifikation der cDNA von PAR2 aus humanen Zellen.

	Temperatur [in $^{\circ}$ C]	Zeit [in sek.]	Nummer der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	180	1
1. Amplifikation	98	30	5
	70	30	
	72	30	
2. Amplifikation	98	30	35
	64,5	30	
	72	30	
Finale Extension	72	300	1
	4	∞	

Tabelle 27. PCR-Protokoll zur Amplifikation der cDNA von Mauritanicain.

	Temperatur [in $^{\circ}$ C]	Zeit [in sek.]	Nummer der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Amplifikation	98	10	40
	60*	30	
	72	30	
Finale Extension	72	120	1
	4	∞	

* Die Annealing-Temperatur wurde spezifisch den unterschiedlichen Primern angepasst

2.2.3.6.1 RACE-PCR

Die *rapid amplification of cDNA-ends* (RACE)-PCR stellt eine Methode zur Strukturaufklärung des 3'- und 5'- Endes der DNA dar. Für die RACE-PCR wurde das FirstChoice® RLM-RACE Kit genutzt. Bei der 3'-RACE-PCR wird an das Poly-A Ende der mRNA während der reversen Transkription ein Adapterprimer an die cDNA verknüpft, welcher dann in der folgenden PCR mit dem spezifischen antisense 3'-RACE Adapterprimer und dem genspezifischen Primer Mau_3 amplifiziert werden kann (Tabelle 9). Die 5'-RACE-PCR wurde als *nested*-PCR (verschachtelte-PCR) durchgeführt. Bei der *nested*-PCR wird im ersten Schritt eine klassische PCR durchgeführt, deren Produkt das Edukt für eine zweite PCR bildet. Die Primer der zweiten PCR binden dann weiter innerhalb der DNA des ersten PCR-Produktes. Dadurch erhält man eine höhere Konzentration der PCR Produkte, welche dann für Analysezwecke besser zu verwenden sind. In der 5'-RACE-PCR wurde für die erste PCR Mau_4 als Primer und in der zweiten PCR Mau_5 eingesetzt (Tabelle 9). Die reverse Transkription wurde nach Herstellerinformationen durchgeführt. Für die PCR wurde das Phusion *High-Fidelity* DNA Polymerase Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) genutzt. Die 3'- und 5'-RACE-PCR wurde nach dem PCR-Protokoll zur Amplifikation der cDNA von Mauritanicin durchgeführt (Tabelle 27).

2.2.3.7 Modulierung degenerierter Primer

Als Vorlage zur Modulierung der degenerierten Primer dienten die erhaltenen Peptidsequenzen aus den MALDI-TOF-MS/MS sowie ISD-MALDI-TOF-MS Versuchen. Die Modulierung der degenerierten Primer zur Strukturaufklärung von Mauritanicain erfolgte nach den folgenden Regeln:

- Das Verhältnis von Guanin/Cytosin zu Adenin/Thymin sollte zwischen 50 - 65% liegen.
- Die Schmelztemperatur (T_M) von *forward* und *reversed* Primer sollte nicht mehr als 2°C voneinander abweichen.
- Die Länge der Primer sollte zwischen 18 – 23 Basen betragen. Die Länge der Primer wurde der T_M angepasst werden.
- Die zwei ersten und letzten Basen sollten entweder aus Guanin oder Cytosin bestehen.
- Die Primer durften nicht mehr als 512 degeneriert (Degeneration = Produkt der möglichen Anzahl von Basentriplets je zu codierender Aminosäure) sein.
- Die Primer wurden nach der IUPAC Nomenklatur benannt.

2.2.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt, um die Reinheit von RNA und DNA aus der PCR zu überprüfen und selektiv PCR-Produkte zu isolieren. Durch ihre Phosphatgruppen sind die Nukleinsäuren negativ geladen. Weil jede Base eine negative Ladung trägt, ist das Verhältnis zwischen Ladung und Größe proportional, weshalb kleinere Moleküle schneller durch das Gel diffundieren, als größere [156]. Die Größe der Poren des Agarosegels richtet sich nach der Konzentration der Agarose. Für das Agarosegel wurde 1-2 % Agarose (m/v) in TAE-Puffer (Tabelle 28) unter Hitze gelöst und nach Abkühlen auf ca. 70°C mit Ethidiumbromid (ca. 0,0002 % v/v) versetzt. Zur Analyse von RNA wurde 10 µL Probe mit 10 µL RNA *Loading Dye* Puffer gemischt und für 10 min. auf 70°C erhitzt. Nach dem Erhitzen wurde die Probe sofort für 5 min. auf Eis gekühlt und im Anschluss in die Taschen des Agarosegels aufgetragen. Mit einer konstanten Spannung von 130 V wurde die Probe für 45 min. aufgetrennt.

Zur Visualisierung der DNA-PCR-Produkte wurden 20 µL PCR-Probe mit 5 µL *DNA Electrophoresis Sample Loading Dye* versetzt. 20 µL dieser Lösung wurden jeweils in die Taschen des Agarosegels aufgetragen und bei konstanter Spannung von 130 V für 45 min. aufgetrennt.

Tabelle 28. *Verwendete Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.*

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA in sterilem DCEP-Wasser

2.2.3.9 Isolation von PCR-Produkten aus dem Agarose-Gel

Zur Isolation der PCR-Produkte aus dem Agarosegel wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit genutzt. Dazu wurden die gewünschten PCR Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit 300 µL „ADB Extraktionspuffer“ für 10 min. bei 50°C gelöst. Im nächsten Schritt wurde das gelöste Gel durch die Filtereinheiten für 30 sek. bei 12.000 * g zentrifugiert und im Anschluss zweimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt wurde die DNA mit 10 µL Wasser eluiert.

2.2.3.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde durch die Firma LGC Genomics GmbH durchgeführt [157]. Die Sequenzierung nach Sanger wird auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynucleotidverfahren bezeichnet. Die DNA-Amplifikation wird in diesem Verfahren parallel in vier Mikroreaktionsgefäßen mit Matrizen-DNA, spezifischen Primer, DNA-Polymerase und allen vier 2'-Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) durchgeführt. In jedem der vier Mikroreaktionsgefäße befindet sich neben den dNTPs ein jeweiliges 2',3'-Didesoxynucleotidphosphat (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP). Wird durch Zufall eines dieser ddNTPs eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch, da aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe kein weiteres dNTP in dem DNA-Fragment eingebaut werden kann. Es entstehen Gemische aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, die der Größe nach in einer Kapillarelektrophorese getrennt und fluorimetrisch detektiert werden. So kann die DNA-Sequenz sukzessive analysiert werden. Die Ergebnisse wurden mit der Software 4peaks (Version 1.8, OSX 10.13.3) ausgewertet.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Hautmodelle

Die humanen Hautmodelle wurden in Zusammenarbeit mit Anne Eichhorst aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Hedtrich (FU-Berlin, Abteilung für Pharmakologie) angefertigt. Die Analyse der Hautmodelle mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Hedtrich durchgeführt. Primäre humane dermale Fibroblasten und primäre humane dermale Keratinozyten wurden für das Hautmodell verwendet. Die Anträge EA1/345/14, EA1/081/13 und EA1/227/14 für die Gewinnung der primären Hautzellen wurden am 01.09.2016 von der Ethikkommission der Charité Berlin positiv bewertet. Alle Patientenproben wurden nach einer schriftlichen Einverständniserklärung erhalten. Für die Versuche wurden ausschließlich anonymisierte Proben verwendet.

Milchsaft zur Stimulation der Hautmodelle aus *E. mauritanica* wurde im Verhältnis 1:25 in PBS direkt nach dem Austreten aus der Sprossachse aufgefangen und bei 4°C gelagert. Um die Koagulation von dem Milchsaft zu verhindern, wurde die Milchsaftprobe alle 24 h kräftig durchmischt. Die Stimulation der Hautmodelle mit jeweils 35 μL Untersuchungslösung betrug 60 min. Als Negativkontrolle diente PBS. Die Untersuchungslösung wurde zentral auf das Hautmodell aufgetragen.

Nach 60 min. Stimulation wurden die Untersuchungslösungen entfernt und die Hautmodelle jeweils mit 200 μL PBS gewaschen. Nach 24 h wurden je Hautmodell jeweils 200 μL Zellmedium zur Untersuchung entnommen und durch 200 μL frischem Zellmedium ersetzt. Der Versuch wurde nach 48 h beendet, die Hautmodelle direkt in -80°C eingefroren und anschließend mittels HE-Färbung untersucht.

2.2.4.2 Zytokinsekretion von adhärennten Zellen

Zur Bestimmung der immunologischen Wirkung von Mauritanicain auf HaCaT-Zellen und primären juvenilen Fibroblasten wurden zunächst 100.000 HaCaT-Zellen bzw. 80.000 primäre humane dermale Fibroblasten in einer 24-well Platte mit Wachstumsmedium (Tabelle 11) über 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ zum Anwachsen ausgesät. Um die Zellen in die G0-Phase übergehen zu lassen, wurde nach 24 h das Wachstumsmedium entfernt und für 24 h mit Basalmedium ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium erneut entfernt und mit jeweils 400 µL Versuchsmedium (Basalmedium + Stimulanzen) für 60 min. bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 60 min. wurde das Versuchsmedium abgenommen und die Zellen im serumfreien Medium für 47 h inkubiert. Als Positivkontrolle diente in diesem Versuch die Stimulation der selektiven PAR2-Agonisten-Peptiden SFLLR-NH₂ und 2-Furoyl-LIGRLO-amid für 48 Stunden. Zur Validierung der Aktivität von Mauritanicain wurde Mauritanicain durch Erhitzung für 10 min. bei 95°C inaktiviert und in der gleichen Konzentration getestet. Als Negativkontrolle diente das Basalmedium. Die Zellüberstände wurden abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Bestimmung von dsDNA in adhärennten Zellen

Zur Bestimmung der dsDNA an adhärennten Zellen wurde das FluoReporter® *Blue Fluorometric dsDNA Quantitation* Kit genutzt. Die Fluoreszenzlösung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 wurde nach den Instruktionen des Herstellers hergestellt. Der Farbstoff bindet in einer kleinen Lücke der dsDNA an Adenosin- und Thyminreiche Strukturen. Dadurch können diese fluorimetrisch bestimmt werden. Da die Menge an dsDNA in den linear zur Zellzahl. Auf die adhärennten Zellen wurde nach Beendigung der Versuche 100 µL Wasser gegeben. Die Zellen wurden dann 1 Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend für 30 min. bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde 100 µL Fluoreszenzlösung hinzugegeben und die Fluoreszenz am Tecan® mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm bestimmt. Die Messgröße beträgt Fluoreszenzeinheiten (FU).

2.2.4.4 Immunhistochemische Färbung von PAR2

Die immunhistochemische Färbung ist eine Methode zur Visualisierung von Proteinstrukturen an verschiedenen Zelltypen. In dieser Arbeit wurden immunhistochemische Färbungen mit Keratinozyten und Fibroblasten, sowie von Hautmodellen durchgeführt, um den PAR2 Rezeptor und dessen Lokalisation zu visualisieren. Die betreffenden Zellen oder Hautabschnitte wurden mit 4% Formaldehyd fixiert und anschließend mit 0,5% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellmodelle mit Waschpuffer (PBS, enthaltend 0,0025% BSA und 0,025% Tween[®] 20) gewaschen und mit Ziegen Serum (1:20 in PBS) blockiert. Über Nacht wurden die Zellen bei 4°C mit dem primären Anti-PAR2-Antikörper (1:50 in Waschpuffer) bzw. 2- (4-Amidinophenyl) -1H-indol-6-carboxamidin (DAPI) inkubiert. DAPI dient in diesem Versuch zur Visualisierung des Zellkerns. Nach einem Waschschrift wurden die Schnitte 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Anti-Maus-IgG Alexa Fluor[®] 488 Antikörper (1: 400 in Waschpuffer) unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen, in Roti[®]-Mount FluorCare eingebettet und mittels Fluoreszenzmikroskopie (BZ-8000; Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) analysiert. Die Belichtungszeit für PAR2 im grünen Kanal betrug 1/12 s; für die Färbung mit DAPI im blauen Kanal 1/50 s.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchung zur immunmodulierenden- und histologischen Wirkung von Milchsafte aus *E. mauritanica* auf humane Hautmodelle

Um die immunmodulierende Wirkung des Milchsafte von *E. mauritanica* auf humane Haut darstellen zu können, wurde die Stimulation eines humanen Hautmodells als Testmodell zur experimentellen Untersuchung der Epidermis genutzt. Um auf Tierversuche und Versuche am Menschen verzichten zu können, stellt das Hautmodell ein ideales System zur Untersuchung der immunmodulierenden Eigenschaften von Testsubstanzen dar [158, 159]. Die Zytokinfreisetzung wurde anhand von zwei unterschiedlichen Hautmodellen demonstriert. Sowohl die Keratinozyten, als auch die Fibroblasten stammen jeweils von unterschiedlichen Spendern. Die Hautmodelle konnten somit als unterschiedlich betrachtet werden und sind zwei individuell reagierende Systeme, was den physiologischen Gegebenheiten in der Realität entspricht. Die Messung der Zytokinfreisetzung in das Zellmedium erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Als Negativkontrolle diente die Stimulation mit sterilem PBS. Für sowohl die Negativkontrolle, als auch die Milchsaftebehandlung, wurden 35 µL Untersuchungslösung zentral auf das Hautmodell aufgetragen. Beide Hautmodelle zeigten einen gleichen Freisetzungstrend für IL-1β, IL-8, IL-12p70 und TNFα. Die Freisetzung von TNFα und IL-12p70 in beiden Hautmodellen war im Vergleich zur histologischen Kontrolle nach 48 h erhöht. Die Freisetzung von IL-1β war im Vergleich zu histologischen Kontrolle nach 24 h in beiden Hautmodellen erhöht, während die Freisetzung von IL-8 gehemmt wurde (Abbildung 19, Abbildung 20 und Tabelle 29).

Tabelle 29. Cytokinkonzentrationen mit und ohne Behandlung von Milchsafte an zwei unterschiedlichen Hautmodellen.

Cytokin	Hautmodel A		Hautmodel B	
	Unbehandelt	Mit Milchsafte behandelt	Unbehandelt	Mit Milchsafte behandelt
IL-1β	87,3 pg/mL	12,7 pg/mL	20,6 pg/mL	8,0 pg/mL
IL-8	16.563 pg/mL	24.021 pg/mL	20.188 pg/mL	27.855 pg/mL
IL-12p70	18,1 pg/mL	2,8 pg/mL	8,9 pg/mL	Unter der Nachweisgrenze
TNFα	65,0 pg/mL	2,6 pg/mL	14,8 pg/mL	Unter der Nachweisgrenze

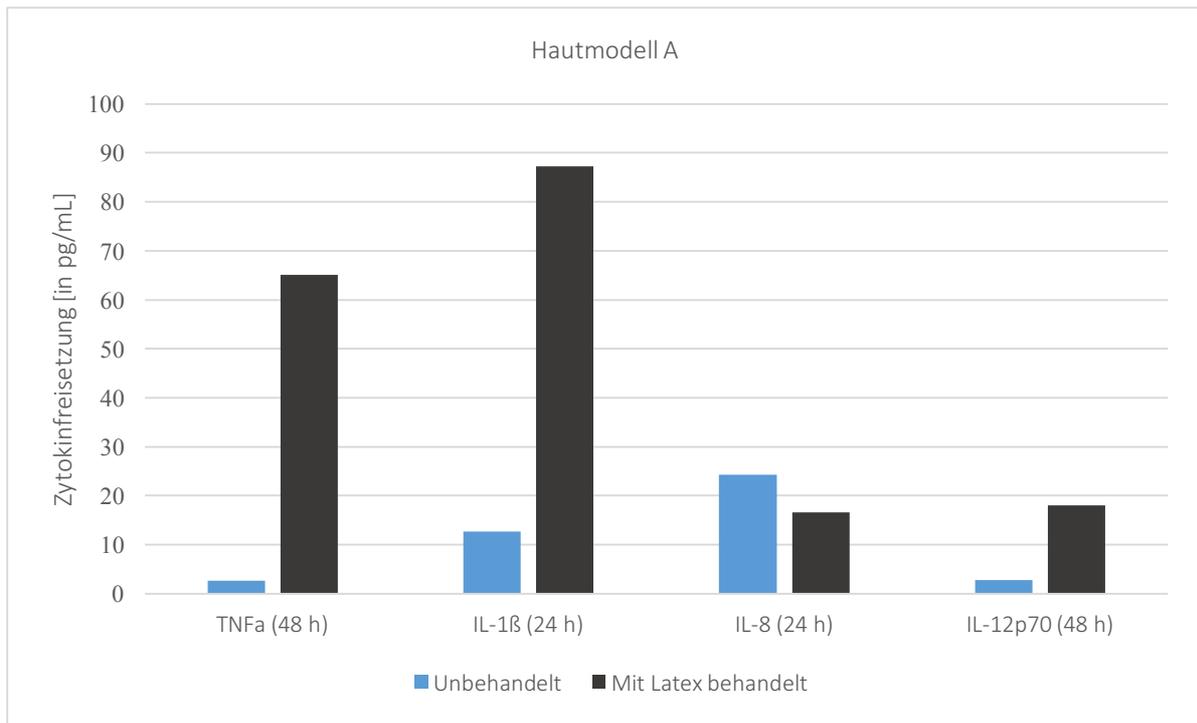


Abbildung 19. Zytokinfreisetzung im humanen Hautmodell A mit und ohne Behandlung durch Milchsaft aus *E. mauritanica*.

Die Abbildung zeigt die Zytokinfreisetzung aus dem Hautmodell A. Messgrößenbestimmung in der Durchflusszytometrie: n=200 pro Zytokin

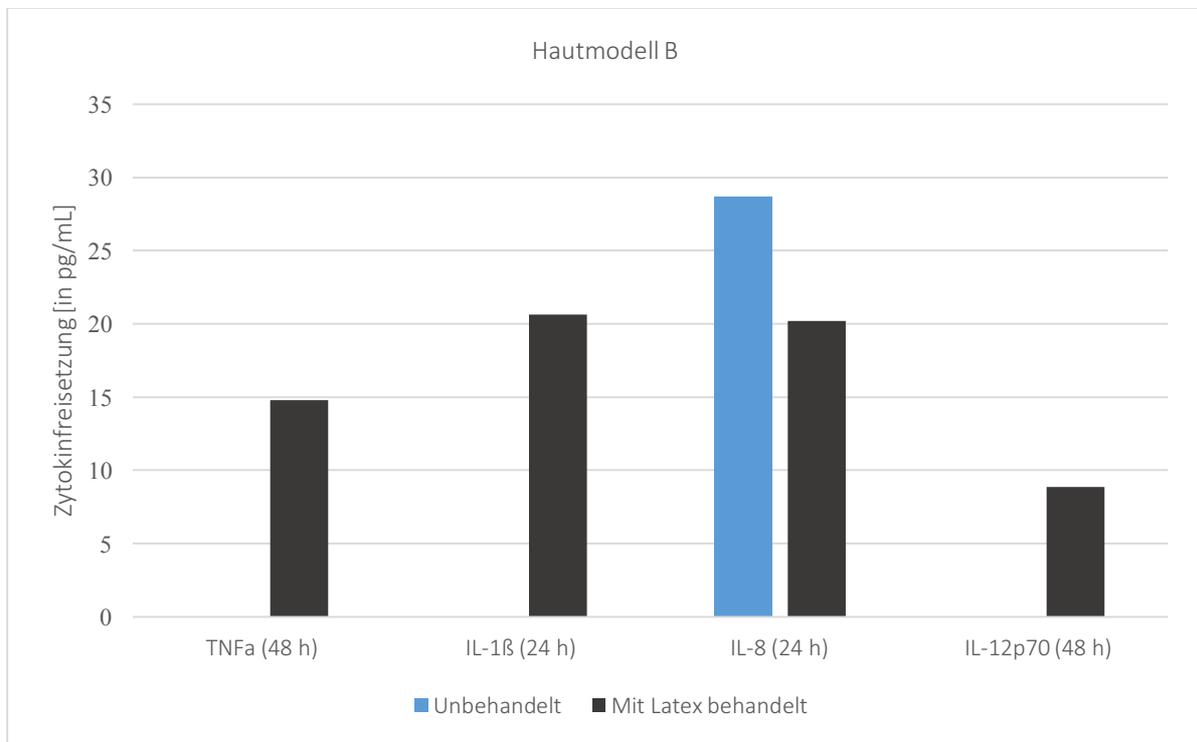


Abbildung 20. Zytokinfreisetzung im humanen Hautmodell B mit und ohne Behandlung durch Milchsaft aus *E. mauritanica*.

Die Abbildung zeigt die Zytokinfreisetzung aus dem Hautmodell B. Messgrößenbestimmung in der Durchflusszytometrie: n=200 pro Zytokin

Im Anschluss an den Versuch wurde eine HE-Färbung mit den unbehandelten und mit den Milchsaff-behandelten Hautmodellen durchgeführt. Das unbehandelte Hautmodell zeigte histologisch keine Auffälligkeiten. Die Epidermis im unbehandelten Hautmodell wies eine Dicke von ca. 130 μm auf. Die Zellkerne der Keratinozyten waren rund und gleichmäßig verteilt. Die Dermis war gleichmäßig gefärbt und unbeschadet (Abbildung 21).

Die Epidermis des mit Milchsaff behandelten Hautmodells unterschied sich histologisch stark zu der Negativkontrolle. Die Dicke der Epidermis in den Hautmodellen betrug ca. 90 μm . Die Zellkerne der Keratinozyten waren schmal, flach und ungleichmäßig verteilt, die Dermis aufgelockert und unstrukturiert (Abbildung 22).

Die histologische Färbung zeigte eindeutig eine Veränderung des Hautgewebes nach dem Kontakt mit dem Milchsaff im Vergleich zum unbehandelten Hautmodell.

Eine Schädigung des Hautgewebes geht mit physiologischen Reparatonsprozessen einher, welche charakteristischerweise auch Entzündungsreaktionen sind. Aus diesem Grund ist es nachvollziehbar, weshalb die erhöhten Cytokinkonzentrationen im Medium der behandelten Hautmodelle gefunden wurden. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Freisetzung von IL-1 β , denn dieses hochpotente Cytokin führt z.B. zu einem Anstieg von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Akute-Phase-Proteine und löst Fieber aus [160]. Eine geringe Erhöhung von IL-1 β hat eine Immunantwort des Organismus zur Folge.

In diesem Versuch kritisch zu betrachten bleibt die Tatsache, dass es sich bei dem Hautmodell um ein künstliches System handelt, welches ohne Immunzellen und anderen physiologischen Gegebenheiten auskommen muss. Zwar konnte in diesem Versuch die histologische Wirkung von Milchsaff auf die humane Haut realitätsnah nachgestellt werden, als ausreichendes System zur Bestimmung der Immunantwort im menschlichen Organismus kann das Hautmodell jedoch nur Hinweise liefern. Um Tierversuche jedoch zu vermeiden war das Hautmodell zum Beantworten der Fragestellung ausreichend ist.

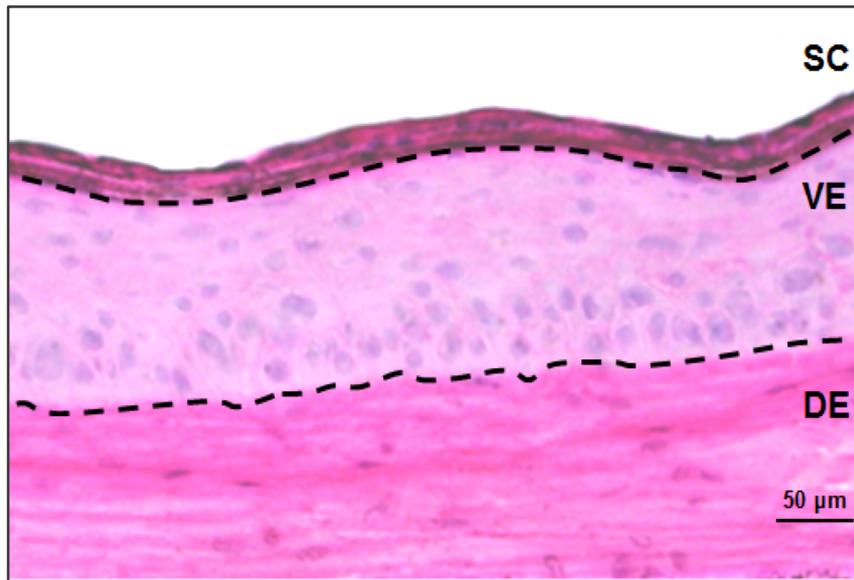


Abbildung 21. HE-Färbung des Hautmodells ohne Behandlung mit Milchsaft aus *E. mauritanica*.

SC=Stratum corneum; VE=viable Epidermis; DE=Dermis

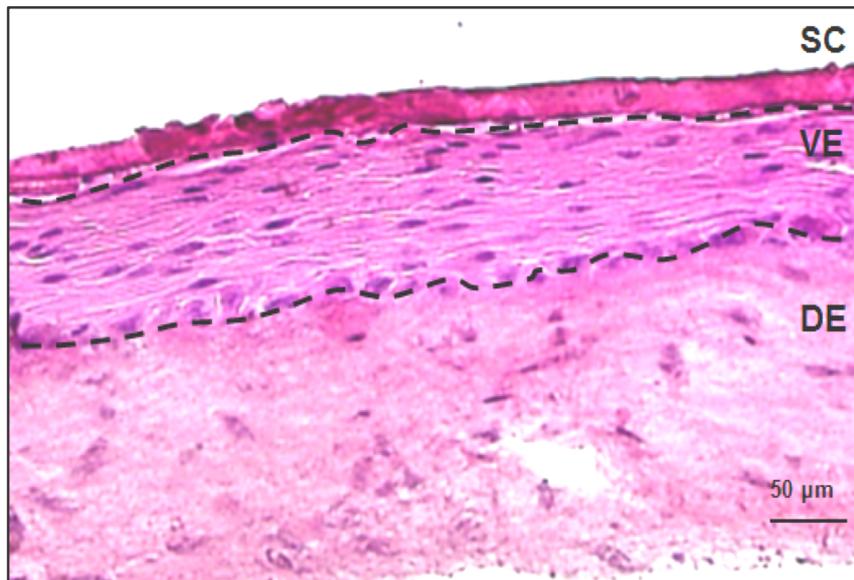


Abbildung 22. HE-Färbung des Hautmodells nach Behandlung mit Milchsaft aus *E. mauritanica*.

SC=Stratum corneum; VE=viable Epidermis; DE=Dermis

3.2 Strukturaufklärung von Mauritanicain

3.2.1 Isolation von Mauritanicain

Nach der Isolation der Gesamtproteine aus dem Milchsaft von *E. mauritanica* wurde Mauritanicain zunächst mittels Ionenaustauschchromatographie isoliert [161]. Die erhaltenen 1,5 mL Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt [mg/mL], anschließend auf ihre proteolytische Aktivität [FU] untersucht und in einem Diagramm, nach aufsteigenden NaCl Gradienten, aufgetragen (Abbildung 23). Die Fraktion mit dem höchstem Proteingehalt und der höchsten proteolytischen Aktivität wurde für die weiteren Untersuchungen genutzt. Wie in Abbildung 23 zu erkennen ist, waren in den Fraktionen 43 und 44 sowohl die proteolytische Aktivität, als auch der Proteingehalt am Größten.

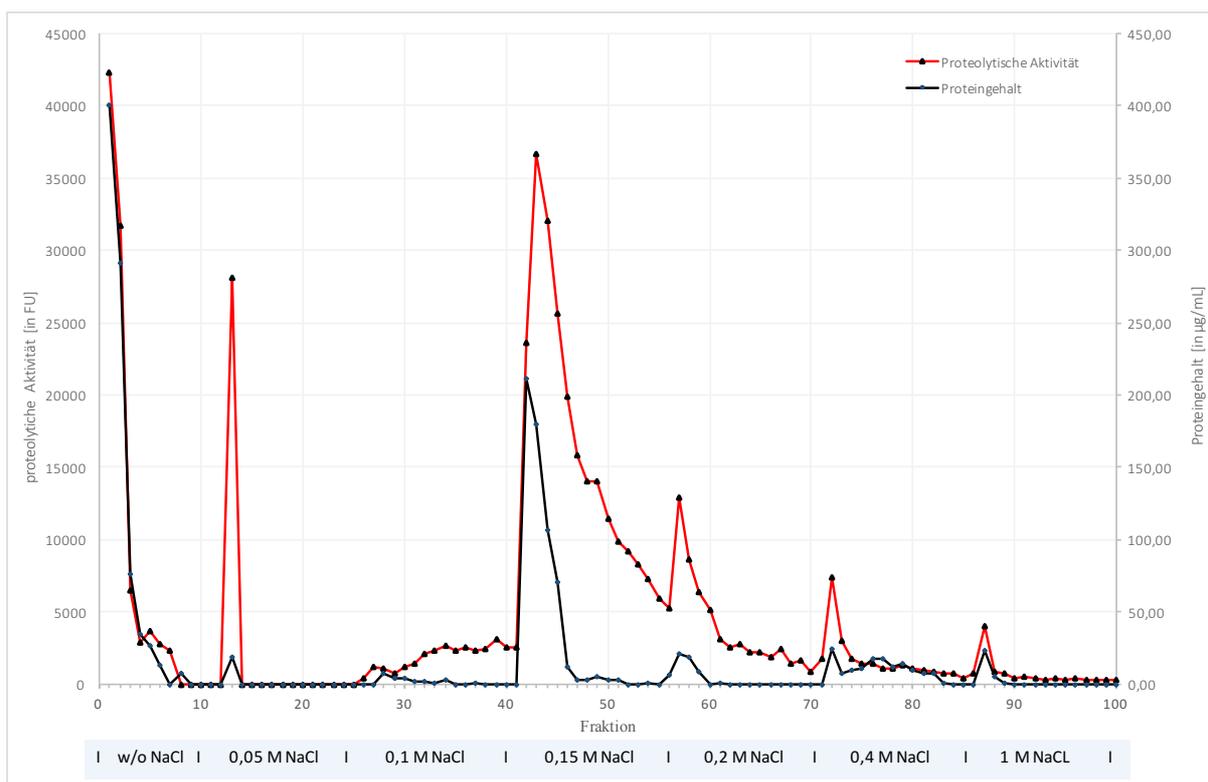


Abbildung 23. Proteolytischer Aktivität und Proteingehalt in den Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie.

Die ausgewählten Fraktionen wurden im Anschluss mittels SEC weiter aufgereinigt. Abbildung 24 zeigt unterschiedliche Fraktionen 44 in der SEC. Teil A der Abbildung zeigt die Fraktion 44 in der SEC, welche vor der IEC nicht verdünnt wurde. Teil B der Abbildung zeigt die Fraktion in der SEC, welche vor der IEC 1:5 mit Phosphatpuffer verdünnt wurde. Deutlich zu erkennen ist, dass die Konzentration von Mauritanicain bei vorheriger Verdünnung auch um das fünffache steigt, wohingegen die anderen Proteine nur geringfügig ansteigen. Eine verbesserte Bindung von Mauritanicain durch eine geringe Konzentration in der IEC an die Säulenmatrix scheint hierfür verantwortlich zu sein (Abbildung 24).

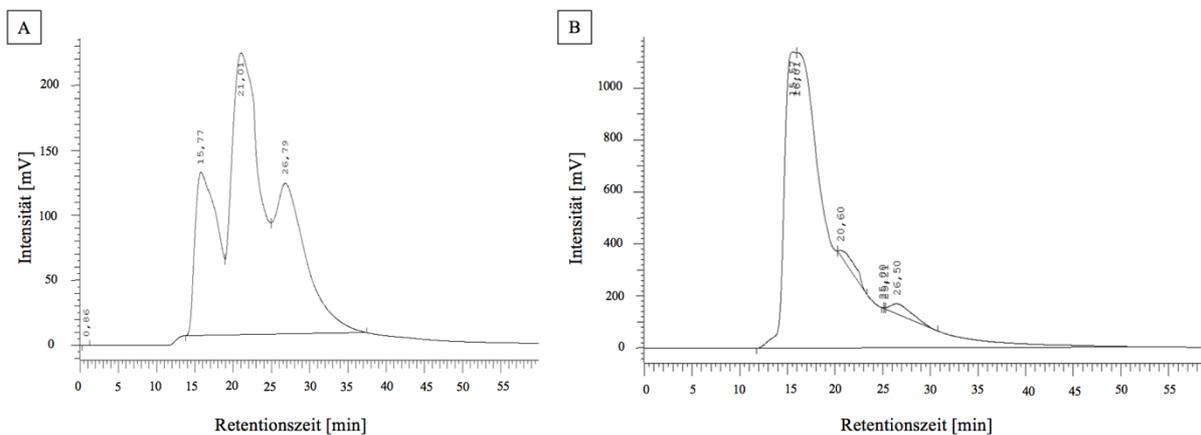


Abbildung 24. Vergleich unterschiedlicher Fraktion 44 in der Größenausschlusschromatographie.

Die Abbildung zeigt die Chromatogramme im Vergleich zweier SECs; das Chromatogramm (A) zeigt die direkt injizierte Fraktion 44 einer Isolation ohne vorherige Verdünnung der Latexprobe; das Chromatogramm (B) zeigt die direkt injizierte Fraktion 44 nach vorheriger Verdünnung (1:5) der Latexprobe; Injektionsvolumen: 200 μ L; Wellenlänge der Detektion: 210 nm; Intensität: 1 mV=Absorption/1000; Flussrate: 0,15 mL/min; Laufpuffer: 10 mM Phosphatpuffer pH 7; Säule: Discovery BIO GFC 30 cm \times 4.6 mm I. D. 5 μ m 150 \AA

Wie Flemmig berichtet, handelt es sich bei den Proteinbanden ca. 38 kDa und ca. 30 kDa um Bestandteile von Mauritanicain, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass sich diese Bruchstücke auch in der SEC der Fraktion 44 detektieren lassen (Abbildung 25; (Bahn 1)) [161]. Der erste in der SEC erhaltene Peak mit der Retentionszeit von ca. 15,5 min. wurde mit einem 50 kDa cut-off Filter behandelt. Kleinere Moleküle wurden nach der Behandlung durch den cut-off Filter abgetrennt und waren in der SDS-PAGE nicht mehr zu detektieren (Abbildung 25; (Bahn 2)).

Die Optimierung der Isolationsmethode stellte für diese Arbeit eine besondere Schwierigkeit dar, weil Mauritanicain komplett allein isoliert werden musste und zudem in einer hochkonzentrierten, salzfreien Lösung vorliegen musste. Die beschriebene Isolation von Flemmig war für die weiteren MS-Untersuchungen, speziell für die ISD-MALDI-TOF-MS, ungeeignet und musste auf die neuen Anforderungen angepasst werden. Zu einer erfolgreichen Isolation von Mauritanicain führte die Verdünnung des Milchsaftes, da dadurch eine höhere Bindung von Mauritanicain auf der AcroSep™ DEAE Ceramic HyperD F Säule der Ionenaustauschchromatographie erreicht wurde. Somit konnte bei der Elution mit Natriumchlorid die Proteinkonzentration erhöht werden, was von Vorteil ist, da bei der Größenausschlusschromatographie Proteinverluste zu verzeichnen sind.

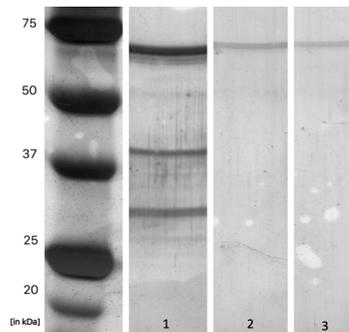


Abbildung 25. SDS-PAGE der Ionenaustauschfraktionen 44.

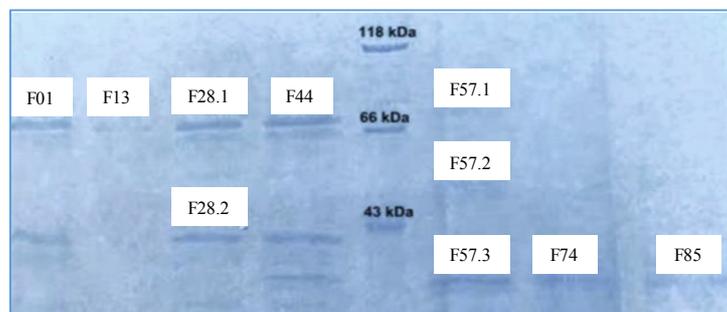
Die Abbildung zeigt die Aufreinigung verschiedener Behandlungsmethoden der Ionenaustauschfraktion 44. Bahn 1 zeigt Fraktion 44 direkt nach der Ionenaustauschchromatographie ohne weitere Nachbehandlung. Bahn 2 zeigt den Überstand der Fraktion 44 nach Filtration mit einem 50 kDa cut-off Filter. Bahn 3 zeigt den ersten Peak nach ca. 15,5 min. Retentionszeit aus der Größenausschlusschromatographie. Gelkonzentration: 10%; Färbemethode: Silberfärbung; 200 V konstant; Trennzeit 45 min.; Temperatur während der Elektrophorese: ca. 8°C.

3.2.1.1 Untersuchung der Ionenaustauschfraktionen mittels MALDI-TOF-MS

Proteolytisch aktive Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie wurden mittels MALDI-TOF-MS untersucht, um festzustellen, ob die proteolytische Aktivität von Mauritanicain oder anderen Proteinen ausgeht. Die Fraktionen mit proteolytischer Aktivität wurden mittels SDS-PAGE (Gelkonzentration: 12,5%) aufgetrennt, ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Welche Proteinbanden mittels MALDI-TOF-MS analysiert wurden, ist in der Abbildung 26 dargestellt.

Neben Mauritanicain in den Fraktionen 1, 13, 28.1, 28.2, 44 und 57 konnte in der MS mit dem Protein aus Fraktion 57.2 eine Übereinstimmung mit D-Mannose bindendem Lectin aus *Euphorbia tirucalli* L. gefunden werden. Die MS-Spektren der Fraktionen 57.3, 74 und 85 konnten keinem Protein zugeordnet werden, zeigten zum Teil jedoch Sequenzübereinstimmungen mit einer Aspartatprotease und einer Pektin Esterase. Anhand der drei Spektren konnte angenommen werden, dass sie demselben Protein zuzuordnen sind (Abbildung 29).

Durch die Charakterisierung aller proteolytisch aktiven Fraktionen konnte sichergestellt werden, dass in dem Milchsafte von *E. mauritanica* keine anderen Proteasen zugeordnet werden konnten. Somit konnte für die Versuche angenommen werden, dass im Falle von *E. mauritanica* das Mauritanicain für die proteolytische Hauptaktivität verantwortlich ist.



Fraktion	Größe [in kDa]	Mögliches Protein
1	74	Mauritanicain
13	74	Mauritanicain
28.1	74	Mauritanicain
28.2	40	Mauritanicain
44	74	Mauritanicain
57.1	74	Mauritanicain
57.2	50	D-Mannose bindendes Lectin (<i>Euphorbia tirucalli</i>)
57.3	35	Nicht identifizierbar – z.T. Übereinstimmung mit Aspartatprotease und Pektin Esterase
74	35	Nicht identifizierbar – z.T. Übereinstimmung mit Aspartatprotease und Pektin Esterase
85	35	Nicht identifizierbar – z.T. Übereinstimmung mit Aspartatprotease und Pektin Esterase

Abbildung 26. SDS-PAGE der proteolytisch aktiven Hauptfraktionen der Ionenaustauschchromatographie.

Die Abbildung zeigt die ausgewählten proteolytisch aktiven Hauptfraktionen der Ionenaustauschchromatographie und die dazugehörige Zuordnung. Gelkonzentration: 12,5 %; 200 V konstant; Trennzeit 45 min.; Temperatur während der Elektrophorese: ca. 8°C Färbemethode: Kolloidale Coomassie Färbung über 12 h.

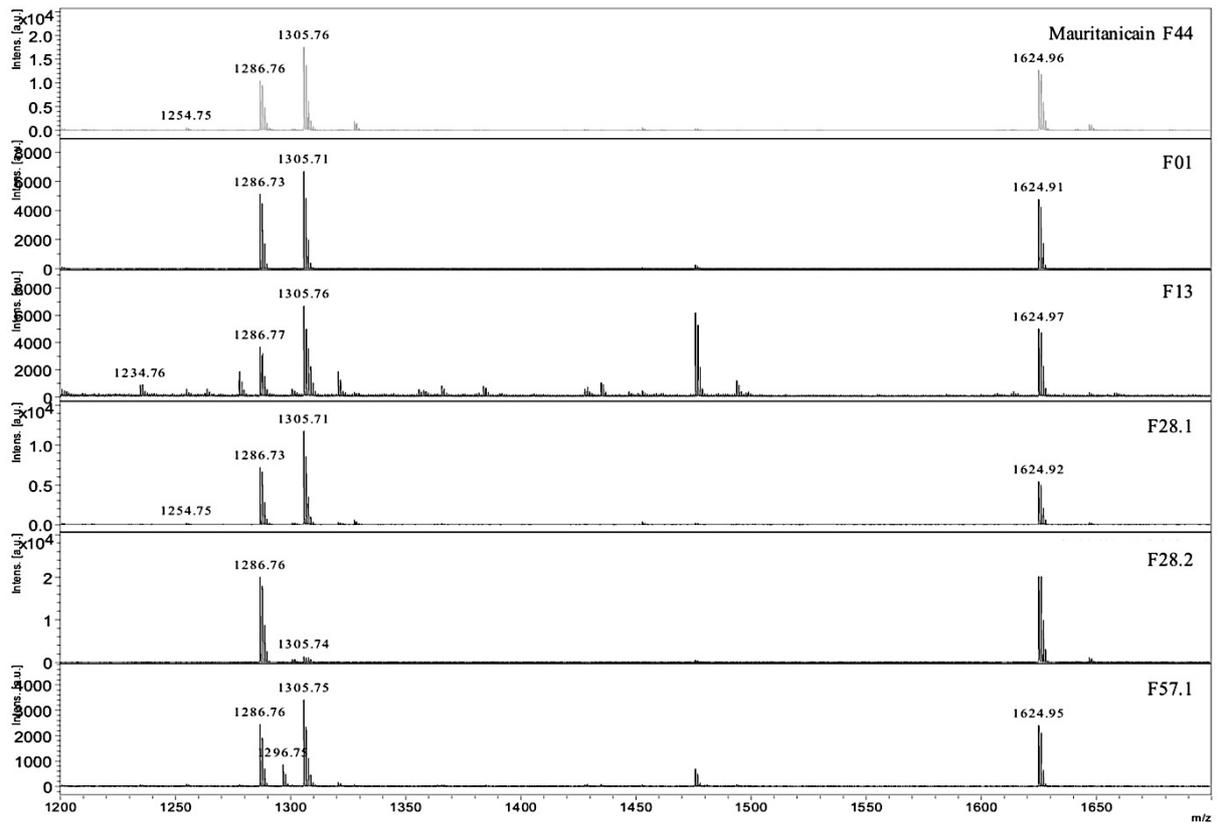


Abbildung 27. Vergleich der MS-Spektren der Fraktionen 1, 13, 28.1, 28.2, 44 und 57.1 im Massenbereich $[m/z]$ zwischen 1200 – 1700.

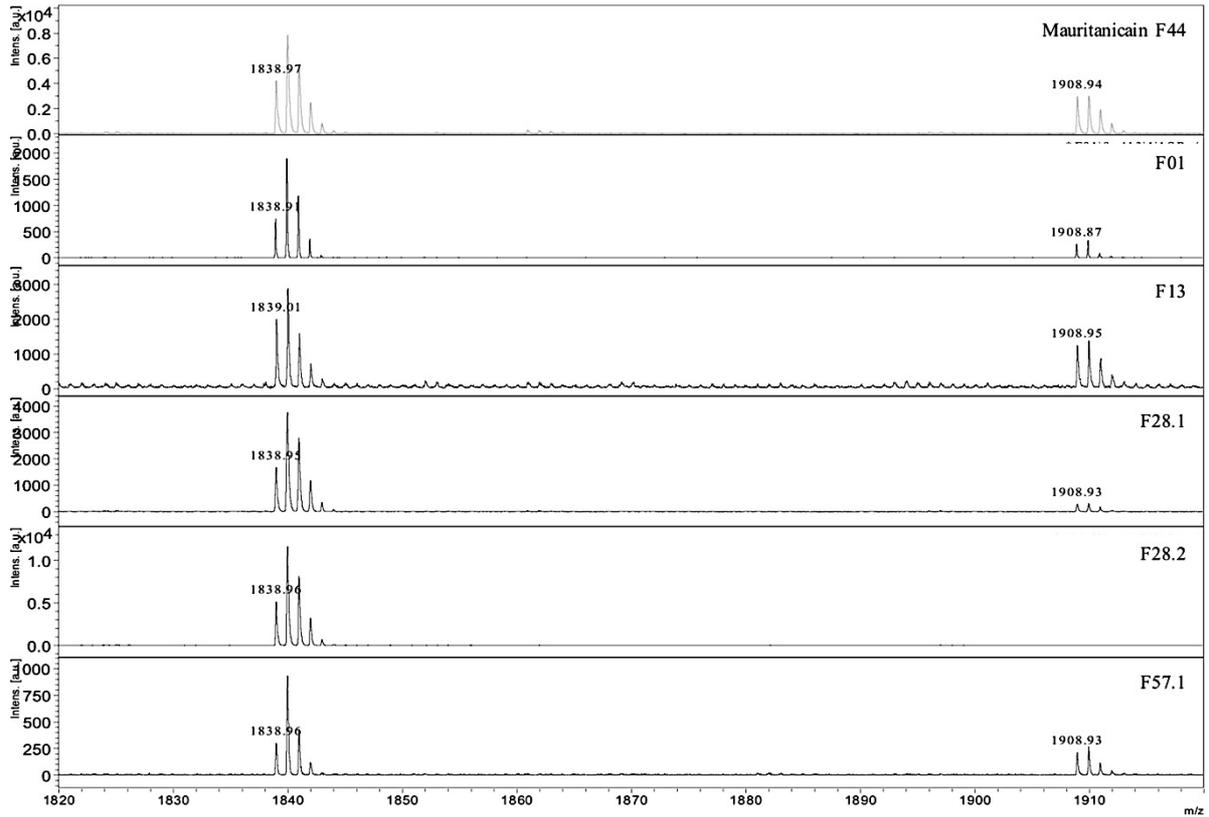


Abbildung 28. Vergleich der MS-Spektren der Fraktionen 1, 13, 28.1, 28.2, 44 und 57.1 im Massenbereich $[m/z]$ zwischen 1700 – 1950.

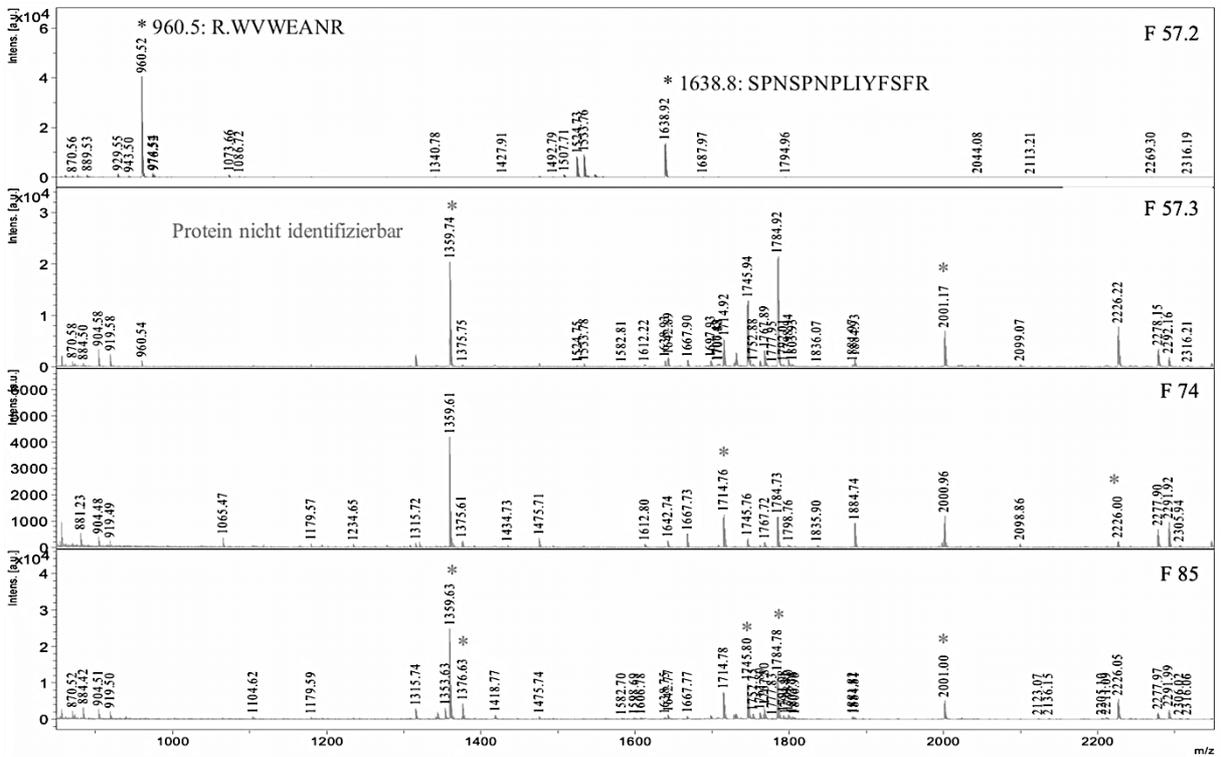


Abbildung 29. Vergleich der MS-Spektren der Fraktionen 57.2, 57.3, 74 und 85 im Massenbereich $[m/z]$ zwischen 800 – 2400.

3.2.2 *De-Novo-Proteinsequenzierung von Mauritanicain*

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie diente zum einen der Überprüfung der Isolation von Mauritanicain aus der SEC und IEC, zum anderen als Vorlage zur weiteren Analyse mittels MS/MS. Das Massenspektrum der isolierten und tryptisch verdauten Proteinbande aus der Elektrophorese zeigte das gleiche Fraktionierungsmuster, wie das isolierte Protein von Flemmig [161]. Als prominente Signale konnten Peptide mit den m/z 793.33, 859.45, 1286.70, 1305.68, 1624.88, 1838.87 und 2281.04 detektiert werden (Abbildung 31). Somit konnte im weiteren Verlauf davon ausgegangen werden, mit dem beschriebenen Mauritanicain zu arbeiten. Im ersten Schritt wurden als Grundlage für das Primer Design die Ergebnisse aus der Peptidsequenzierung von Mauritanicain genutzt, welche mit MALDI-TOF-MS/MS erhalten wurden. Die Abbildung 30 zeigt schematisch den Aufbau der *De-Novo-Proteinsequenzierung* von Mauritanicain mit den dazugehörigen Primern. Jede gleiche Farbe hinter den Primern in der Abbildung zeigen das Primer Paar für die jeweilige PCR und die Lokalisation des Abschnitts, für welche Gensektion die jeweilige PCR durchgeführt worden ist. Bei einer Proteinsequenzierung ohne Hintergrundinformationen zur Konstitution des Proteins wird versucht, die Proteinsequenz in kleineren Schritten aufzudecken. Dazu wurden verschiedene Primer übergreifend in der Gensequenz genutzt (Abbildung 30).

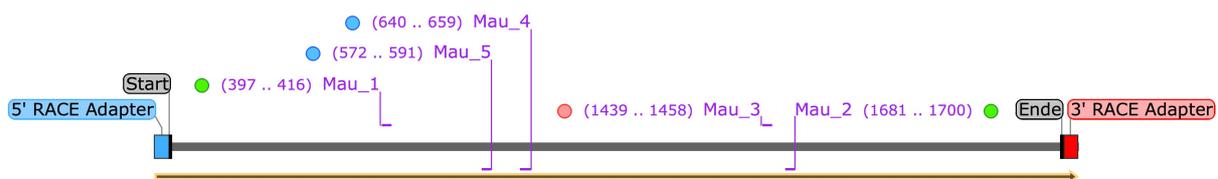


Abbildung 30. Schematische Darstellung der *De-Novo Sequenzierung* von Mauritanicain.

Tabelle 30. Mittelwerte der Residuen-Massen der Aminosäuren in der Massenspektrometrie.

Aminosäure	Abkürzung	m/z	Aminosäure	Abkürzung	m/z
Glycin	G	57,0520	Asparaginsäure	D	115,0890
Alanin	A	71,0790	Glutamin	Q	128,1310
Serin	S	87,0780	Lysin	K	128,1740
Prolin	P	97,1170	Glutaminsäure	E	129,1160
Valin	V	99,1330	Methionin	M	131,1980
Threonin	T	101,0477	Histidin	H	137,1420
Cystein	C	103,1440	Phenylalanin	F	147,1770
Isoleucin	I	113,1600	Arginin	R	156,1880
Leucin	L	113,1600	Tyrosin	Y	163,1700
Asparagin	N	114,1040	Tryptophan	W	186,2130

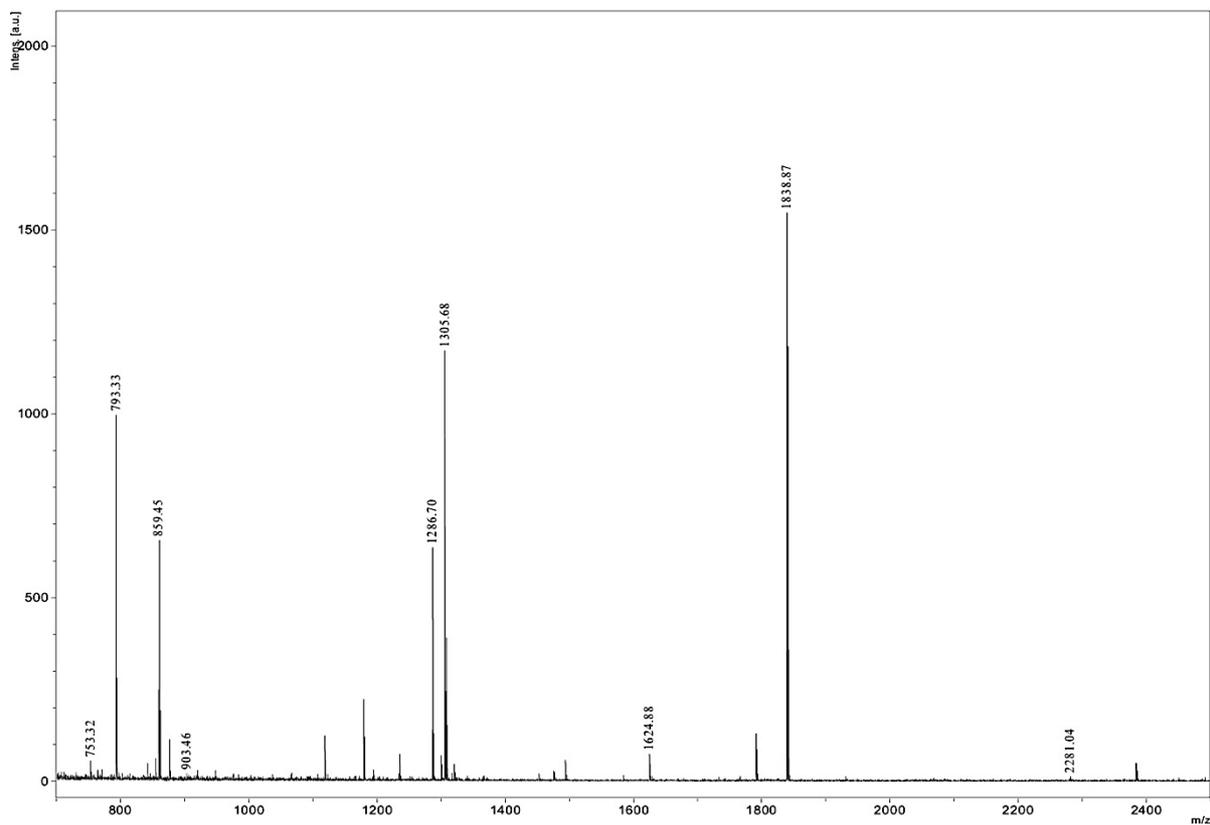


Abbildung 31. MALDI-TOF MS Spektrum von Mauritanicin nach tryptischen Verdau.

Die Abbildung zeigt das MALDI-TOF-MS Spektrum von Mauritanicin nach der SEC. Der Vergleich mit dem MS-Spektrum von Flemmig (Abb. 14.) zeigt eine Übereinstimmung mit dem erneut untersuchten Protein [161].

Die Peptide mit der m/z 1305.68 und m/z 1838.87 wurden zur weiteren Strukturaufklärung mittels MS/MS weiter fragmentiert. Die Auswertung der MS/MS Daten wurde mit Hilfe der Residuen-Massen für die Fragmente der einzelnen Aminosäuren durchgeführt (Tabelle 30). Das MS/MS-Spektrum von der Fragmentierung des Peptids mit der m/z 1305.68 ist in Abbildung 32 dargestellt. Nach computergestütztem Abgleich mit der NCBI Datenbank und anschließender manueller Auswertung ergab sich für dieses Fragment eine vermutete Peptidsequenz von *NAHPNWSPAA(L/I)K* (Tabelle 31).

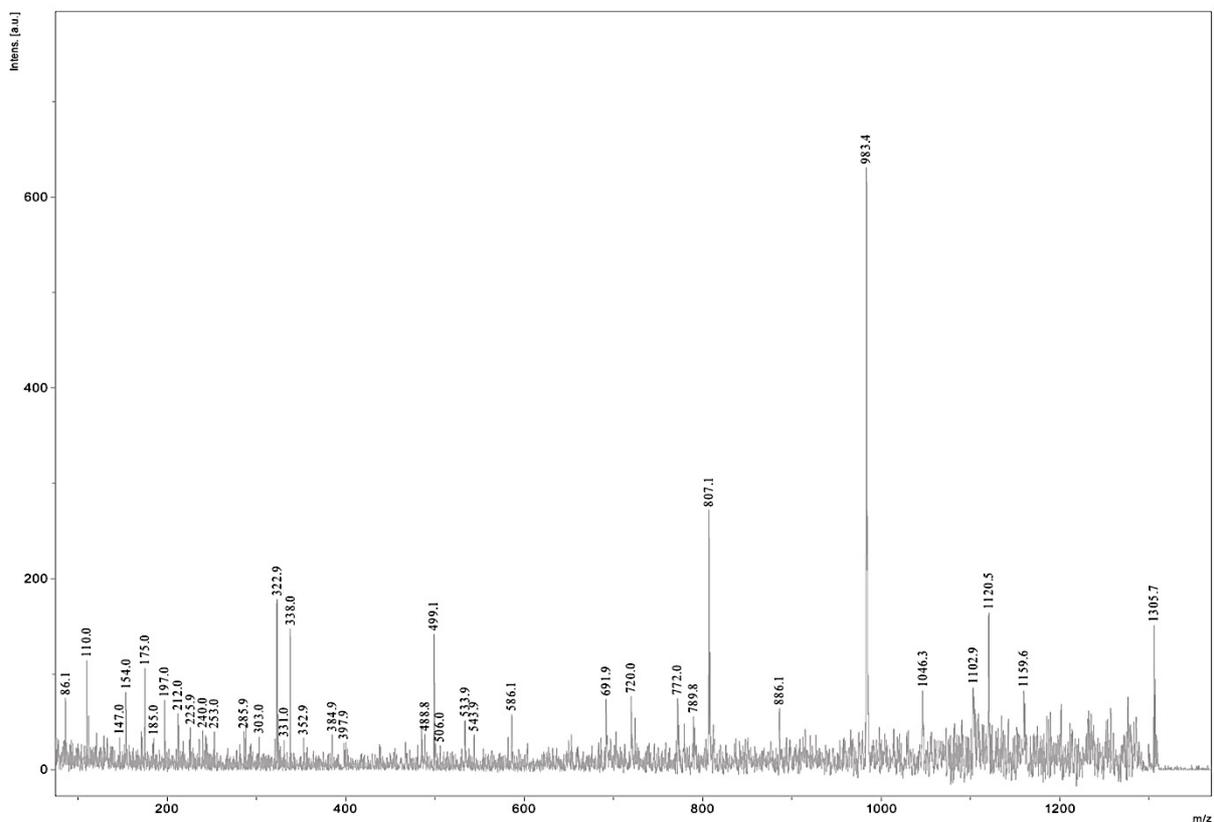


Abbildung 32. MS/MS des Peptids mit der m/z 1305,68.

Die Abbildung zeigt das MS/MS Spektrum des 1305,68 m/z Fragmentes von Mauritanicin.

Tabelle 31. Aminosäuresequenz nach computerbasierter und manueller Auswertung des 1305.68 Fragmentes.

b-Fragment [m/z]		Aminosäure		y-Fragment[m/z]
----	1	A	12	----
186.0873	2	N	11	1234.6327
323.1462	3	H	10	1120.5898
420.1990	4	P	9	983.5309
534.2419	5	N	8	886.4781
720.3212	6	W	7	772.4352
807.3533	7	S	6	586.3559
904.4060	8	P	5	499.3239
975.4431	9	A	4	402.2711
1046.4803	10	A	3	331.2340
1159.5643	11	L/I	2	260.1969
----	12	K	1	147.1128

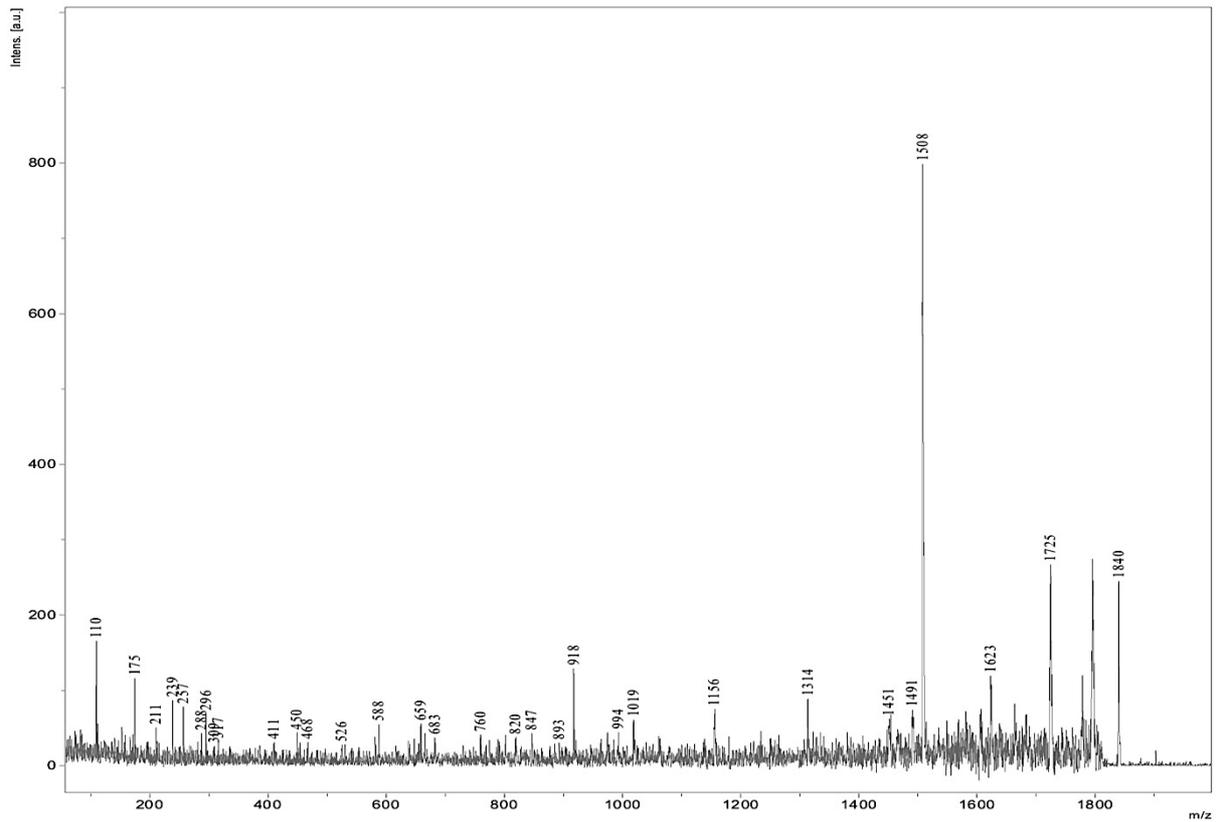


Abbildung 33. MS/MS des Peptids mit der m/z 1838,87.

Die Abbildung zeigt das MS/MS Spektrum des 1838,87 m/z Fragmentes von Mauritanicin.

Zusätzlich zum m/z 305.68 Peptid wurde das Peptid mit der m/z von 1838.87 fragmentiert (Abbildung 33). Nach computergestütztem Abgleich mit der NCBI Datenbank und anschließender manueller Auswertung ergab sich für dieses Fragment eine vermutete Peptidsequenz von *NTDGHGHTASTAGGS(L/I)VR* (Tabelle 32), wobei die Sequenz *TDGHGHTASTA* mit anderen Proteinen wie z.B. der Subtilisin-ähnlichen Protease aus *Glycine soja* SIEBOLD & ZUCC. (GenBank: KHN13887.1) oder der Subtilisin-ähnlichen Protease SBT1.7 aus *Solanum tuberosum* L. (NCBI Referenz Sequenz: XP_006339267.2) in Übereinstimmung gebracht werden konnte.

Tabelle 32. Aminosäuresequenz nach computerbasierter und manueller Auswertung des 1838.87 Fragmentes.

b-Fragment [m/z]		Aminosäure		y-Fragment[m/z]
----	1	N	19	----
217.0819	2	T	18	1723.8358
332.1088	3	D	17	1622.7881
389.1303	4	G	16	1507.7612
526.1892	5	H	15	1450.7397
583.2107	6	G	14	1313.6808
684.2584	7	T	13	1256.6593
821.3173	8	H	12	1155.6117
922.3649	9	T	11	1018.5527
993.4021	10	A	10	917.5051
1080.4341	11	S	9	846.4680
1181.4818	12	T	8	759.4359
1252.5189	13	A	7	658.3883
1323.5560	14	G	6	587.3511
1380.5775	15	G	5	516.3140
1494.6204	16	S	4	459.2926
1593.6888	17	L/I	3	345.2496
1692.7572	18	V	2	246.1812
----	19	K	1	147.1128

Um den N- bzw. C-Terminus des Proteins zu bestimmen, wurde mit isoliertem Mauritanicain ISD-MALDI-TOF-MS durchgeführt (Abbildung 34). Nach Strukturvergleichen mit Subtilisin-ähnlichen Proteasen SBT1.4 (*Hevea brasiliensis*), CDL15_Pgr013779 (*Punica granatum* L.) und SBT1.4 (*Ricinus communis*) konnte die erhaltene Sequenz dem N-terminus zugeordnet werden (Tabelle 33).

Durch die Sequenzübereinstimmung mit den vergleichbaren Proteinen konnte gezeigt werden, dass das in der ISD-MALDI-TOF-MS detektierte Peptid zwischen Position 9 bis Position 25 im Protein liegen muss.

Vergleicht man die Proteinsequenz von SBT1.4 mit den detektierten Massen von Mauritanicain, ist zu erkennen, dass sich das übereinstimmende Peptid zwischen Position 119 und 135 im gesamten Protein befindet. Bei SBT1.4 befindet sich das Signalpeptid zwischen Position 1 und 25 und ein Propeptid zwischen Position 26 und 110 befindet. Die 8 Aminosäuren, die in der ISD-MALDI-TOF-MS mit dem Signal von m/z 962,9 zu detektiert wurden, wurde zur Position 110 addiert und stimmte dann mit den verglichenen Proteinen überein. Das Peptid mit der m/z 962,9 stellte somit die ersten Aminosäuren ungeachtet von Signal- und Propeptid aus dem N-Terminus von dem aktiven Protein Mauritanicain dar (Tabelle 33).

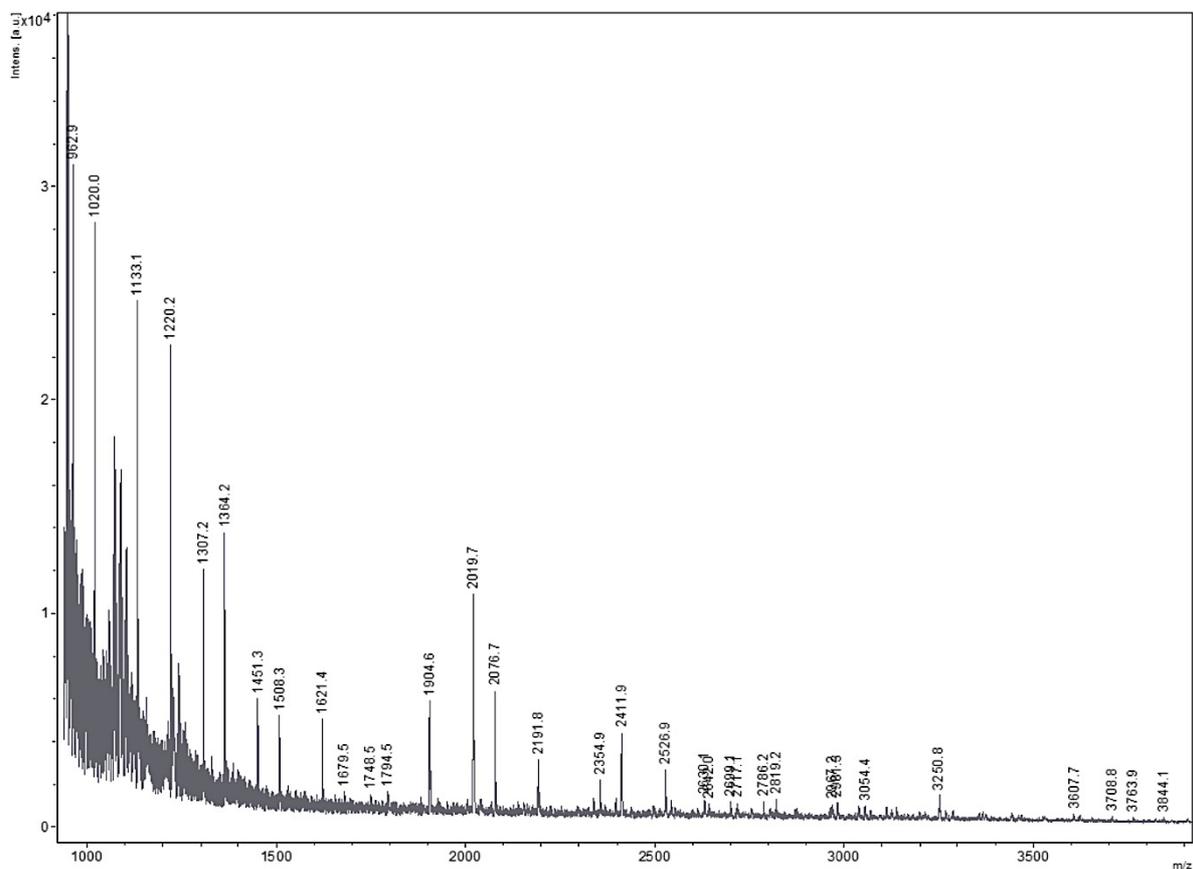


Abbildung 34. ISD-MALDI-TOF-MS Spektrum von Mauritanicain.

Tabelle 33. Vergleich des N-terminus von Mauritanicain mit anderen Subtilisin-ähnlichen Proteasen.

Protein (Pflanze)	Aminosäuresequenz 001-008 (Masse [m/z])	Aminosäuresequenz (009-025)	Folgesequenz
Mauritanicain (<i>Euphorbia mauritanica</i>)	TTRTPQFL (962,9)	GLSSGSLWPDGDYGD	IIIG
SBT1.4 (<i>Hevea brasiliensis</i>)	TTRTPHFL (971,5)	GLSTGSLWPNLAYGED	VVIG
Theoretisches Protein CDL15_Pgr013779 (<i>Punica granatum</i>)	TTRTPHFL (971,5)	GLSEGSGLWPDSNYADD	VIVG
SBT1.4 (<i>Ricinus communis</i>)	TTRTPHFL (971,5)	DLSSVSLWPNLAYGED	VIIG

Aus dem ISD-Massenspektrum von Mauritanicain lässt sich anhand der erhaltenen Massensignale die Sequenz GLSSGSLWPDGDYGD ableiten. Die Zuordnung der erhaltenen Massensignale ist tabellarisch dargestellt. Das Signal für Tryptophan muss rechnerisch bestimmt werden, da Tryptophan im Massenspektrum typischerweise kein Signal aufweist (Tabelle 34).

Tabelle 34. Zuordnung der Messsignale aus Abbildung 34 den dazugehörigen Aminosäuren.

Aminosäure(n)	Fragment [m/z]	Aminosäure(n)	Fragment [m/z]
TTRTPQFL	962,9	W	$1904,6 - 1621,4 - 97,1 = 186,1$
G	1020,0	P	1904,6
L	1133,1	D	2019,7
S	1220,2	G	2076,7
S	1307,2	D	2191,8
G	1364,2	Y	2354,9
S	1451,3	G	2411,9
G	1508,3	D	2526,9
L	1621,4	D	2642,0

3.2.3 Isolierung von RNA aus *E. mauritanica*

Die Messung der Absorption der isolierten Gesamt-RNA wie in 2.2.3.3 beschrieben diente zum einen der Quantifizierung und zum anderen zur Überprüfung der Reinheit der RNA von möglicher DNA Verunreinigung. Beispielhaft ist eine Quantifizierung von RNA in Abbildung 35 dargestellt. Im dargestellten Beispiel konnte eine RNA Konzentration von $412,7 \mu\text{g}/\text{mL}$ bestimmt werden. Der Quotient aus der Absorption A_{260}/A_{280} lag bei 2,03 und der Quotient aus der Absorption A_{260}/A_{230} bei 2,09, was auf eine sehr gute Reinheit hinwies.

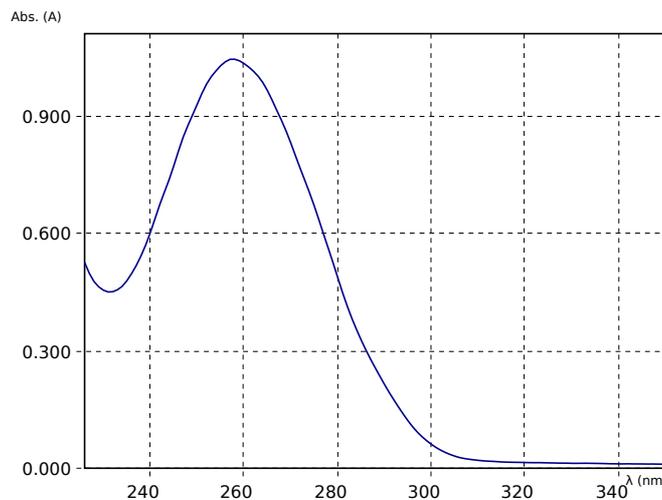


Abbildung 35. Die Abbildung zeigt die Absorption isolierter RNA aus *E. mauritanica*.

Dargestellt ist repräsentativ ein Absorptionsspektrum von RNA aus *E. mauritanica*. Die Messung erfolgte im Eppendorf-Spektrometer in einer 1 mm Küvette.

Zur weiteren Reinheitsüberprüfung der isolierten RNA wurde die Agarose-Elektrophorese genutzt. Durch diese Methode konnte nachgewiesen werden, dass die isolierte RNA nicht mit genomischer DNA (gDNA) verunreinigt war und für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand (Abbildung 36). In der Abbildung 36 zu erkennen ist das Verhältnis zwischen 28S-ribosomaler RNA und 18S-ribosomaler RNA, welche im Verhältnis 2:1 (28S:18S) vorliegen müssen. Ebenso ist zu erkennen, dass die Isolation der RNA frei von DNA ist, da sonst im oberen Teil des Agarosegels eine spezifische DNA Bande zu erkennen sein wäre.

Eine mögliche Verunreinigung mit gDNA stellt ein Problem dar, da bei weiterer Amplifizierung von RNA auch gDNA durch die Primer in der PCR erfasst würde.

Wenn es zur Amplifizierung von gDNA käme, könnte nicht sichergestellt werden, ob es sich bei dem daraus erhaltenen PCR-Produkt um ein PCR-Produkt handelt, welches aus RNA bzw. mRNA oder aus gDNA amplifiziert wurde. Stammt ein PCR-Produkt aus gDNA, muss es sich bei dem finalen PCR-Produkt nicht um ein aktiv sezerniertes Protein handeln, da die gDNA für mehr Proteine codiert, als funktionstüchtige Proteine durch die Proteinbiosynthese im Organismus gebildet werden.

Wird nur die mRNA bzw. die aus der mRNA translatierte cDNA amplifiziert, kann sichergestellt werden, dass das erhaltene PCR-Produkt von einem aktiv sezernierten Protein stammt, da die mRNA als Teil der Proteinbiosynthese funktionstüchtige Proteine codiert. Ein weiterer Vorteil von mRNA ist, dass nach dem Spleißen die mRNA keine Introns besitzt und somit nur aus Exons besteht. Sie kann somit direkt als Matrize zum ablesen des Proteins genutzt werden.

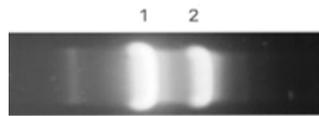


Abbildung 36. RNA-Agarose-Gelelektrophorese.

Die Abbildung zeigt die Agarose-Gelelektrophorese von isolierter RNA Probe aus *E. mauritanica*. Bande 1: 28S-ribosomale RNA; Bande 2: 18S-ribosomale RNA. Gelkonzentration: 1%; 130 V konst.; Trennzeit: 40 min; Färbung: Ethidiumbromid.

3.2.4 Gensequenzierung von Mauritanicain

Im ersten Schritt der Gensequenzierung von Mauritanicain wurde mit Hilfe von degenerierten Primern versucht, ein PCR-Produkt zum Start der Gensequenzierung zu erhalten (Abbildung 30). In Abbildung 37 dargestellt ist das PCR-Produkt für die Primer Kombination aus *Mau_1* und *Mau_2* (Tabelle 9). Als Vorlage zur Modifizierung der Primer diente für den Primer *Mau_1* die Aminosäuresequenz „WPNGAYG“ aus dem ISD-MALDI-TOF-MS und für den Primer *Mau_2* die Aminosäuresequenz „HPNWSPA“ aus den Ergebnissen der MS/MS Untersuchungen (Abbildung 32). Das PCR Produkt betrug ca. 1300 Basenpaare und konnte mit dem Zymoclean™ Kit extrahiert, aufgereinigt und sequenziert werden.

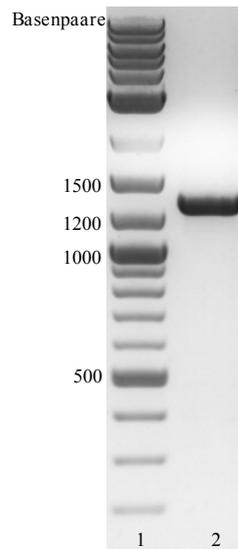


Abbildung 37. Agarose-Gel der Mauritanicain PCR mit degenerierten Primern Mau_1/Mau_2.

Die Abbildung zeigt die erste PCR der degenerierten Primern von Mauritanicain; Bahn 1: 2-log DNA Leiter (NEB Biolabs) Bahn 2: Primer Kombination: *Mau_1/Mau_2* (Tabelle 9); Agarose-Gel Konzentration: 1,5%; Trennzeit: 50 min.; Spannung: 130V konst.

Die isolierten PCR-Produkte wurden von der Firma LGC Genomics GmbH mittels Sanger Sequenzierung sequenziert. Die erhaltenen Spektren wurden mit dem Programm 4peaks ausgewertet (Abbildung 38). Es konnte sowohl die Gensequenz als auch die daraus resultierende Aminosäuresequenz abgelesen werden.

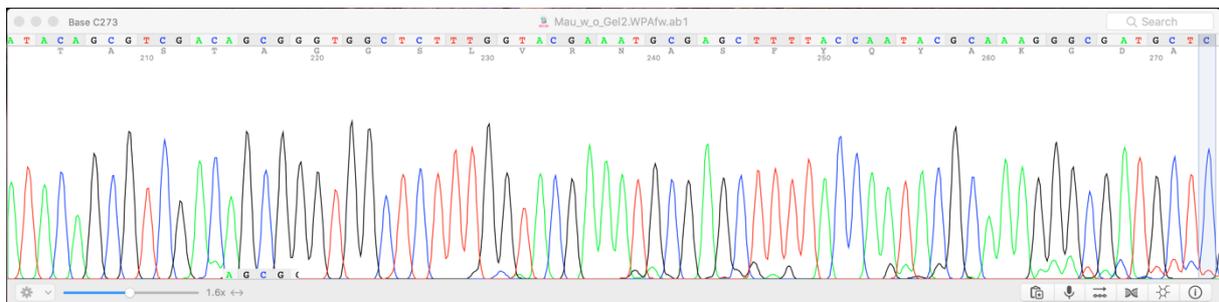


Abbildung 38. Beispielhafter Ausschnitt der Detektionssignale aus der Gensequenzierung nach Sanger.

Die Abbildung zeigt beispielhaft einen Ausschnitt der Gensequenzierung nach Sanger (LGC Genomics GmbH). Auswerteprogramm: 4peaks (Version 1.8, OSX 10.13.3)

Die erhaltene Aminosäuresequenz zeigt überwiegende Übereinstimmung mit den erhaltenen Spektren aus der Massenspektrometrie von Mauritanicain (Abbildung 32). Die detektierten Peptide mit den m/z 753.32, 859.45, 903.46, 1286.72, 1624.90, 1838.95, sowie 2280.21 und 2896.16 ließen sich der aus PCR und Sequenzierung erhaltenen Aminosäuresequenz zuordnen.

Das Peptid „HPNWSPA“ aus dem detektierten Peptid-Fragment mit der m/z von 1305.73 diene als Vorlage für den *Mau_2* Primer und kann daher nicht in der erhaltenden Sequenz detektiert werden. Das Peptid mit der Masse 793.34 liegt nicht innerhalb der detektierten Sequenz (Tabelle 35). Die Peptide mit der Masse 1286.72, 1305.73 und 1838.95 schließen sich in der Aminosäuresequenz direkt an die tryptische Spaltstelle Lysin an. Die DNA Sequenz von Mauritanicain aus dem PCR Produkt mit den degenerierten Primern *Mau_1* und *Mau_2* konnte direkt aus den Daten der Sequenzierung abgeleitet werden und lag zwischen den Aminosäurepositionen 168 und 495. Die Sequenzierungsdaten mit der passenden Aufschlüsselung sind in den Abbildungen 40-43 dargestellt.

Tabelle 35. MS Signale von Mauritanicain und ihre Übereinstimmung mit dem PCR Produkt mit den Primern *Mau_1*/*Mau_2*.

MS Signal [m/z]	Aminosäuresequenz	Position in Tabelle 36
753.32	KVSFSSR	336 - 343
793.34	ASTPFDR	-
859.45	AGGVGMIVR	269 - 278
903.46	ADVTLGDGR	196 - 205
1286.72	IVLCDNGVIQR	250 - 260
1305.73	NAHPNWSPAAK	-
1624.90	IVFHGSVLSDSPAAK	321 - 335
1838.95	NTDGHGHTASTAGGSIVR	59 - 77
2280.21	RGATLYAGEPLTDEMLPLVYAR	208 - 229
2296.16	RGATLYAGEPLTDEM _(ox) LPLVYAR	208 - 229

Zur weiteren Strukturaufklärung des fehlenden 3'- und 5'- Endes wurde eine RACE-PCR durchgeführt. Für die RACE-PCR wurde das FirstChoice[®] RLM-RACE Kit genutzt. Die 3'RACE-PCR wurde mit den Primern 3'RACE und *Mau_3* durchgeführt (Tabelle 9). Das erhaltene PCR Produkt wies eine Größe von ca. 1100 Basenpaare auf. Das extrahierte PCR wurde sequenziert und mit der Sequenz aus dem Mittelteil in Übereinstimmung gebracht. Ein Teil der gemeinsamen Aminosäureüberlagerungssequenz betrug „YLT“ (Ende der Sequenz aus dem Mittelteil) bzw. „YIT“ (Anfang der Sequenz nach der 3'-RACE PCR). Nach wiederholter Sequenzierung konnte bei der vakanten Position um Leucin und Isoleucin das Isoleucin bestätigt werden. Das 3'-RACE-PCR Produkt enthielt zusätzlich zu der Übergangssequenz die aus der *Mau_1*/*Mau_2* PCR fehlenden zwei Peptide mit den Massen 1305.73 sowie 793.34 (Tabelle 35).

Die Lokalisation der gesamten aus der Massenspektrometrie von Mauritanicain erhaltenen Massensignale ist in der Tabelle 36 dargestellt. Die Sequenzierungsdaten mit der passenden Aufschlüsselung sind in den Abbildungen 39-42 dargestellt. Die Auflösung der Messsignale ist vom 5'- bis zum 3'-Ende lückenlos, die einzelnen Messsignale sind gut aufgelöst. Die unterschiedlichen Intensitäten der Messsignale kommen daher, dass die Sequenzierung insgesamt aus drei einzelnen Sequenzierungen zusammengesetzt wurde. Mittels Sanger-Sequenzierung können bis ca. 1100 Basen sicher bestimmen werden. Da Mauritanicain aus 769 Aminosäuren besteht, musste hier eine differenzierte Sequenzierung eingesetzt werden. Das PCR Produkt wurde zweimal in unabhängigen Versuchen sequenziert. Die Daten lieferten übereinstimmende Ergebnisse.

Die Aufklärung der Proteinsequenz von Mauritanicain kann genutzt werden, um das Protein in Zukunft gentechnisch herstellen zu können, um es für industrielle und medizinische Einsätze in großer Menge zur Verfügung zu stellen. Wie Flemmig in seiner Dissertation bereits gezeigt hat, besitzt Mauritanicain sowohl die Fähigkeit Plasmin aus Plasminogen freizusetzen, als auch die Hydrolyse von Fibrin und Fibrinogen zu katalysieren [161]. Die Behandlung von Patienten mit Schlaganfällen und Gewebeinfarkt, bei denen keine genaue Zeit zwischen Infarkt und Behandlung festgestellt werden kann, könnte mit dem gentechnischen Mauritanicain eine neue Dimension in der Behandlung sowohl in der Notfallversorgung durch Notärzte, als auch in der fortgeschrittenen Therapie solcher Patienten darstellen. Die Standardmedikation mit Heparinen birgt das Risiko auf allergische Reaktionen. Diese könnten unter Umständen mit Mauritanicain als Therapieoption umgangen werden. Die gentechnische Herstellung von Mauritanicain ist somit von besonderer Bedeutung und könnte ein wichtiges Forschungsthema für die Zukunft darstellen.

Tabelle 36. Proteinsequenz von Mauritanicain.

In rot eingefärbt sind die durch die Massenspektren von Mauritanicain detektieren Peptidfragmente.

10	20	30	40	50	60
QHGLIHPYVS	IVIPLIFFFL	SLASKSFSSP	LSNNHPQTFI	VFMSKSHKPT	LFSSYHHWYS
70	80	90	100	110	120
SIINSLPPSP	HSPEILYTYP	ESISGFSAARI	TPDQAEALRR	VYGVIVHVIPD	TINQLH TTRT
130	140	150	160	170	180
PQFLGLSSGS	GLWPDGDYGD	DIIIGVLDTG	VWPGHPSFSD	SGMSDVPASW	KGSCETTDDF
190	200	210	220	230	240
PSSVCNKKLI	GAKAFYRGIN	ASKDTHSPKD	TNGHGHTAS	TAGGSLVRNA	SFYQYAKGDA
250	260	270	280	290	300
RGMATKARIA	VYKVCWSSGC	WSTDILAAYG	EAIGDGVHVI	SLSVGSKSLA	SPYFVDATAI
310	320	330	340	350	360
GAFVASAQYG	IIVSCSAGNS	GPGAHTAVNI	APWILTVGAS	TIDREFR ADV	TLGDGR TFRG
370	380	390	400	410	420
ATLYAGEPLT	DEMLPLVYAR	DAGSRFCTAG	SLDSSKVKGK	IVLCDNGVIQ	R TEKGIEVNR
430	440	450	460	470	480
AGGVGMIVRN	AIDDQTLAAD	AYFLTPATTV	SLTDGTAIY	YIIYNDSPKA	KIVFHGSVIS
490	500	510	520	530	540
DSPAAPKVAS	FSSR GPNIIT	TEILKPDVIA	PGVMVLAWGT	GAAPPSKLDV	DPRRVEFWLD
550	560	570	580	590	600
SGTSMSCPHV	SGLAALLR NA	HPNWSPAAIK	STLMTTAYNL	DNSNETIGDI	ATGK ASTPFD
610	620	630	640	650	660
R GAGHIDPNA	ALDPGLVYDI	DQDEYISFLC	AIGYNSTQIS	VLTKKTEPGD	ICDTHMGNPG
670	680	690	700	710	720
NLNYPFSVSV	FEDTSSAVTY	VRTVKNVGSS	PNAVYEVNVN	APANVDVDVS	PRVLKFSETD
730	740	750	760		
VLSYEITFS	SSSGSYSSSF	GSIAWSGDIH	TVTSPIAVWV	KEGMSVASI	

Tabelle 37. DNA Sequenz von Mauritanicin.

15	30	45	60
CAACATGGGCTAATT	CATCCATATGTCTCC	ATTGTCATCCCTCTC	ATCTTCTTCTTCCTT
75	90	105	120
TCTTTAGCCTCTAAA	TCTTTCTCTTCACCA	TTATCTAATAATCAT	CCTCAAACATTCATT
135	150	165	180
GTCTTCATGTCCAAA	TCACACAAGCCTACC	CTCTTCTCCTCCTAT	CACCATTGGTACTCC
195	210	225	240
TCAATCATCAACTCC	CTTCTCCATCGCCT	CACTCTCCCAGATC	CTTTACACGTATCCC
255	270	285	300
GAATCCATTAGTGGA	TTCTCCGCCCGAATC	ACTCCCGATCAAGCT	GAAGCATTACGCCGA
315	330	345	360
GTTTATGGTGTAATC	CATGTCATCCCGGAC	ACGATCAACCAACTC	CATACCACTCGCACC
375	390	405	420
CCTCAATTTTTAGGC	CTTTCTTCTGGCTCT	GGCCTTTGGCCGGAT	GGTGATTATGGTGAT
435	450	465	480
GACATTATCATTGGT	GTCCTTGACACCGGA	GTATGGCCCGGACAT	CCGAGTTTTTCGGAC
495	510	525	540
TCCGGGATGTCTGAT	GTTCCGGCTAGTTGG	AAAGGAAGTTGCGAA	ACAACGGATGATTTT
555	570	585	600
CCTTCTTCCGTGTGC	AACAAGAAACTTATA	GGCGCGAAAGCGTTT	TATCGTGTTATAAT
615	630	645	660
GCATCAAAAGATACA	CATTCTCCTAAAGAC	ACGAACGGCCACGGC	ACTCATAACAGCGTCG
675	690	705	720
ACAGCGGGTGGCTCT	TTGGTACGAAATGCG	AGCTTTTACCAATAC	GCAAAGGGCGATGCT
735	750	765	780
CGTGGTATGGCCACG	AAGGCGCGAATTGCT	GTTTATAAGGTTTGT	TGGTCAAGCGGATGC
795	810	825	840
TGGTCCACGGATATT	CTAGCAGCCTATGGT	GAAGCTATTGGAGAT	GGTGTCCATGTGATC
855	870	885	900
TCTTTATCTGTGCGGT	TCGAAAAGCTTAGCT	TCTCCGTATTTTGTA	GATGCCACAGCAATT
915	930	945	960
GGGGCATTGTAGCA	TCAGCTCAATATGGT	ATCATCGTGTCTGT	TCTGCGGGGAATTCG
975	990	1005	1020
GGTCCTGGTGCACAC	ACTGCTGTTAACATT	GCCCCTTGGATTCTA	ACCGTAGGCGCTTCT
1035	1050	1065	1080
ACCATTGATAGGGAG	TTTCGAGCGGATGTT	ACTCTTGGCGATGGG	AGAACTTTTCGAGGG
1095	1110	1125	1140
GCAACGCTCTATGCG	GGTGAGCCTTTAACC	GATGAAATGCTTCCA	TTAGTGTACGCGCGT
1155	1170	1185	1200
GACGCTGGAAGTAGA	TTTTGTACCGCGGGG	AGTTTGGATTTCGTCG	AAAGTTAAAGGTAAA
1215	1230	1245	1260
ATTGTGCTTTGTGAC	AATGGAGTGATTCAA	AGAACGGAAAAAGGC	ATTGAAGTGAATCGT
1275	1290	1305	1320
GCGGGTGGCGTTGGA	ATGATAGTTCGTAAT	GCGAAAGACGATCAA	ACGCTCGCTGCTGAT
1335	1350	1365	1380
GCTTATTTTCTTACA	CCGGCTACCACGGTT	AGCTTAACCGATGGA	ACGGCTATTATATAT
1395	1410	1425	1440
TACATCATATATAAC	GATTGCCTAAAGCA	AAAATCGTCTTCCAT	GGATCGGTAATTTTCG

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1455	1470	1485	1500
GATTCACCAGCAGCT	CCTAAAGTCGCATCA	TTTTCAAGTCGCGGT	CCAAACTATATAACG
1515	1530	1545	1560
ACCGAAATCCTAAAG	CCGGATGTTATAGCA	CCC GGT GTT ATG	GTT TTG GCT GGT
1575	1590	1605	1620
TGGACCGGTGCTGCT	CCGCCTTCAAAGTTA	GATGTTGATCCTAGA	CGAGTCGAGTTTTGG
1635	1650	1665	1680
CTCGATTCGGGTACA	TCAATGTCTTGTCTT	CACGTGAGCGGACTT	GCAGCTTTGCTACGA
1695	1710	1725	1740
AATGCGCACCCGAAT	TGGTCTCCAGCAGCG	ATCAAATCCACTCTA	ATGACTACCGCTTAT
1755	1770	1785	1800
AATTTGGATAATTCT	AACGAAACCATCGGT	GACATTGCTACTAGC	AAAGCCTCAACACCC
1815	1830	1845	1860
TTTGATCGCGGAGCT	GGACACATCGATCCT	AATGCCGCTCTTGAT	CCCGGACTAGTCTAC
1875	1890	1905	1920
GACATTGATCAAGAC	GAGTATATCTCATTT	CTATGCGCAATTGGT	TACAATTCGACGCAA
1935	1950	1965	1980
ATTTCTGTACTTACG	AAAAAGACTGAGCCT	GGAGATATATGTGAT	ACGCATATGGGCAAC
1995	2010	2025	2040
CCGGGAAACCTCAAC	TACCCATCATTTTCG	GTTGTTTTTCGAGGAT	ACCTCGTCCGCGGTA
2055	2070	2085	2100
ACATATGTGAGGACA	GTGAAGAATGTGGGA	AGTTCTCCTAACGCG	GTTTATGAAGTGAAC
2115	2130	2145	2160
GTTAATGCTCCCGCG	AATGTAGATGTCGAT	GTGTCACCGCGAGTT	CTAAAGTTTAGCGAA
2175	2190	2205	2220
ACGGATGTGAGCTTA	TCGTATGAAATAACA	TTCTCGAGTAGCTCG	GGTTCATATTCGAGT
2235	2250	2265	2280
AGTTTTGGATCGATT	GCATGGAGCGATGGA	ATTCACACTGTTACA	AGTCCCATTGCTGTT
2295	2310		
GTGTGGAAAGAAGGA	ATGTCCGTGGCTTCA	ATT TGA	

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

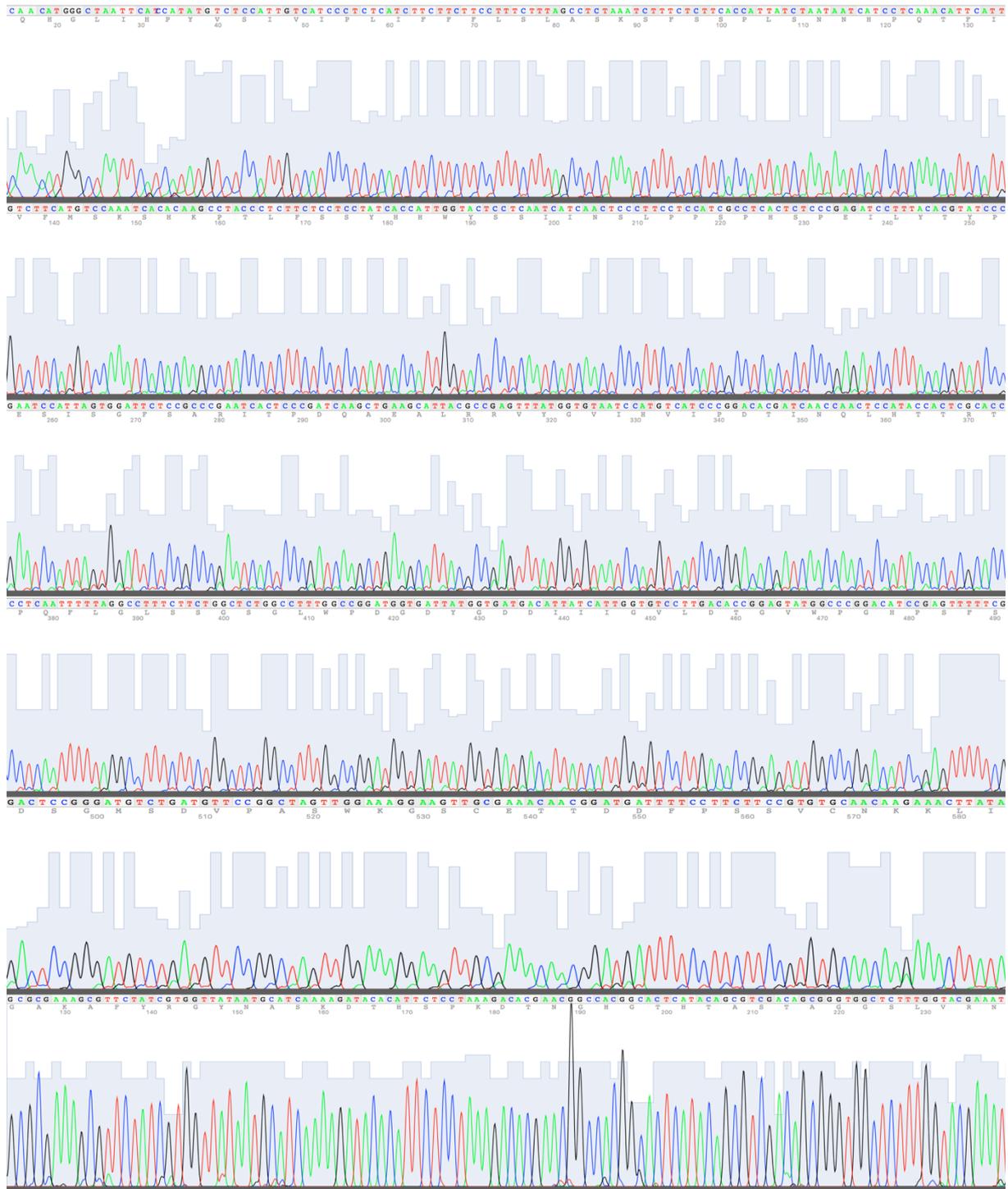


Abbildung 39. Sequenzierungsdaten von Mauritanicin Teil 1.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

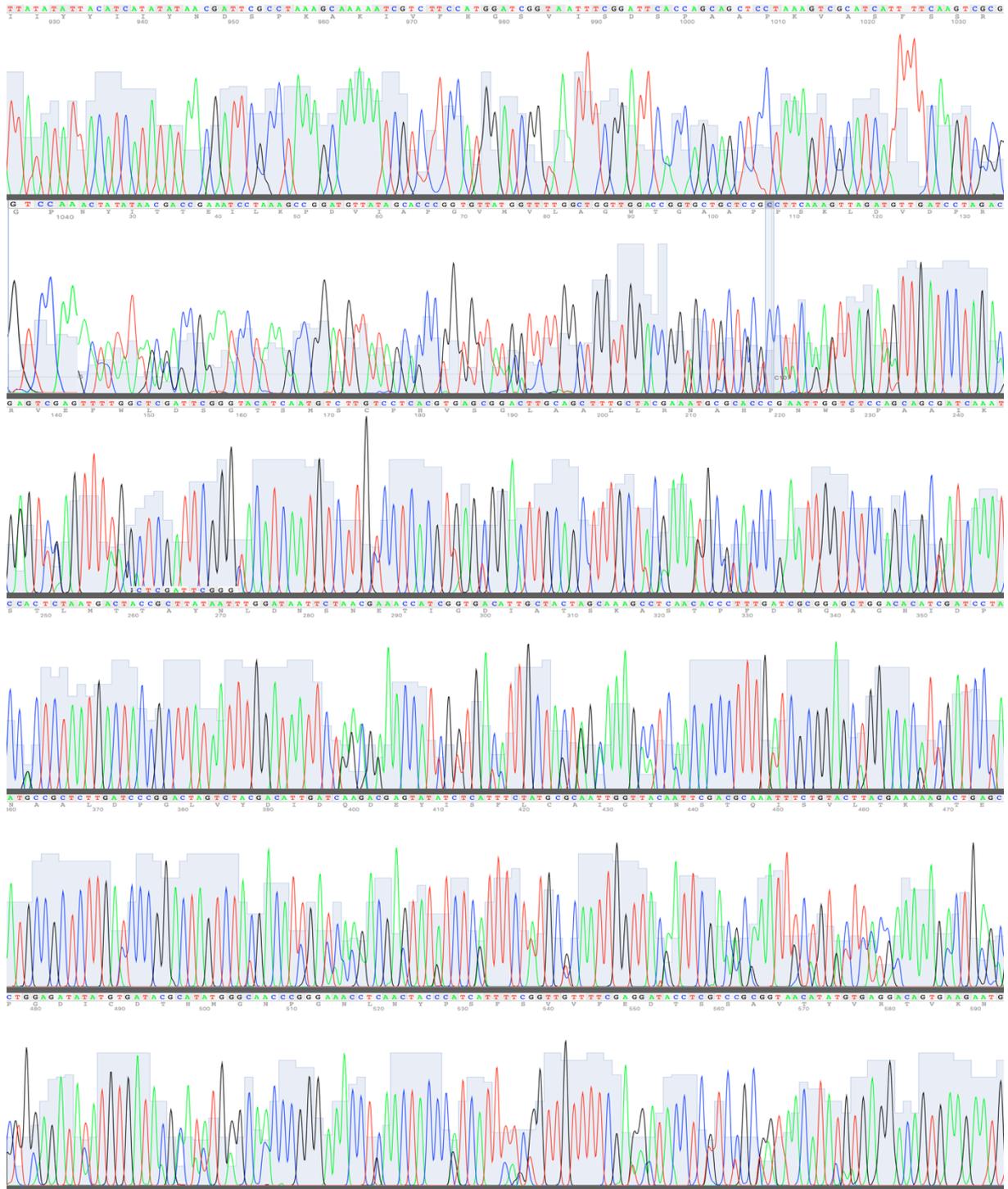


Abbildung 41. Sequenzierungsdaten von Mauritanicin Teil 3.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

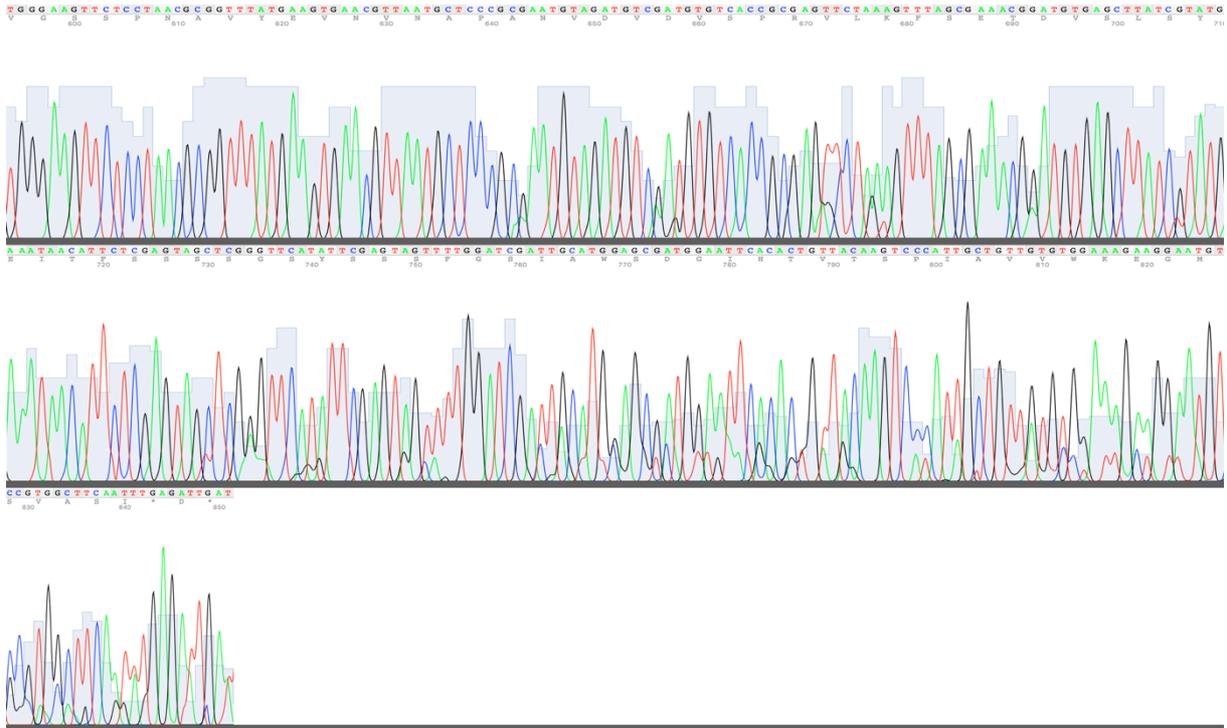


Abbildung 42. Sequenzierungsdaten von Mauritanicin Teil 4.

3.2.5 *In silico* Homologiemodell von Mauritanicain

In Zusammenarbeit mit Szymon Pach aus der Arbeitsgruppe molekulares Wirkstoffdesign von Prof. Dr. G. Wolber wurde ein Homologiemodell erstellt. Ein Homologiemodell dient zum einen der dreidimensionalen Visualisierung von Proteinen und zum anderen als Grundlage für ein molekulares Dynamikmodell.

Das Homologiemodell von Mauritanicain wurde mit Hilfe des Swiss-Model Servers erstellt [142]. Das endgültige Homologiemodell wurde auf Basis der Subtilisin-ähnlichen Protease aus Tomaten (pdb-Code: 3i74 [143]) erstellt, da in der originalen Cucumisin-Kristallstruktur mehr als 30 Aminosäuren fehlten. Das Protein 3i74 hatte 41% Sequenz-ähnlichkeit zu Mauritanicain. Das Homologiemodell von Mauritanicain wurde unter Verwendung des Swiss-Model-*Builders* angepasst. Das Homologiemodell wurden manuell mit der Software MOE 2015.10 [162] ausgerichtet und die Disulfidbindungen angepasst.

Tabelle 38. Disulfidbrücken in den Proteinen 3vta und 3i74.

Protein	Positionen der Disulfidbrücken		
3vta	166 - 174	245 - 250	380 - 397
3i74	70 - 181	-	382 - 401

Die Subtilisin-ähnliche Protease 3i74 aus der Tomate enthält zwei Disulfidbindungen, da die Reste, welche in Cucumisin den Positionen 245 und 250 entsprechen, Serin und Threonin sind (Tabelle 38). Weil die homologen Cysteinreste (271 und 288) in Mauritanicain eine geeignete Geometrie zur Bildung einer Disulfidbrücke aufwiesen, wurden diese manuell hinzugefügt und das Modell unter Verwendung des Amber 10-Kraftfelds bei Standardeinstellungen energieminiert [163]. Der Ramachandran-Plot [164] des Homologiemodells zeigte eine geeignete Diederwinkel-Geometrie (Abbildung 43).

Die Abbildung 44 zeigt das *in-silico* Homologiemodell von Mauritanicain. Die unterschiedlichen Polaritäten von Mauritanicain sind in der Abbildung farbig dargestellt. Lipophile und hydrophile Oberflächenstrukturen sind an der Proteinoberfläche gleichmäßig verteilt. Die Bindungstasche von Mauritanicain, in welcher Substrate gebunden werden können, bildet eine Vertiefung in der Oberfläche.

Das aktive Zentrum bilden die Aminosäuren Asparaginsäure₍₃₂₎, Histidin₍₉₈₎ und Serin₍₄₂₈₎ (Abbildung 46). Wie für Serinproteasen typisch spaltet auch Mauritanicain in einer katalytischen Triade (Abbildung 47). Die Abbildung 45 zeigt eine gesamte Übersicht des Homologiemodells von Mauritanicain aus unterschiedlichen Winkeln. Das Protein wurde in dieser Abbildung immer um 90° nach links gedreht, sowohl in horizontal, als auch in vertikaler Achse.

Mit Hilfe eines Homologiemodells erhält man eine räumliche Vorstellung des Proteins. Mit der Röntgenkristallographie lassen sich durch Röntgenstrahlen Kristallstrukturen nachweisen. Dieses Verfahren wird genutzt, um reale Abbildungen von Proteinen zu erlangen. Das Problem dieser Methode ist aber, dass ein Protein in einer Kristallstruktur präzipitiert und dadurch ein flexibles Molekül in eine Geometrie gezwungen wird. Mit weniger Aufwand und mit vorhandener Aminosäuresequenz von dem Zielprotein ist ein *in-silico* Homologiemodell eine sehr gute Option, Proteine zu visualisieren.

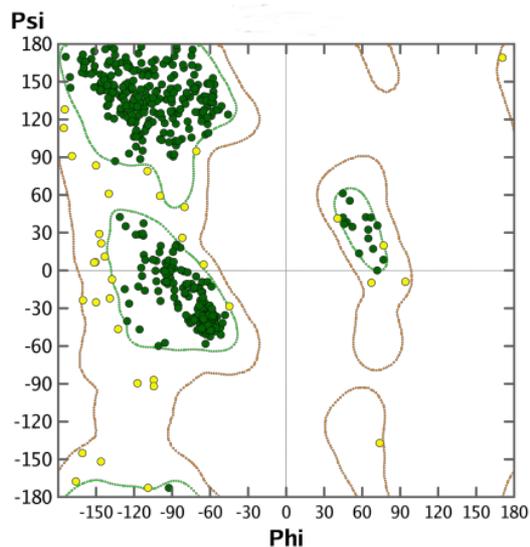


Abbildung 43. Ramachandran-Plot des Homologiemodells von Mauritanicain.

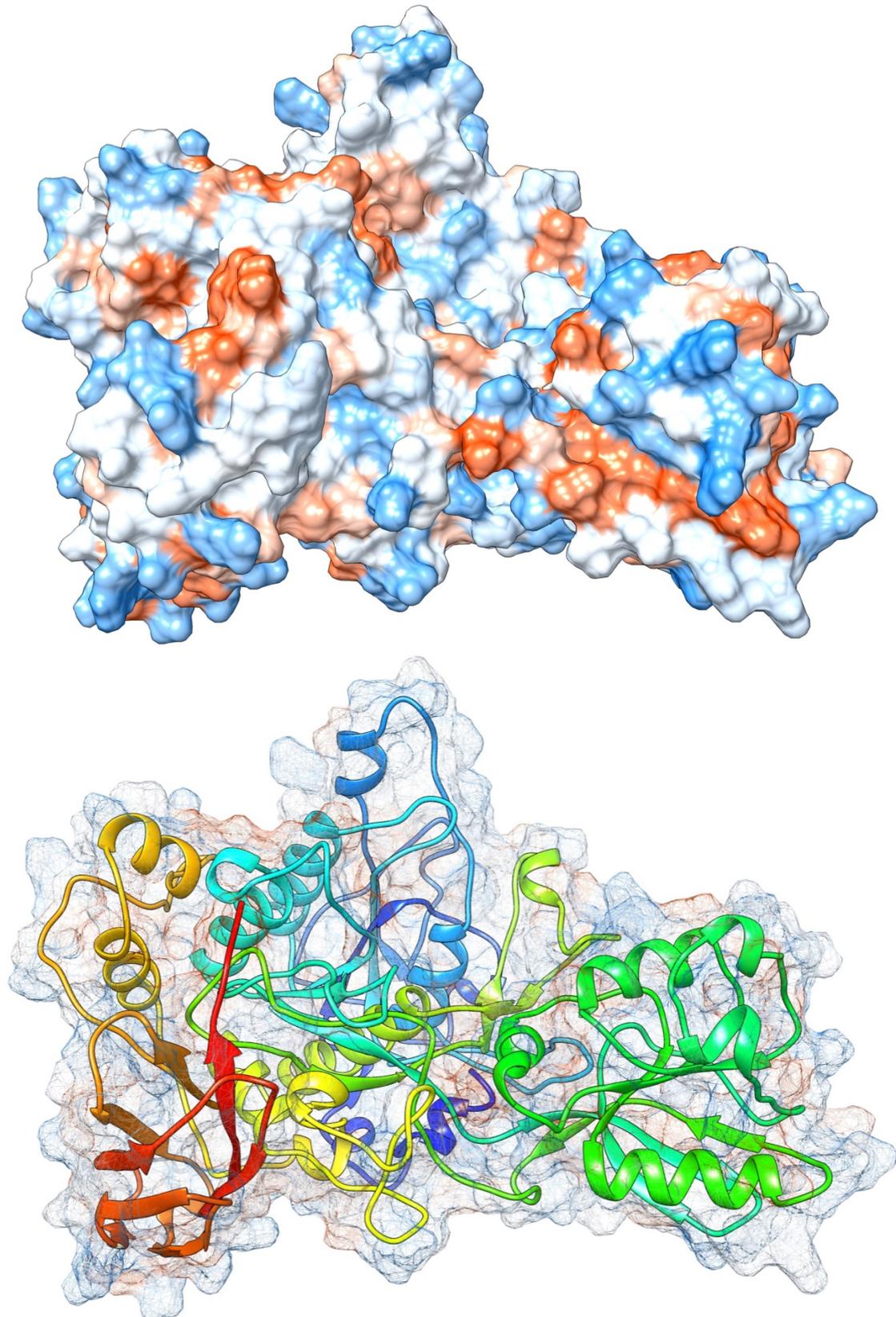


Abbildung 44. *In-silico* Homologiemodell von Mauritanicin.

Die obere Abbildung zeigt das Homologiemodell von Mauritanicin und dessen Oberflächenstruktur; Hydrophile Oberflächenstrukturen: blau; Lipophile Strukturmerkmale: orange (schwach) und rot (stark). Die untere Abbildung zeigt die Quartärstruktur des Homologiemodells von Mauritanicin. Die Abbildung wurde mit dem Programm UCSF Chimera, Candidate Version 1.13.1 angefertigt.

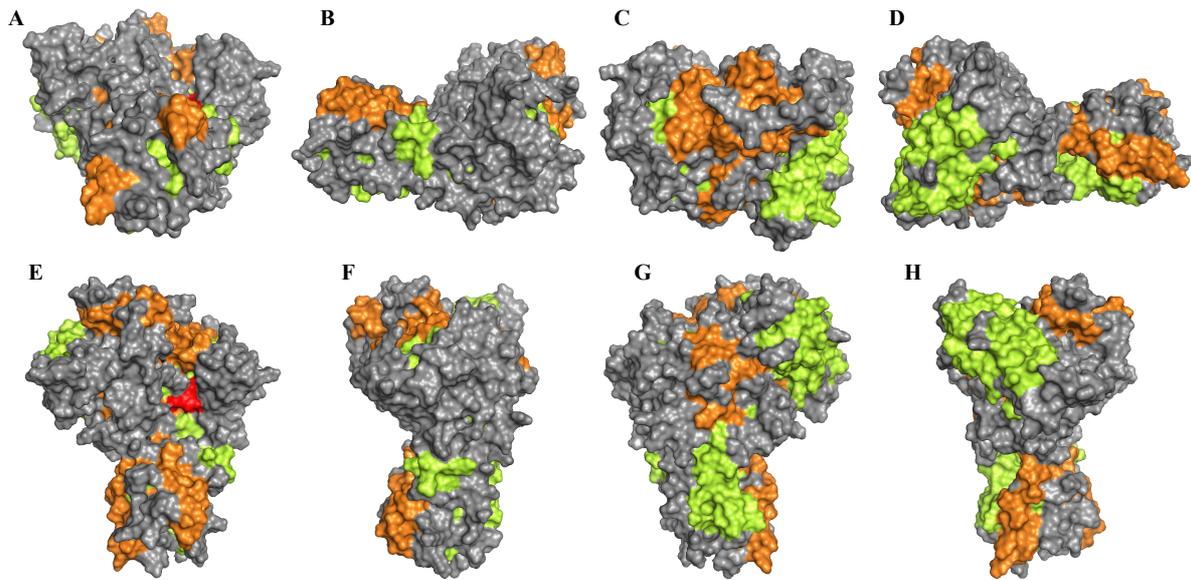


Abbildung 45. Homologiemodell von Mauritanicain aus verschiedenen Winkeln.

Die Abbildung zeigt das Homologiemodell Mauritanicain aus verschiedenen Winkeln. Das Protein wurde jeweils um 90° nach links gedreht (A-D: horizontale Achse; E-H: vertikale Achse). Aminosäuren des aktiven Zentrums: rot; Beta-Faltblätter: grün; Alpha-Helices: orange. Die Abbildung wurde mit MacPyMOL: PyMOL v1.7.4.5 Edu Enhanced angefertigt.

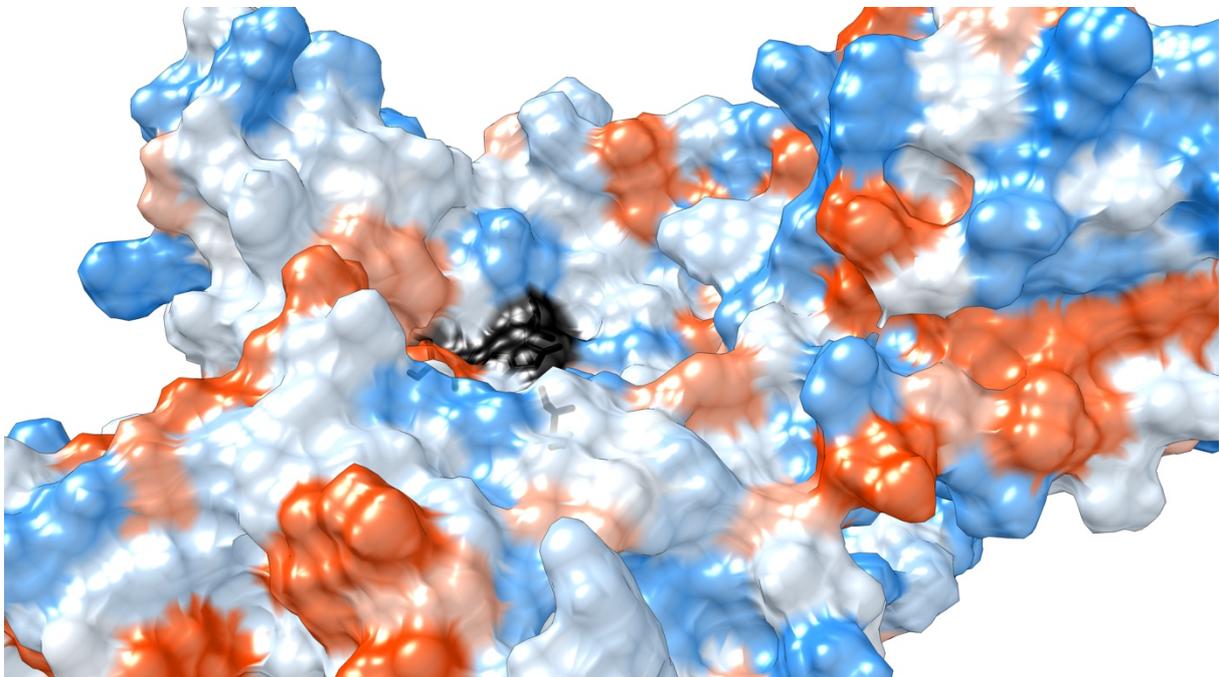


Abbildung 46. Oberflächenstruktur der Bindungstasche von Mauritanicain.

Mit schwarz dargestellte Oberflächenstruktur zeigt die Aminosäuren des aktiven Zentrums von Mauritanicain. Die Abbildung wurde mit dem Programm UCSF Chimera, Candidate Version 1.13.1 angefertigt.

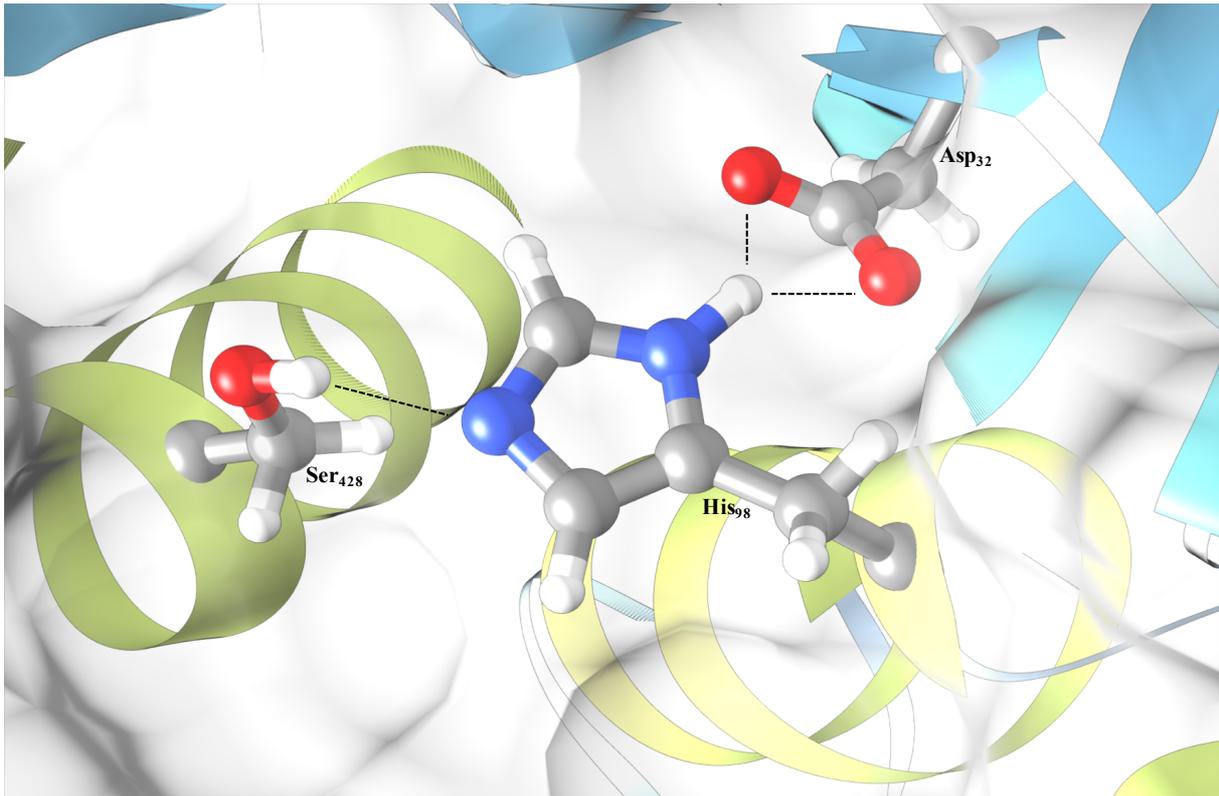


Abbildung 47. Aktives Zentrum von Mauritanicin mit den Aminosäuren Asparaginsäure₍₃₂₎, Histidin₍₉₈₎ und Serin₍₄₂₈₎. Die Abbildung zeigt die Bindungstasche von Mauritanicin und die an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäuren Asparaginsäure₍₃₂₎, Histidin₍₉₈₎ und Serin₍₄₂₈₎. Die an der katalytischen Triade beteiligten Aminosäuren sind in zwei alpha-Helices und ein beta-Faltblatt eingebaut. Die Abbildung wurde mit dem Programm UCSF Chimera, Candidate Version 1.13.1 angefertigt.

Zur weiteren Validierung des Homologiemodells von Mauritanicin wurde eine Molekulardynamik (MD)-Simulation in Triplikate durchgeführt, um die Stabilität des Modells zu demonstrieren. Wenn das Homologiemodell im Dynamikmodell zerfällt, wäre das ein Hinweis darauf, dass das Homologiemodell fehlerhaft ist und nicht genutzt werden kann. Ein weiterer Hinweis auf ein stabiles Homologiemodell liefert die Bewegung der Aminosäuren der katalytischen Triade. Diese sollten nicht flexibel sein, da in der Realität das Protein in der Lage sein muss, Substrate schnell umzusetzen. Über die gesamte Zeit von 100 ns blieb das Homologiemodell in der MD-Simulation intakt. Während das Homologiemodell in der MD-Simulation hoch flexible Regionen in den Aminosäure-Regionen zwischen 272-285, 406-420 und 530-540 aufzeigte, bewegten sich die Aminosäuren der katalytischen Triade nicht weiter als $\pm 0,6 \text{ \AA}$ auseinander (Abbildung 48). Eine kovalente Bindung zwischen zwei sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffen beträgt zum Vergleich ca. $1,54 \text{ \AA}$.

Wenn man die Bewegung der katalytischen Triade mit der Länge einer kovalenten Kohlenstoffbindung ins Verhältnis setzt, wird deutlich, wie wenig sich die Aminosäuren der katalytischen Triade voneinander bewegen und wie stabil das Homologiemodell ist.

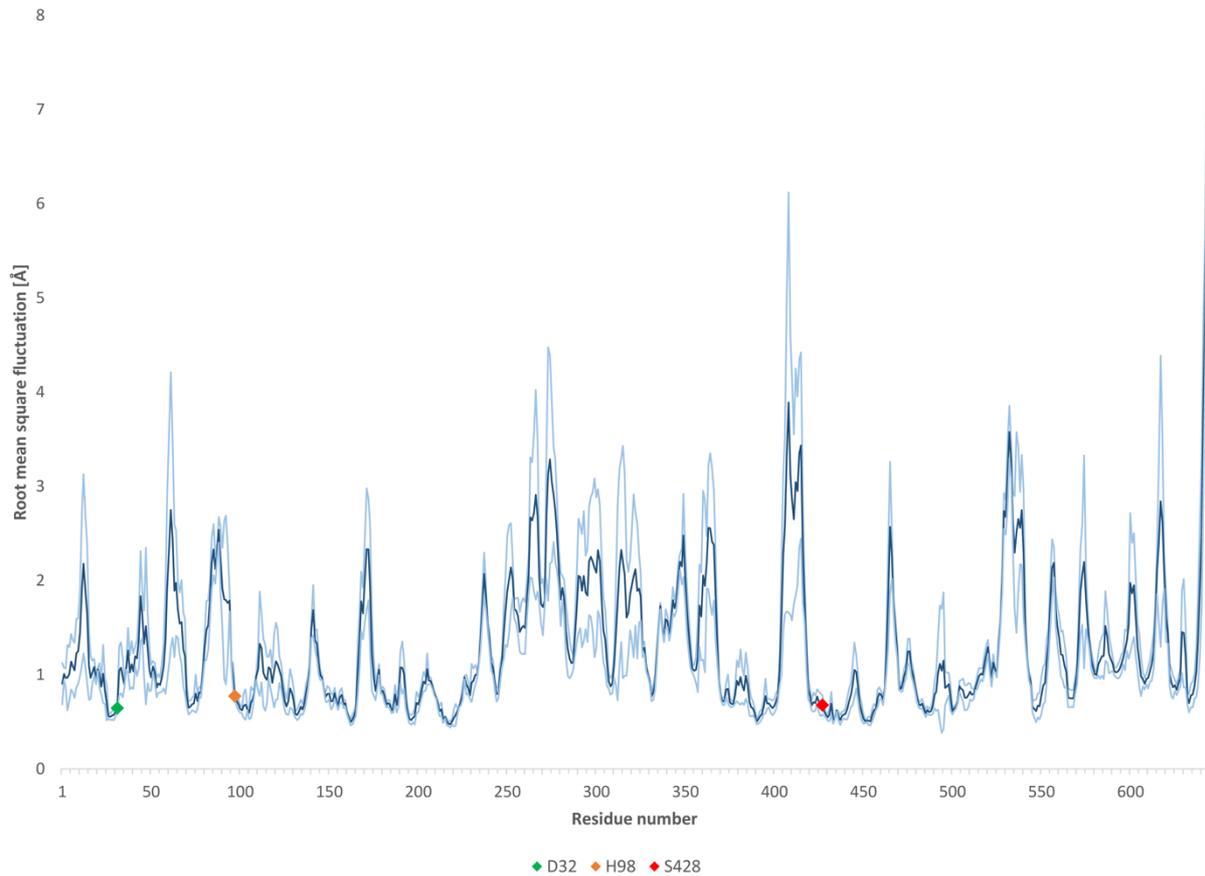


Abbildung 48. Molekulares Dynamik Modell von Mauritanicain.

Die Abbildung zeigt die mittlere quadratische Fluktuation der Aminosäuren in Mauritanicain in Ångström (Å) über 100 ns; dunkelblaue Linie: mittlere Schwankung; hellblaue Linien: positive und negative Abweichung vom Mittelwert; $n=3$; Farbige Rauten zeigen die Aminosäuren Asparaginsäure₍₃₂₎, Histidin₍₉₈₎ und Serin₍₄₂₈₎ der katalytischen Triade.

3.2.6 Massenbestimmung von Mauritanicain

Anhand der Proteinsequenz von Mauritanicain lässt sich rechnerisch eine Gesamtmasse von 68.582,68 Da bestimmen. Die Bestimmung der Gesamtmasse mittels Massenspektrometrie ergab im Mittelwert 72.751 Da \pm 15 Da. Dieser setzt sich aus der Gesamtmasse des einfach geladenen Mauritanicains (72.747 Da), des doppelt geladenen Mauritanicains (36.373 Da (entspricht 72.746 Da)) und der Masse des dreifach geladenen Mauritanicains (24.255 Da (entspricht 72.765 Da)) zusammen. Die Differenz aus der errechneten und der im MS bestimmten Masse beträgt 4.169 Da.

Eine mögliche Ursache für die Differenz können Glykosylierungsstellen im Protein sein. Proteine werden nach der Proteinbiosynthese häufig glykosyliert, da sie durch verknüpfte Zucker gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen stabilisiert werden und ihre räumliche Struktur behalten. Dafür können Zucker sowohl über Sauerstoff, als auch über Stickstoff mit dem Protein verknüpft sein [165].

Um erste Hinweise auf mögliche Glykosylierungen zu erhalten, wurde die Aminosäuresequenz von Mauritanicain zunächst mit dem Onlinetool „NetNGlyc 1.0“ der Technischen Universität von Dänemark analysiert [166]. Dieses Onlinetool sucht nach potentiellen N-Glykosylierungsstellen in der Aminosäuresequenz und berechnet deren Wahrscheinlichkeit anhand von Datenbanken. Ab einem Potential von 0,5 ist es wahrscheinlich, dass ein Protein an dieser Position glykosyliert ist. Mauritanicain hatte drei mögliche Positionen Glykosylierungsstellen („NASK“, „NETI“ und „NSTQ“) (Abbildung 49).

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	84 NASK	0.7120	(9/9)	++
Sequence	113 NASF	0.4674	(6/9)	-
Sequence	348 NDSP	0.1510	(9/9)	---
Sequence	446 NWSP	0.1216	(9/9)	---
Sequence	467 NETI	0.5443	(6/9)	+
Sequence	518 NSTQ	0.6662	(9/9)	++

Abbildung 49. Mögliche N-Glykosylierung von Mauritanicain.

Im nächsten Schritt wurde versucht, isoliertes Mauritanicain experimentell mittels einer N-Glykosidase, der PNGase A, zu deglykosylieren, um mögliche Zuckerreste vom Protein abzutrennen. Sollte Mauritanicain Zuckerreste haben, die, wie zu vermuten, über Stickstoff mit dem Mauritanicain verknüpft sind, müsste in anschließender SDS-PAGE ein Größenunterschied zwischen behandelten und unbehandelten Mauritanicain erkennbar sein. Abbildung 50 zeigt die SDS-PAGE der Deglykosylierung nach 5 h in Abhängigkeit von unterschiedlichen PNGase Konzentrationen. In dem Versuch zu erkennen ist ein Größenunterschied von Mauritanicain vor und nach der Behandlung mit dem Enzym. Die Konzentration der aufgetragenen Proteinmenge von Mauritanicain betrug in jeder Probe 5 μg , die Konzentration von PNGase A wurde erhöht. In dem Versuch wird deutlich, dass mit zunehmender PNGase A Konzentration die Menge an glykosylierten Mauritanicain geringer wird und zwei kleinere Proteinbanden zwischen der originalen Mauritanicain Bande (72,7 kDa) und PNGase A (63,8 kDa) aufwies. Die Ergebnisse des Onlinetools konnten durch den Versuch bestätigt werden. Neben dem glykosylierten Mauritanicain entsteht weiterhin deglykosyliertes Mauritanicain mit zwei Unterschiedlichen Größen.

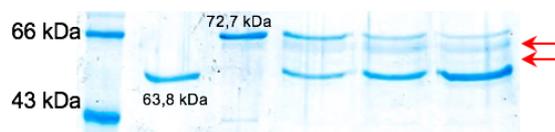


Abbildung 50. Deglykosylierung von Mauritanicain.

Deglykosylierung von Mauritanicain nach 5 Stunden Inkubation mit PNGase A; Bahn 1 v.l.: Größenmarker Roth®-Mark Standard; Bahn 2 v.l.: 7,5 U/mL PNGase A; Bahn 3 v.l.: Mauritanicain (5 μg) unbehandelt; Bahn 4 v.l.: Mauritanicain (5 μg), deglykosyliert mit 5 U/mL PNGase A; Bahn 5 v.l.: Mauritanicain (5 μg), deglykosyliert mit 10 U/mL PNGase A; Bahn 6 v.l.: Mauritanicain (5 μg), deglykosyliert mit 20 U/mL PNGase A; Gelkonzentration: 10%; 180 V konstant; Trennzeit 45 min.; Temperatur während der Elektrophorese: 4°C; Färbemethode: kolloidale Coomassie Färbung

3.3 Nachweis von PAR2 in HaCaT-Keratinocyten und humanen dermalen Fibroblasten

3.3.1 PAR2 -PCR

Zum Nachweis von PAR2 in den genutzten Zellmodellen wurde sowohl mit der cDNA von Fibroblasten, als auch mit der cDNA der HaCaT-Keratinocyten eine PCR durchgeführt. Dazu wurde zunächst mRNA isoliert, welche dann für die PCR in cDNA umgeschrieben wurde. Mit den ausgewählten Primern für den humanen PAR2 sollte ein PCR Produkt von 157 Basenpaaren erhalten werden, was mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen wurde. Sowohl das PCR Produkt aus primären humanen dermalen Fibroblasten (Bahn 2), als auch aus den HaCaT-Keratinocyten (Bahn 3) ergaben ein gleichgroßes PCR Produkt bei ca. 160 Basenpaaren. Zum Vergleich wurde eine Negativprobe mit Wasser statt cDNA durchgeführt. Die Negativprobe zeigte eine auffällige Bande auf Höhe der Lauffront (Bahn 1), welche aber deutlich geringer in den positiven PCRs ausgeprägt ist (Abbildung 51; Bahn 2 und Bahn 3). Diese Bande kann von Primer-Polymeren stammen und ist unspezifisch. u im Fall einer positiven PCR muss diese Bande geringer werden, weil die Primer in der neu synthetisierten DNA eingebaut werden und dadurch nicht für Polymerisationen zur Verfügung stehen.

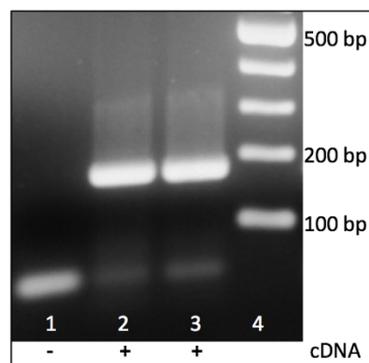


Abbildung 51. Agarose-Gelelektrophorese der PAR2-PCR von HaCaT-Zellen und primären Fibroblasten.

Agarose-Gelelektrophorese der PAR2-PCR von HaCaT-Keratinocyten und primären humanen dermalen Fibroblasten; Agarose-Gel Konzentration: 2%; Trennzeit: 45 min.; Spannung: 130V konst.; Bahn 1: Negativkontrolle mit Wasser anstelle von cDNA; Bahn 2: PCR-Produkt mit cDNA von dermalen primären humanen Fibroblasten; Bahn 3: PCR-Produkt mit cDNA von HaCaT-Keratinocyten; Bahn 4: 2-log DNA Leiter; bp = Basenpaare

3.3.2 Immunhistochemische Färbung von PAR2-Rezeptoren

Als visueller Nachweis für PAR2 wurde eine immunhistochemische Färbung mit humanen Anti-PAR2-Antikörpern und DAPI zur Färbung der Zellkerne durchgeführt. Dazu wurden Keratinozyten und primäre humane dermale Fibroblasten in einer Einzelschicht angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die Färbung sowohl der Keratinozyten (Abbildung 52), als auch der Fibroblasten (Abbildung 53) wies auf das Vorhandensein von PAR2 hin. Im Unterschied zu den Keratinozyten, die PAR2 über die ganze Zellmembran verteilt exprimieren, ist bei den Fibroblasten erkennbar, dass PAR2 regional bevorzugt an der Membranoberfläche präsentiert wird. Deutlich zu erkennen ist eine vermehrte Häufung von PAR2 in der Nähe der Zellkerne. Die Negativkontrolle der Fluoreszenzanregung der Fibroblasten zeigte keine Eigenfluoreszenz. Die Negativkontrolle der Keratinozyten wies eine schwache Eigenfluoreszenz auf, welche sich aber durch den PAR2-Antikörper verstärken lies. Zudem traten mit der Antikörperfärbung stark Fluoreszierende Signale auf, welche einen deutlichen Unterschied zur Eigenfluoreszenz darstellen (Abbildung 52; D-F). Zusammenfassend lässt sich die Anwesenheit der Rezeptoren in den genutzten Zellen nicht nur auf genetischer, sondern auch auf visueller Ebene nachweisen.

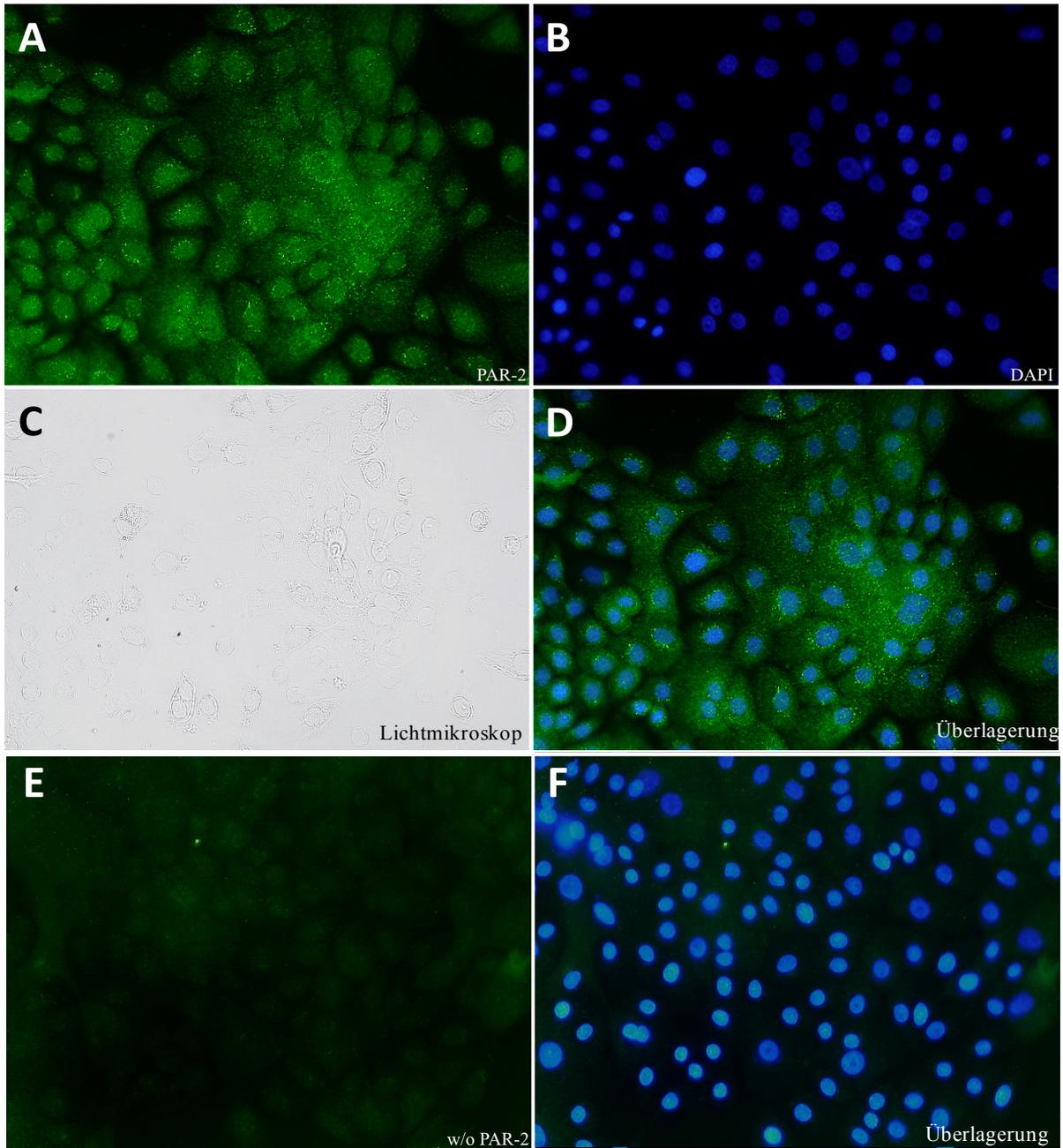


Abbildung 52. Immunhistochemische Färbung der PAR2-Rezeptoren in Keratinozyten.

Immunhistochemische Färbung von Keratinozyten mit humanen Anti-PAR2-Antikörper (grün); A: Fluoreszenzanregung des PAR2-Antikörper; B: Fluoreszenzanregung von 2-(4-Amidinophenyl)-1H-indol-6-carboxamidin (DAPI); C: Kontrolle im Lichtmikroskop ohne Fluoreszenzanregung; die Abbildung D: Überlagerung der PAR2-Antikörper-Fluoreszenzanregung und DAPI-Fluoreszenzanregung (blau; Zellkern); E: Negativkontrolle ohne PAR2-Antikörper; F: Überlagerung der Negativkontrolle ohne PAR2-Antikörper und DAPI-Fluoreszenzanregung optische Vergrößerung: 10-fach

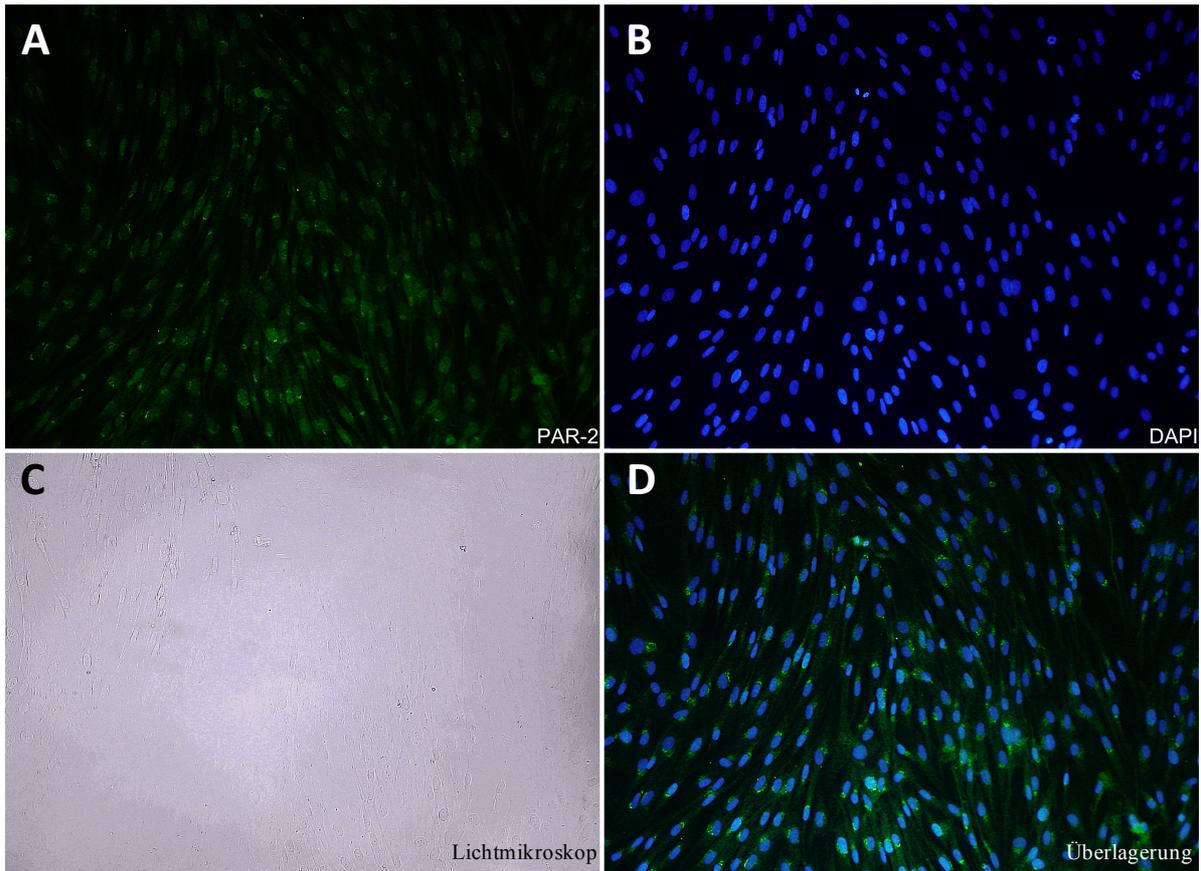


Abbildung 53. Immunhistochemische Färbung der PAR2-Rezeptoren in Fibroblasten.

Immunhistochemische Färbung von Fibroblasten mit humanen Anti-PAR2-Antikörper (grün); A: Fluoreszenzanregung des PAR2-Antikörper; B: Fluoreszenzanregung von 2- (4-Amidinophenyl) -1H-indol-6-carboxamidin (DAPI); C: Kontrolle im Lichtmikroskop ohne Fluoreszenzanregung; die Abbildung D: Überlagerung der PAR2-Antikörper-Fluoreszenzanregung und DAPI-Fluoreszenzanregung (blau; Zellkern); optische Vergrößerung: 10-fach

3.4 Proliferation von HaCaT- Keratinozyten

In dem Versuch wurde nachgewiesen, ob sich Zellen nach Entfernen von FBS weiterhin proliferieren oder ob die Zellteilung stagniert. Dazu wurde die dsDNA nachgewiesen. In diesem Versuch wurde wie in 2.2.3.4 beschrieben die dsDNA nach 4 h und 48 h nach Start des Versuches gemessen. Der Versuch wurde mit HaCaT-Keratinozyten durchgeführt. Die Daten zeigten, dass die Menge an dsDNA nach 4 h mit $34624 \text{ FU} \pm 8569 \text{ FU}$ sich im Vergleich zur Messung nach 48 h mit $36102 \text{ FU} \pm 6196 \text{ FU}$ nicht signifikant unterscheidet (Abbildung 54).

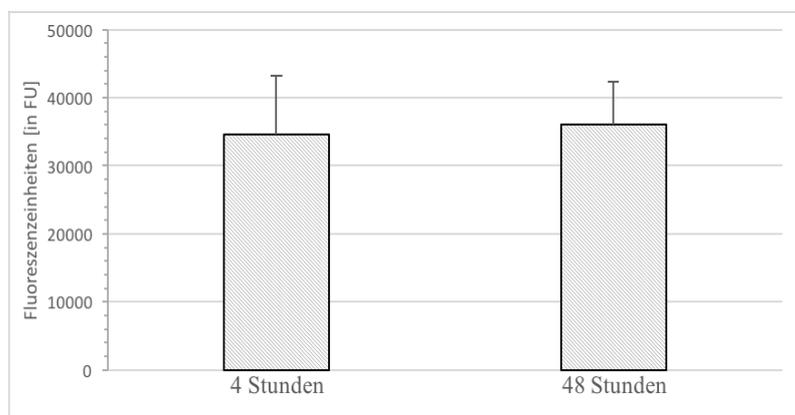


Abbildung 54. Übersicht des dsDNA Gehalts in HaCaT-Keratinozyten.

Die Abbildung zeigt die Menge an dsDNA in Fluoreszenzeinheiten (FU) von HaCaT- Keratinozyten. Die Zellen wurden in einer schwarzen 96-well Platte für 24 h anwachsen gelassen und im Weiteren für 24 h serumfrei gesetzt. Die Balken zeigen die Menge an dsDNA 4 h bzw. 48 h nach Beginn des Zellversuches (n=3, Messverstärkung: 73).

Da die Menge an dsDNA im Verhältnis zur Zellzahl proportional zueinander ist (Abbildung 55), lässt sich aus diesem Versuch ableiten, dass nach 48 h nach beginn des Versuches sich die Zellen nicht vermehrt haben. Anhand dieser Ergebnisse kann gezeigt werden, dass die Zellen sich nicht mehr im Wachstum befinden und somit in der G₀-Phase sind. Wenn der Versuch mit Wachstumsmedium durchgeführt wird, ist eine Detektion der Fluoreszenz nach 48 h nicht mehr möglich, da die Menge an Zellen nach 48 h zu groß ist und dadurch ein zu hohes Messsignal entsteht.

Das lässt den Schluss zu, dass die Zellen ohne Serum nach 48 h sich nicht mehr im Wachstum befinden und folglich für den Versuch als differenziert angesehen werden können.

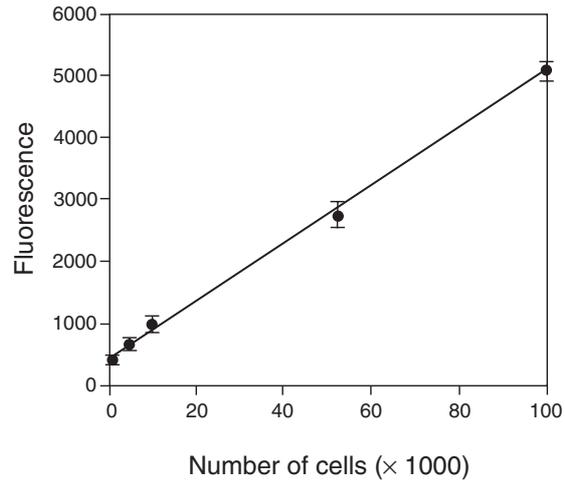


Abbildung 55. Verhältnis zwischen Zellzahl und dsDNA, adaptiert nach FluoReporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit [167].

Die Abbildung zeigt die Menge an dsDNA in Fluoreszenzeinheiten (FU) im Verhältnis zur Zellzahl von 3T3 Zellen [167].

3.5 Bestimmung von IL-8 in HaCaT- Keratinozyten und primären humanen dermalen Fibroblasten mittels ELISA

Der Versuch zur Bestimmung der Freisetzung von IL-8 diente zum einen der Untersuchung zur biologischen Aktivität von Mauritanicain und PMA auf humane primäre dermale Fibroblasten und HaCaT-Keratinozyten und zum anderen zur Untersuchung gemeinsamer Effekte die ausgewählten Hautzellen. Der Versuch ist durch seinen Aufbau eine Aufschlüsselung der Hautmodelle und soll Informationen darüber geben, ob Proteasen und Diterpene miteinander für entzündliche Immunantworten der Haut verantwortlich sein können. Zur Auswertung der Zellversuche wurde eine relative Cytokinfreisetzung gebildet, welche sich prozentual auf den Kontrollwert bezieht. Der Kontrollwert in diesen Versuchen ist die unbehandelte Probe.

Für die Optimierung der Freisetzung von IL-8 in HaCaT-Keratinozyten wurde ein Kinetik-Versuch über 48 h durchgeführt. Dazu wurde Zellmedium nach 24 h und 48 h entnommen und analysiert. Das Zellmedium wurde aus den selben Wells entnommen. In dem Versuch wurde neben den Positivkontrollen 2-Furoyl-LIGRLO-amid und PMA Subtilisin und erhitztes Mauritanicain getestet. Nach der Entnahme des Zellüberstandes wurde das Medium nicht wie üblich mit frischen Medium aufgefüllt. Das bietet den Vorteil, dass die Ergebnisse absolut ausgewertet werden können und ein Abbild der tatsächlichen Freisetzung liefert. Erhitztes bzw. inaktiviertes Mauritanicain zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle keine erhöhte IL-8 Freisetzung nach 48h. Subtilisin und Mauritanicain hatten nach 24 h bzw. 48 h ein ähnliches Freisetzungsprofil. Unterschiede zwischen Mauritanicain und Subtilisin können in der Aktivität am Rezeptor liegen, da unterschiedliche Proteinstrukturen unterschiedliche Bindungsspezifitäten haben, obgleich sie zur gleichen Proteinklasse gehören können. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung innerhalb der ersten 24 h für die Unterschiede in der Freisetzung von IL-8 verantwortlich war. Die IL-8 Freisetzung in der Zeit zwischen 24 h und 48 h ist mit Ausnahme von 2-Furoyl-LIGRLO-amid (30,28 pg/mL) gleich (13,18 pg/mL \pm 1,72 pg/mL) (Abbildung 56). Die 48 h-Freisetzung kann exemplarisch die Freisetzungsverhältnisse darstellen. Da in allen Proben nach 48 h die IL-8 Konzentration im messbaren Bereich des ELISA lag, wurde für weitere Versuche die Freisetzung nach 48h genutzt.

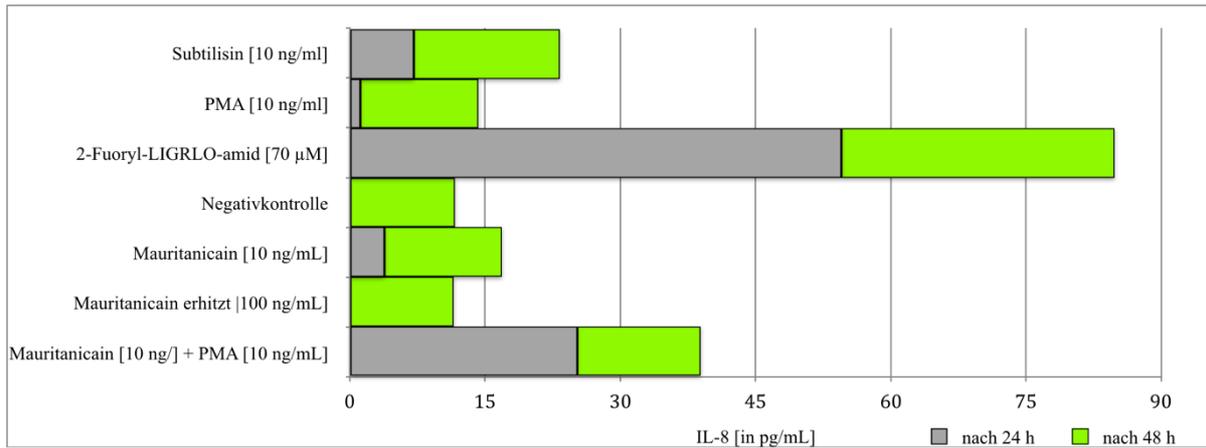


Abbildung 56. Freisetzung von IL-8 über 48h in HaCaT-Keratinocyten.

Die Abbildung zeigt die Freisetzung von IL-8 in HaCaT-Keratinocyten nach 24h und 48h. n=3

In primären humanen dermalen Fibroblasten erhöhte die Inkubation mit PMA die relative IL-8-Freisetzung nach 48 h im Vergleich zur Kontrolle auf $627\% \pm 14\%$. Die Kombination von Mauritanicain und PMA verringerte die Freisetzung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit PMA ($496\% \pm 8\%$). Mauritanicain allein zeigte eine verminderte Freisetzung ($44\% \pm 5\%$), der PAR2-Agonist 2-Fuoyl-LIGRLO-amid unterdrückte ebenfalls die Freisetzung auf $40\% \pm 4\%$ im Vergleich zur Kontrolle. (Abbildung 58)

Die erhaltenen Ergebnisse in der HaCaT-Zelllinie zeigten, dass die Kombination von Mauritanicain und PMA die relative IL-8-Freisetzung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit PMA ($122\% \pm 29\%$) und Mauritanicain ($157\% \pm 16\%$) auf $285\% \pm 12\%$ erhöhte. Der spezifische PAR2-Agonist 2-Fuoyl-LIGRLO-amid erhöhte die relative IL-8-Freisetzung auf $609\% \pm 13$ (Abbildung 57).

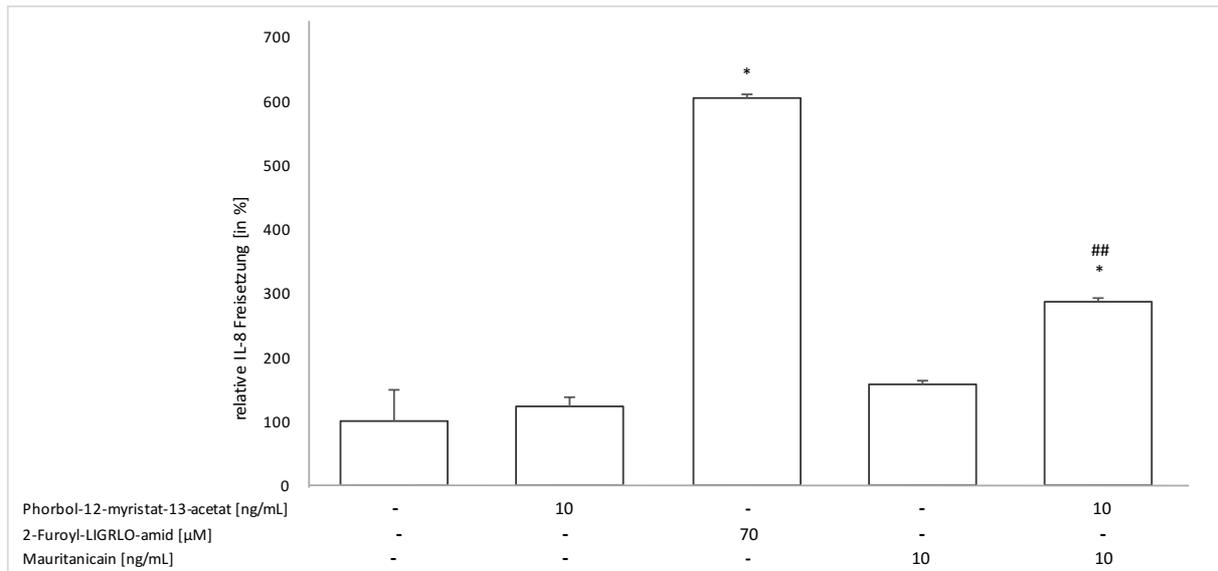


Abbildung 57. IL-8 Freisetzung in HaCaT- Keratinozyten.

Die Abbildung zeigt die relative Freisetzung von IL-8 in Prozent von HaCaT Keratinozyten nach 48 h. Die Positivkontrolle: 2-Furoyl-LIGRO-amid; * = Signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test, $p=0,05$, $n=5$); ## = Signifikant unterschiedlich gegenüber den Einzelsubstanzen; Ausreißer wurden mittels Dean-Dixon und Nalimov-Ausreißertest bestimmt.

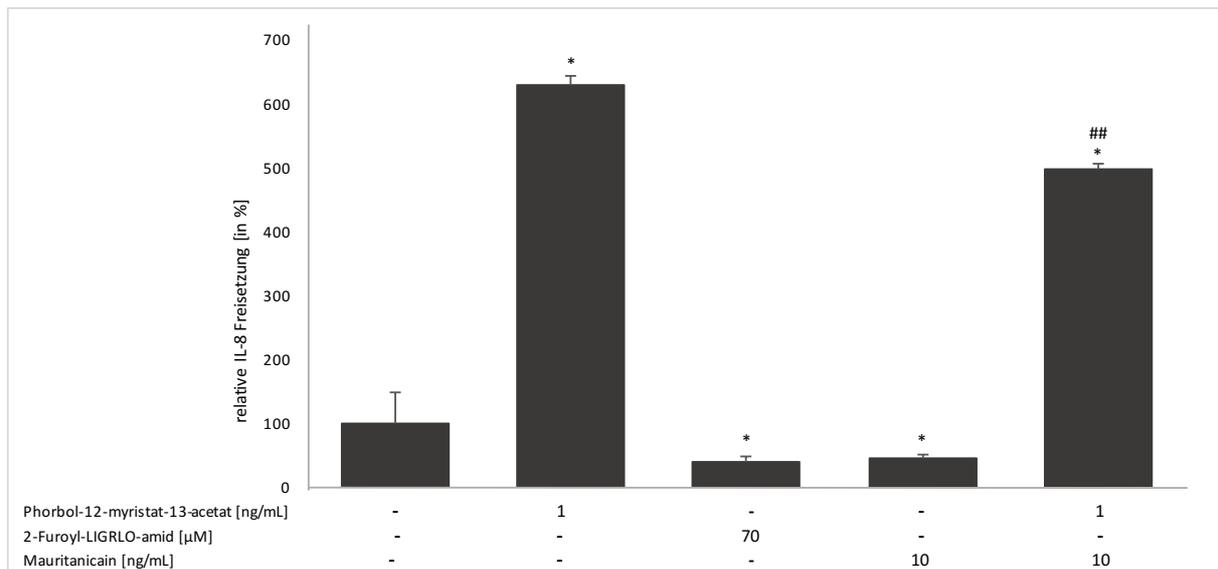


Abbildung 58. IL-8 Freisetzung in primären humanen dermalen Fibroblasten.

Die Abbildung zeigt die relative Freisetzung von IL-8 in Prozent von primären humanen dermalen Fibroblasten nach 48 h. Die Positivkontrolle: 2-Furoyl-LIGRO-amid; * = Signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle (Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test, $p=0,05$, $n=5$); ## = Signifikant erhöht gegenüber den Einzelsubstanzen; Ausreißer wurden mittels Dean-Dixon und Nalimov-Ausreißertest bestimmt.

Die Freisetzung von IL-8 in humanen Hautzellen ist von gesteigertem Interesse, weil IL-8 neben den autokrinen Funktionen wie die Aktivierung von Zellproliferation [168] als pro-inflammatorisches Cytokin eine Schlüsselfunktion in der Auslösung entzündlicher Immunantworten einnimmt und eine Reihe von weiteren Immunreaktionen auslösen kann. Auch wenn Fibroblasten und Keratinozyten keine großen Mengen IL-8 produzieren, kann durch die parakrine Sezernierung von IL-8 schon in geringen Konzentrationen eine physiologische Wirkung ausgelöst werden.

IL-8 aktiviert neutrophile Granulozyten und erhöht die Chemotaxis [168]. Die vermehrte Freisetzung von IL-8 in der Haut bei Patienten mit Psoriasis im Vergleich zu gesunden Patienten wird in der Literatur beschrieben [169]. IL-8 Rezeptoren, welche sich unter anderem auf neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, T-Lymphozyten und dermalen Makrophagen befinden, werden in einer psoriatischen Haut vermehrt exprimiert [170]. Wie wichtig zum einen die Bedeutung von Serin-Proteasen bei entzündlichen Hautkrankheiten und zum anderen die Freisetzung von IL-8 ist, zeigt eine Studie von Limón *et. al.*, die beides miteinander kombiniert. Die Arbeitsgruppe um Limón stellt multifunktionale wasserlösliche Serin-Protease-Inhibitor ummantelte Gold-Nanopartikel her, um damit die Serin-Protease Kallikrein 5 (KLK5) zu inhibieren. Nach Zugabe der Nanopartikel testen sie die Freisetzung von IL-8 an HaCaT Keratinozyten. Das Ziel ist es, eine Option für die therapeutische Behandlung entzündlicher Hautkrankheiten zu schaffen, die gezielt in die Pathophysiologie eingreift. KLK5 zeigt charakteristisch eine erhöhte Aktivität bei entzündlichen Hautkrankheiten wie Rosacea [171]. Die Freisetzung von IL-8 konnte in unserem Versuch sowohl in den HaCaT-Keratinozyten, als auch in den Fibroblasten beobachtet werden, obgleich die Freisetzung von IL-8 durch den PAR2-Agonisten und Mauritanicain stark variiert. So ist in den Fibroblasten eine verringerte Freisetzung zu beobachten, in den Keratinozyten hingegen eine gesteigerte (Abbildung 59).

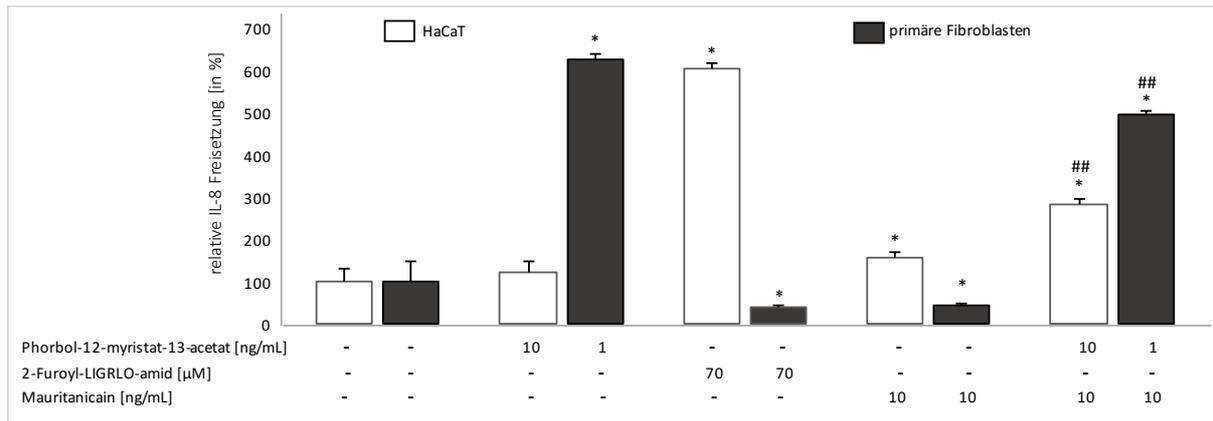


Abbildung 59. Vergleich der IL-8 Freisetzung zwischen HaCaT und primären humanen dermal Fibroblasten.

Die Abbildung zeigt die relative Freisetzung von IL-8 in Prozent im Vergleich zwischen den einzelnen Monozellkulturen nach 48 h. Positivkontrolle: 2-Furoyl-LIGRO-amid. * = Signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle (Wilcoxon-Mann-Whitney U-Test, $p=0,05$, $n=5$); ## = Signifikant erhöht gegenüber den Einzelsubstanzen; Ausreißer wurden mittels Dean-Dixon und Nalimov-Ausreißertest bestimmt.

Viele wissenschaftliche Arbeiten wie beispielsweise die von Limón *et. al* zum Beispiel fokussieren sich vermehrt auf die Wirkung von Proteasen auf Keratinozyten. In Anbetracht der von uns erhaltenen Ergebnisse kann man die unterschiedlichen Eigenschaften differenziert betrachten. Beim Kontakt mit Milchsäure gelangt dieser zuerst auf die Epidermis und bei Eindringen in die Haut in das *Stratum Granulosum*, *Stratum Spinosum* und schließlich auf das *Stratum Basale*, ehe der Milchsäure die Dermis, also die Fibroblasten erreicht. Physiologisch ist es logisch, dass Fibroblasten nicht mit Entzündungsreaktionen nach dem Kontakt mit Proteasen reagieren, denn Proteasen sind einer der Bestandteile u.a. der Blutgerinnungskaskade und somit ubiquitär im Blut und Körper enthalten. Da Fibroblasten die Dermis bilden und diese z.T. durchblutet ist, macht es für den menschlichen Organismus Sinn, nicht mit einer Immunantwort zu reagieren, wie es das Ergebnis auch bestätigt. Anders ist es in der Epidermis. Diese ist zum größten Teil nicht durchblutet, stellt für den menschlichen Organismus die erste Barriere zur Außenwelt dar und dient somit als Schutz gegen Schadstoffe und physikalische Gefahren. Eine sensitive Reaktion durch Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine auf schädliche Stoffe wie z.B. die Protease Mauritanicin oder Diterpene ist für den Körper als Schutzmechanismus sinnvoll. Da die Wirkweise von Diterpenestern bekannt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit PMA exemplarisch als Diterpenester genutzt.

Die Diterpene können zum einen in der Grundstruktur unterschieden werden, zum anderen in der Veresterung der Hydroxygruppen mit unterschiedlichen Fettsäuren. Die Aktivierung der PKC haben jedoch alle Diterpene gemeinsam, weshalb es für die Versuche eine untergeordnete Rolle spielt, welches Diterpen man einsetzt. Das Ergebnis der Untersuchung zur Freisetzung von Cytokinen zeigt, wie sich chemische Inhaltsstoffe von Pflanzen und Proteinen gegenseitig beeinflussen können und zu gesteigerten oder verringerten Wirkungen eines Pflanzenextraktes beitragen können. Es kann im Fall des Milchsaftes von *E. mauritanica* angenommen werden, dass Hautentzündungen nach dem Kontakt durch das Mauritanicain und die im Milchsaft enthaltenen Diterpene ausgelöst werden können.

4. Zusammenfassung / Summary

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um das inflammatorische Potential von Milchsäften im physiologischen humanen Hautmodell darzustellen. Die Hautmodelle stellten zudem eine Basis für weitere Screenings dar. Das Potential Entzündungen auszulösen kann mit diesem Versuch auf weitere Pflanzen angewendet werden, Pflanzen könnten dadurch in Zukunft kategorisiert werden und für die Mitarbeiter Botanischer Gärten optisch mit Warnhinweisen versehen werden.

Die Optimierung der Isolation von Mauritanicain stellte für diese Arbeit eine besondere Herausforderung dar, weil Mauritanicain ohne Verunreinigungen isoliert werden und zudem in einer hochkonzentrierten, salzfreien Lösung vorliegen musste. Zum Erfolg dieser Isolierung führte eine Verdünnung des Milchsaftes, da dadurch eine höhere Bindung von Mauritanicain auf der AcroSep™ DEAE Ceramic HyperD F Säule der Ionenaustauschchromatografie erreicht werden konnte. Somit konnte bei der Elution die Proteinkonzentration erhöht werden, was für die anschließende Größenausschlusschromatografie von Vorteil war.

Durch die Untersuchung von Mauritanicain mit MALDI-TOF-MS/MS konnten Hinweise auf Sequenzen von Peptidfragmenten aus dem Protein ermittelt werden, was einen Rückschluss auf die mögliche DNA-Sequenz der Peptide zuließ. Die DNA-Sequenzen dienten als Vorlage für das Designen von degenerierten Primern. Die degenerierten Primer waren der Startpunkt für die *De-novo* Sequenzierung.

Die Untersuchung des Mauritanicains mittels ISD-MALDI-TOF-MS zur Strukturaufklärung des N-Terminus war für die finale Strukturaufklärung von zentraler Bedeutung, weil durch diesen Versuch die Lokalisation des N-Terminus von Mauritanicain in der DNA Sequenz gewährleistet werden konnte. Zudem lieferte die N-terminale Sequenz den passenden Primer für die erste erfolgreiche PCR und diente somit als Startpunkt für die Strukturaufklärung von Mauritanicain.

Mittels *in-silico* Studie konnte anhand der Sequenz von Mauritanicain ein Homologiemodell erstellt werden, welches für das Dynamikmodell unabdingbar war. Zusammen mit dem Homologiemodell konnte die Struktur bzw. die Aminosäuresequenz abgeglichen werden und untersucht werden, ob diese fehlerbehaftet ist oder nicht.

Das Protein war in dem Dynamikmodell über den gesamten untersuchten Zeitraum stabil, die Aminosäuren der katalytischen Triade haben sich nicht weiter als um ca. 0,6 Å voneinander bewegt, was den Schluss zulässt, dass sowohl die Proteinsequenz, als auch das Homologiemodell realen Bedingungen im Mauritanicain entsprechen. Als aktives Zentrum konnten die Aminosäuren Asparaginsäure₍₃₂₎, Histidin₍₉₈₎ und Serin₍₄₂₈₎ identifiziert werden.

In den Monozellkulturen mit HaCaT-Keratinocyten und primären humanen dermalen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Mauritanicain und das Diterpen PMA gemeinsame Einflüsse auf die Freisetzung von IL-8 haben. In den Keratinocyten wird bei gleichzeitiger Stimulation mit Mauritanicain und PMA die Freisetzung von IL-8 erhöht, währenddessen ist in Fibroblasten eine verminderte Freisetzung von IL-8 im Vergleich zu der einzelnen Stimulation mit PMA zu detektieren. In den Zellkulturen konnte sowohl auf genetischer, als auch auf histochemischer Grundlage die Anwesenheit von PAR 2 nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass der selektive PAR2-Agonist 2-Furoyl-LIGRLO-Amid in der Tendenz ähnliche Ergebnisse wie das Mauritanicain liefert, lässt den Schluss zu, dass die physiologische Bioaktivität von Mauritanicain auch PAR2 vermittelt abläuft.

Erstmals konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, wie sich Proteasen und Diterpene gegenseitig in Bezug auf die inflammatorische Immunantwort beeinflussen. Es ist anzunehmen, dass die Kombination von Proteasen mit Diterpenen einer der Haupteinflussfaktoren der Auslösung von Entzündungsreaktionen bzw. Hautentzündungen nach Kontakt mit Milchsäure ist.

In the present work, a new method was developed to depict the inflammatory potential of milk juices on human skin model. The skin model provides a basis for further screenings. The potential to trigger inflammation can be applied to other plants with this experiment. Plants could thereby be categorized in the future and visually provided with warning signs for the employees of botanical gardens.

The optimization of the isolation method was a particular hurdle for this work because Mauritanicain had to be completely isolated on its own and had to be present in a highly concentrated, salt-free solution. Dilution of the latex resulted in higher binding of Mauritanicain on the AcroSep™ DEAE Ceramic HyperD F column of ion exchange chromatography. Thus, upon elution, the protein concentration could be increased, which was advantageous for size exclusion chromatography.

The investigation of Mauritanicain with MALDI-TOF-MS/MS revealed indications for possible sequences of peptide fragments from the protein, which allowed conclusions to be drawn regarding the possible DNA sequence of the peptides. The DNA sequences served as templates for the design of degenerated primers. The degenerated primers were necessary for *de-novo* sequencing.

The investigation of the intact Mauritanicain by ISD-MALDI-TOF-MS delivered the structure of the N-terminus and was for the structure elucidation of importance, because by this experiment was necessary for localization of the DNA sequence. In addition, the N-terminal sequence provided the appropriate primer for the first successful PCR and thus served as the starting point for the structure elucidation of Mauritanicain.

Using *in-silico* study, a homology model was created based on the sequence of Mauritanicain, which was indispensable for the dynamics model. Together with the homology model, the structure or the amino acid sequence was compared and investigated whether it is defective or not. The protein was stable in the dynamics model over the entire period studied, the amino acids of the catalytic triad did not move more than approximately 0.6 Å apart, suggesting that both the protein sequence and the

homology model correspond to Mauritanicain. Aspartic acid₍₃₂₎, histidine₍₉₈₎ and serine₍₄₂₈₎ were identified as the active center of the protein.

In the mono cell cultures HaCaT-keratinocytes and primary human dermal fibroblasts have been shown that Mauritanicain and the diterpene PMA have a common influence on the release of IL-8. In the keratinocytes, stimulation by Mauritanicain together with PMA increased the release of IL-8, whereas in fibroblasts a reduced release of IL-8 was detectable compared to the single stimulation with PMA.

In both cell cultures, the presence of protease-activated receptor 2 was confirmed by genetic and histochemical investigations. The fact, that the selective PAR2 agonist 2-Furoyl-LIGRLO-amide tends to produce similar results as Mauritanicain, suggests that the physiological bioactivity of Mauritanicain is also mediated by activation of PAR2. For the first time, this work demonstrated how proteases and diterpenes influence each other regarding the inflammatory immune response. One can be assume that the combination of proteases and diterpenes is one of the main influencing factors of the triggering of inflammatory reactions or skin inflammations after contact with latices.

Literaturverzeichnis

1. Dörken VM. *Euphorbiaceae – Wolfsmilchgewächse (Malpighiales)*. Universität Konstanz, FB Biologie.
2. Motta LB, Furlan CM, Santos DYAC, Salatino MLF, Negri G, Carvalho JE, Monteiro PA, Ruiz ALTG, Caruzo MB, Salatino A. *Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of Croton sphaerogynus Baill. (Euphorbiaceae)*. Ind Crops Prod 2013; 50: 661-665
3. Barberá P, Velayos M, Aedo C. *Annotated checklist and identification keys of the Acalyphoideae (Euphorbiaceae) of Equatorial Guinea (Annobón, Bioko and Río Muni)*. Phytotaxa 2013; 140: 1-25
4. Pritchard A. *Introduction to the Euphorbiaceae*. Cactus & Co. Libri 2003
5. Anselmino O, E.G. *Kommentar zum Deutschen Arzneibuch. 6. Ausgabe* 1926: 540
6. Berman B. *New developments in the treatment of actinic keratosis: focus on ingenol mebutate gel*. Clin Cosmet Investig Dermatol 2012; 5: 111–122
7. <http://pza.sanbi.org/euphorbia-mauritanica>; Zugriff: 13.06.2018; 10:28 Uhr
8. https://commons.wikimedia.org/wiki/Euphorbia_mauritanica-/media/File:Euphorbia_mauritanica-P1010239.JPG; Zugriff: 13.06.2018; 12.50 Uhr
9. Lewinsohn TM. *The geographical distribution of plant latex*. Chemoecology 1991; 2: 64-68
10. Domsalla A, Melzig MF. *Occurrence and properties of proteases in plant latices*. Planta Med 2008; 74: 699-711
11. Vasas A, Rédai D, Csupor D, Molnár J, Hohmann J. *Diterpenes from European Euphorbia Species Serving as Prototypes for Natural-Product-Based Drug Discovery*. European J Org Chem 2012.; 2012: 5115-5130
12. Sytwala S, Gunther F, Melzig MF. *Lysozyme- and chitinase activity in latex bearing plants of genus Euphorbia--A contribution to plant defense mechanism*. Plant Physiol Biochem 2015; 95: 35-40
13. Rao KV. *Toxic principles of hippomane mancinella. II. Structure of Hippomanin A*. Lloydia 1977; 40: 169-172

14. Guillet G, Helenon R, Guillet MH. Dermatitis caused by the manchineel tree. *Ann Dermatol Venereol* 1985; 112: 51-56
15. Bygbjerg IC, Johansen HK. *Manchineel poisoning complicated by streptococcal pharyngitis and impetigo*. *Ugeskr Laeger* 1991; 154: 27-28
16. Hess J. *Gran Canaria*. <https://books.google.de/books?id=4UlgAgAAQBAJ&pg=PT298&lpg=PT298&dq=euphorbia+nahrung+echsen&source=bl&ots=1ZNEOm3zB&sig=Q9H-B4wQmxe-trpCAOvDyOagE&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwioloCxpjMAhUJ3CwKHU7VAGAQ6AEIVDAL-v=snippet&q=euphorbia&f=false> Zugriff: 19.04.2016, 09:45 Uhr
17. Lokale Erzählungen von Einheimischen während einer Führung in Namibia - Damara Land; September 2017
18. *DocCheck Medical Services GmbH, Entzündung*. <http://flexikon.doccheck.com/de/Entzündung>, Zugriff: 14.12.2017, 10:32 Uhr
19. Medzhitov R. *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature* 2008. 454: 428
20. Barton GM. *A calculated response: control of inflammation by the innate immune system*. *J Clin Invest* 2008; 118: 413-420
21. Pober JS, Sessa WC. *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 803-815
22. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 2563-2582
23. Fuchs E, Raghavan S. *Getting under the skin of epidermal morphogenesis*. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 199-209.
24. Fore J. *A review of skin and the effects of aging on skin structure and function*. *Ostomy Wound Manage* 2006; 52: 24-35
25. Beiersdorf AG. <https://www.eucerin.de/beratung/die-haut-grundlagen/aufbau-und-funktion-der-haut>. Zugriff: 25.09.2017; 12:30 Uhr
26. Welsch U. *Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie (Sobotta)*. Elsevier Urban & Fischer 2005
27. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. *Mechanisms regulating skin immunity and inflammation*. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 289-301

28. NC-IUBMB. *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2018
29. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 597-635
30. Fuchs JE, von Grafenstein S, Huber RG, Margreiter MA, Spitzer GM, Wallnoefer HG, Liedl KR. *Cleavage entropy as quantitative measure of protease specificity*. *PLoS Comput Biol* 2013; 9: doi: 10.1371/journal.pcbi. 1003007
31. Waldner BJ, Fuchs JE, Huber RG, von Grafenstein S, Schauperl M, Kramer C, Liedl KR. *Quantitative Correlation of Conformational Binding Enthalpy with Substrate Specificity of Serine Proteases*. *J Phys Chem B* 2016; 120: 299-308
32. Fuchs JE, von Grafenstein S, Huber RG, Kramer C, Liedl KR. *Substrate-driven mapping of the degradome by comparison of sequence logos*. *PLoS Comput Biol* 2013; 9: doi: 10.1371/journal.pcbi. 1003353
33. Mótyán J, Tóth F, Tózsér J. *Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology*. *Biomolecules* 2013; 3: 923-942
34. de Souza PM, de Assis Bittencourt ML, Caprara CC, de Freitas M, de Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Ferreira EX, Filho, Pessao A, Magalhães PO. *A biotechnology perspective of fungal proteases*. *Braz J Microbiol* 2015; 46: 337-346
35. Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL. *Commercial proteases: Present and future*. *FEBS Letters* 2013; 587: 1155-1163
36. Dodson G, Wlodawer A. *Catalytic triads and their relatives*. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 347-352
37. Hunkapiller MW, Smallcombe SH, Witaker DR, Richards JH. *Ionization behavior of the histidine residue in the catalytic triad of serine proteases. Mechanistic implications*. *J Biol Chem* 1973; 248: 8306-8308
38. Siezen RJ, Leunissen JA. *Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases*. *Protein Sci* 1997; 6: 501-523
39. Figueiredo A, Monteiro F, Sebastiana M. *Subtilisin-like proteases in plant-pathogen recognition and immune priming: a perspective*. *Front Plant Sci*, 2014; 5: 739
40. Meyer M, Huttenlocher F, Cedzich A, Procopio S, Stroeder J, Pau-Roblot C, Lequart-Pillon M, Pelloux J, Stintzi A, Schaller A. *The subtilisin-like protease SBT3 contributes to insect resistance in tomato*. *J Exp Bot* 2016; 67: 4325-4338

41. Murayama K, Kato-Murayama M, Hosaka T, Sotokawauchi A, Yokoyama S, Arima K, Shirouzu M. *Crystal structure of cucumisin, a subtilisin-like endoprotease from Cucumis melo L.* J Mol Biol 2012; 423: 386-396
42. Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, Hooper JD. *Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors.* Pharmacol Ther 2011; 130: 248-282
43. Hollenberg MD, Yang SD, Laniyon AA, Moore GJ, Saifeddine M. *Action of thrombin receptor polypeptide in gastric smooth muscle: identification of a core pentapeptide retaining full thrombin-mimetic intrinsic activity.* Mol Pharmacol 1992; 42: 186-191
44. Corvera CU, Déry O, McConalogue K, Böhm SK, Khitin LM, Caughey GH, Payan DG, Bunnett NW. *Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2.* J Clin Invest 1997; 100: 1383-1393
45. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. *Proteinase-Activated Receptors.* Pharmacol Rev 2001; 53: 245-282
46. Luo W, Wang Y, Reiser G. *Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection.* Brain Res Rev 2007; 56: 331-345
47. Palmer HS, Kelso SB, Lockhart JC, Sommerhoff CP, Plevin R, Goh FG, Ferrell WR. *Protease-activated receptor 2 mediates the proinflammatory effects of synovial mast cells.* Arthritis Rheum 2007; 56: 3532-3540
48. Alberelli MA, de Candia E. *Functional role of protease activated receptors in vascular biology.* Vascul Pharmacol 2014; 62: 72-81
49. Fortunato TM, Vara DS, Wheeler-Jones CP, Pula G. *Expression of protease-activated receptor 1 and 2 and anti-tubulogenic activity of protease-activated receptor 1 in human endothelial colony-forming cells.* PLoS One 2014; 9: doi: 10.1371/journal.pone.0109375
50. Iablokov V, Hirota CL, Peplowski MA, Ramachandran R, Mihara K, Hollenberg MD, MacNaughton WK. *Proteinase-Activated Receptor 2 Decreases Apoptosis in Colonic Epithelial Cells.* J Biol Chem 2014; 289: doi: 10.1074/jbc.M114.610485
51. Afkhami-Goli A, Noorbakhsh F, Keller AJ, Vergnolle N, Westaway D, Jhamandas JH, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Arab H, Dyck RH, Power C. *Proteinase-activated receptor-2 exerts protective and pathogenic cell type-specific effects in Alzheimer's disease.* J Immunol 2007; 179: 5493-5503

52. Loubele ST, Spek CA, Leenders P, van Oerle R, Aberson HL, Hamulyák K, Ferrell G, Emson CT, Spronk HM, ten Cate H. *Activated protein C protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via inhibition of apoptosis and inflammation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1087-1092
53. Antoniak S, Rojas M, Spring D, Bullard TA, Verrier ED, Blaxall BC, Mackman N, Pwalinski R. *Protease-activated receptor 2 deficiency reduces cardiac ischemia/reperfusion injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 2136-2142
54. Mackman N, Antoniak S. *Roles of PAR1 and PAR2 in viral myocarditis*. *Thromb Res* 2014; 133: 18-20
55. Rajput PS, Lyden PD, Chen B, Lamb JA, Pereira B, Lamb A, Zhao L, Lei IF, Bai J. *Protease activated receptor-1 mediates cytotoxicity during ischemia using in vivo and in vitro models*. *Neuroscience* 2014; 281: 229-240
56. Bokarewa MI, Morrissey J, Tarkowski A. *Intra-articular tissue factor/factor VII complex induces chronic arthritis*. *Inflamm Res* 2002; 51: 471-477
57. Ferrell WR, Lockhart JC, Kelso EB, Dunning L, Plevin R, Meek SE, Smith AJ, Hunter GD, McLean JS, McGarry F, Ramage R, Jiang L, Kanke T, Kawagoe J. *Essential role for proteinase-activated receptor-2 in arthritis*. *J Clin Invest* 2003; 111: 35-41
58. Asfaha S, Cenac N, Houle S, Altier C, Papez MD, Nguyen C, Steinhoff M, Chapman K, Zamponi GW, Vergnolle N. *Protease-activated receptor-4: a novel mechanism of inflammatory pain modulation*. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 176-185
59. Jian C, Wenjuan H, Huaizhen R. *Protease-activated receptors in neuropathic pain: an important mediator between neuron and glia*. *J Med Colleges of PLA* 2009; 24: 244-249
60. Cenac N. *Protease-activated receptors as therapeutic targets in visceral pain*. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11: 598-605
61. Bao Y, Hou W, Hua B. *Protease-activated receptor 2 signalling pathways: a role in pain processing*. *Expert Opin Ther Targets* 2014; 18: 15-27
62. Ostrowska E, Reiser G. *Protease-activated receptor (PAR)-induced interleukin-8 production in airway epithelial cells requires activation of MAP kinases p44/42 and JNK*. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 1030-1035
63. Rothmeier AS, Ruf W. *Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation*. *Semin Immunopathol* 2012; 34: 133-149

64. Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Guccione MA, Rand ML, Packham MA. *Degranulation of human platelets by the thrombin receptor peptide SFLLRN: comparison with degranulation by thrombin*. *Thromb Haemost* 1993; 70: 1019-1023
65. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. *Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans*. *Nature* 1997; 386: 502-506
66. Busso N, Chobaz-Péclat V, Hamilton J, Spee P, Wagtmann N, So A. *Essential role of platelet activation via protease activated receptor 4 in tissue factor-initiated inflammation*. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R42
67. Chu AJ. *Tissue factor, blood coagulation, and beyond: an overview*. *Int J Inflam* 2011; 2011: doi: 10.4061/2011/367284.
68. Rezaie AR. *Protease-activated receptor signalling by coagulation proteases in endothelial cells*. *Thromb Haemost* 2014; 112:876.882
69. Rosser G, Tricoci P, Mottow D, Christopoulos C, Niespialowska-Steuden MN, Kozarski R, Wilcox R, Gorog DA. *PAR-1 antagonist vorapaxar favorably improves global thrombotic status in patients with coronary disease*. *J Thromb Thrombolysis* 2014; 38: 423-429
70. Whellan DJ, Tricoci P, Chen E, Huang Z, Leibowitz D, Vranckx P, Marhefka GD, Held C, Nicolau JC, Storey RF, Ruzyllo W, Huber K, Sinnaeve P, Weiss AT, Dery JP, Moliterno DJ, Van de Werf F, Aylward PE, White HD, Armstrong PW, Wallentin L, Strony J, Harrington RA, Mahaffey KW. *Vorapaxar in acute coronary syndrome patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: subgroup analysis from the TRACER trial (Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction in Acute Coronary Syndrome)*. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63: 1048-1057
71. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. *Cell* 1991; 64: 1057-1068
72. McLaughlin JN, Patterson MM, Malik AB. *Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5662-5667
73. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. *PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin*. *Nature* 2000; 404: 609-613

74. Guenther F, Melzig MF. *Protease-activated receptors and their biological role - focused on skin inflammation*. J Pharm Pharmacol 2015; 67: 1623-1633.
75. http://gpcr.usc.edu/images/GPCR_tree_Mar2013.jpg. Zugriff:13.04.2018; 10:15 Uhr
76. Ostrowska E, Reiser G. *The protease-activated receptor-3 (PAR-3) can signal autonomously to induce interleukin-8 release*. Cell Mol Life Sci 2008; 65: 970-981
77. Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. *Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 11189-11193
78. Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ, Stewart GA. *Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells*. J Immunol 2002; 168: 3577-3585
79. Wang L, Lou J, Fu Y, He S. *Induction of interleukin-8 secretion and activation of ERK1/2, p38 MAPK signaling pathways by thrombin in dermal fibroblasts*. Int J Biochem Cell Biol 2006; 38: 1571-1583
80. Lee MC, Huang SC. *Proteinase-activated receptor-1 (PAR(1)) and PAR(2) but not PAR(4) mediate contraction in human and guinea-pig gallbladders*. Neurogastroenterol Motil 2008; 20: 385-391
81. Abraham LA, MacKie EJ. *Modulation of osteoblast-like cell behavior by activation of protease-activated receptor-1*. J Bone Miner Res 1999; 14: 1320-1329
82. Cocks TM, Fong B, Chow JM, Anderson GP, Frauman AG, Goldie RG, Henry PJ, Carr MJ, Hamilton JR, Moffatt JD. *A protective role for protease-activated receptors in the airways*. Nature 1999; 398: 156-160
83. O'Sullivan CJ, Allen NM, O'Loughlin AJ, Friel AM, Morrison JJ. *Thrombin and PAR1-activating peptide: effects on human uterine contractility in vitro*. Am J Obstet Gynecol 2004; 190: 1098-1105
84. Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McAnulty RJ. *Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 278: L193-201

-
85. Sherwood CL, Daines MO, Price TJ, Vagner J, Boitano S. *A highly potent agonist to protease-activated receptor-2 reveals apical activation of the airway epithelium resulting in Ca²⁺-regulated ion conductance*. Am J Physiol Cell Physiol 2014; 307: C718-726
86. de Boer JD, Van't Veer C, Stroo I, van der Meer AJ, de Vos AF, van der Zee JS, Roelfos JJ, van der Poll T. *Protease-activated receptor-2 deficient mice have reduced house dust mite-evoked allergic lung inflammation*. Innate Immun 2013; 20: 618-625
87. Hauck RW, Schulz C, Schömig A, Hoffmann RK, Panettieri RA Jr. *alpha-Thrombin stimulates contraction of human bronchial rings by activation of protease-activated receptors*. Am J Physiol 1999; 277: L22-29
88. Su X, Camerer E, Hamilton JR, Coughlin SR, Matthay MA. *Protease-activated receptor-2 activation induces acute lung inflammation by neuropeptide-dependent mechanisms*. J Immunol 2005; 175: 2598-2605
89. Cicala C, Pinto A, Bucci M, Sorrentino R, Walker B, Harriot P, Cruchley A, Kapas S, Howells GL, Cirino G. *Protease-activated receptor-2 involvement in hypotension in normal and endotoxemic rats in vivo*. Circulation 1999; 99: 2590-2597
90. Hennessey JC, McGuire JJ. *Attenuated vasodilator effectiveness of protease-activated receptor 2 agonist in heterozygous par2 knockout mice*. PLoS One 2013; 8: doi: 10.1371/journal.pone.0055965
91. Borensztajn K, Bijlsma MF, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. *Coagulation factor Xa inhibits cancer cell migration via protease-activated receptor-1 activation*. Thromb Res 2009; 124: 219-225
92. Antoniak S, Sparkenbaugh EM, Tencati M, Rojas M, Mackman N, Pawlinski R. *Protease activated receptor-2 contributes to heart failure*. PLoS One 2013; 8: doi: 10.1371/journal.pone.0081733
93. Kawabata A, Morimoto N, Nishikawa H, Kuroda R, Oda Y, Kakehi K. *Activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2) triggers mucin secretion in the rat sublingual gland*. Biochem Biophys Res Commun 2000; 270: 298-302
94. Bhagwat SS, Larsen AK, Winberg JO, Seternes OM, Bang BE. *Salmon and king crab trypsin stimulate interleukin-8 and matrix metalloproteinases via protease-activated receptor-2 in the skin keratinocytic HaCaT cell line*. Food Chem Toxicol 2014; 69: 303-311

95. Kim JY, Kim DY, Son H, Kim YJ, Oh SH. *Protease-activated receptor-2 activates NQO-1 via Nrf2 stabilization in keratinocytes*. J Dermatol Sci 2014; 74: 48-55
96. Kim JY, Kim YJ, Lim BJ, Sohn HJ, Shin D, Oh SH. *Increased expression of cathelicidin by direct activation of protease-activated receptor 2: possible implications on the pathogenesis of rosacea*. Yonsei Med J 2014; 55: 1648-1655
97. Cocks TM, Sozzi V, Moffatt JD, Selemidis S. *Protease-activated receptors mediate apamin-sensitive relaxation of mouse and guinea pig gastrointestinal smooth muscle*. Gastroenterology 1999; 116: 586-592
98. Li Y, Feng C, Wei X, Zhang J, Zan R, Zheng G, Yang X, Zhai J. *Activation of protease-activated receptor-2 disrupts vaginal epithelial barrier function*. Cell Biol Int 2014; 38: 1247-1251
99. Fu Q, Cheng J, Gao Y, Zhang Y, Chen X, Xie J. *Protease-Activated Receptor 4: A Critical Participator in Inflammatory Response*. Inflammation 2014; 38: doi: 10.1007/s10753-014-9999-6
100. Tourdot BE, Conaway S, Niisuke K, Edelstein LC, Bray PF, Holinstat M. *Mechanism of Race-Dependent Platelet Activation Through the Protease-Activated Receptor-4 and Gq Signaling Axis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34: doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304249
101. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. *Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines*. Circ Res 2005; 96: 1233-1239
102. Jiang P, Yu GY, Zhang Y, Xiang Y, Hua HR, Bian L, Wang CY, Lee WH, Zhang Y. *Down-regulation of protease-activated receptor 4 in lung adenocarcinoma is associated with a more aggressive phenotype*. Asian Pac J Cancer Prev 2013; 14: 3793-3798
103. MacMillan J. *Diterpene Biosynthesis*. University of Bristol, UK, Zugriff 15.06.2016.
104. Brock NL, Tudzynski B, Dickschat JS. *Biosynthesis of sesqui- and diterpenes by the gibberellin producer Fusarium fujikuroi*. Chembiochem 2011; 12: 2667-2676
105. Dockerill B, Hanson JR. *The fate of C-20 in C19 gibberellin biosynthesis*. Phytochemistry 1978; 17: 701-704
106. Yamaguchi S. *Gibberellin metabolism and its regulation*. Annu Rev Plant Biol 2008; 59: 225-251

107. El-Bassuony AA. *Antibacterial activity of new polyester diterpenes from Euphorbia guyoniana*. Asian J Chem 2007; 19: 4553-4562
108. Mwine JT, van Damme P. *Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features*. J Med Plant Res 2011; 5: 652-662
109. Vasas A, Hohmann J. *Euphorbia diterpenes: isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008-2012)*. Chem Rev 2014; 114: 8579-8612
110. Krauter G, Von der Lieth CW, Schmidt R, Hecker E. *Structure/activity relationships of polyfunctional diterpenes of the tiglane type. A pharmacophore model for protein-kinase-C activators based on structure/activity studies and molecular modeling of the tumor promoters 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and 3-O-tetradecanoylingenol*. Eur J Biochem 1996; 242: 417-427
111. Goel G, Makkar HP, Francis G, Becker K. *Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals*. Int J Toxicol 2007; 26: 279-288
112. Eichmann TO, Lass A. *DAG tales: the multiple faces of diacylglycerol--stereochemistry, metabolism, and signaling*. Cell Mol Life Sci 2015; 72: 3931-3952
113. Nishizuka Y. *Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C*. Science 1992; 258: 607-614
114. Sánchez-Duffhues G, Vo MQ, Pérez M, Calzado MA, Moreno S, Appendino G, Muñoz E. *Activation of latent HIV-1 expression by protein kinase C agonists. A novel therapeutic approach to eradicate HIV-1 reservoirs*. Curr Drug Targets 2011; 12: 348-356
115. Shi QW, Su XH, Kiyota H. *Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus Euphorbia*. Chem Rev 2008; 108: 4295-4327
116. Jassbi AR. *Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia from Iran*. Phytochemistry 2006; 67: 1977-1984
117. Sumagin R, Robin AZ, Nusrat A, Parkos CA. *Activation of PKC β 1 by PMA facilitates enhanced epithelial wound repair through increased cell spreading and migration*. PLoS One 2013; 8: doi: 10.1371/journal.pone.0055775
118. Ryle CM, Breitreutz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D, Fusenig NE. *Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones*. Differentiation 1989; 40: 42-54

-
119. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.* J Cell Biol 1988; 106: 761-771
120. Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. *Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts.* J Invest Dermatol 1999; 112: 343-353
121. Wiechelmann K, Braun RD, Fitzpatrick JD. *Investigation of the bicinchoninic protein assay: Identification of the groups responsible for color formation.* Anal Biochem 1988; 175: 231-237
122. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Measurement of protein using bicinchonic acid.* Anal Biochem 1985; 150: 76-85
123. Pierce® BCA Protein Assay Kit, T.S., Rockford, USA
124. Jones LJ, Upson RH, Haugland RP, Panchuk-Voloshina N, Zhou M, Haugland RP. *Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement.* Anal Biochem 1997; 251: 144-152
125. EnzCheck® Protease Assay Kit, I., Darmstadt
126. Al-Tubuly AA. *SDS-PAGE and Western Blotting.* Methods Mol Med 2000; 40: 391-405
127. Brunelle JL, Green R. *One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE).* Methods Enzymol 2014; 541: 151-159
128. Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 1970; 227: 680-685
129. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. *Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.* Electrophoresis 1988; 9: 255-262
130. Nielsen BL, Brown LR. *The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels.* Anal Biochem 1984; 141: 311-315
131. Switzer RC, Merrill CR, Shifrin S. *A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels.* Anal Biochem 1979; 98: 231-237
132. Bio-Rad Silver Stain, B.-R.L.G., München
133. Strasser R. *Plant protein glycosylation.* Glycobiology 2016; 26: 926-939

-
134. PNGase A inkl. Pufferlösungen, New England Biolabs, Frankfurt am Main.
135. Ali M, Homann T, Kreisel J, Khalil M, Puhlmann R, Kruse HP, Rawel H. *Characterization and modeling of the interactions between coffee storage proteins and phenolic compounds*. J Agric Food Chem 2012; 60: 11601-11608
136. Bonk T, Humeny A. *MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA*. Neuroscientist 2001; 7: 6-12
137. Roepstorff P, Fohlman J. *Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides*. Biomed Mass Spectrom 1984; 11: 601
138. <http://www.uniprot.org/>, Zugriff: 14.06.2016, 14.35 Uhr
139. http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_nr.html, Zugriff: 14.06.2016, 14.35 Uhr
140. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A. *A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics*. Anal Bioanal Chem 2003; 376: 952-965
141. Instructions for Use Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonic, Bremen
142. Bienert S, Waterhouse A, de Beer TA, Tauriello G, Studer G, Bordoli L, Schwede T. *The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality*. Nucleic Acids Res 2017; 45: D313-D319
143. Ottmann C, Rose R, Huttenlocher F, Cedzich A, Hauske P, Kaiser M, Huber R, Schaller A. *Structural basis for Ca²⁺-independence and activation by homodimerization of tomato subtilase 3*. Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106: 17223-17228
144. Bowers KJC, Edmond C, Xu H, Dror RO, Eastwood MP, Gregersen BA, Klepeis JL, Kolossvary I, Moraes MA, Sacerdoti FD, Salmon JK, Shan Y, Shaw DE. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06), Tampa, Florida, 2006; November 11-17
145. Toukan K, Rahman A. *Molecular-dynamics study of atomic motions in water*. Phys Rev B Condens Matter 1985; 31: 2643-2648
146. Kashara T, Yamaguchi Y, Yamashita K. *Quantitative analysis of cytokines and its problems*. Rinsho Byori 1990; 38: 380-385
147. BD OptEIAM Set Human IL-8, Becton Dickinson, San Diego, USA

148. BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit, Becton Dickinson, San Diego, USA
149. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A. *Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology*. Clin Immunol 2004; 110: 252-266
150. Castillo L, MacCallum DM. *Cytokine measurement using cytometric bead arrays*. Methods Mol Biol 2012; 845: 425-434
151. RNAqueous® Phenol-free total RNA Isolation, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA
152. Vosberg HP. *The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids*. Hum Genet 1989; 83: 1-15
153. Clewley JP. *The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis*. J Virol Methods 1989; 2: 179-187
154. White TJ, Arnheim N, Erlich HA. *The polymerase chain reaction*. Trends Genet 1989; 5: 185-189
155. Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, USA
156. <https://flexikon.doccheck.com/de/Agarose-Gelelektrophorese>. Zugriff: 16.11.2018; 19:34 Uhr
157. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463-5467
158. Hönzke S, Wallmeyer L, Ostrowski A, Radbruch M, Mundhenk L, Schäfer-Korting M, Hedtrich S. *Influence of Th2 Cytokines on the Cornified Envelope, Tight Junction Proteins, and ss-Defensins in Filaggrin-Deficient Skin Equivalents*. J Invest Dermatol 2016; 136: 631-639
159. Sriram G, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M. *Fibroblast heterogeneity and its implications for engineering organotypic skin models in vitro*. Eur J Cell Biol 2015; 94: 483-512
160. Dinarello CA. *Blocking IL-1 in systemic inflammation*. J Exp Med 2005; 201: 1355-1359
161. Flemmig M. *Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität pflanzlicher Milchsäfte und deren Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse*. Dissertation, 2015
162. Molecular Operating Environment (MOE); Chemical Computing Group ULC, Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018

163. Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Crowley M, Walker RC, Zhang W, Merz KM, Wang B, Hayik S, Roitberg A, Seabra G, Kolossváry I, Wong KF, Paesani F, Vanicek J, Wu X, Brozell SR, Steinbrecher T, Gohlke H, Yang L, Tan C, Mongan J, Hornak V, Cui G, Mathews DH, Seetin MG, Sagui C, Babin V, Kollman PA. AMBER 10, University of California, San Francisco, 2008
164. Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. *Stereochemistry of polypeptide chain configurations*. J Mol Biol 1963; 7: 95-99
165. Strasser R. Plant protein glycosylation. Glycobiology 2016; 26: 926-939
166. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>; Zugriff 07.07.2018; 18.00 Uhr
167. FluoReporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit, M.P., Inc., Eugene, USA
168. Seggewiss R, Dunbar CE, Orlic D. 53 - *Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing*, in *Handbook of Stem Cells*. Editors 2004; Academic Press: Burlington; 593-607
169. Baggiolini M, Clark-Lewis I. *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett 1992; 307: 97-101
170. Kemény L, Ruzicka T, Dobozy A, Michel G. *Role of interleukin-8 receptor in skin*. Int Arch Allergy Immunol 1994; 104: 317-322
171. Limón D, Fábrega MJ, Calpena AC, Badia J, Baldomà L, Pérez-García L. *Multifunctional Serine Protease Inhibitor-Coated Water-Soluble Gold Nanoparticles as a Novel Targeted Approach for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases*. Bioconjug Chem 2018; 29: 1060-1072

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht wichtiger Cytokine adaptiert nach Turner et al. [22].	14
Tabelle 2. Übersicht Protease-aktivierter Rezeptoren [42, 43, 45, 46, 48, 50, 65, 76].	24
Tabelle 3. Übersicht von in vivo und in vitro Studien von Protease-aktivierter Rezeptoren und deren Effekt.	25
Tabelle 4. Verwendete allgemeine Geräte.	30
Tabelle 5. Verwendete allgemeine Verbrauchsmaterialien.	31
Tabelle 6. Verwendete Chemikalien.	32
Tabelle 7. Verwendete Chemikalien für die Zellkultur.	34
Tabelle 8. Verwendete Kits.	35
Tabelle 9. Verwendete Primer für die PCR.	36
Tabelle 10. Verwendete Software.	36
Tabelle 11. Verwendete Medien in der Zellkultur.	38
Tabelle 12. Verwendete Lösungen für die BCA-Proteinbestimmung.	40
Tabelle 13. Verdünnungsreihe des BCA Assay's adaptiert nach Thermo Scientific™ [123].	41
Tabelle 14. Verwendete Pufferlösungen für die Ionenaustauschchromatographie.	42
Tabelle 15. Verwendete Lösungen zur Bestimmung der Proteaseaktivität.	43
Tabelle 16. Verwendete Puffer in der Elektrophorese.	45
Tabelle 17. Pipettierschema verschiedener SDS-Gel Konzentrationen.	46
Tabelle 18. Verwendete Lösungen für die kolloidale Coomassie Färbung.	46
Tabelle 19. Verwendete Lösungen für die Silberfärbung.	47
Tabelle 20. Durchführungsprotokoll der Silberfärbung von SDS-PAGE Gelen.	47
Tabelle 21. Verwendete Lösungen für den tryptischen In-Gel Verdau.	48
Tabelle 22. Verwendete Puffer für die Deglykosylierung von Mauritanicain.	49
Tabelle 23. Peptide des Peptid-Standards II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen und deren Masse-zu- Ladung-Verhältnis [141].	52
Tabelle 24. Verwendete Lösungen im ELISA.	54
Tabelle 25. Zusammensetzung der 20 µL PCR.	59
Tabelle 26. PCR-Protokoll zur Amplifikation der cDNA von PAR2 aus humanen Zellen.	59
Tabelle 27. PCR-Protokoll zur Amplifikation der cDNA von Mauritanicain.	59
Tabelle 28. Verwendete Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.	62

Tabelle 29. Cytokinkonzentrationen mit und ohne Behandlung von Milchsaft an zwei unterschiedlichen Hautmodellen.....	67
Tabelle 30. Mittelwerte der Residuen-Massen der Aminosäuren in der Massenspektrometrie.	78
Tabelle 31. Aminosäuresequenz nach computerbasierter und manueller Auswertung des 1305.68 Fragmentes.....	80
Tabelle 32. Aminosäuresequenz nach computerbasierter und manueller Auswertung des 1838.87 Fragmentes.....	81
Tabelle 33. Vergleich des N-terminus von Mauritanicain mit anderen Subtilisin-ähnlichen Proteasen.....	83
Tabelle 34. Zuordnung der Messsignale aus Abbildung 34 den dazugehörigen Aminosäuren.	83
Tabelle 35. MS Signale von Mauritanicain und ihre Übereinstimmung mit dem PCR Produkt mit den Primern Mau_1/Mau_2.....	87
Tabelle 36. Proteinsequenz von Mauritanicain.	89
Tabelle 37. DNA Sequenz von Mauritanicain.....	90
Tabelle 38. Disulfidbrücken in den Proteinen 3vta und 3i74.	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Ausfließender Milchsaft aus milchführenden Leitbahnen von <i>E. mauritanica</i>	8
Abbildung 2. Pflanzenvorkommen der Euphorbiaceen, Gattung <i>Euphorbia</i> , des Botanischen Gartens der FU-Berlin.....	9
Abbildung 3. <i>Euphorbia mauritanica</i> Juss. [8].....	10
Abbildung 4. Ursachen, physiologische und pathologische Folgen der Entzündung [19].	12
Abbildung 5. Schematische Darstellung der Haut.	16
Abbildung 6. Stammbaum der Protease-Spezifität über die gesamte Bindungsregion [32].	18
Abbildung 7. Bindungstaschendefinition von Proteasen am Beispiel von Faktor Xa [31].	18
Abbildung 8. Katalytische Triade von Serinproteasen [36, 37].....	19
Abbildung 9. Schematische Darstellung der Aktivierung von Protease aktivierten Rezeptoren.	22
Abbildung 10. Stammbaum der G-Protein gekoppelten Rezeptoren nach University of Southern California – The Scripps Research Institute [75].	23
Abbildung 11. Aktivierungskaskade der Protein-Kinase C (PKC).	27
Abbildung 12. Aufbau verschiedener Grundstrukturen von Diterpenen.....	28
Abbildung 13. Sammlung des austretenden Milchsaftes nach Anritzen von <i>E. mauritanica</i> .	39
Abbildung 14. Bildung des BCA-Kupfer-Komplexes [121].....	40
Abbildung 15. Schematisches Prinzip des EnzCheck® Protease Assay Kit [125].	43
Abbildung 16. Polymerisation von Acrylamid und N, N'- Methylenebisacrylamid unter Zusatz von Ammoniumperoxidsulfat.....	45
Abbildung 17. Nomenklatur für Sequenz-Ionen in der Massenspektrometrie von Peptiden nach Roepstorff und Fohlman [137].	50
Abbildung 18. Schematische Darstellung des Cytometric Bead Array (CBA)	55
Abbildung 19. Zytokinfreisetzung im humanen Hautmodell A mit und ohne Behandlung durch Milchsaft aus <i>E. mauritanica</i> .	68
Abbildung 20. Zytokinfreisetzung im humanen Hautmodell B mit und ohne Behandlung durch Milchsaft aus <i>E. mauritanica</i> .	68
Abbildung 21. HE-Färbung des Hautmodells ohne Behandlung mit Milchsaft aus <i>E. mauritanica</i>	70

Abbildung 22. HE-Färbung des Hautmodells nach Behandlung mit Milchsäure aus <i>E. mauritanica</i>	70
Abbildung 23. Proteolytischer Aktivität und Proteingehalt in den Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie.....	71
Abbildung 24. Vergleich unterschiedlicher Fraktion 44 in der Größenausschlusschromatographie.....	72
Abbildung 25. SDS-PAGE der Ionenaustauschfraktionen 44.....	73
Abbildung 26. SDS-PAGE der proteolytisch aktiven Hauptfraktionen der Ionenaustauschchromatographie.....	74
Abbildung 27. Vergleich der MS-Spektren der Fraktionen 1, 13, 28.1, 28.2, 44 und 57.1 im Massenbereich [m/z] zwischen 1200 – 1700.....	75
Abbildung 28. Vergleich der MS-Spektren der Fraktionen 1, 13, 28.1, 28.2, 44 und 57.1 im Massenbereich [m/z] zwischen 1700 - 1950.....	76
Abbildung 29. Vergleich der MS-Spektren der Fraktionen 57.2, 57.3, 74 und 85 im Massenbereich [m/z] zwischen 800 - 2400.....	76
Abbildung 30. Schematische Darstellung der De-Novo Sequenzierung von Mauritanicain.....	77
Abbildung 31. MALDI-TOF MS Spektrum von Mauritanicain nach tryptischen Verdau.....	78
Abbildung 32. MS/MS des Peptids mit der m/z 1305,68.....	79
Abbildung 33. MS/MS des Peptids mit der m/z 1838,87.....	80
Abbildung 34. ISD-MALDI -TOF-MS Spektrum von Mauritanicain.....	82
Abbildung 35. Die Abbildung zeigt die Absorption isolierter RNA aus <i>E. mauritanica</i>	84
Abbildung 36. RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	85
Abbildung 37. Agarose-Gel der Mauritanicain PCR mit degenerierten Primern Mau_1/Mau_2.....	86
Abbildung 38. Beispielhafter Ausschnitt der Detektionssignale aus der Gensequenzierung nach Sanger.....	86
Abbildung 39. Sequenzierungsdaten von Mauritanicain Teil 1.....	92
Abbildung 40. Sequenzierungsdaten von Mauritanicain Teil 2.....	93
Abbildung 41. Sequenzierungsdaten von Mauritanicain Teil 3.....	94
Abbildung 42. Sequenzierungsdaten von Mauritanicain Teil 4.....	95
Abbildung 43. Ramachandran-Plot des Homologiemodells von Mauritanicain.....	97
Abbildung 44. In-silico Homologiemodell von Mauritanicain.....	98

Abbildung 45 Homologiemodell von Mauritanicain aus verschiedenen Winkeln.	99
Abbildung 46. Oberflächenstruktur der Bindungstasche von Mauritanicain.....	99
Abbildung 47. Aktives Zentrum von Mauritanicain mit den Aminosäuren Asparaginsäure ₍₃₂₎ , Histidin ₍₉₈₎ und Serin ₍₄₂₈₎	100
Abbildung 48. Molekulares Dynamik Modell von Mauritanicain.	101
Abbildung 49. Mögliche N-Glykosylierung von Mauritanicain.	102
Abbildung 50. Deglykosylierung von Mauritanicain.	103
Abbildung 51. Agarose-Gelelektrophorese der PAR2-PCR von HaCaT-Zellen und primären Fibroblasten.	104
Abbildung 52. Immunhistochemische Färbung der PAR2-Rezeptoren in Keratinozyten.	106
Abbildung 53. Immunhistochemische Färbung der PAR2-Rezeptoren in Fibroblasten.....	107
Abbildung 54. Übersicht des dsDNA Gehalts in HaCaT- Keratinozyten.....	108
Abbildung 55. Verhältnis zwischen Zellzahl und dsDNA, adaptiert nach FluoReporter® Blue Fluorometric dsDNA Quantitation Kit [167].	109
Abbildung 56. Freisetzung von IL-8 über 48h in HaCaT-Keratinozyten.....	111
Abbildung 57. IL-8 Freisetzung in HaCaT- Keratinozyten.....	112
Abbildung 58. IL-8 Freisetzung in primären humanen dermalen Fibroblasten.	112
Abbildung 59. Vergleich der IL-8 Freisetzung zwischen HaCaT und primären humanen dermal Fibroblasten.....	114

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Sytwala S, **Günther F**, Melzig MF. Lysozyme- and chitinase activity in latex bearing plants of genus *Euphorbia* – A contribution to plant defense mechanism. *Plant Physiol. Biochem.* 2015, 95: 35-40

Günther F, Melzig MF. Protease-activated receptors and their biological role – focused on skin inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 2015; 67: 1623-1633

Günther F, Maus D, Hedtrich S, Melzig MF. Serine protease Mauritanicin from *Euphorbia Mauritanica* and phorbol-12-myristate-13-acetate modulate the IL-8 release in fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Planta Med.* 2018; doi: 10.1055/a-0735-9911

Poster

Görick C, **Günther F**, Melzig MF. Enzymes and diterpenes in latices of *Euphorbia* species. 62th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 31.08. – 04.09.2014, Guimarães, Portugal

Günther F, Melzig MF. Investigation of lysozyme from the latices of *Euphorbia coerulescens* Haw. and *Euphorbia fortissima* L.C. LEACH. 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 23. – 27.08.2015, Budapest, Ungarn; *Planta Med* 2015; 81; DOI: 10.1055/s-0035-1565773

Günther F, Melzig MF. Comparative studies of plant latex proteins from *Euphorbia coerulescens* HAW. and *Euphorbia fortissima* L.C.LEACH with hen egg white lysozyme. Havel-Spree-Colloquium, 11/2015, Berlin, Deutschland

Günther F, Weise C, Melzig MF. MALDI-TOF-MS/MS analysis of a serine protease from the latex of *Euphorbia mauritanica* L. Tag der Pharmazie, 07/2016, Berlin, Deutschland

Günther F, Melzig MF. Proteolytic active proteins from *Euphorbia mauritanica* L. stimulate the production from interleukine-6 and interleukine-8 in keratinocytes HaCaT cells. 9th Joint Natural Products Conference, 24. – 27.07.2016, Kopenhagen, Dänemark; *Planta Med* 2016; 82: 1-381; DOI: 10.1055/s-0036-1596720

Günther F, Melzig MF. Subtilisin-like protease Mauritanicain and Phorbol-12-myristate-13-acetate stimulate production of IL-8 in HaCaT keratinocytes and juvenile primary human fibroblasts. 65th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 03. – 07.09.2017, Basel, Schweiz; *PMIO* 2017; 4: 1-202; DOI: 10.1055/s-0037-1608060

Günther F. GPCRs and its role in skin inflammation after contact with latex of *Euphorbia mauritanica* L. 1. Berlin Interdisciplinary Symposium for Young GPCR Researchers; 12.04.2018

Günther F, Eichhorst A, Hedtrich S, Melzig MF. Modulating activity of latex from *Euphorbia mauritanica* L. on human skin models' immune response. 66th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research & 11th Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, 26. – 29.08.2018, Shanghai, China

Vorträge

Günther F. Protease activated receptors and their biological role. 1. Minisymposium „New developments in pharmacognosy” – Berlin-Warschau 2015“

Günther F. Cytokine release in HaCaT cell line. 2. Minisymposium „Searching for active compounds from natural sources – Warschau-Berlin 2016“

Günther F. Plant Latices – Investigations of the inflammatory potential from *Euphorbia mauritanica* L. Berlin; 11/2017

Günther F. GPCRs and its role in skin inflammation after contact with latex of *Euphorbia mauritanica* L. 1. Berlin Interdisciplinary Symposium for Young GPCR Researchers; 12.04.2018

Günther F. Characterization of the protease Mauritanicain from *Euphorbia mauritanica* L. and its modulating activity on human skin cells' immune response. Tag der Pharmazie; 06.07.2018

Günther F. Modulating activity of latex from *Euphorbia mauritanica* L. on human skin cells' immune response. 66th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research & 11th Shanghai International Conference on Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine, 26. – 29.08.2018, Shanghai, China

Lebenslauf

Aufgrund der EU Datenschutz-Grundverordnung (DSGVO) ist der Lebenslauf in der elektronischen Version nicht enthalten.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. F. Melzig für die exzellente Betreuung während der letzten Jahre, während der Doktorarbeit, aber auch während der Diplomarbeit und dem Studium. Auch in schwierigen Situationen hatten Sie stets Lösungen parat. Für Ihr Verständnis und Engagement bin ich Ihnen sehr dankbar. Vielen Dank dafür!

Bei Herrn Prof. Dr. H. Rawel möchte ich mich herzlich für die Anfänge der MS-Versuche mit dem Mauritanicain bedanken. Ohne Ihre Hilfe wäre das Projekt „Mauritanicain“ niemals soweit, wie es jetzt ist. Herzlichen Dank.

Ein großer Dank gilt Dr. Christoph Weise! Danke für all deine Hilfe. Du warst während einer der wichtigsten Phasen meiner Doktorarbeit immer ein guter Ansprechpartner für mich – ich habe sehr viel von dir gelernt (nicht zuletzt, Ruhe zu bewahren). Ohne die MS/MS-Versuche wäre das ganze Projekt mit dem Mauritanicain nicht möglich gewesen!

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. G. Wolber möchte ich herzlich für die Zusammenarbeit der *in-silico* Studien danken. Natürlich danke ich insbesondere Szymon Pach für unsere Zusammenarbeit nicht nur während des OC-Praktikums, sondern auch für die Versuche am Computer.

Bei der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. S. Hedtrich möchte ich mich herzlich für die Zusammenarbeit mit den Hautmodellen bedanken. Insbesondere Anne Eichhorst war hier eine große Hilfe.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Weindl möchte ich mich herzlich für das Bereitstellen der HaCaT-Keratinocyten und Fibroblasten sowie für die Möglichkeit der Nutzung der Durchflusszytometrie bedanken. Ohne Ihre Hilfe hätten die Versuche so nicht stattfinden können.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Botanischen Gartens Berlin, stellvertretend Frau Gasper. Die stets freundliche Zusammenarbeit und Hilfe im Umgang mit den Pflanzen war mir zu jeder Zeit eine Freude!

Ganz herzlich möchte ich mich natürlich bei meinen Laborpartnern Dr. Tina Buchholz und Eric Woith bedanken. Tina, ich glaube wir haben uns ziemlich gut im Labor ergänzt. Schade, dass

du schon so viel früher fertig warst, ich hätte gerne noch weiter mit dir zusammengearbeitet – Hakuna matata! Dafür kam ja aber Eric! Musikalisch nicht immer auf der selben Wellenlänge, aber mindestens genau so viel Spaß während der langen gemeinsamen Labortage! Auf die Frage „*Whose house????!!*“ hattest du meist die korrekte Antwort ;). Den Montag-Morgen-*Hangover* mit dir werde ich wohl schmerzlich vermissen in Zukunft! Danke Eric auch fürs Korrekturlesen. Ihr musstet mich manchmal ganz schön aushalten! Sorry an dieser Stelle ;)!

Auch wenn die Laune nach missglückten Versuchen oft im Keller war, Dr. Annette Kietzmann, Cornelia Görick und Dr. Stefan Böttger hatten stets ein offenes Ohr für die Probleme und halfen mir immer, meine Laune wieder aufzubessern. Dankeschön euch Dreien!

Meinem Arbeitskreis (Eric, Tina, Marian, Simko, Arsenji, Franzi, Alexander, Andreas, Sonja, Martin, Wenyan, Jakub und Sebastian – sorry, falls ich jemanden vergessen habe) möchte ich herzlich für die Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima der letzten Jahre danken. Die Dienstreisen waren immer toll, die Stimmung nach langen Kongresstagen immer gut! Unvergessen unser Abend im „Hot Pot“ in Shanghai (oh *no no no no no, boil boil boil boil boil!*). Auch die Mittagspausen waren immer ein Tageshighlight und durften an einem langen Arbeitstag nicht zu kurz kommen.

Meiner Masterstudentin Maria Serrano Gregori gilt ebenso ein besonderer Dank, wie den zahlreichen Wahlpflichtstudenten, die mir im Labor tatkräftig weiterhelfen konnten.

Nadine und Noah: danke, dass ihr in der letzten Zeit immer für mich da wart! Ohne eure Hilfe wäre das letzte Jahr so viel schwerer gewesen!

Zu Letzt danke ich aus tiefstem Herzen meiner ganzen Familie, meinem Papa Michael und meiner Mama Elke Günther, sowie meiner Schwester Alexandra Wummel geb. Günther. Ohne eure Unterstützung, euer Vertrauen und euren Rückhalt hätte ich vermutlich im 1. Semester das Studium hingeschmissen und wäre Weltenbummler geworden. Es ist schön euch zu haben!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, 09. April 2019