

**Untersuchungen von pflanzlichen Latices hinsichtlich ihrer
Proteaseaktivität und deren Einfluss auf die
Interleukin-6 Sekretion monozytischer Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Apotheker André Domsalla

Berlin 2012

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel

Disputation am: 25.04.2012

Für meine Familie

Abkürzungsverzeichnis	VI
I. Einleitung	1
I.1. Proteasen	1
I.1.1. Klassifizierung proteolytischer Enzyme	1
I.1.1.1. Serinproteasen	2
I.1.1.2. Cysteinproteasen	3
I.1.1.3. Aspartatproteasen	3
I.1.1.4. Metalloproteasen	3
I.1.2. Vorkommen und Bedeutung von Pflanzenmilchsäften	3
I.1.2.1. Industriell genutzte Milchsäfte	5
I.1.2.2. Pharmazeutische und traditionelle Nutzung von Pflanzenmilchsäften	6
I.1.3. Proteolytische Enzyme in Pflanzenmilchsäften	6
I.1.3.1. Serinproteasen aus Milchsäften	7
I.1.3.2. Cysteinproteasen aus Milchsäften	8
I.1.3.3. Aspartatproteasen aus Milchsäften	10
I.1.3.4. Metalloproteasen aus Milchsäften	10
I.1.3.5. Proteasehaltige Milchsäfte ohne Zuordnung	11
I.1.4. Euphorbiaceae	12
I.1.4.1. Systematischer Überblick Euphorbiaceae	12
I.1.4.2. Gattung Euphorbia	13
II. Zielsetzung der Arbeit	15
III. Material und Methoden	16
III.1. Geräte	16
III.1.1. Elektrophorese	16
III.1.2. Zellkultur	16
III.1.3. Waagen	16
III.1.4. Zentrifugen	16
III.1.5. Sonstige Geräte	16
III.2. Verbrauchsmaterial	17
III.2.1. Zellkultur	17
III.2.2. Elektrophorese	18
III.2.3. Substrate	19
III.2.4. Enzyme	19
III.2.5. Inhibitoren	19
III.2.6. Dialyse	20

III.2.7. Chromatographie.....	20
III.2.8. Zelllinien	20
III.2.9. Kits	20
III.3. Puffer und Chemikalien.....	21
III.4. Verbrauchsmaterialien	22
III.5. Programme.....	23
III.6. Methoden	24
III.6.1. Probengewinnung und Latexaufbereitung	24
III.6.2. Protein-Bestimmung	24
III.6.2.1. Bradford-Assay	24
III.6.2.2. Bicinchoninsäure Assay (BCA-Assay)	24
III.6.3. Protease Assays.....	25
III.6.3.1. Universelles Protease Substrat Roche®	25
III.6.3.2. Enzchek® Protease Assay Kit Green Fluoreszenz.....	26
III.6.4. Untersuchungen zur Lagerungsstabilität.....	27
III.6.5. Bestimmung der Residualaktivitäten nach Zugabe spezifischer Inhibitoren.....	28
III.6.6. Proteinkonzentrierung.....	29
III.6.7. Untersuchungen hinsichtlich der Substratspezifität.....	29
III.6.7.1. Synthetische Substrate.....	29
III.6.7.2. In-Gel-Verdau verschiedener Substrate durch unbekannte Protease	30
III.6.8. Elektrophorese und Gelfärbung	32
III.6.8.1. SDS- Gelelektrophorese	32
III.6.8.2. Silberfärbung	32
III.6.8.3. Zymographie	33
III.6.8.4. Glykoproteinfärbung	34
III.6.9. Nano LC-ESI-MS/MS, Q-TOF.....	34
III.6.10. Reinigung des Latex von <i>Euphorbia mauritanica</i> L.	35
III.6.10.1. Ionenaustauschchromatographie	35
III.6.10.2. Größenausschlusschromatographie	36
III.6.11. Charakterisierung der unbekanntenen Protease.....	37
III.6.11.1. Verhalten gegenüber pH-Wertveränderungen.....	37
III.6.11.2. Verhalten gegenüber Temperaturänderungen	37
III.6.11.3. Verhalten gegenüber organischen Solventien	37
III.6.12. Zellkultur.....	38
III.6.12.1. Kultivierung von U-937 und THP-1 Zellen	38

III.6.12.1.1. Kryokonservierung	38
III.6.12.1.2. Revitalisierung	39
III.6.12.2. Differenzierung mit rekombinantem humanen Interferon-gamma (rhINF- γ)	39
III.6.12.3. Bestimmung der Zytotoxizität bzw. Zellviabilität mittels XTT	39
III.6.13. Interleukin-6 ELISA	40
III.6.13.1. Il-6 Status nach Behandlung mit ausgewählten Proteasen, PMA und deren Kombination	41
III.6.13.2. Il-6 Sekretion nach Behandlung mit Pflanzenlatices	42
III.6.14. Statistische Methoden	42
IV. Ergebnisse und Diskussion	43
IV.1. Untersuchung zur Substratauswahl	43
IV.2. Proteasescreening	44
IV.2.1. Proteolytische Aktivität in Araceae	44
IV.2.2. Proteolytische Aktivität in Apocynaceae und Asclepiadaceae	45
IV.2.3. Proteolytische Aktivität in Caricaceae, Clusiaceae und Convolvulaceae	46
IV.2.4. Proteolytische Aktivität in Moraceae und Papaveraceae	47
IV.2.5. Proteolytische Aktivität in Asteraceae	48
IV.2.6. Proteolytische Aktivität in Campanulaceae	50
IV.2.7. Proteolytische Aktivität in Euphorbiaceae	51
IV.3. Bestimmung der Residualaktivität ausgewählter Euphorbien	55
IV.4. Reinigung und Charakterisierung einer Proteasefraktion aus <i>Euphorbia</i> <i>mauritanica</i> L.	58
IV.4.1. <i>Euphorbia mauritanica</i> L.	58
IV.4.1.1. Mikroskopische Untersuchungen des Milchsaftes und des Stängels	59
IV.4.1.2. Nano LC-MS-MS nach tryptischen Verdau von SDS-Gelbanden	60
IV.4.1.3. Reinigung der Proteasefraktion aus <i>Euphorbia mauritanica</i>	61
IV.4.1.3.1. Ionenaustauschchromatographie	61
IV.4.1.3.2. Größenausschlusschromatographie	63
IV.4.1.4. Charakterisierung der unbekanntenen Proteasefraktion aus <i>Euphorbia</i> <i>mauritanica</i> L.	64
IV.4.1.4.1. Abschätzung der molekularen Masse	64
IV.4.1.4.2. Zymographie	65
IV.4.1.4.3. Glycoproteinfärbung	66
IV.4.1.4.4. Verhalten gegenüber pH-Wert	66
IV.4.1.4.5. Temperaturoptimum und Stabilität	67
IV.4.1.4.6. Verhalten gegenüber Solventien	68

IV.4.1.4.7. Stabilität der isolierten Fraktion.....	69
IV.4.1.4.8. Identifikation der Substratspezifität der unbekannt Protease durch Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS.....	70
IV.4.1.4.8.1. Verdau von Myoglobin (horse heart).....	70
IV.4.1.4.8.2. Verdau von β -Lactoglobulin (bovine).....	71
IV.4.1.4.8.3. Verdau von Lysozym (hen egg white).....	71
IV.4.1.4.8.4. Vergleich der unbekannt Protease mit Trypsin.....	72
IV.4.1.4.9. Untersuchungen zur Substratspezifität anhand synthetischer Substrate	73
IV.4.1.4.10. Inhibitorisches Profil der unbekannt Protease.....	74
IV.4.2. Zellkultur-Untersuchungen.....	75
IV.4.2.1. Vorbemerkung.....	75
IV.4.2.2. Differenzierung von U-937 Zellen.....	76
IV.4.2.3. Interleukin-6 ELISA.....	77
IV.4.2.4. Status der Interleukin-6 Sekretion durch Behandlung von Proteasen in undifferenzierten U-937/THP-1 Zellen.....	78
IV.4.2.5. Status der Interleukin-6 Sekretion durch Behandlung von Proteasen, PMA und deren Kombination in differenzierten U-937.....	79
IV.4.2.5.1. Versuch mit Thrombin.....	79
IV.4.2.5.2. Versuch mit Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA).....	80
IV.4.2.5.3. Kombination PMA 0,1 ng/ml mit Thrombin.....	81
IV.4.2.5.4. Kombination PMA 1 ng/ml mit Thrombin.....	82
IV.4.2.5.5. Kombination PMA 10 ng/ml mit Thrombin.....	83
IV.4.2.5.6. Versuch mit Papain.....	84
IV.4.2.5.7. Kombination Papain mit PMA.....	85
IV.4.2.5.8. Versuch mit Trypsin.....	86
IV.4.2.5.9. Kombination Trypsin mit PMA.....	87
IV.4.2.5.10. Il-6 Status nach Behandlung mit Pflanzenlatices.....	87
IV.4.2.5.11. Pflanzenproben mit moderater Il-6 Sekretionssteigerung.....	88
IV.4.2.5.12. Pflanzenproben mit höherer Il-6 Sekretionssteigerung.....	89
IV.4.2.5.13. Pflanzenproben mit hoher Il-6 Sekretionssteigerung.....	90
V. Schlussfolgerungen.....	91
V.1. Protease Screening.....	91
V.2. Residualwertbestimmung nach Behandlung mit spezifischen Inhibitoren.....	93
V. 3. Reinigung und Charakterisierung einer Proteasefraktion aus <i>Euphorbia mauritanica</i>	94
V.4. Modulation der Interleukin-6 Sekretion in monozytären Zellen durch Proteasen, PMA und deren Kombination.....	96
V.4.1. Il-6 Konzentration nach Latexbehandlung ausgewählter Euphorbien.....	98

VI. Zusammenfassung.....	99
VII. Summary.....	101
VIII. Abbildungsverzeichnis	103
IX. Tabellenverzeichnis	105
X. Literaturverzeichnis.....	107
XI. Publikationsverzeichnis	126
XII. Curriculum Vitae	127
XIII. Danksagung	128
XIV. Eidesstattliche Erklärung	129

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dem.	Aqua demineralisata
AEBSF	(4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid)
BCA	<i>Bicinchonic Acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serum Albumin
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E-64	trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan
EC	<i>Enzyme Commission</i> , Gesellschaft zur Klassifizierung von Enzymen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	<i>Enzym Linked Immuno Sorbent Assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorbtionstest
FBS	fötales Rinderserum
FMP	Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
g	Erdbeschleunigung
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IC	Ionenaustauschchromatographie
Il-6	Interleukin-6
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i> , Molekularer Größenausschluss
MS	Massenspektrometrie
Nano LC	<i>Nano Liquid Chromatography</i> , Nano Flüssigkeitschromatographie
Page	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	<i>Proteinase-activated receptor</i> , Proteinase-aktivierter Rezeptor
Pepstatin A	Isovaleryl-L-val-L-val-4-(S)-amino-3-(S)-hydroxy-6-methyl-heptanoyl-2-ala-4-(S)-amino-3-(S)-amino-3-(S)-hydroxy-6-methylheptansäure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMS	Phenazinmethosulfonat
rhIFN- γ	rekombinates humanes Interferon gamma

RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
XTT	(2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid)

Aminosäuren

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

I. Einleitung

I.1. Proteasen

Das Vorkommen in allen Lebensformen, die unterschiedliche Lokalisation innerhalb, außerhalb und an der Oberfläche von Zellen und die funktionelle Diversität lässt die Gruppe der proteolytischen Enzyme zu einer der vielfältigsten und größten Enzymgruppen zählen. Insgesamt machen Proteasen ungefähr die Hälfte des Enzym-Weltmarktes aus. Große Bedeutung haben die alkalischen Proteasen vom Typ des Subtilisin aus Bakterien, die in Waschmitteln eingesetzt werden, sowie die Rennine, Labenzyme zur Käseherstellung. Weiterhin ist die pflanzliche Protease Papain aus *Carica papaya* L. (Caricaceae) für die Getränkeindustrie zur Entfernung von Trübungen und für die Lebensmittelindustrie zur Fleischzartmachung (*tenderizing*) bzw. Geschmacksverbesserung von Proteinhydrolysaten von großer Bedeutung. Die Pankreasprotease Trypsin findet in der Lederindustrie zur Entfernung von Haaren und Nichtstrukturproteinen Anwendung. Ein weiteres technologisches Anwendungsgebiet stellt die Backindustrie dar, *Aspergillus oryzae*-Proteasen werden zum Abbau von Gluten genutzt [1, 2].

I.1.1. Klassifizierung proteolytischer Enzyme

Proteolytische Enzyme (EC 3.4) (synonym Proteasen, Proteinasen, Peptidasen) katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen und werden entsprechend der *Enzyme Commission* (EC) den Hydrolasen EC 3 zugeordnet. Je nach Angriffspunkt der Protease kann zwischen Exo- und Endopeptidasen unterschieden werden. Exopeptidasen (EC 3.4.11. - EC 3.4.19.) spalten Peptidbindungen vom N- oder C-Terminus der Polypeptidkette. Exopeptidasen, die nur eine einzige Aminosäure vom freien N-terminalen Ende abspalten, werden als Aminopeptidasen, die ein Dipeptid oder Tripeptid freisetzen, werden als Dipeptidyl-Peptidasen bzw. Tripeptidyl-Peptidasen bezeichnet. Ist der Angriffsort der freie C-Terminus, so spricht man im Falle der Abspaltung eines einzigen Restes von Carboxypeptidasen, im Falle der Freisetzung eines Dipeptids von Peptidyl-Dipeptidasen. Endopeptidasen spalten die Bindungen innerhalb der Polypeptidkette und werden nach dem Bau ihres aktiven Zentrums in Serin- (EC 3.4.21), Cystein- (EC 3.4.22), Aspartat- (EC 3.4.23) und Metalloproteasen (EC 3.4.24) sowie Proteasen unbekanntem Typs (EC 3.4.99) unterschieden [3, 4].

I.1.1.1. Serinproteasen

Es gibt ca. 40 Serinprotease-Familien, die in 6 Clans eingruppiert werden. Die Katalyse benötigt in Ergänzung zum Serin, welches das Nukleophil darstellt, einen Protonendonator. In den Clans SA, SB, SC und SH ist der Protonendonator die Aminosäure Histidin. Für die Katalyse ist noch eine dritte Aminosäure zur Orientierung des Imidazolringes des Histidins notwendig. Gewöhnlich ist dies Aspartat. Somit entsteht eine katalytische Triade. In Clan SH ist es allerdings ein weiteres Histidin. In den Clans SE und SF hat Lysin die Rolle des Protonendonators. Eine dritte Aminosäure ist nicht notwendig, es ist somit nur eine katalytische Diade. Die Clans SA, SB und SC haben die typische katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat, allerdings in unterschiedlichen Abfolgen [3].

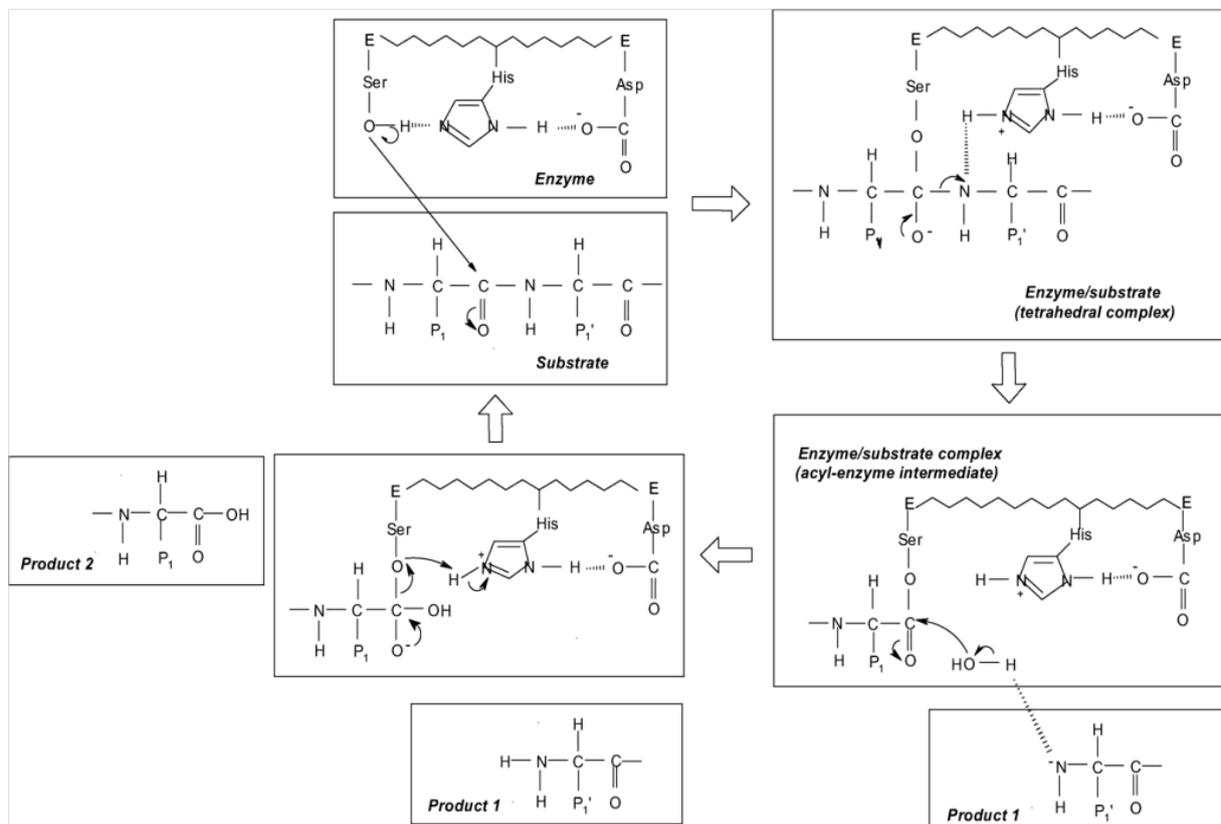


Abb. 1 Mechanismus der Katalyse durch Serinproteasen adaptiert nach Antão, C. M. und F. X. Malcata (2005). Die Basisreaktion der Katalyse besteht aus zwei Schritten; 1. Die Formation einer Esters zwischen dem Sauerstoff des Serins und der Acyl-Komponente der Peptidbindung des Substrats- dadurch bildet sich ein tetraedrisches Intermediat, 2. durch die Deacylierung wird ein Proton eines Wassermoleküls auf das Histidin übertragen, welches zur Freisetzung der Carbonylkomponente und der Regenerierung des Enzyms [5].

I.1.1.2. Cysteinproteasen

Cysteinproteasen (SH- oder Sulfhydrylproteasen) werden in 41 Familien eingeteilt. Im aktiven Zentrum, welches gleichzeitig die nukleophile Komponente darstellt, ist die Sulfhydrylgruppe des Cysteins. Der Mechanismus der Katalyse ist vergleichbar mit dem der Serinproteasen, der Protonendonator ist bei allen Cysteinproteasen ein Histidin [5, 6].

I.1.1.3. Aspartatproteasen

Bei Aspartat- oder sauren Proteasen, ist das Wassermolekül im aktiven Zentrum von zwei Aspartatresten umgeben. Die Aspartatreste führen zur Aktivierung der Wassermoleküle. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, sind sie gleichzeitig als Protonenakzeptoren bzw. –donatoren. Das aktivierte Wassermolekül agiert als Nukleophil und initiiert die Hydrolyse der Peptidbindung unter Ausbildung eines tetraedrischen Intermediats [7].

I.1.1.4. Metalloproteasen

Die Aktivierung des Wassermoleküls erfolgt bei Metalloproteasen in der Regel durch das Zinkion im katalytischen Zentrum. Das aktivierte Wassermolekül agiert wiederum als Nukleophil und initiiert die Hydrolyse der Peptidbindung. Als Protonenakzeptor reagiert hier ein Glutamat. Es bildet sich ein tetraedrisches Intermediat. Nach anschließendem Protonentransfer von der Carbonylfunktion des Glutamates auf die Aminkomponente der Peptidbindung kommt es zur Hydrolyse der Peptidbindung und die Produkte diffundieren vom aktiven Zentrum unter Regeneration des Enzyms [8].

I.1.2. Vorkommen und Bedeutung von Pflanzenmilchsäften

Mehr als 35000 Gefäßpflanzen produzieren Milchsaft, Harze oder andere Exsudate. Milchsaft wird von 39 Pflanzenfamilien in mehr als 20000 Arten [9, 10] produziert. Latexführende Pflanzen sind vor allem tropische Pflanzen, 12.2% aller Familien bzw. 14.0% aller tropischen Species enthalten Milchsaft, hingegen sind nur 4,9% der Familien bzw. 5.9% der Species in

gemäßigten Breiten milchsaftführend. Regional betrachtet, findet man für das tropische Afrika bzw. tropische Südamerika Anteile bis zu 35% aller Arten, die Milchsaft produzieren. Weltweit sind 8.9% aller Pflanzen milchsaftthaltig [9]. Phylogenetisch ist das Vorhandensein milchsaftproduzierender Pflanzen weitverbreitet und konvergent, so dass die Entwicklung von Latexstrukturen unabhängig und auf mehreren Wegen stattfand. Es gibt eng miteinander verwandte Familien innerhalb einer Ordnung, die milchsaftthaltig sind und welche, die keinen Milchsaft aufweisen, wie Moraceae vs. Rosaceae (Rosales), Apocynaceae vs. Rubiaceae (Gentianales) oder Caricaceae vs. Brassicaceae (Brassicales).

Tab. 1 Übersicht über Milchsaft führende Pflanzenfamilien

Aceraceae (Ahorngewächse)	Alismataceae (Froschlöffelgewächse)	Alliaceae (Lauchgewächse)	Anacardiaceae (Sumachgewächse)	Apiaceae (Doldenblütler)
Apocynaceae (Hundsgiftgewächse)	Aponogetonaceae (Wasserährengewächse)	Araceae (Aronstabgewächse)	Asclepiadaceae (Seidenpflanzen/ Schwalbenwurzgewächse)	Asteraceae (Korbblütler)
Butomaceae (Schwanenblumen- gewächse)	Cabombaceae (Fischgrasgewächse)	Cactaceae (Kakteengewächse)	Campanulaceae (Glockenblumen- gewächse)	Cannabinaceae (Hanfgewächse)
Caricaceae (Melonenbaum- gewächse)	Celastraceae (Spindelbaum- gewächse)	Clusiaceae (Johanniskraut- gewächse)	Connaraceae (Zebraholz- gewächse)	Convolvulaceae (Windengewächse)
Curcubitaceae (Kürbisgewächse)	Cyclanthaceae (Scheibenblumen- gewächse)	Eucommiaceae	Euphorbiaceae (Wolfsmilch- gewächse)	Gnetaceae
Hippocrateaceae	Icacinaceae	Menispermaceae (Mondsamen- gewächse)	Moraceae (Maulbeer- gewächse)	Musaceae (Bananen- gewächse)
Nymphaeaceae (Seerosen- gewächse)	Olacaceae	Papaveraceae (Mohngewächse)	Peripterygiaceae	Podostemaceae
Sapindaceae (Seifenbaum- gewächse)	Sapotaceae (Breiapfelgewächse)	Saxifragaceae (Steinbrechgewächse)	Urticaceae (Brennnessel- gewächse)	

Milchsaft stellt eine wässrige Emulsion bzw. Suspension mit unterschiedlicher Zusammensetzung dar. Das mögliche Inhaltsstoffspektrum reicht von Stärke, Ölen, Tanninen, Alkaloiden, Isoprenoiden, herzwirksame Steroidglykosiden, Di- und Triterpenen, Flavonoiden, Proteinen, Lektinen und Enzymen (Polyphenoloxidasen und -peroxidasen, Proteasen, Lipasen, Phosphatasen, Chitinasen) bis zu lebenden Zellen [9]. Die Latices haben dabei verschiedene Farben und variieren je nach Zusammensetzung von durchsichtig, leicht opaleszierend über weiß trüb bis hin zu gelben, rot oder orange gefärbten Milchsaften. Der unter Druck stehende Milchsaft tritt bei kleinsten Verletzungen von Blättern, Stengeln,

Früchten oder Wurzeln aus und führt bei den meisten Pflanzen innerhalb weniger Minuten durch Koagulation zum Wundverschluss. Außer zum Wundverschluss dient der Latex durch zum Teil toxische Inhaltsstoffe der Abwehr von Fressfeinden und zum Schutz vor Herbivoren, Parasiten, Pilzen und Pathogen allgemein. Der koagulierte Latex kann dabei zum Verkleben der Beißwerkzeuge von Insekten führen. Die Kombination aus Adhäsivität, Wundverschluss und toxischen Inhaltsstoffen kann somit als Verteidigungssystem der Pflanzen angesehen werden [11].

I.1.2.1. Industriell genutzte Milchsäfte

Der wohl bekannteste und kommerziell genutzte Latex ist der Milchsaft von *Hevea brasiliensis* MUELL. ARG. (Euphorbiaceae). Circa. 90% der Weltkautschukmenge (9,7 Mio. t/a (2009)) *International Rubber Study Group (IRSG)*) wird aus dem in Plantagen angebauten Kautschukbaum gewonnen und dient als Grundlage der Gummi-Industrie. Andere Kautschukquellen sind der Panama- oder Castilla-Gummi aus *Castilla elastica* SESSÉ ex CERV. (Moraceae), Ceara- oder Manicoba-Gummi von *Manihot glaziovii* MÜLL. ARG. (Euphorbiaceae), Assam bzw. Indischer Gummi von *Ficus elastica* ROXB. Moraceae, Lagos-Seidengummi von *Funtumia elastica* (PREUSS) STAPF. (Apocynaceae), Landolphia Gummi von verschiedenen Arten der Gattung *Landolphia* P. BEAUV (Apocynaceae), Guayule von *Parthenium argentatum* A. GRAY (Asteraceae), Dandelion-Gummi von *Taraxacum kok-saghyz* L. E. RODIN (Asteraceae) und kleinere Vorkommen in *Euphorbia intisy* DRAKE (Euphorbiaceae), *Cryptostegia grandiflora* ROXB. ex R. BR. und *C. madagascariensis* BOJER ex DECNE (Apocynaceae), *Hancornia speciosa* GOMES (Apocynaceae), *Asclepias subulata* DECNE. (Asclepiadaceae) und *Apocynum cannabinum* L. (Apocynaceae). Andere kommerziell genutzte Latexprodukte sind Guttapercha (*Palaquium gutta* (HOOK.) BURCK, Sapotaceae), Balata (*Manilkara bidentata* (A. DC.) A. CHEV., Sapotaceae), Jelutong (*Dyera costulata* HOOK. f., Apocynaceae) und Chicle (*Manilkara zapota* (L.) P. ROYEN, Sapotaceae), welche dienen bzw. dienten als Ausgangsprodukte für die Kaugummiproduktion (Chicle), Klebematerial für chirurgische Pflaster und für zahnmedizinische Zwecke (Guttaperchaspitzen bei Wurzelspitzenbehandlungen) aber auch als Isolierung für submarine Kabel [12].

I.1.2.2. Pharmazeutische und traditionelle Nutzung von Pflanzenmilchsäften

Neben der kommerziellen Nutzung von Latex als Kautschukquelle wird Latex auch in der traditionellen Heilkunde verwendet. Der Milchsaft des Schöllkrauts (*Chelidonium majus*, Papaveraceae) wird als Mittel zur Warzenentfernung verwendet [13]. Der getrocknete Milchsaft der unreifen Kapsel Früchte von *Papaver somniferum* L., die nach dem Fall der Kronblätter angeritzt werden, stellt die Droge Opium cudrum dar. Aus Rohopium werden diverse Isochinolinalkaloide isoliert. Diese dienen vor allem als Therapeutika in der Schmerztherapie (z.B. Morphin, Codein) und als Antitussiva (z.B. Codein, Noscapin) sowie als Spasmolytikum (Papaverin). Desweiteren werden die Milchsäfte von *Funastrum clausum* (JACQ.) SCHLECHTER [14] und *Araujia hortorum* FOURN. [15] ebenfalls als Mittel zur Entfernung von Warzen genutzt. Eine andere Anwendungsmöglichkeit von Latices, ist die Behandlung von gastrointestinalen Nematoden. So wird der Milchsaft des Christudorns *Euphorbia milii* DES MOUL. gegen Leberegel, Bilharziose sowohl bei Tieren (Rindern und Schafen) als auch beim Menschen eingesetzt [16], auch der Latex von *Ficus glabrata* H. B. K. wird gegen Nematoden eingesetzt [17]. Der Latex von *Ervatamia coronaria* (JACQ.) STAPF. wirkt kühlend und ist auf Grund seiner antiinflammatorischen Effekte wundheilungsfördernd [18].

I.1.3. Proteolytische Enzyme in Pflanzenmilchsäften

Über 130 verschiedenen Arten mit proteolytischer Aktivität im Latex sind in der Literatur beschrieben. Die meisten sind Vertreter der Moraceae (65), Euphorbiaceae (26), Apocynaceae (13), Asclepiadaceae (11), Caricaceae (6), Asteraceae (2) und Convolvulaceae (1) und Anacardiaceae (1) [19]. Bisher wurden 46 Arten hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu einer der Proteaseklassen untersucht, dabei wurden 22 Arten mit Serinprotease- und 22 Arten mit Cysteinproteaseaktivität gefunden, bei einigen Arten wurden auch mehrere Proteasen isoliert, aus der Gruppe der Aspartat- und Metalloproteasen ist bis heute nur jeweils eine Art bekannt.

I.1.3.1. Serinproteasen aus Milchsäften

22 Serinproteasen sind bisher beschrieben worden. Darunter wurden vor allem Serinproteasen in der Familie der Euphorbiaceen isoliert, von den 12 charakterisierten Proteasen aus Euphorbiaceen entfallen 10 auf die Gattung *Euphorbia*. Die beiden einzigen in Asteraceae gefunden Proteasen Parthenain (*Parthenium argentatum* A. GRAY) und Taraxalisin (*Taraxacum officinale* WEBB s. l.) wurden ebenfalls als Serinproteasen beschrieben. Desweiteren wurden sechs Serinproteasen aus der Familie der Moraceae, eine aus der Familie der Convolvulaceae und eine aus der Familie der Asclepiadaceae isoliert.

Tab. 2 Serinproteasen und deren biochemische Eigenschaften

Protease	Art	M _r [kDa]	Isoelk- trischer Punkt (PI)	pH-Optimum- (Substrat)	Temperatur- Optimum [°C] (Substrat)	Ref.
Cryptolepain	<i>Cryptolepis buchananii</i> ROEM. & SCHULT. Asclepiadaceae	79.5	6.3	8-10 (Azoalbumin)	65-75 (Azoalbumin)	[20, 21]
Parthenain	<i>Parthenium argentatum</i> A. GRAY Asteraceae	63	6.3	7.0-8.0 (Z- glycine-p- nitrophenyl- ester)	-	[22]
Taraxalisin	<i>Taraxacum officinale</i> WEBB s.l. Asteraceae	65	4.5	8.0 (Glp-Ala- Ala-Leu-pNa)	40 (Glp-Ala- Ala-Leu-pNa)	[23]
Carnein	<i>Ipomoea carnea</i> ssp. <i>fistulosa</i> (MART. ex CHOISY) D.F. AUSTIN Convolvulaceae	80.236	6.5	6.5	60	[24, 25]
Euphorbain D₁	<i>Elaeophorbia drupifera</i> (SCHUM.) Stapf. Euphorbiaceae	117	5.8-7.5	6.3 (d1)	-	[26]
Euphorbain D₂		65	5.2-9.1	7.8(d2) (Azokollagen)		
Euphorbain Y₁	<i>Euphorbia cyparissias</i> L. Euphorbiaceae	67	5.2	5.2		[27]
Euphorbain Y₂		33	5.2	5.5		
Euphorbain Y₃		67	6.3	7.0 (azocollagen)		
Euphorbain La₁	<i>Euphorbia lactea</i> HAW. Euphorbiaceae	66	7.0	La ₁ : 7.5 (Azokollagen)	-	[28]
Euphorbain La₂		44	5.0-6.4			
Euphorbain La₃		33	4.5			
Euphorbain Lc	<i>Euphorbia lactea</i> L. <i>crinata</i> Euphorbiaceae	70	5.0 - 8.0 (5)	8.3 (Azokollagen)	-	[28]
Euphorbain L	<i>Euphorbia lathyris</i> L. Euphorbiaceae	43	4.9	7-7.5	-	[29]
Milin	<i>Euphorbia milii</i> DES MOUL. Euphorbiaceae	51.4	7.2	8.0 (Casein)	60	[16]
Neriifolin	<i>Euphorbia neriifolia</i> Euphorbiaceae	35.24	5.7	8.5	55	[30]
Protease	<i>Euphorbia pseudo- chamaesyce</i> FISCH. Euphorbiaceae	82	-	7.5 (Casein)	-	[31]
Euphorbain P	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	74	4.7	7.0	-	[32]

	WILLD. Euphorbiaceae	(Azocasein)				
Euphorbain T₁	<i>Euphorbia tirucalli</i> L.	74				[33]
T₂	Euphorbiaceae	74	5.0-5.5(4)			
Euphorbain T₃		74	4.7-5.2(4)			
T₄		74	4.0-5.0(4)			
Hevain A	<i>Hevea brasiliensis</i>	69	4.3	A: 6.6	-	[34,
B	MUELL. ARG	58	4.8-5.3 (4)	B: 6.3		35]
L	Euphorbiaceae	80	4.9-6.9 (6)	L: 6.3 and 7.7 (CGN)		
Two proteases	<i>Synadenium grantii</i> HOOK. f. Euphorbiaceae	76±2	-	7.0	60 (Azocasein)	[36]
Artocarpin	<i>Artocarpus heterophyllus</i> LAM. Moraceae	79.5	6.3	8.0 (Casein)	60 (Casein)	[37]
Macluralisin	<i>Maclura pomifera</i> (RAF.) SCHNEID. Moraceae	65	-	8.5 (Glp-Ala- Ala-Leu- NHC ₆ H ₄ NO ₂)	58 (Glp-Ala- Ala-Leu - HC ₆ H ₄ NO ₂)	[38]
Ficin E	<i>Ficus elastica</i> ROXB. Moraceae	50	3.7	6.0 (Azokollagen)	-	[39]
Religosin B	<i>Ficus religiosa</i> L. Moraceae	63	7.6	8.0-8.5	55	[40]
Indicain	<i>Morus indica</i> L. Moraceae	67.3 67.2	4.8	8.5	80	[41]
Streblin	<i>Streblus asper</i> LOUR. Moraceae	64	9.2	9.0	65	[42]

I.1.3.2. Cysteinproteasen aus Milchsäften

Die 22 bisher charakterisierten Cysteinproteasen sind vor allem aus Arten der Asclepiadaceae, Apocynaceae, Moraceae und Caricaceae und eine Euphorbie (*Euphorbia milii* var. *hislopilii*). Aus dem Latex von *Carica papaya* sind 4 verschiedene Cysteinproteasen isoliert worden (Papain, Caricain, Chymopapain, Glycylendopeptidase). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Proteasen des Papayalates direkt als Verteidigungsagenz dienen und als Defence-Proteine bezeichnet werden können. Raupen des Götterbaumspinners (*Samia cynthia ricini*, Saturniidae) wurden entweder mit nativen Blättern des Papayabaums oder mit Papayablättern, aus denen der Latex ausgewaschen wurde bzw. Blätter, die mit dem spezifischen Inhibitor E-64 (trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan) behandelt und somit die Cysteinproteasen inhibiert wurden, gefüttert. Bei Raupen die mit den ausgewaschenen bzw. mit E-64 behandelten Blättern gefüttert wurden, zeigten sich keine Störungen im Wachstum wie bei denen, die mit den Kontrollblättern (Blätter von *Ricinus communis* L.) gefüttert wurden, hingegen starben bzw. wuchsen die Raupen kaum, die mit den nativen Blättern gefüttert wurden. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit den Blättern von *Ficus variegata* erzielt [43].

Tab. 3 Cysteinproteasen und deren biochemische Eigenschaften

Protease	Art	M _r [kDa]	PI	pH-Optimum (Substrat)	Temperatur- Optimum[°C] (Substrat)	Ref.
Ervatamin A	<i>Ervatamia coronaria</i> (JACQ.) STAPF. Apocynaceae	27.6	8.37	8.0-8.5 (Azoalbumin)	50-55 (Azoalbumin)	[18]
Ervatamin B	<i>Ervatamia coronaria</i> (JACQ.) STAPF. Apocynaceae	26	9.35	6.0-6.5 (Azocasein) 7.0-7.5 (Azoalbumin)	50-55	[44]
Ervatamin C	<i>Ervatamia coronaria</i> (JACQ.) STAPF. Apocynaceae	23	9.54	7.5-8.0 (Azoalbumin)	50 (Azoalbumin)	[44-47]
Heynein	<i>Ervatamia heyneana</i> (WALL.) T. COOKE Apocynaceae	23	10.8	8.0-8.5 (Hämoglobin)	52±2	[45]
Funastrain CII	<i>Funastrum clausum</i> (JACQ.) SCHLECHTER Apocynaceae	23.636	>9.3	9-10 (Casein) 6.2-6.8 (PFLNA)		[14, 48]
Philibertain G I	<i>Philiberta gilliesii</i> HOOK. et ARN. (fruits) Apocynaceae	23.530	>10.2 5	7.6 (Casein) 6.2-7.2 (PFLNA)		[49]
Morrenain BI	<i>Morrenia brachystephana</i> GRISEB. Asclepiadaceae	23.205	>9.3	8.4-9.0 (Casein)		[50-52]
Morrenain BII	<i>Morrenia brachystephana</i> GRISEB. Asclepiadaceae	25.5	>9.3	7.5-9.0 (Casein)		[50-52]
Morrenain OII	<i>Morrenia odorata</i> HOOK. et ARN. Asclepiadaceae	25.8	>9.3	7.0-10.0 (Casein)		[51]
Asclepain F	<i>Asclepias fruticosa</i> L. Asclepiadaceae	23.652	>9.3	8.5-10.5 (Casein)		[53]
Asclepain C I	<i>Asclepias curassavica</i> L. Asclepiadaceae	23.2	>9.3	8.5		[54]
Asclepain A3 B5	<i>Asclepias syrica</i> L. Asclepiadaceae	23 21		7.5-8.5 (Casein) 7.0-7.5 (Casein)		[55]
Asclepain G 10 forms	<i>Asclepias glaucescens</i> H.B.K. Asclepiadaceae	Ag ₃ 22.6 Ag ₆ 23.5 Ag ₇ 23 Ag ₈ 23.5	>9			[56]
Asclepain S	<i>Asclepias speciosa</i> TORR. Asclepiadaceae			7.0-8.0	65-75	[57]
Calotropin DI DII	<i>Calotropis gigantea</i> (L.) DYRAND. Asclepiadaceae	23.8 24.2	9.55 9.65	7.5-8.0	55	[58-60]
Procerain	<i>Calotropis procera</i> (AITON) DRYAND. Asclepiadaceae	28.8	9.32	7.0-9.0 (Azoalbumin)	55-60°C (Azoalbumin)	[61]
Araujain H I	<i>Araujia hortorum</i> FOURN. Asclepiadaceae	24.03	>9.3	8.0-9.5 (Casein)	60	[15, 62]
Araujain H II	<i>Araujia hortorum</i> FOURN. Asclepiadaceae	23.718	8.9	8.0-9.0 (Casein)		[62]
Araujain H III	<i>Araujia hortorum</i> FOURN. Asclepiadaceae	23.546	>9.3	8.0-9.0 (Casein)		[62]
Mexicain	<i>Jacartia mexicana</i> A. DC. (fruits) Caricaceae	23.8		8.5-9.0 (Casein)	65	[63, 64]
Papain	<i>Carica papaya</i> L. Caricaceae	23.429	8.75	5.5-7.0		[3]
Caricain	<i>Carica papaya</i> L.	23.280	11.7	7.0		[3]

	Caricaceae					
Chymopapain	<i>Carica papaya</i> L. Caricaceae	23.650	10.3- 10.7	7		[3]
Glycyl- endopeptidases	<i>Carica papaya</i> L. Caricaceae	23.313	above 10	7		[3]
Endopeptidase CCI, CCII, CCIII,CCIV, CC28, CMS1, CMS2	<i>Carica candamarcensis</i> HOOK. f. Caricaceae	23- 28.6	above 10.5- 11.5	6.8 (7.0)	60	[65- 71]
Eumilin	<i>Euphorbia milii</i> var. <i>hislopilii</i> (N.E. BR.) URSCH & LEANDRI Euphorbiaceae	30	-	8.0	60	[72]
Ficain	<i>Ficus glabrata</i> H.B.K. Moraceae	-	-	7.0		[3, 17]
Ficain P I	<i>Ficus pumila</i> L. Moraceae	28.6	>9.3	7.0-9.0 (Casein)	65	[73]
Ficain A, B, C, D	<i>Ficus carica</i> var. <i>horaishi</i> Moraceae	24.0- 26.0	8.3- 10.2	8.0	60	[74- 76]
Protease	<i>Ficus hispida</i> L. f. Moraceae		4.4- 4.7	7.0	40	[77]

I.1.3.3. Aspartatproteasen aus Milchsäften

Die einzige bisher charakterisierte Aspartatprotease wurde von Devaraj et al. (2008) [78] aus dem Latex von *Ficus racemosa* L. isoliert. Der Latex wird als Aphrodisiakum aber auch gegen Geschwüre, Diarrhö, Hämorrhoiden und Ruhr sowie zur Behandlung von Magenschmerzen und Knochenbrüchen verwendet. Außerdem wird der Latex aufgrund seiner Adhäsivität genutzt [79].

Tab. 4 Aspartatprotease und deren biochemische Eigenschaft

Protease	Art	M _r [kDa]	PI	pH-Optimum (Substrat)	Temperatur- Optimum [°C]	Ref.
Protease	<i>Ficus racemosa</i> L. Moraceae	44.5	4.5-6.4	-	50	[78]

I.1.3.4. Metalloproteasen aus Milchsäften

Cotinifolin wurde von Kumar et al. (2011) [80] aus dem Latex von *Euphorbia cotinifolia* L. (Caribbean Copper plant red spurge) isoliert und als Metalloprotease charakterisiert. Die Blätter von *Euphorbia cotinifolia* L. haben molluskizide und antivirale Eigenschaften. In Bezug auf die antiviralen Eigenschaften haben vor allem Wasser/Methanolextrakte starke

antiherpale Wirkungen [80]. Cotinifolin ist die einzige Metalloprotease aus pflanzlichem Milchsaft, die bisher biochemisch charakterisiert wurde.

Tab. 5 Metalloprotease und deren biochemischen Eigenschaften

Protease	Art	M _r [kDa]	PI	pH-Optimum (Substrate)	Temperatur Optimum [°C]	Ref.
Cotinifolin	<i>Euphorbia cotinifolia</i> L. Euphorbiaceae	79.76	7.7	7.0-8.0	50	[80]

I.1.3.5. Proteasehaltige Milchsäfte ohne Zuordnung

Diverse Pflanzenarten wurden positiv hinsichtlich der Proteasesaktivität im Latex getestet. Es wurden allerdings keine Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren durchgeführt. Daher ist eine Zuordnung zu einer der Proteasefamilien nicht möglich.

Tab. 6 Übersicht über proteasehaltige Latices ohne Zuordnung

Apocynaceae	Ref.	Caricaceae	Ref.	Euphorbiaceae	Ref.	Moraceae	Ref.
<i>Holarrhena antidiysenterica</i> (L.)WALL. ex A. DC.	[81]	<i>Vasconcellea x heilbornii</i> V. M. BADILLO	[82]	<i>Euphorbia amygdaloides</i> L.	[83]	<i>Brosimum alicastrum</i> SW.	[84]
<i>Plumeria acutifolia</i> (AIT) WOODSOON	[81]	<i>Vasconcellea monoica</i> (DESF.) A. DC.	[82]	<i>Euphorbia cerifera</i> ALC.	[85]	<i>Broussonetia papyrifera</i> VENT.	[84]
<i>Plumeria obtusifolia</i> L.	[81]	<i>Vasconcellea stipulata</i> V. M. BADILLO	[82]	<i>Euphorbia coerulescens</i> HAW.	[86]	<i>Ficus benghalensis</i> L.	[81]
<i>Tabernaemontana divaricata</i> L.	[81]			<i>Euphorbia esula</i> L.	[87]	<i>Ficus benjamina</i> L.	[84]
<i>Tabernaemontana grandiflora</i> JACQ. MIERS	[88]			<i>Euphorbia helioscopia</i> L.	[87]	<i>Ficus brevifolia</i> NUTT.	[84]
<i>Thevetia nerifolia</i> JUR. ex STEUD.	[81]			<i>Euphorbia hirta</i> L.	[81]	<i>Ficus carica</i> L. var. <i>kadota</i>	[89]
<i>Vallaris heynei</i> SPRUNG	[81]			<i>Euphorbia royleana</i> BOISS.	[90]	<i>Ficus carica</i> ssp.	[91]
<i>Wirghtia tinctoria</i> R. BR.	[92]			<i>Euphorbia splendens</i> BOJER ex HOOK.	[86]	<i>Ficus crassinervia</i> DESF. ex WILDENOW	[84]
				<i>Euphorbia trigona</i> HAW.	[86]	<i>Ficus glabella</i> BLUME	[84]
Anacardiaceae				<i>Hura crepitans</i> L.	[93]	<i>Ficus glomerata</i> ROXB.	[81]
<i>Mangifera indica</i> L.	[94]			<i>Jatropha curcas</i> L.	[95, 96]	<i>Ficus laurifolia</i> HORT. ex LAM.	[97]
				<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	[90]	<i>Ficus nitida</i> THUNB.	[84]
				<i>Jatropha podagrica</i> HOOK.	[81]	<i>Ficus nota</i> (BLANCO) MERR.	[84]
						<i>Ficus religiosa</i> L.	[81]

	<i>Ficus spragueana</i>	[84]
	MILDBR. & BURRET	
	37 <i>Ficus</i> ssp.	[98]
	<i>Morus alba</i> L.	[87]
	<i>Morus nigra</i> L.	[84]

I.1.4. Euphorbiaceae

Die Familie der Wolfsmilchgewächse (Euphorbiaceae, Malpighiales) wird in drei Unterfamilien unterteilt. In der vorliegenden Arbeit stellt die Unterfamilie Euphorbioideae einen Schwerpunkt dar und innerhalb der Unterfamilie die Gattung *Euphorbia*.

I.1.4.1. Systematischer Überblick Euphorbiaceae

Euphorbiaceae

Unterfamilien Acalyphoideae

Crotonoideae

Euphorbioideae

Tribus *Euphorbieae*

Subtribus *Anthosteminae*

Subtribus *Euphorbiinae*

Gattung *Euphorbia*

Untergattung *Esula*

Untergattung *Chamaesyce*

Untergattung *Euphorbia*

Untergattung *Rhizanthium*

Subtribus *Neoguillaumininae*

Tribus *Hippomaneae*

Subtribus *Carumbiinae*

Subtribus *Hippomaninae*

Tribus *Hureae*

Tribus *Pachystromateae*

Tribus *Stomatocalyceae*

Subtribus *Hamilcoinae*

Subtribus *Stomatocalycinae*

I.1.4.2. Gattung *Euphorbia*

Die Gattung *Euphorbia* umfasst ca. 2000 Arten und ist damit einer der artenreichsten Gattungen im Pflanzenreich. Die meisten Arten sind krautig oder verholzende Bäume oder Sträucher mit teils toxischem Milchsafte in ungegliederten Milchsaftröhren. Die Hälfte der Arten sind Xerophyten. Die Blätter sind überwiegend wechselständig oder seltener quirlig bzw. kreuzständig angeordnet. Die männlichen Blüten stehen in den Achseln sogenannter Cyathien aus einer Hülle von fünf Hochblättern. Die weibliche Blüte bildet als Fruchtknoten das Ende der Achse. Der Milchsafte weist, mikroskopisch betrachtet, stäbchen- bzw. hantelförmige Stärkekörner auf [99].

Den Namen der Gattung findet man schon bei Plinius dem Älteren (23-79 n. Chr.), der beschreibt, dass König Juba II. von Mauretanien die Heilkraft einer im Atlasgebirge wachsenden dornigen Pflanze entdeckt (wahrscheinlich *Euphorbia officinarum* oder *E. resinifera*) habe, deren milchiger Saft starke Kraft habe. Der geronnene Saft wurde als Gummi Euphorbium gegen Schlangenbisse angewendet. Der Legende nach hat König Juba II die Pflanze den Namen Euphorbea gegeben, da ihn deren gedrungene, fleischige Gestalt an seinen Leibarzt Euphorbus erinnerte. Der deutsche Name Wolfsmilch geht auf den beißend schmeckenden Milchsafte zurück. Der englische Name der Gattung spurge, abgeleitet vom Mittelenglischen /Altfranzösisch espurge (to purge) geht auf die Verwendung von Euphorbien als Abführmittel zurück [100].

Euphorbium, der erhärtete Milchsafte von *Euphorbia officinarum* oder *E. resinifera*, wird auch heute in Form homöopathischen Dilutionen in Euphorbium comp. SN Tropfen (Heel, Dilution D3) bei chronischen Entzündungen der Nasennebenhöhlen (Sinusitis) und bei Tubenkatarrhen bzw. Euphorbium comp. Nasentropfen SN (Heel, Dilution D4) bei Schnupfen und zur Begleittherapie bei Nasennebenhöhlenentzündungen eingesetzt [101]. Weiterhin wird in der Homöopathie Euphorbium bei Erkrankungen mit dem Leitsymptom Brennen verwendet. Wie zum Beispiel brennende Schmerzen der Schleimhäute, Brennen in inneren Organen, Gangrän innerer Organe sowie unerträgliche, brennende Karzinomschmerzen[102].

Traditionell wird der Milchsafte von Euphorbien als Mittel gegen Hauterkrankungen und zur Entfernung von Warzen genutzt. So wird der Latex von *E. heterodoxa* als Balsam gegen Geschwüre an Lippen, Nasen und Augenlidern in Südamerika genutzt. Die Behandlung von Warzen ist für *Euphorbia milii* var. *splendens* beschrieben, sowie die in niedrigen Dosen letale Wirkung auf die als Vektor für Bilharziose fungierenden Schnecken[103]. Es stellt ein günstiges und vor Ort produzierbares Mittel zur Kontrolle dieser Krankheit dar. Der Latex

von *Euphorbia peplus* wird ebenfalls zur Behandlung von Warzen verwendet aber auch für die Behandlung von Hühneraugen und Asthma. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Behandlung von Hauttumoren [104].

Die Milchsäfte von *Euphorbia abyssinica* GMEL., *Euphorbia cooperi* N.E. BR. ex A. BERGER, *Euphorbia ingens* E. MEY. ex BOISS., *Euphorbia poissonii* PAX, *Euphorbia tirucalli* L. und *Euphorbia trigona* HAW werden zum Poisoning Fishing genutzt [105]. Die Funktion der Kiemen der Fische wird eingeschränkt und diese treiben dann an der Wasseroberfläche. Der Prozess ist so schnell, dass das Fischfleisch nicht vergiftet wird.

Ansonsten sind die Euphorbia-Milchsäfte auf Grund des Vorkommens cocarcinogener und Tumor-fördernder Diterpenester, wie z.B. des Phorbol- bzw. Ingenol-Typs und ihrer starken, reizenden Eigenschaften auf Haut und Schleimhäute eher gefürchtet. Entzündungsgeschehen im Rahmen von Unfällen mit Milchsäften sind lange bekannt. Nach Kontakt mit dem Milchsaft kann es zu starken Reaktionen der Haut kommen. Diese können mit Rötungen, Juckreiz, Schwellungen, Blasenbildung und Ödem einhergehen [106]. Wenn der Saft mit den Augen in Kontakt kommt, kann es zur Konjunktivitis, Keratitis mit feiner Blasenbildung, Iritis oder/und Iridozyklitis führen. In schlimmsten Fällen kam es zur Erblindung [107]. Nach oraler Aufnahme von Euphorbien-Milchsäften kann es beim Menschen zu Magenschmerzen, blutigen Durchfällen, Erbrechen, Herzrhythmusstörungen und Bewusstseinsstörungen kommen [106].



Abb. 2 Blasenbildung im Bereich des Kinns nach Kontakt mit *Euphorbia helioscopia* L. [106]

II. Zielsetzung der Arbeit

Das Vorkommen von Proteasen in pflanzlichen Milchsäften wurde bisher nur für wenige Pflanzen bzw. Pflanzenfamilien beschrieben. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Screening über verschiedene Pflanzenfamilien vorgenommen werden. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Pflanzenfamilie Euphorbiaceae gelegt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, um welchen Typ von Protease es sich handelt. Daher wurden ausgewählte Pflanzen einem Inhibitor-Screening unterzogen, um anhand der Residualaktivitäten auf den Proteasetyp zuschließen.

Da proteolytische Enzyme aufgrund ihrer Spezifität und Stabilität auch industriell genutzt werden, war das Ziel, eine Protease zu reinigen und zu charakterisieren.

Euphorbienlatices werden nicht nur volksmedizinisch genutzt. Aufgrund ihres Inhaltsstoffspektrums und des Vorkommens von Diterpenestern besteht auch toxikologisches Interesse. Es sollte der Einfluss von Diterpenestern und Proteasen sowie deren Kombination in vitalen differenzierten monozytären Zellen hinsichtlich der Modulation des Status der Interleukin-6 Sekretion ermittelt werden, um Aussagen zur Entzündungsinduktion durch Milchsäfte zu erhalten.

III. Material und Methoden

III.1. Geräte

III.1.1. Elektrophorese

- Mini-Protean-3-cell-Elektrophoresekammer, Bio-Rad, München
- Power-Pac 300, Bio Rad, München

III.1.2. Zellkultur

- Biosafe plus, Integra Bioscience, Fernwald
- CASY-Cellcounter, Schärfe System GmbH, Reutlingen
- Präzisionsheizplatte PZ 28-1, Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf
- Sterilbank, Tecnoflow, Integra Bioscience, Fernwald
- Vakuum Sicherheitsabsaugsystem A2 104, VWR, Darmstadt
- Pipettierhilfe Maxipette, Greiner bio-one, Frickenhausen

III.1.3. Waagen

- Sartorius portable PT1200, Sartorius, Göttingen
- Sartorius analytic AC210P, Sartorius, Göttingen
- Sartorius BP211D, Sartorius, Göttingen

III.1.4. Zentrifugen

- Biofuge pico, Heraeus instruments, Hanau
- Medifuge, Heraeus instruments, Hanau
- Megafuge 1.0, Heraeus instruments, Hanau
- Mikro200R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

III.1.5. Sonstige Geräte

- Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage, Osterode
- Canon Power Shot G5, Canon, Krefeld

- Canon EOS 1000D, Canon, Krefeld
- Cryo 1°C Freezing Container, Nalgene, Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
- Epi-Fluoreszenzmikroskop, BX 41, Olympus, Japan
- Lichtmikroskop TMS-F, Nikon, Japan
- MALDI-TOF-Massenspektrometer (AUTOFLEX-III LRF200-CID, ausgestattet mit einem Smartbeam-Laser 200, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland)
- Mikroplattenreader, Tecan Infinite F200, Tecan, Berlin
- Mikroplattenreader, Tecan- Spectra Fluor, Tecan, Berlin
- Mini-pH-Einstabmesskette, SymphonySP70P, VWR Prolab, Leuven
- MS2 Minishaker, IKA[®] Labortechnik, Staufen
- pH-Einstabmesskette Typ Nr. N 62, Schott, Mainz
- pH-Meter766, Knick, Berlin
- Rotavapor R114, Büchi, Flawil, Schweiz
- Smartline Pumpe 1000, Knauer, Berlin
- Thermomixer MKR13, HLC BioTech, Bovenden
- Ultraschallbad Sonorex RK 100, BANDELIN electronic GmbH, Berlin
- Vacuum concentrator, Bachofer, Reutlingen
- Varioklav, H+P Labortechnik, Hackermoos
- Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
- Wasseraufbereitungsanlage (SG Reinstwasser-System) SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
- Wasserbad GFL, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
- Kolbenhubpipetten, Eppendorf, Hamburg
- Mehrkanalpipette Transferpette[®]-8, Brand, Wertheim
- Variable Wavelength monitor, Knauer, Berlin

III.2. Verbrauchsmaterial

III.2.1. Zellkultur

- Casy Ton Lösung, Schärfe System GmbH, Reutlingen(Roch Diagnostics Mannheim)
- Fetales Kälberserum (FBS superior), Biochrom AG, Berlin
- Fibronectin from human plasma, Roche diagnostics, Mannheim
- L-Alanyl-L-Glutamin (200 mM), Biochrom AG, Berlin
- Lipopolysaccharides(LPS) from Escherichia coli 0111:B4, Sigma Aldrich, Steinheim

- Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA), Calbiochem
- Phosphate buffered saline (PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}), Biochrom AG, Berlin
- Rekombinates humanes Interferon gamma, Biomol, Hamburg
- RPMI 1640 Zellkulturmedium flüssig mit 2,0g/l NaHCO_3 , ohne Phenolrot, ohne Glutamin), Biochrom AG, Berlin

III.2.2. Elektrophorese

- Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution, BioRad, München
- 10x Tris/Glycin/SDS/Buffer, Bio-Rad, München
- Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad, München
- 10x Tris/Glycin/Buffer, Bio-Rad, München
- SDS Ready Gel Precast Gels, 10% Tris-HCL, Bio-Rad, München
- SDS Ready Gel Precast Gels, 12% Tris-HCL, Bio-Rad, München
- SDS Ready Gel Precast Gels, 10-20% Tris-HCL, Bio-Rad, München
- Destain Solution Coomassie R-250, Bio-Rad, München
- Bio-Rad Silver Staining Kit, Bio-Rad, München
 - Bio-Rad Silverstain Developer
 - Bio-Rad Silverstain, Oxidizer concentrate
 - Bio-Rad Silverstain, Silver
- SDS-Page Standards, broad range, Bio-Rad, München
 - Myosin 200 kDa, β - Galactosidase 116,25 kDa, Phosphorylase b 97,4 kDa; BSA 66,2 kDa; Ovalbumin 45 kDa; Carboanhydrase 31 kDa; Trypsininhibitor 21,5 kDa; Lysozym 14,4 kDa, Aprotinin 6,5 kDa
- Protein Marker I (14-116), Applichem, Darmstadt
- Protein Marker II (6,5-200) prestained, Applichem, Darmstadt
- Rapid StainTM, Bioscience, St. Louis, MO, USA
- Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (2-250) Bio-Rad, München
- Glycoprotein-Staining-Kit, Pierce Protein Research Products, Thermo Scientific, Rockford (USA)
 - Oxidation Reagent
 - Reduction Reagent
 - Glycoprotein Stain solution
 - Positive Control (Horseradish Peroxidase)

- Negative Control (Soybean Trypsin Inhibitor)
- Ready Gel Zymogram Gel, 12%, Casein, Bio-Rad, München
- Zymogram Sample Buffer, Bio-Rad, München
 - 62,5 mM Tris- HCl, pH 6,8; 4% SDS; 25% Glycerol; 0,01% Bromphenolblau
- 10x Zymogram Development Buffer, Bio-Rad, München
- 10x Zymogram Renaturation Buffer, Bio-Rad, München
- 2-Mercaptoethanol, Sigma Aldrich, Steinheim
- GELoader Tips 0,5- 20 µl, Eppendorf, Hamburg

III.2.3. Substrate

- Boc-Asp-(OBzl)-Pro-Arg-AMC, Bachem, Bubendorf, CH
- Boc-Val-Pro-Arg-AMC, Bachem, Bubendorf, CH
- BZ-Arg-AMC, Bachem, Bubendorf, CH
- Enzchek Protease Assay kit green fluorescence, Invitrogen, Karlsruhe
- H-Leu-AMC, Bachem, Bubendorf, CH
- H-Phe-AMC, Bachem, Bubendorf, CH
- MeOSucc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC, Bachem, Bubendorf, CH
- Succ-Ala-Ala-Phe-AMC, Bachem, Bubendorf, CH
- Universal Protease Substrate, Roche, Mannheim
- Z-Gly-Gly-Arg-AMC, Bachem, Bubendorf, CH
- Z-Phe-Arg-AMC, Bachem, Bubendorf, CH

III.2.4. Enzyme

- Papain from *Carica papaya*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Pepsin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Thermolysin from *Bacillus thermoproteolyticus rokko*, Sigma-Aldrich, Steinheim
- Thrombin, Calbiochem, Merck, Darmstadt
- Thrombin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Trypsin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

III.2.5. Inhibitoren

- AEBSF, Applichem, Darmstadt
- Aprotinin, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

- E-64, Sigma Aldrich, Taufkirchen
- EDTA Dinatrium dihydrat, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- EGTA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Leupeptin, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Pefabloc SC, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Pepstatin A, Sigma Aldrich, Taufkirchen
- Phosphoramidon, Sigma Aldrich, Taufkirchen

III.2.6. Dialyse

- Microcentrifuge filters-Ultrafree MC Filter Units (NMWL 5000), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- QuixSep-Mikro-Dialysierkapseln, Carl Roth AG, Karlsruhe
- Vivaspin 4 (MWCO 5000 Da), Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen
- Vivaspin 500 (MWCO 5000 Da), Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen
- ZelluTrans-V-Series Dialyse Membran (1000 MWCO), Carl Roth AG, Karlsruhe

III.2.7. Chromatographie

- AcroSep™ Chromatography columns, Pall Corporation, Ann Arbor, USA
 - CM Ceramic HyperD F
 - Q Ceramic HyperD F
 - DEAE Ceramic HyperD F
- Größenausschlusschromatographie
 - Discovery Bio GFC 150 30 cm x 4.6 mm I.D., Supelco, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

III.2.8. Zelllinien

- THP-1, Humane akute monozytische Leukämie, ACC 16, DSMZ Braunschweig
- U-937, Humane akute monozytische Leukämie, ATCC, CRL-1593.2, DSMZ Braunschweig

III.2.9. Kits

- Human Il-6 ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience, San Diego, USA
 - Capture Antibody (purified anti-human Il-6 (clone MQ2-13A5))

- Detection Antibody (Biotin-conjugate anti-human Il-6) (clone MQ2-39C3)
 - Il-6 standard (purified human Il-6) (1 µg/ml)
 - ELISA/ELISPOT Coating buffer
 - Assay Diluent
 - Detection enzyme: pre-titrated Avidin-Horse radish peroxidase
 - Substrate solution: Tetramethylbenzidin (TMB) substrate solution
 - Corning Star 9018 96 well plate
- BCA Protein assay, Pierce Protein Research Products, Thermo Scientific, Rockford (USA)
 - BCA Reagenz A(Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA, Natriumtatarat in 0,1 M NaOH)
 - BCA Reagenz B (Kupfersulfatlösung 4%)
 - Albumin Standard 2 mg/ml
 - Enzchek Protease Assay Kit green Fluorescence, Invitrogen, Darmstadt
 - Komponente A: Casein, BODYPY[®] FL conjugate
 - Komponente B: Digestion buffer (200 mM Tris; pH 7,8; 2 mM Natriumazid)
 - In-Gel Tryptic Digestion Kit, Pierce Protein Research Products, Thermo Scientific, Rockford (USA)
 - Trypsin, Modified, 20 µg
 - Trypsin Storage Solution, 40 µl
 - Acetonitrile, 3 × 24 ml
 - Ammonium Bicarbonate, 300 mg
 - TCEP (Tris[2-carboxyethyl]phosphine), 500 µl
 - Iodoacetamide (IAA), 500 mg

III.3. Puffer und Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Acetonitril, VWR, Darmstadt
- Albumin Fraktion V, Carl Roth, Karlsruhe
- Calciumchlorid, Merck, Darmstadt
- Dinatriumhydrogenphosphat, Merk, Darmstadt

- Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Essigsäure, Sigma Aldrich Laborchemikalien, Seelze
- Glycerol, p.A., Merck, Darmstadt
- Glycin, Merck, Darmstadt
- Isopropanol, Carl Roth, Karlsruhe
- Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt
- Methanol, VWR Prolab, Leuven
- Natriumacetat-trihydrat, Merk, Darmstadt
- Natriumazid, Sigma Aldrich, Steinheim
- Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$, Carl Roth, Karlsruhe
- Natriumdihydrogenphosphat, Merk, Darmstadt
- Natriumhydroxid 1 M, Merck, Darmstadt
- Peptide calibration standard II^{cc} (Massenbereich von 700–3500 Da), Bruker Daltonics
- PMS, Phenazinmethosulfonat, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- rhIFN gamma, Biomol, Hamburg
- Salzsäure 37%, Merck, Darmstadt
- Tris p.A., Merck, Darmstadt
- TWEEN[®] 20, Carl Roth AG, Karlsruhe
- XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid)

III.4. Verbrauchsmaterialien

- Casy[®] cups, Roche Diagnostics, Mannheim
- Cellstar[®] Filter Top Zellkulturflaschen (Suspensionskultur) 25 cm², 75 cm², Greiner bio-one, Frickenhausen
- Einmalspritzen Omnifix (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml), B. Braun, Melsungen
- Flüssigkeitsreservoirs, steril Carl Roth, Karlsruhe
- Kryoröhrchen, 2ml, steril, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Pasteurpipetten, Carl Roth, Karlsruhe
- Pipettenspitzen (10-200 μ l), VWR, Darmstadt
- Pipettenspitzen (10-200 μ l, 100-1000 μ l), Greiner bio-one, Frickenhausen
- Pipettenspitzen 0,1-10 μ l, 100-5000 μ l, Eppendorf, Hamburg
- Plastikreaktionsgefäße (1,5 ml; 1,7 ml 2 ml), Greiner bio-one, Frickenhausen
- Plastikzentrifugenröhrchen, steril (15 ml, 50 ml), Greiner bio-one, Frickenhausen

- Spritzenvorsatzfilter DMSO-Safe Acrodisc[®], VWR, Darmstadt
- Spritzenvorsatzfilter für wässrige Medien Whatman[®], Steril, VWR, Darmstadt
- Zellkultur Microplatten (96 Well), steril, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Zellkultur Multiwell Platten (24 Well), steril, Greiner bio-one, Frickenhausen
- 96-Well-Platten, transparent, F-Boden, unbeschichtet, Carl Roth, Karlsruhe
- 96-Well-Platten, schwarz, F-Boden, unbeschichtet, Greiner bio-one, Frickenhausen

III.5. Programme

- Bruker Daltonics FlexAnalysis (Vers. 3,3), Bruker Daltonik GmbH, Bremen
- Eurochrom Version 1.55, Knauer, Berlin

III.6. Methoden

III.6.1. Probengewinnung und Latexaufbereitung

Die Latexproben wurden im Botanischen Garten Berlin, Königin-Luise-Str. 6, 14195 Berlin gesammelt. Alle gesammelten Proben wurden von gesunden Pflanzen gewonnen, die mit einer Akzessionsnummer versehen und durch Mitarbeiter des Botanischen Gartens bestimmt worden sind. Nach Anritzen von Blättern, Sprossachsen, Wurzeln oder Blüten wurde der ausströmende Milchsaft entweder in einem Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen oder mit einem Stück Filterpapier (1x2 cm) aufgesaugt und dann in ein Reaktionsgefäß überführt, welches in beiden Fällen mit Aqua dem. oder PBS-Puffer vorgefüllt war. Die gewonnenen Proben wurden kurz geschüttelt und wurden je nach Umgebungstemperatur gekühlt gelagert. Initial wurden alle Proben 30 min bei 16435*g bei 4°C zentrifugiert und thermostabile Proben eingefroren (-18°C). Thermolabile Latices wurden unmittelbar nach der Zentrifugation weiter untersucht. Verwendet wurde in jedem Fall der klare Überstand der Probe.

III.6.2. Protein-Bestimmung

III.6.2.1. Bradford-Assay

Der Bradford-Assay ist eine schnelle und einfache Methode zur Quantifizierung von Proteinmengen und beruht auf der Bindung von Proteinen an Coomassie Brilliantblau R-250 [108]. Diese Reaktion führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 490 nm auf 595 nm und kann kolorimetrisch erfasst werden. Das System wurde mit Rinderserumalbumin (2,5 µg/ml-2 mg/ml) kalibriert. 150 µl Probe (1-25 µg/ml Proteingehalt) bzw. 5 µl Probe (100-1500 µg/ml Proteingehalt) wurden mit 150 µl respektive 250 µl Coomassie-Brilliantblau R-250 versetzt, 30 s geschüttelt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 590 nm gemessen. Leerkontrollen ohne Protein wurden mitgeführt und bei der Auswertung rechnerisch berücksichtigt.

III.6.2.2. Bicinchoninsäure Assay (BCA-Assay)

Der BCA-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Proteinen. Der Test beruht auf der Kombination der Biuret Reaktion, Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen im alkalischen Milieu durch Proteine und der

anschließenden selektiven und sensitiven Detektion der Cu^{1+} -Ionen mit Bicinchoninsäure. Der sich dabei gebildete violette Farbkomplex zeigt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm.

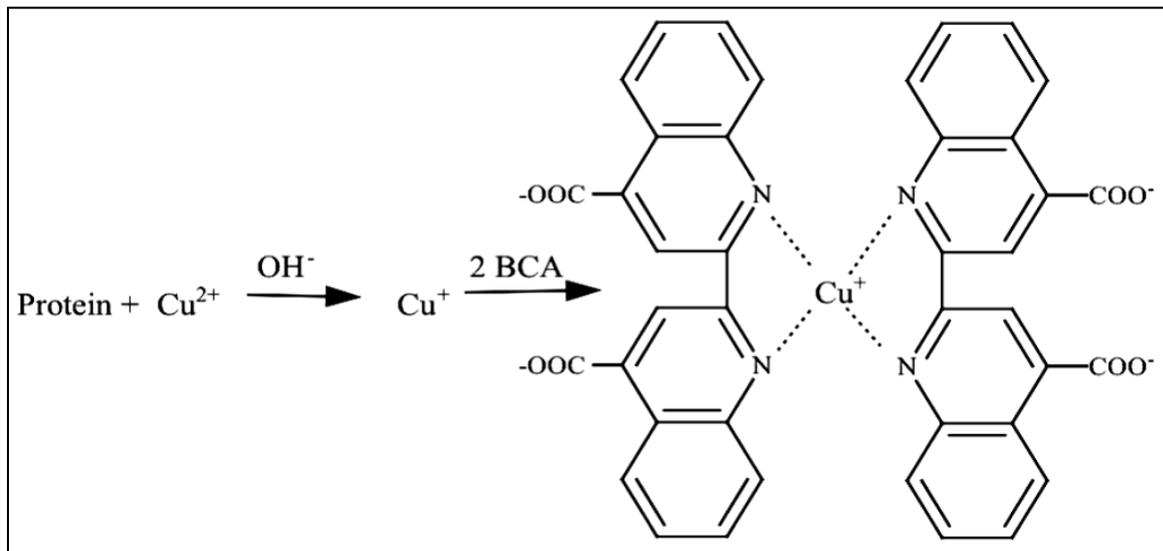


Abb. 3 Reaktion der Proteinbestimmung mit BCA [109]

Der Assay wurde in 96 Well Platten durchgeführt. Dazu wurden 25 μl der zu vermessenen Probe mit 200 μl Assay Reagenz gemischt, geschüttelt und 30 min bei 37°C inkubiert und bei 560 nm kolorimetrisch vermessen (Tecan Infinite F200). Als Blindwert diente 25 μl PBS-Puffer, außerdem wurde 25 μl Probe mit 200 μl PBS-Puffer versetzt um etwaige Eigenabsorption auszuschließen bzw. den gemessenen Wert damit zu korrigieren. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde das System mit Rinder-Serum-Albumin (2 mg/ml – 5 $\mu\text{g/ml}$) kalibriert [110-112].

III.6.3. Protease Assays

III.6.3.1. Universelles Protease Substrat Roche®

Bei dem universellen Proteasen Substrat handelt es sich, um Casein aus Kuhmilch, dass mit aktiviertem Resorufin umgesetzt wurde. Pro mg Casein sind ca. 90 μg Resorufin gebunden.

Beim Einwirken von Proteasen auf das markierte Casein werden Resorufin markierte Peptide, die nicht mit Trichloressigsäure fällbar sind, freigesetzt. Diese dienen als Messgröße für die vorhandene Proteaseaktivität. Die Reaktion wurde in Eppendorf- Reaktionsgefäßen durchgeführt und ein Teil des Zentrifugationsüberstandes in Mikrotiterplatten übertragen, die Messung erfolgte bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und Emissionswellenlänge von 595 nm [113, 114].

Tab. 7 Arbeitsschema für das Universelle Protease Substrat Roche®

	Blank	Probe
Substrat-Lösung (0,4% Casein, Resorufin gelabelt)	50 µl	50 µl
Inkubationspuffer (0,2 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,02 M CaCl ₂)	50 µl	50 µl
Aqua dem.	100 µl	
Probe		100 µl
Inkubation bei 37°C für 15-60 min		
Stopp-Reagenz (TFA 5%)	480 µl	480 µl
Inkubation bei 37°C für 10 min, anschließend 5 min zentrifugiert		
Zentrifugationsüberstand	80 µl	80 µl
Test-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	120 µl	120 µl

Entsprechende Kontrollen und Leerwerte ohne Protease wurden mitgeführt und rechnerisch bei der Auswertung berücksichtigt.

III.6.3.2. Enzchek® Protease Assay Kit Green Fluoreszenz

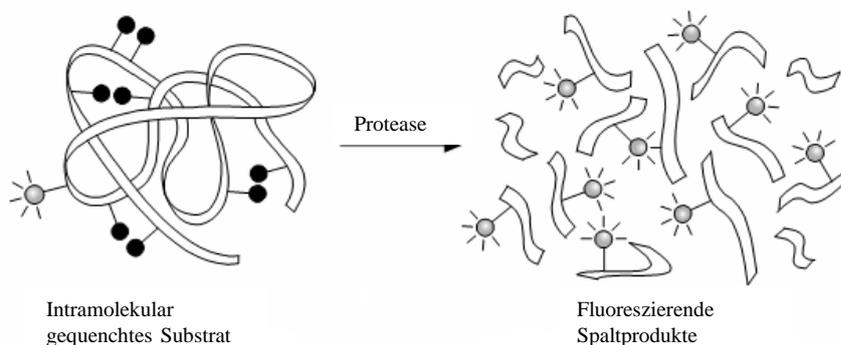


Abb. 4 Prinzip der Umsetzung des Substrats des Enzchek Protease Assay Kit green Fluorescence (Invitrogen)

Der Enzchek® Protease Assay basiert ebenfalls auf Casein als Substrat, welches mit dem Fluoreszenz-Farbstoff BODYPY® (4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-S-indacen-3-propionsäure) umgesetzt wird, wodurch ein Quenching des Fluoreszenzfarbstoffs resultiert. Die durch die Proteasen forcierte Hydrolyse des Caseins, führt zu einem Dequenching und einem daraus resultierenden Anstieg der Fluoreszenz, der bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge 535 nm gemessen wird [115-117].

Jeweils 25 µl Probenlösung wurden mit 100 µl Substrat versetzt, kurz geschüttelt und unter Lichtausschluß bei 37°C für 60-120 min inkubiert und danach fluorimetrisch vermessen. Für die Reagenzherstellung wurde das lyophilisierte Substrat mit 200 µl PBS-Puffer rekonstituiert und zu 20,0 ml mit Digestionbuffer (200 mM Tris; pH 7,8; 2 mM Natriumazid) auf Arbeitskonzentration verdünnt. Entsprechende Kontrollen ohne Protease wurden ebenfalls vermessen und bei der Auswertung rechnerisch berücksichtigt.

III.6.4. Untersuchungen zur Lagerungsstabilität

Mit dem Ziel, eine stabile Lagerung der Proben hinsichtlich der Enzymaktivität zu gewährleisten, wurden exemplarisch Proben unter verschiedenen Bedingungen gelagert und nach definierter Zeit deren Aktivität bestimmt und im Vergleich zur Frischprobe verglichen. Folgende Methoden fanden Anwendung,

- Kühlung bei -18°C
- Gefriertrocknung
- Vakuumzentrifugation
- Trockenlagerung im Exsikkator

Zunächst wurde die Aktivität der Frischprobe bestimmt und diente als Bezugspunkt für die Messungen nach den Lagerungsuntersuchungen.

Für die Kühlung wurden die Proben in Puffer aufgenommen und bei -18°C eingefroren. Für die Bestimmung der Aktivität wurden die Proben aufgetaut, zentrifugiert und der Überstand vermessen. Für die Gefriertrocknung und Vakuumzentrifugation wurden je 100 µl der Frischprobe eingesetzt, bei der Gefriertrocknung wurden die Proben bei -80°C eingefroren und über Nacht lyophilisiert und bei der Vakuumzentrifugation bis Trockne der Probe zentrifugiert. Der Rückstand bzw. auch das Lyophilisat wurden mit 100 µl PBS Puffer aufgenommen, die Aktivität gemessen und die Residualaktivität bestimmt.

Für die Trockenlagerung im Exsikkator wurden die Proben auf Filterpapieren gesammelt und dieses Filterpapier geteilt, eine Hälfte wurde mit 300 µl PBS Puffer versetzt, geschüttelt und die Aktivität bestimmt, die andere Hälfte wurde im Exsikkator unter Lichtausschluss gelagert. Die Aktivität der gelagerten Proben wurde im wöchentlichen Abstand über 3 Wochen bestimmt, dazu wurden die Filterpapiere mit 300 µl PBS Puffer ebenfalls versetzt, intensiv geschüttelt und die Aktivität bestimmt.

III.6.5. Bestimmung der Residualaktivitäten nach Zugabe spezifischer Inhibitoren

Um die untersuchten Proteasen einem Proteasentyp zuordnen zu können, wurden spezifische Inhibitoren für die jeweilige Proteaseklasse verwendet.

Tab. 8 Überblick zu Protease-Inhibitoren

Proteaseklasse	Spezifische Inhibitoren	Konzentration	Referenzprotease
Serinprotease	Pefabloc, AEBSF	40 mM	Trypsin, Thrombin
	Aprotinin	0,3 µM	
Cysteinprotease	E-64	98 µM	Papain von <i>Carica papaya</i>
Serin/ Cysteinprotease	Leupeptin	20 µM	Trypsin, Papain
Aspartatprotease	Pepstatin A	3,5 µM	Pepsin
Metalloprotease	EDTA	35 µM	Thermolysin
	EGTA	10 µM	
	Phosphoramidon		

Zur Bestimmung der Aktivitäten nach Inhibition, wurden 25 µl Probe mit 50 µl des jeweiligen Inhibitors 30 min bei Raumtemperatur pre-inkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrat. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die verbliebene Aktivität fluorimetrisch bestimmt [118]. Die jeweiligen Proben ohne Inhibitorzusatz wurden zeitgleich mitbestimmt und dienten als Bezug gegenüber der inhibierten Probe. Außerdem wurden Leerkontrollen ohne Protease mitgeführt und bei der Auswertung rechnerisch berücksichtigt. Als Positivkontrollen wurden geeignete Konzentrationen der Referenzproteasen mitgeführt.

Tab. 9 Arbeitsschema zur Bestimmung der Residualaktivität

	Ausgangswert	Residualwert	Inhibitorblindwert	Blindwert
PROBE	25	25	-	
PBS	50	-	25	75
Inhibitor	-	50	50	
BODIPY FL-casein	100	100	100	100

III.6.6. Proteinkonzentrierung

Für die Proteinkonzentrierung bzw. Pufferwechsel wurden Zentrifugationseinheiten mit einem *Molecular Weight Cut Off* von 10 kDa verwendet. Die Proben wurden nach Herstellerangaben in einer Festwinkelzentrifuge bei 5000*g eingengt und danach mit Aqua dem. oder dem entsprechenden Puffer 2-4-mal gewaschen.

III.6.7. Untersuchungen hinsichtlich der Substratspezifität

III.6.7.1. Synthetische Substrate

Zur näheren Charakterisierung der Protease wurden verschiedene synthetische Substrate verwendet. Genutzt wurden substituierte Di- oder Tripeptide oder Aminosäuren, an die 4-Aminomethylcumarin gebunden ist, welches nach hydrolytischer Spaltung fluorimetrisch erfasst wurde. Getestet wurden 8 verschiedene Substrate.

Tab. 10 Übersicht zu Peptidsubstraten

Peptidsubstrat	M _r [Da]	c [µg/ml]	Proteasen	Proteaseklasse
Boc-Asp-(OBzl)-Pro-Arg-AMC	770,28	10	Thrombin	Serinprotease
Boc-Val-Pro-Arg-AMC	627,74	10	Thrombin	Serinprotease
BZ-Arg-AMC	435,48	10	Trypsin, Papain	Serinprotease, Cysteinprotease
H-Leu-AMC	288,35	10	Leucinaminopeptidase Aminopeptidase M	
H-Phe-AMC	322,36	10	Aminopeptidase M	
MeO-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-AMC	627,69	10	humane Leukocyten- Elastase Schweine Pankreas- Elastase	Serinprotease
Succ-Ala-Ala-Phe-AMC	564,60	10	Chymotrypsin, neutrale Metallo- endopeptidase, Thermolysin, Enkephalinase (NEP 24.11)	Serinprotease, Metalloprotease
Z-Gly-Gly-Arg-AMC	616,07	10	Urokinase, Tissue-type plasminogen activator, Trypsin, Thrombin	Serinprotease

Die Probe (25 µl) wurde mit 100 µl Substrat versetzt, geschüttelt und bei 37°C 60 min inkubiert und vermessen bei 360 nm zu 465 nm. Blindwerte ohne Enzym wurden mitgeführt und bei der Auswertung rechnerisch berücksichtigt.

III.6.7.2. In-Gel-Verdau verschiedener Substrate durch unbekannte Protease

Zur Identifikation der Spezifität der unbekannt Protease wurden Proteine mit bekannter Aminosäuresequenz enzymatisch verdaut, als Proteine wurden Myoglobin (*horse heart*)

Lysozym (*hen egg white*) und β -Lactoglobulin (*bovine*) eingesetzt.

Dazu wurden die Proteine auf eine SDS-PAGE übertragen, die betreffenden Banden ausgeschnitten, entfärbt, zerkleinert und gewaschen, anschließend erfolgte der In-Gel-Verdau der Proteine durch die unbekannter Protease, dem folgte eine analytische Messung mittels MALDI-TOF-MS.

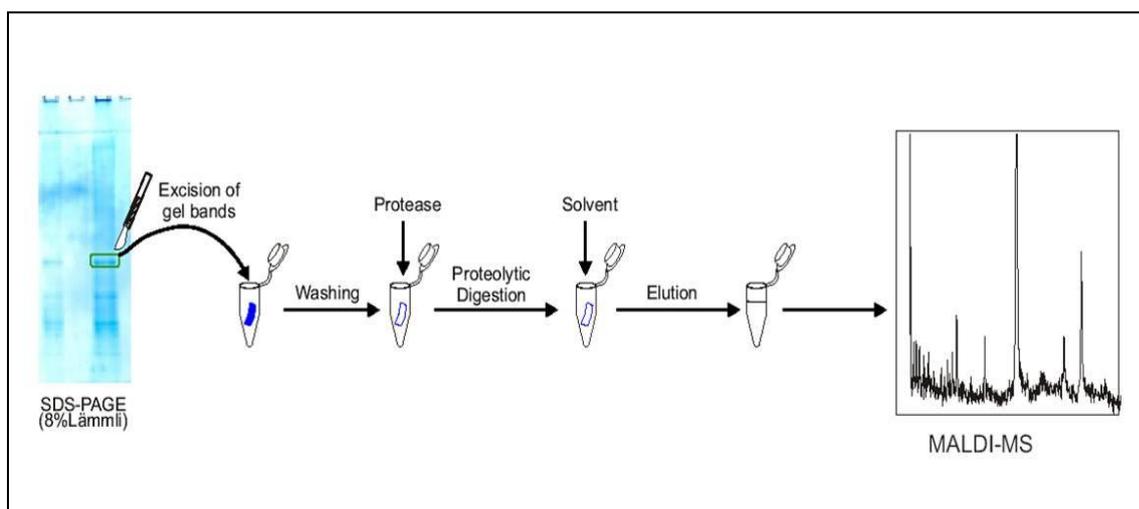


Abb. 5 Versuchsprinzip In-Gel-Verdau mit anschließender Maldi-MS [119]

MS-Probenvorbereitung: als Matrix diente α -cyano-4-Hydroxymizsäure (CHCA, gesättigt in Acetonitril / 0,1% TFA, 70:30, v/v) 2 μ L Matrix wurden mit jeweils 2 μ L Probe gemischt, 0,5 μ L je Spot auf einem Stahltemplate aufgetragen und auskristallisiert („dried droplet“ Methode). Die Analyse der Proben erfolgte durch ein MALDI-TOF-Massenspektrometer (AUTOFLEX-III LRF200-CID, ausgestattet mit Smartbeam-Laser 200 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland)) bei einer Beschleunigungsspannung von rund 5 kV im Reflektor Modus [119].

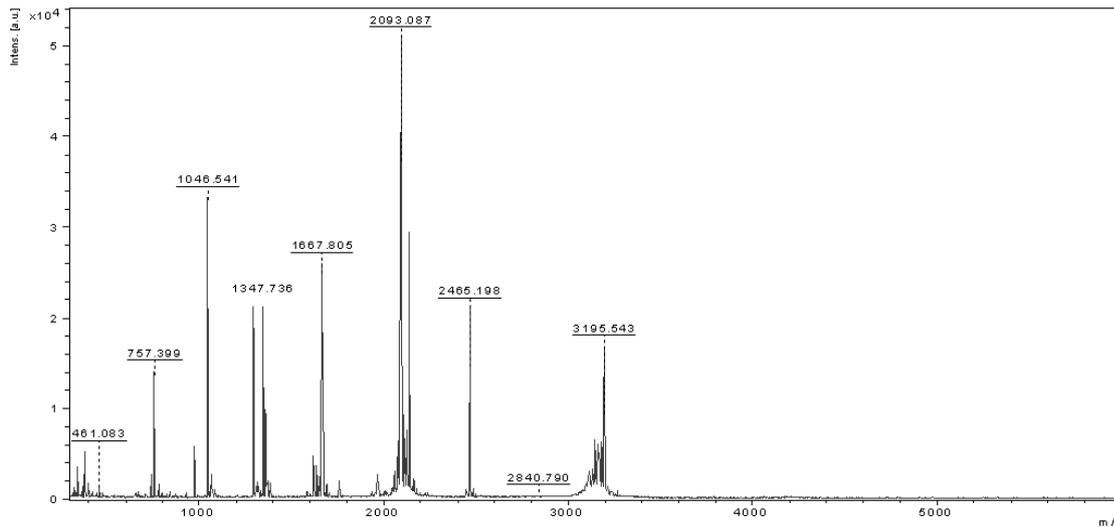


Abb. 6 Massenspektrum des Peptidstandards

Tab. 11 Zusammensetzung des Peptidstandards

Peptid	[M+H] ⁺ Mono isotopic	[M+H] ⁺ Average
Bradykinin 1-7	757,3992	757,86
Angiotensin II	1046,5418	1047,19
Angiotensin I	1296,6848	1297,49
Substance P	1347,7354	1348,64
Bombesin	1619,8223	1620,86
Renin Substrate	1758,9326	1760,03
ACTH clip 1-17	2093,0862	2094,43
ACTH clip 18-39	2465,1983	2466,68
Somatostatin 28	3147,4710	3149,57



Abb. 7 SDS-PAGE (8%), Coomassie Färbung, Auftrennung der Proteine nach der relativen Molmasse, die umrandeten Banden wurden ausgeschnitten, zerkleinert, gewaschen und dann durch die Protease verdaut.

Alle Untersuchungen bezüglich des In-Gel-Verdau wurden am Institut für Ernährungswissenschaft, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie von Prof. Dr. H. M. Rawel und Tina Buchholz durchgeführt.

III.6.8. Elektrophorese und Gelfärbung

III.6.8.1. SDS- Gelelektrophorese

Für die SDS Gelelektrophorese wurden Probe und Laemmli- Puffer [120] (ergänzt mit 2-Mercaptoethanol) im Verhältnis 1:1 gemischt, 5 min im Thermocycler bei 95°C erhitzt, zentrifugiert und auf die vorbereiteten SDS-Fertiggele übertragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V über 35-40 min in Tris-/Glycin-/SDS-Laufpuffer. Zur Orientierung im Gel wurde ein Broad range Proteinmarker mitgeführt. Um Diffusionsprozesse zu unterbinden, wurde die Apparatur mit Eis gekühlt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel entnommen und mit Coomassie Stain-Solution 3h gefärbt und bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt (Methanol 40% / Essigsäure 10%) [121]. Für Proben mit geringem Proteingehalt wurde die Silberfärbung verwendet.

Tab. 12 Arbeitschema zur SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung

Arbeitsschritt	Reagenzien	Durchführung
Probenvorbereitung	Laemmli-Puffer (mit 2-Mercaptoethanol)	Mischen von Probe und Auftragepuffer 1:1
Hitzenaturierung		5min bei 95°C
Elektrophorese	Tris-/Glycin-/SDS-Puffer	35-40 min, 200 V konstant
Färbung	Coomassie-Stain-Solution	3 h
Entfärbung	Methanol 40%/Essigsäure 10%	bis zur gewünschten Farbintensität

III.6.8.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung stellt eine sehr sensitive Methode zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen dar. Sie ist 10-50-mal empfindlicher als die Färbung mit Coomassie Brilliantblau. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben für Minigele der Firma BioRad. Die Proteine wurden als braune bis schwarze Banden während der Entwicklung sichtbar [122-124].

Tab. 13 Arbeitsschema zur Silberfärbung

Arbeitsschritt	Reagenzien	Durchführung
Fixierung	40% Methanol, 10% Essigsäure	über Nacht
Oxidierung	Oxidier-Solution (Kaliumdichromat, Salpetersäure)	5 min
Waschen	Aqua dem.	5-7-mal innerhalb von 15 min
Silbersensibilisierung	Silberlösung	20 min
Waschen	Aqua dem.	1-mal 30 sec
Entwickeln	Developer solution (Na ₂ CO ₃ , Paraformaldehyd)	mehrmaliges Wechseln bis zur gewünschten Intensität
Stopp-Reaktion	5% Essigsäure	15 min

III.6.8.3. Zymographie

Die Zymographie ist eine elektrophoretische Methode, die die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mit dem Nachweis der proteolytischen Aktivität kombiniert. Verwendet wurden Zymogramm Fertiggele (12%). Casein wurden dabei als Substrat für die Proteasen, während der Herstellung der Polyacrylamidgele, co-polymerisiert. 25 µl Probe wurden mit 25 µl Zymogram sample buffer gemischt und auf das Zymogrammgel übertragen, als Laufpuffer wurde der Tris-/Glycin-/SDS-Puffer verwendet, die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 100 Volt. Die Apparatur wurde ebenfalls gekühlt, um etwaige Diffusionsprozesse zu verhindern. Während der Entwicklung wurde Casein durch die Proteasen verdaut, bei der anschließenden Färbung mit Coomassie-Brilliantblau bleiben die Zonen mit Proteaseaktivität hell und konnten somit vom umgebenen blaugefärbten Gel unterschieden werden [125-129].

Tab. 14 Arbeitsschema zur Zymogrammentwicklung

Arbeitsschritt	Reagenz	Durchführung
Renaturierung	Renaturation buffer (2,5% Triton X-100)	30 min
Entwicklung	Developer buffer (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl ₂ , 0,02% Brij-35)	über Nacht bei 37°C
Färbung	Coomassie-Brilliantblau R-250 Lösung	1 h
Entfärbung	40% Methanol, 10% Essigsäure	bis zur gewünschten Intensität

III.6.8.4. Glykoproteinfärbung

Für die Charakterisierung der gereinigten Fraktion und zum spezifischen Nachweis von Glykoproteinen wurde eine SDS-Page, wie unter III.6.8.1. beschrieben, angefertigt und mit dem Glycoprotein Staining Kit (Thermo Scientific) gefärbt [130-132], mitgeführt wurden Horse Radish Peroxidase als Positivkontrolle und Trypsininhibitor als Negativkontrolle. Die Färbung der Gele erfolgte nach Herstellerangaben.

Tab. 15 Arbeitsschema zur Glykoproteinfärbung

Arbeitsschritt	Reagenzien	Durchführung
Fixierung	50% Methanol	30 min
Waschen	3% Essigsäure	2-mal mit 100 ml
Oxidation	Oxidizing solution	15 min
Waschen	3% Essigsäure	3-mal mit je 100 ml
Färben	Glycoprotein-Staining Reagent	15 min
Reduzieren	Reducing solution	5 min
Waschen	3% Essigsäure/H ₂ O	3-5-mal mit je 100 ml

III.6.9. Nano LC-ESI-MS/MS, Q-TOF

Ausgewählte mit Coomassie gefärbte SDS-Page Gelbanden von dem Gesamtlax von *Euphorbia mauritanica* wurden mittels Skalpell ausgeschnitten, gereinigt, zerschnitten und tryptisch verdaut. Bei dem enzymatischen Verdau mit Trypsin entstehen für die jeweiligen Proteine charakteristische Peptidfragmente, diese werden über Nano LC chromatographisch aufgetrennt, ionisiert (ESI) und nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis analysiert. Über eine Ionenfalle werden die einzelnen Peptidfragmente selektiert und über Kollision mit Neutralteilchen (Argon) erneut fragmentiert (*collision induced dissociation*). Dadurch wird ein Tandemmassenspektrum (MS/MS-Spektrum) der Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptidfragmente erzeugt [4]. Da das MS/MS-Spektrum charakteristisch für die Peptidbruchstücke ist, wurden über Abgleich mit Datenbanken (SwissProt, NCBI) entsprechende Proteine identifiziert.

Verdau und MS-Untersuchungen, wurden vom FMP Berlin, Abteilung Massenspektrometrie (Dr. E. Krause, Heike Stephanowitz) durchgeführt.

Methode : Trypsin-Verdau im Gel ohne Reduktion/Alkylierung,
Nano LC-ESI-MS/MS, Q-TOF

Datenbank: SwissProt 57.6 (495880 Sequenzen; 174780353 Reste)
NCBIInr 02022009 (7787617 Sequenzen; 2685418921 Reste)
Search Parameters
Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin/P
Variable modifications: Oxidation(M), Propionamide(C)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 100 ppm
Fragment Mass Tolerance: ± 0.05 Da
Max Missed Cleavages : 2
Instrument type : ESI-QUAD-TOF

III.6.10. Reinigung des Latex von *Euphorbia mauritanica* L.

III.6.10.1. Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie erfolgt die Separation der Proteine aufgrund kompetitiver Wechselwirkungen geladener Ionen, dabei konkurriert ein Probenmolekül mit Salzionen um die geladenen Positionen der Ionenaustauscher-Matrix (hier Keramik-Kügelchen), im ersten Schritt binden die Probeproteine an die fixierten Ladungen der stationären Phase, und werden im zweiten Schritt durch die steigende Salzkonzentration des Eluenten von der Matrix verdrängt und eluiert. Proteine tragen aufgrund der sauren und basischen Seitenketten der einzelnen Aminosäuren positive oder negative Ladungen, der Gesamtzustand ist daher vom umgebenen pH-Wert der Lösung abhängig, daher können sie, je nach Wahl des pH-Wertes über Anionen- oder Kationen-Tauscher getrennt werden [4].

Die Ionenaustauschchromatographie erfolgte mit AcroSepTM Ceramic HyperD F Säulen mit einem Säulenvolumen von 1 ml und einer Beladungskapazität von mind. 5 mg/ml BSA und einer Flussrate von 1,5 ml pro min, es wurden Fraktionen von 1,5 ml Volumen aufgefangen. Nach Säulenbeladung wurde mit 15-20 Säulenvolumen Puffer gespült. Die Elution der Säule erfolgte mit steigenden NaCl Gradienten (0-1,0 M NaCl) mit jeweils 15-20 Säulenvolumen.

Tab. 16 Übersicht über die verwendeten Ionenaustauscher

Bezeichnung		funktionelle Gruppe	Austausch-Typ
DEAE	Diethylaminoethyl	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-$ $\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	schwacher Anionenaustauscher
Q	quaternäre Trimethylaminoethyl	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	starker Anionenaustauscher
CM	Carboxymethyl	$-\text{O}-\text{CH}_2\text{COO}^-$	schwacher Kationenaustauscher

III.6.10.2. Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie (SEC) oder Gelpermeationschromatographie erfolgt die Trennung aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße der einzelnen Komponenten. Die stationäre Phase besitzt eine Porenstruktur oder besteht aus gequollenen Polymeren. Das Trennprinzip beruht darauf, dass die Poren und das Innere von Gelphasen nur solchen Bestandteilen aus der mobilen Phase zugänglich sind, die klein genug sind, um hinein diffundieren zu können, ihre Elution ist verzögert. Größere Moleküle bleiben in der mobilen Phase und wandern praktisch wechselwirkungsfrei an der stationären Phase vorbei und werden somit als erstes eluiert, mittelgroße Moleküle können nur teilweise in die Poren eindringen und sind langsamer als große und schneller als kleinere Moleküle hinsichtlich der Elution [4].

Parameter für die Größenausschlusschromatographie

Injektionsvolumen: 50 μl

Detektionswellenlänge: 210 nm

Elutionsmittel: Phosphatpuffer 0,01 M, pH 7,0

Flussrate: 0,150 ml/min

III.6.11. Charakterisierung der unbekannt Protease

III.6.11.1. Verhalten gegenüber pH-Wertveränderungen

Für die Ermittlung des Aktivitätsoptimums bezüglich des umgebenen pH-Wertes wurde die Aktivität der zu untersuchenden Probe bei verschiedenen pH-Werten bestimmt [24]. Dazu wurden 25 µl Probe (20 µg/ml) 30 Minuten bei den jeweiligen pH-Werten (50 µl Pufferlösung) inkubiert und anschließend die Aktivität nach Zugabe von 200 µl Enzchek-Reagenz bestimmt (s. III.6.3.2), Kontroll- und Blindwerte wurden jeweils mitgeführt und rechnerisch berücksichtigt. Als Lösungen mit definierten pH-Wert dienten folgende eingestellte wässrige 0,1 M Puffer. Dabei wurden Puffer in 0,5 pH Schritten benutzt.

Tab. 17 Übersicht der verwendeten Puffer

pH-Werte	Puffer
1,0-1,5	KCl/HCl
2,0-3,5	Glycin/HCl
4,0-5,5	Essigsäure/Natriumacetat
6,0-7,5	Natriumdihydrogenphosphat/ Dinatriumhydrogenphosphat
8,0-9,5	Tris/HCL
10,0-12,0	Natriumhydrogencarbonat/Natriumcarbonat

III.6.11.2. Verhalten gegenüber Temperaturänderungen

Zur Ermittlung des Temperaturoptimums wurden 25 µl Probe (20 µg/ml) 15 min bei der jeweiligen Temperatur mit 200 µl Enzchek-Reagenz in einem Thermoheizblock belassen und anschließend die Aktivität bestimmt. Die maximale Aktivität diene als 100% Wert, auf den die anderen Werte kalkuliert wurden. Zur Abschätzung der Stabilität der Protease wurden 25 µl Probe nach 15 min bei der jeweiligen Temperatur auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend die Aktivität bei 37°C bestimmt [24]. Getestet wurde der Bereich von 20-90°C.

III.6.11.3. Verhalten gegenüber organischen Solventien

Um die Stabilität der unbekannt Protease gegenüber organischen Solventien zu testen, wurden wässrige Acetonitril, Methanol und DMSO-Lösungen im Bereich von 5-50% (v/v)

hergestellt und Harnstoff-Lösungen (1-8 M). Die entsprechenden Lösungen wurden 30 min mit der unbekannt Protease (20 µg/ml) inkubiert und danach die verbleibende Aktivität bestimmt.

III.6.12. Zellkultur

III.6.12.1. Kultivierung von U-937 und THP-1 Zellen

Die permanente humane hämatopoetische Suspensions-Zelllinie U-937 wurde aus einem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes 1974 gewonnen, der unter einem generalisierten diffusen histozytischen Lymphom litt, die Zellen zeigen Eigenschaften von Monozyten und exprimieren deren Marker [133, 134]. U-937 Zellen wurden mit RPMI 1640 ohne Phenolrot unter Zusatz von 10% FBS-Superior und 1% D-Alanyl-Glutamin bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank, nach Empfehlung des DSMZ, kultiviert. Die Verdopplungsdauer betrug 30-40 h, sie wurden alle 2-3 Tage subkultiviert (gesplittet 1:2 bis 1:5) und bei einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL ausgesät.

Die THP-1 Zelllinie entstammt dem Blut eines 1-jährigen Jungen, der an akuter monozytischer Leukämie litt [135, 136]. Die Zellen können phagozytieren und für Differenzierungsstudien genutzt werden [137]. THP-1 Zellen wurden ebenfalls mit RPMI 1640 ohne Phenolrot unter Zusatz von 10% FBS Superior und 1% D-Alanyl-Glutamin bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Verdopplungsdauer betrug ca. 35-50 h, die Subkultivierung erfolgte alle 3 bis 4 Tage. Die Aussaatdichte betrug $0,5-1 \cdot 10^6$ Zellen/ml.

III.6.12.1.1. Kryokonservierung

Für die Langzeitlagerung der Zellen unter Erhalt ihrer spezifischen Merkmale und Eigenschaften wurden Aliquote der ersten Passagen beider Zelllinien in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt. Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde als kryoprotektive Substanz zugesetzt, um die Kristallwasserbildung in den Zellen während des Einfrierens zu verhindern [138]. Die bestehende Zellsuspension wurde 5min bei 1100 rpm zentrifugiert, das vorhandene Medium entfernt und durch 4°C kaltes Einfriermedium ersetzt. Als Medium diente RPMI 1640 ohne Phenolrot mit 20% FBS-Superior, 1% D-Alanyl-glutamat und 10% DMSO. Anschließend wurden die Zellen langsam (1°C/min) auf -80°C abgekühlt, bei -80°C für 24 h belassen und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Die Zellzahl für beide Zelllinien betrug $4-5 \cdot 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen.

III.6.12.1.2. Revitalisierung

Zur Revitalisierung der Zellen wurden diese schnell aufgetaut und in vorgewärmtes Medium überführt, 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert, das DMSO haltige Medium entfernt, und durch FBS angereichertes Auftaumedium (RPMI 1640 ohne Phenolrot, 20% FBS-Superior, 1% D-Alanyl-Glutamin) ersetzt, suspendiert und auf Zellkulturflaschen verteilt. DMSO wurde entfernt, um die Induktion etwaiger Differenzierungsprozesse durch DMSO zu unterbinden.

III.6.12.2. Differenzierung mit rekombinantem humanen Interferon-gamma (rhINF- γ)

Die Differenzierung von U-937 Zellen geht mit der Adhärenz der differenzierten Zellen einher. Um eine optimale Anheftung zu gewährleisten, wurden die Oberflächen der Gewebekulturplatten mit Adhäsionsfaktoren beschichtet. Genutzt wurden Fibronectin (75 $\mu\text{g/ml}$) und Gelatine (10 mg/ml) [139]. Für die Untersuchungen mit differenzierten Zellen wurden 96 well bzw. 24 well Platten mit Fibronectin (50 $\mu\text{l/well}$ bzw. 200 $\mu\text{l/well}$) 45 min bei RT inkubiert, abgesaugt und $5 \cdot 10^4$ bzw. $2 \cdot 10^5$ Zellen in 100 μl RPMI 1640 (10% FBS, 1% D-Alanyl-Glutamin) mit 1000 U hrINF- γ pro well eingesät (Endkonzentration hrINF- γ 100 U). Nach 24 h erfolgte eine nochmalige Zugabe von 100 μl RPMI 1640. Die Zellen wurden dann über 4 Tage differenziert mit einem Mediumwechsel (RPMI 1640, 10% FBS, 1% D-Alanyl-Glutamin, 1000 U hrINF- γ) nach 48 h [140].

III.6.12.3. Bestimmung der Zytotoxizität bzw. Zellviabilität mittels XTT

Metabolisch aktive Zellen sind in der Lage, durch mitochondriale Enzyme das schwach gelbe XTT-Tetrazoliumsalz (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxy anilid) zum stark orange-rot gefärbten Formazan [141] zu reduzieren. Dieses Formazan wird anschließend bei 450-500 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) photometrisch bestimmt. Die Reaktion bedarf eines elektronenkuppelnden Reagenzes (Phenazinmethosulfonat, PMS), welches als intermediärer Elektronenakzeptor fungiert. Die Intensität des entstanden Formazans ist proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Je höher die Anzahl metabolisch aktiver Zellen ist, desto höher ist das photometrisch erfassbare Signal [142, 143].

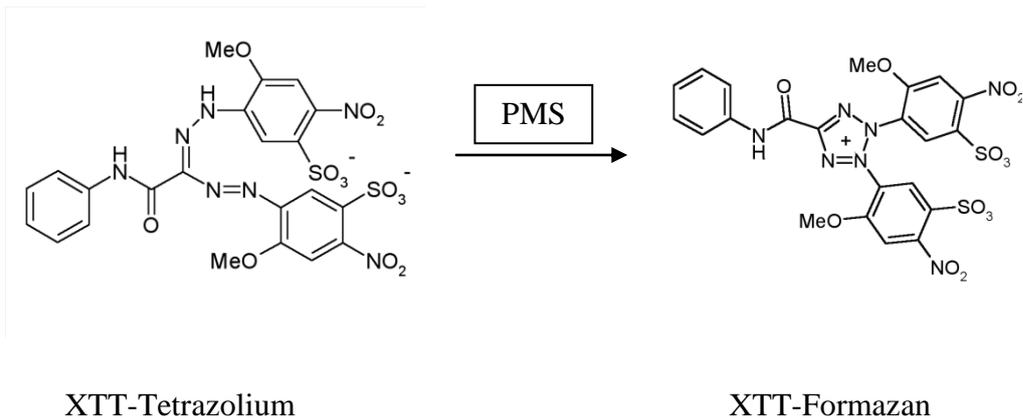


Abb. 8 Reduktion des XTT zum Formazan [144]

Versuchsansatz

Für den XTT-Assay wurden wie unter III.6.12.3. beschrieben, differenzierte Zellen bzw. $1 \cdot 10^4$ undifferenzierte Zellen benutzt. Nach der Inkubation mit der Testsubstanz wurden je Well 50 μ l frisch hergestellte XTT-Lösung (XTT (1 mg/ml) in PBS plus 0,1 ml PMS-Lösung (0,4 mg/ml)) zugegeben und für 3 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, geschüttelt und das entstandene Formazan im Mikroplattenspektrometer vermessen. Die Kalkulation der Zellviabilität erfolgte im Verhältnis zur Kontrolle.

III.6.13. Interleukin-6 ELISA

Der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren zur spezifischen und sensitiven Detektion der jeweiligen „Antigene“ (Proteine, Viren, Antikörper, Hormone, Toxine und Pestizide). Als immun-histochemische Färbemethode wurde in diesem Assay die Avidin-Biotin-Methode verwendet und basiert auf der hohen Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) zu Biotin. Bei dieser Methode wird der Sekundärantikörper biotinyliert und als Tertiärreagenz enzymkonjugiertes Avidin hinzugegeben, welches dann aufgrund seiner hohen Affinität an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Als Enzym wird Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet, welches dann das zugegebene Substrat TMB (Tetramethylbenzidin) umsetzt und ein blaues Endprodukt bildet, das nach Abstoppen der Reaktion mit Phosphor- oder Schwefelsäure einen stabilen gelben Farbkomplex bildet [4].

Prinzipielle Abfolge der Reagenzien:

1. Primärantikörper (*Capture Antibody*)
2. Antigen
3. Biotin-markierter Sekundärantikörper (*Detection Antibody*)
4. HRP-markiertes Avidin
5. chromogenes Substrat (TMB)

Die Intensität des gebildeten gelben Farbkomplexes ist proportional der Menge an nachgewiesenem Antigen und konnte so quantifiziert werden. Zur Erstellung der Kalibriergerade wurden entsprechende Konzentrationen (1 pg/ml- 200 pg/ml) auf jeder Platte mitgeführt. Die Durchführung des Il-6 ELISAs erfolgte nach Herstellerangaben.

Tab. 18 Arbeitschema zum Il-6 ELISA

Arbeitsschritt	Durchführung	Reagenz
Coating	über Nacht bei 4°C	Capture Antibody
Waschen	5-mal	PBS + Tween® 20
Blockieren	1 h bei RT	Assay Diluent
Waschen	5-mal	PBS + Tween® 20
Probenaufgabe	Inkubation über Nacht	Proben und Standards
Waschen	5-mal	PBS + Tween® 20
Detektion	1 h bei RT	Detection Antibody
Waschen	5-mal	PBS + Tween® 20
Enzym	30 min bei RT	HRP-Avidin
Waschen	7-mal	PBS + Tween® 20
Substratzugabe	15 min bei RT	TMB- Lösung
Stopp Reaktion	50 µl/well	1 M Phosphorsäure
Messung	450 nm / 570 nm (Referenzwellenlänge)	

III.6.13.1. Il-6 Status nach Behandlung mit ausgewählten Proteasen, PMA und deren Kombination

Nach 4 Tagen Differenzierung von U-937 und THP-1 Zellen wurde der Überstand abgesaugt und 2-mal mit vorgewärmtem PBS-Puffer vorsichtig gewaschen. Dadurch wurden bis dahin nicht differenzierte Zellen mit abgesaugt. Anschließend wurden Thrombin (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml), Trypsin (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml,) und Papain (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml) (100 µl/Well) aufgegeben und 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dem folgte die Zugabe von 100 µl/Well Minimalmedium (RPMI 1640, 2% FBS hitzeinaktiviert, 1% D-Alanyl-Glutamin) und eine entsprechende Inkubation über 24 h, 48 h und 72 h. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden 100 µl der Zellüberstände entnommen, zentrifugiert und

bis zur Testung bei -18°C eingefroren. Entsprechende Kontrollproben mit $100\ \mu\text{l}$ RPMI 1640 und $100\ \mu\text{l}$ PBS wurden mitgeführt [140].

PMA wurde in Konzentrationen von $0,1\ \text{ng/ml}$ bis $10\ \text{ng/ml}$ getestet. Dazu wurde eine Stammlösung von $1\ \text{mg/ml}$ in DMSO hergestellt und mit PBS-Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt, es wurden wiederum $100\ \mu\text{l}$ PMA. Die Zellüberstände wurden nach den jeweiligen Inkubationszeiten ebenfalls abgenommen und eingefroren (-18°C).

Bei der Kombination von Thrombin, Trypsin oder Papain mit PMA wurden $50\ \mu\text{l}$ Protease ($2\ \mu\text{g/ml}$, $1\ \mu\text{g/ml}$, $20\ \mu\text{g/ml}$) und $50\ \mu\text{l}$ PMA ($0,2\ \text{ng/ml}$, $2\ \text{ng/ml}$, $20\ \text{ng/ml}$) nacheinander auf die differenzierten Zellen gegeben und ebenfalls $60\ \text{min}$ bei 37°C inkubiert und mit $100\ \mu\text{l}$ Minimalmedium ergänzt, auch hier wurden die Zellüberstände abgenommen und eingefroren (-18°C). Bei allen eingefrorenen Proben wurde die Konzentration an Il-6 mittels ELISA bestimmt.

III.6.13.2. Il-6 Sekretion nach Behandlung mit Pflanzenlatices

Für die Testung der Pflanzenlatices wurden die Latexproben zentrifugiert ($30\ \text{min}$, 4°C , $16435\times g$) und der Proteingehalt auf $10\ \mu\text{g/ml}$ mit PBS- Puffer eingestellt und steril filtriert ($0,22\ \mu\text{m}$ Whatman-Filter). $100\ \mu\text{l}$ der Proben wurden dann auf die differenzierten Zellen gegeben und $60\ \text{min}$ inkubiert (37°C und $5\% \text{CO}_2$) und mit $100\ \mu\text{l}$ Minimalmedium ergänzt und die Zellüberstände nach 24h , 48h und 72h abgenommen und bis zur Bestimmung der Il-6 Konzentration mittels ELISA eingefroren.

III.6.14. Statistische Methoden

Die Ergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung (SD) dargestellt. Die Signifikanz der Werte im Vergleich zur Kontrolle wurde mittels U-Test von Mann und Whitney ermittelt, das Signifikanzniveau α wurde mit $0,05$ festgelegt.

IV. Ergebnisse und Diskussion

IV.1. Untersuchung zur Substratauswahl

Das universelle Proteasesubstrat von Roche bedurfte bei der Untersuchung einer Stoppreaktion mit 5% Trifluoressigsäure (w/v) und mehrerer Schritte bis zum Ergebnis. Eine kontinuierliche Messung war nicht möglich.

Für das Protease-Screening wurde der Enzchek-Protease-Assay verwendet. Dieser bot den Vorteil, kontinuierlich zu messen, um so auch Hydrolyseprozesse zu erfassen, die eine längere Inkubationszeit erfordern. Außerdem waren die einfache Handhabbarkeit („Ein-Topf-Methode“), pH-Insensibilität und die Temperaturstabilität von Vorteil.

Die Korrelation zwischen Proteinmenge und Aktivität wurde anhand von Standardproteasen (Trypsin, Papain) ermittelt. Es zeigte sich, dass die Standards einer Sättigungskurve folgten, im unteren Konzentrationsbereich von 0,1 µg/ml bis 1 mg/ml folgten sie einem eher linearen Zusammenhang und ab einer Konzentration von 5 mg/ml war keine Steigerung mehr zu verzeichnen. Dem schloss sich ein Plateau an. Mögliche Ursache war die geringe Substratmenge im Verhältnis zum eingesetzten Enzym und damit weniger Schnittstellen für die Proteolyse durch Trypsin.

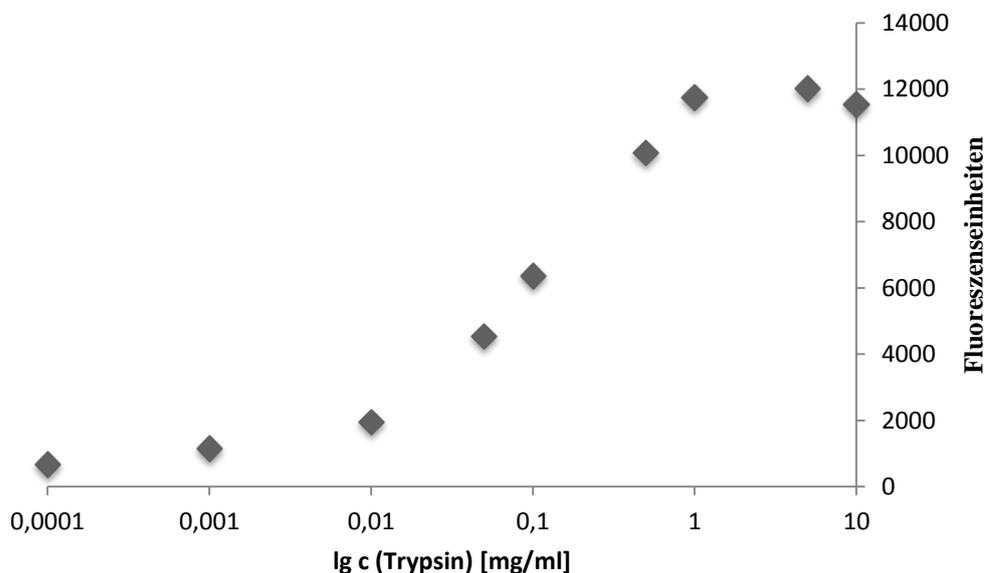


Abb. 9 Trypsin in Konzentrationen von 0,1 µg/ml-10 mg/ml nach 2 h Inkubation

Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Messungen mit je 4 Parallelen.

IV.2. Proteasescreening

Insgesamt wurden 311 Pflanzen aus 91 Gattungen aus 11 verschiedenen Familien auf das Vorhandensein proteolytischer Aktivität im Latex untersucht. 75% der untersuchten Pflanzen zeigten proteolytische Aktivität. Als aktivitätslos wurden Proben definiert, die keine signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals gegenüber den mitgeführten Leerwerten (Substrat plus Puffer) zeigten und werden in den folgenden Tabellen mit 0 gekennzeichnet. Werte die bis 13000 Fluoreszenzeinheiten, welches einer Trypsinkonzentration von ca. 1 mg/ml entspricht, lagen, werden mit # gekennzeichnet und Werte, die eine stärkere Aktivität zeigten, mit ##.

Tab. 19 Übersicht über die untersuchten Familien mit Anzahl der untersuchten Gattungen und Arten

Familie	Anzahl der untersuchten Gattungen	Anzahl der untersuchten Arten
Araceae	3	4
Apocynaceae	11	12
Asclepiadaceae	9	17
Asteraceae	36	95
Campanulaceae	5	23
Caricaceae	1	2
Clusiaceae	2	2
Convolvulaceae	3	5
Euphorbiaceae	10	129
Moraceae	5	18
Papaveraceae	6	6

IV.2.1. Proteolytische Aktivität in Araceae

Tab. 20 Übersicht Araceae

Art	Erstautor	Akzessionsnummer des Bot. Gartens	Proteolytische Aktivität
Araceae			
<i>Dieffenbachia oerstedii</i> <i>var. variegata</i>	SCHOTT	046-39-74-83	##
<i>Dieffenbachia seguine</i>	(JACQ.) SCHOTT	293-21-95-33	##
<i>Philodendron hederaceum</i>	(JACQ.) SCHOTT	031-92-74-83	0
<i>Syngonium wendlandii</i>	SCHOTT	...-12--39	0

In der Familie der Araceae wurden 4 Arten hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht. Lediglich die auch oft als Zimmerpflanze genutzte Gattung *Dieffenbachia* zeigte proteolytische Aktivität. Auffällig war, dass alle Proben der Familie eher durchsichtig klar bis leicht opaleszierend waren.

IV.2.2. Proteolytische Aktivität in Apocynaceae und Asclepiadaceae

Tab. 21 Übersicht Apocynaceae

Art	Erstautor	Akzessionsnummer des Bot. Gartens	Proteolytische Aktivität
Apocynaceae			
<i>Allamanda schottii</i>	POHL	117-07-74-83	0
<i>Alyxia gynopagon</i>	ROEM&SCHULT.	008-27-74-80	0
<i>Amsonia tabernaemontana</i>	WALTER	093-22-74-80	0
<i>Apocynum cannabinum</i>	L.	093-20-74-80	0
<i>Pachypodium lamerei</i>	DRAKE	186-01-83-40	##
<i>Rauvolfia serpentina</i>	(L.) BENTH. ex KURZ	135-01-79-84	0
<i>Rauvolfia tetraphylla</i>	L.	340-23-85-44	0
<i>Stemmadenia tomentosa</i> var. <i>palmeri</i>	(ROSE & STANDL.) WOODSON	058-93-74-73	##
<i>Strophantus speciosus</i>	REBER	146-19-74-73	#
<i>Tabernaemontana pachysiphon</i>	STAPF.	186-03-91-10	##
<i>Thevetia peruviana</i>	(PERS.) K. SCHUM.	011-28-78-10	0
<i>Trachomitum venetum</i>	(L.) WOODSON	093-19-74-80	0

In der Familie der Hundsgiftgewächse wurden Vertreter aus 11 verschiedenen Gattungen untersucht, 4 Arten (*Pachypodium lamerei* Drake, *Stemmadenia tomentosa* var. *palmeri* (Rose & Standl.) Woodson, *Strophantus speciosus* Reber, *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf.) zeigten dabei proteolytische Aktivität. Die restlichen Arten konnten keine signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals bewirken.

Tab. 22 Übersicht Asclepiadaceae

Art	Erstautor	Akzessionsnummer des Bot. Gartens	Proteolytische Aktivität
Asclepiadaceae			
<i>Asclepias incarnata</i>	L.	093-18-74-80	#
<i>Asclepias syriaca</i> [55]	L.	242-82-97-10	##
<i>Ceropegia dichotona</i>	HAW.	055-63-74-80	#
<i>Ceropegia fusca</i>	BOLLE	009-72-74-80	#
<i>Dischidia balansae</i>	COSTANTIN	244-87-84-63	0
<i>Dischidia nulec</i>		234-22-97-83	##
<i>Dischidia species</i>		054-85-74-83	##
<i>Echidnopsis cereiformis</i> var. <i>brunnea</i>	(DAMMANN) A. BERGER	055-49-74-80	#
<i>Hoya australis</i>	R. BR. ex J. TRAILL	054-65-74-83	#
<i>Hoya bandaensis</i>	SCHLTR.	179-01-85-83	#
<i>Hoya carnosa</i>	(L. F.) R. BR.	163-01-85-83	#
<i>Hoya cumingiana</i>	DECNE.	117-08-88-63	#
<i>Mondia whitei</i>	HOOK. f. SKEELS	084-38-83-50	0
<i>Periploca angustifolia</i>	LABILL.	223-07-97-10	0
<i>Stapelia gigantea</i>	N. E. BR.	061-19-74-80	#
<i>Stephanotis floribunda</i>	BRONGN.	020-84-84-83	#

13 von 16 Arten der Familie Asclepiadaceae zeigten in den Untersuchungen proteolytische Aktivität darunter auch der Latex von *Asclepias syriaca* L., aus dessen Latex zwei Asclepaine isoliert und als Cysteinprotease charakterisiert wurden [55]. Die gefundene Aktivität konnte bestätigt werden. Auch *Asclepias incarnata* L. zeigte Aktivität. Festzustellen war weiterhin, dass alle Vertreter der Gattung Hoya (Wachsblumen) und Ceropegia (Leuchterblume) Protease- Aktivität zeigten. Drei Arten (*Dischidia balansae* COSTANTIN, *Mondia whitei* HOOK. f. SKEELS, *Periploca angustifolia* LABILL.) waren ohne Proteaseaktivität und konnten das Substrat nicht umsetzen.

IV.2.3. Proteolytische Aktivität in Caricaceae, Clusiaceae und Convolvulaceae

Tab. 23 Übersicht Caricaceae, Clusiaceae und Convolvulaceae

Art	Erstautor	Akzessionsnummer des Bot. Gartens	Proteolytische Aktivität
Caricaceae			
<i>Carica jamaicensis</i>	URB.	065-29-94-74	##
<i>Carica papaya</i> *[3]	L.	078-14-01-70	##
Clusiaceae			
<i>Clusia nemorosa</i>	G. MEY.	166-01-83-10	0
<i>Calophyllum inophyllum</i>	L.	001-72-82-13	#
Convolvulaceae			
<i>Calystegia sepium</i>	(L.) R. BR.	401-11-84-10	#
<i>Cuscuta europaea</i>	L.	240-14-84-10	0
<i>Ipomoea cairica</i>	(L.) SWEET	019-81-74-83	0
<i>Ipomoea purpurea</i>	(L.) ROTH	081-19-74-80	0
<i>Ipomoea tricolor</i>	CAV.		0

In den Familien der Caricaceae und Clusiaceae konnten je zwei Vertreter untersucht werden. Die beiden Arten der Gattung *Carica* zeichneten sich durch eine starke Aktivität aus. Proteasen aus *Carica papaya* L. (Papain, Caricain, Chymopapain A und B, Glycylendopeptidase) sind bereits seit Jahren bekannt und genutzt [3]. Der Milchsafte aus *Calophyllum inophyllum* L. zeigte als einzige Art der untersuchten Clusiaceae Proteaseaktivität. Bei den untersuchten Convolvulaceae konnte nur *Calystegia sepium* (L.) R. BR. das gegebene Substrat umsetzen. Die Gattungen *Ipomoea* mit 3 Arten und die Gattung *Cuscuta* waren ohne signifikante Aktivität.

IV.2.4. Proteolytische Aktivität in Moraceae und Papaveraceae

Tab. 24 Übersicht Moraceae und Papaveraceae

Art	Erstautor	Akzessionsnummer des Bot. Gartens	Proteolytische Aktivität
Moraceae			
<i>Artocarpus altilis</i>	(PARKINSON) FOSBERG	202-03-93-80	##
<i>Broussonetia papyrifera</i>	(L.) L'HÉR. ex VENT.	179-29-74-80	##
<i>Castilla elastica</i>	SESSÉ ex CERV.	060-74-44-70	#
<i>Ficus aspera</i>	PARCELLI.	142-07-74-83	##
<i>Ficus carica</i>	L.	089-34-74-80	##
<i>Ficus citrifolia</i>	MILL.	239-05-81-23	##
<i>Ficus leprieurii</i>	MIA.	062-95-74-83	#
<i>Ficus lutea</i>	VAHL	142-18-74-73	0
<i>Ficus microcarpa</i>	L. F.	309-01-95-13	##
<i>Ficus pertusa</i>	L. F.	016-16-05-10	0
<i>Ficus erecta</i> THUNB. var. <i>erecta</i>		163-16-94-10	0
<i>Ficus rubiginosa</i>	VENT.	019-76-74-83	##
<i>Ficus schlechteri</i>	WARB.	142-30-74-83	##
<i>Ficus sinuata</i>	THUNB.	142-31-74-83	##
<i>Ficus tequendamae</i>	DUGAND	239-03-81-23	#
<i>Maclura pomifera</i> *[38]	(RAF.) C. K. SCHNEID.	092-17-74-80	##
<i>Maclura tricuspidata</i>	CARRIÈRE	179-31-74-80	##
<i>Morus cathayana</i>	HEMSL.	179-39-74-80	##
Papaveraceae			
<i>Argemone platyceras</i>	LINK & OTTO	053-32-74-14	0
<i>Eschscholtzia californica</i>	CHAM.	069-11-74-80	0
<i>Chelidonium majus</i>	L.	020-22-95-14	0
<i>Macleaya microcarpa</i>	(MAXIM.) FEDDE	069-12-74-80	0
<i>Papaver lapponicum</i>	(TOLM.) NORDH.	065-15-86-14	0

Die getesteten Arten der Papaveraceae waren alle ohne Aktivität und konnten keine signifikante Änderung der Fluoreszenz bewirken. Hingegen konnten in der Familie der Moraceae 12 Vertretern mit starker proteolytischer Aktivität gefunden werden. Bei der Gattung *Maclura* wurden die Proben aus den unreifen Früchten gewonnen, *Macluralisin* wurde von Rudenskaya et al. (1995) [38] als Serinprotease aus dem Latex unreifer Früchte isoliert und charakterisiert. Des Weiteren ist die Gattung *Ficus* durch 6 von 12 Arten mit hoher Aktivität aufgefallen, allerdings konnten nicht alle Arten das gegebene Substrat umsetzen.

IV.2.5. Proteolytische Aktivität in Asteraceae

Tab. 25 Übersicht Asteraceae

Art	Erstautor	Akzessionsnummer des Bot. Gartens	Proteolytische Aktivität
Asteraceae			
<i>Agoseris elata</i>	GREENE	063-01-10-40	0
<i>Aposeris foetida</i>	LESS.	o. Nr.	#
<i>Azorina vidalii</i>	(H. C. WATS.) FEER	048-10-80-14/2	##
<i>Catananche caerulea</i>	L.	142-72-79-10	###
<i>Chondrilla juncea</i>	L.	143-37-98-10	#
<i>Chondrilla ramosissima</i>	SM.	244-03-06-10/2	#
<i>Cicerbita macrophylla</i>	WALLR.	195-02-74-80/6	#
<i>Cicerbita plumieri</i>	KIRSCHL.	137-02-89-14	#
<i>Cichorium endivia ssp. divaricatum</i>	(SCHOUSB.) P. D. SELL	208-42-05-10/2	0
<i>Cichorium intybus</i>	L.	025-10-92-10	0
<i>Cichorium spinosum</i>	L.	057-02-06-40/2	0
<i>Crepis biennis</i>	L.	016-44-79-14	##
<i>Crepis canariensis</i>	BABCOCK ex JENKINS	306-03-84-44	#
<i>Crepis pannonica</i>	(JACQ.) K. KOCH	256-01-00-14	#
<i>Crepis pyrenaica</i>	GREUTER	151-24-86-10	##
<i>Crepis turcica</i>	DEGEN & BALDACCI	048-10-09-10/2	#
<i>Dendroseris litoralis</i>	SKOTTSB.	015-01-76-14/6	#
<i>Hieracium amplexicaule</i>	L.	001-24-25-14	##
<i>Hieracium aurantiacum</i>	L.	110-05-93-10	#
<i>Hieracium bornmuelleri</i>	FREYN	195-12-74-80/2	##
<i>Hieracium bracteolatum</i>	SIBTH. & SM.	267-10-80-10/1	##
<i>Hieracium calophyllum</i>	UECHTR.	o. Nr.	##
<i>Hieracium compositum</i>	LAPEYR.	176-01-07-10	##
<i>Hieracium glaucinum</i>	JORD.	215-42-74-80/2	#
<i>Hieracium humile</i>	LAPEYR.	161-02-03-20/1	##
<i>Hieracium jankae</i>	R. UECHTR.	044-17-10-70	##
<i>Hieracium korshinskyi</i>	ZAHN	201-91-07-10	##
<i>Hieracium olympicum</i>	BOISS.	057-04-07-40/1	##
<i>Hieracium porrifolium</i>	L.	258-06-01-10/1	##
<i>Hieracium staticifolium</i>	ALL.	108-05-95-10/2	###
<i>Hieracium umbellatum</i>	L.	015-03-95-1	##
<i>Hieracium villosum</i>	JACQ.	061-44-86-13/3	##
<i>Hieracium vogesiacum</i>	MOUNG. ex FR.	120-16-05-14/3	##
<i>Hypochaeris maculata</i>	L.	181-01-08-10/1	0
<i>Hypochaeris oligocephala</i>	(SVENT. & BRAMW.) LACK	130-02-79-44	#
<i>Hypochaeris radicata</i>	L.	289-04-83-10	###
<i>Launea arborescens</i>	MURB.	037-12-95-14	0
<i>Lactuca alpestris</i>	(GRAND.) RECH. F.	261-27-00-10	0
<i>Lactuca perennis</i>	L.	154-15-98-10/2	0
<i>Lactuca sativa</i>	L.	224-62-74-70/1	0
<i>Lactuca serriola</i>	L.	229-46-99-14	0
<i>Lactuca tatarica</i>	(L.) C. A. MEY	o. Nr.	##
<i>Lactuca virosa</i>	L.	242-48-58-14	0
<i>Lapsana communis</i>	L.	171-34-99-14	#
<i>Leontodon hispidus</i>	L.	044-16-10-10	##
<i>Leontodon incanus</i>	SCHRANK	128-02-01-10	##
<i>Leontodon saxatilis</i>	LAM.	017-09-10-10	#
<i>Microseris douglasii</i>	(DC.) SCH. BIP.	072-03-10-70	##
<i>Nabalus tatarinowii</i>	(MAXIM.) NAKAI	o. Nr.	0

<i>Picris hieracioides</i>	L.	160-28-00-10	##
<i>Pilosella aurantiaca</i>	(L.) F. W. SCHULTZ & SCH. BIP.	110-05-93-10	#
<i>Pilosella echioides</i>	F.W. SCHULTZ & SCH. BIP.	179-04-06-14	##
<i>Pilosella hoppeana</i>	(SCHULT.) F. W. SCHULTZ & SCH. BIP.	265-18-80-10	##
<i>Pilosella islandica</i>	(LANGE) Á. LÖVE	053-11-04-40/2	###
<i>Pilosella macrantha</i>	F.W. SCHULTZ & SCH. BIP.	265-18-80-10	##
<i>Pilosella officinarum</i>	F.W. SCHULTZ & SCH. BIP.	250-17-88-10	##
<i>Pilosella peleteriana</i>	(MÉRAT) F. W. SCHULTZ & SCH. BIP.	259-13-02-20	#
<i>Pilosella setigera</i>	ARV.- TOUV.	197-47-00-10	##
<i>Pilosella ziziana</i>	F.W. SCHULTZ & SCH. BIP.	148-45-80/1	###
<i>Podospermum canum</i>	C.A. MEY	068-3387-44	0
<i>Podospermum roseum</i>	(WALDST. & KIT.) GEMEINHOLZER & GREUTER	258-08-01-10/2	0
<i>Prenanthes purpurea</i>	L.	143-19-79-10	#
<i>Reichardia gaditana</i>	COUNT.	143-07-90-10	0
<i>Schlagintweitia intybacea</i>	GRISEB.	261-10-99-10/2	#
<i>Scolymus hispanicus</i>	L.	197-19-94-10	#
<i>Scorzonera elata</i>	BOISS.	091-09-09-20/1	0
<i>Scorzonera hispanica</i>	L.	055-10-06-40/1	0
<i>Scorzonera humilis</i>	L.	174-01-08-10/1	0
<i>Scorzonera purpurea</i>	L.	026-05-09-10/1	0
<i>Scorzoneroides autumnalis</i>	(L.) MOENCH	166-10-94-10/2	##
<i>Sonchus abbreviatus</i>	LINK	041-12-00-10	0
<i>Sonchus congestus</i>	WILLD.	121-02-94-34/1	#
<i>Sonchus daltonii</i>	WEBB.	064-29-98-14	#
<i>Sonchus hierrensis</i> var. <i>benehoavensis</i>	(PIT.) BOULOS	045-43-04-14	##
<i>Sonchus masquindalii</i>	PAU & FONT QUER	051-31-93-10	0
<i>Sonchus palmensis</i>	(SCH. BIP.) BOULUS	045-50-04-10/2	##
<i>Sonchus palustris</i>	L.	202-06-92-10	0
<i>Taeckholmia arborea</i>	(DC.) BOULOS	312-04-00-14	##
<i>Taraxacum officinale</i> [23]	L.	025-26-88-10	0
<i>Taraxacum ohwianum</i>	KITAM.	218-03-05-10	0
<i>Tolpis staticifolia</i>	SCH. BIP.	300-04-03-10/1	##
<i>Tolpis succulenta</i>	LOWE	014-01-76-14	0
<i>Tragopogon dubius</i>	SCOP.	002-01-05-10/2	##
<i>Tragopogon pratensis</i>	L.	110-20-06-10/2	##
<i>Tragopogon porrifolius</i> ssp. <i>porrifolius</i>	L.	197-73-86-14/1	#
<i>Tragopogon songoricus</i>	S. A. NIKITIN	060-05-06-10/2	##
<i>Tragopogon tommasinii</i>	SCH. BIP.	141-11-00-14/3	#
<i>Trommsdorffia maculata</i>	(L.) BERNH.	201-90-67-10	0
<i>Urospermum picroides</i>	(L.) F. W. SCHMIDT	045-49-04-14	##
<i>Vernonia arkansana</i>	DC.	076-32-10-70	#
<i>Vernonia flexuosa</i>	SIMS	131-11-96-10	0
<i>Vernonia gigantea</i> ssp. <i>gigantea</i>	(WALTER) TREL. ex BRANNER & COVILLE	073-08-10-70	#
<i>Warionia saharae</i>	BENTHEM ex COSS.	249-57-90-10	##
<i>Willemetia stipitata</i>	CASS.	029-16-01-13/2	0
<i>Youngia tenuifolia</i>	(WILLD.) BABC. & STEBBINS	017-10-10-10	##

entspr. c (Papain) > 10 µg · mL⁻¹ ## entspr. c (Papain) < 0,1-5 µg · mL⁻¹ # entspr. c (Papain) < 0,1 µg · mL⁻¹ [109]

Die Pflanzenfamilie der Asteraceae, Unterfamilie Cichorioideae stellte einen Schwerpunkt des Screenings dar. Es wurden insgesamt 95 verschiedenen Arten aus 36 Gattungen getestet, bei 67 Arten konnte Proteaseaktivität festgestellt werden. Auffallend, da alle getesteten Vertreter einer Gattung aktiv waren, sind die Gattungen *Crepis* (Pippau), *Hieracium/ Pilosella* (Habichtskräuter), *Leontodon* (Löwenzahn, Milchkraut) und *Tragopogon* (Bocksbärte). Hohe Proteaseaktivität, da hohe Fluoreszenzwerte ermittelt wurden waren aus der Gattung *Pilosella* *Pilosella ziziana* F.W.SCHULTZ & SCH. BIP., *Pilosella islandica* (LANGE) Á. LÖVE, *P. setigera* ARV.- TOUV. sowie *P. echinoides* F.W. SCHULTZ & SCH. BIP.. In der Gattung *Sonchus* konnte für vier Arten Aktivität ermittelt werden, im Verlauf der Untersuchungen wurde bemerkt, dass während der Blüte *Sonchus congestus* WILLD. und *Sonchus hierrensis* var. *benhoavensis* (PIT.) BOULOS keine Proteaseaktivität aufzeigten. Für die untersuchten Arten der Gattung *Lactuca* L. zeigte nur *L. tatarica* (L.) C.A. MEY Proteaseaktivität, alle weiteren 5 untersuchten Arten konnten das gegebene Substrat nicht umsetzen. Durch hohe Fluoreszenzwerte zeichneten sich auch folgende Asteraceen aus: *Catananche caerulea* L., *Dendroseris litoralis* SKOTTSB., *Hypochaeris radicata* L., *Leontodon hispidus* L., *Tolpis staticifolia* SCH. BIP. und *Tragopogon songoricus* S. A. NIKTIN [109]. Das Screening der Asteraceae und Campanulaceae wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Dipl. Pharm. Sonja Sytwala durchgeführt [109].

IV.2.6. Proteolytische Aktivität in Campanulaceae

Tab. 26 Übersicht Campanulaceae

Art	Erstautor	Akzessionsnummer des Bot. Gartens	Proteolytische Aktivität
Campanulaceae			
<i>Campanula alliariifolia</i>	WILLD.	194-28-74-80/4	###
<i>Campanula hofmanii</i>	(PANTAN.) GREUTER & BURDET	o. Nr.	##
<i>Campanula makaschvilii</i>	E. BUSCH	022-11-08-40/1	##
<i>Campanula persicifolia</i>	L.	194-34-74-80	##
<i>Campanula punctata</i> var. <i>hondoensis</i>	(KITAM.) OHWI	088-07-04-10/1	##
<i>Campanula pyramidalis</i>	L.	041-01-80-14	##
<i>Campanula rapunculoides</i>	L.	283-02-74-80/1	##
<i>Campanula rupicola</i>	BOISS. & SPRUN.	142-08-09-70/1	#
<i>Campanula takhtadzhianii</i>	FEDOROV	o. Nr.	##
<i>Campanula trachelium</i>	BROT.	o. Nr.	##
<i>Campanula xylocarpa</i>	KOVANDA	087-03-03-14	###
<i>Canarina canariensis</i>	(L.) VATKE	289-21-80-10	##
<i>Downingia elegans</i>	(DOUGLAS ex LINDL.)	072-01-10-70	##

	TORR.		
<i>Lobelia erinus</i>	L.	053-98-74-80	#
<i>Lobelia excelsa</i>	BONPL.	080-11-93-10/1	0
<i>Lobelia gibberroa</i>	HEMSL.	026-01-08-30/1	##
<i>Lobelia inflata</i>	L.	242-06-00-14	#
<i>Lobelia morogorensis</i>	E.B. KNOX & POCS	225-10-10-30/1	##
<i>Lobelia polyphylla</i>	HOOK. & ARN.	166-03-89-10/3	##
<i>Lobelia salicina</i>	LAM.	175-29-09-80	#
<i>Lobelia valida</i>	L. BOLUS	003-10-96-54/1	#
<i>Musschia aurea</i>	DUMORT.	081-02-95-14	#
<i>Musschia wollastonii</i>	LOWE	102-05-01-44/4	##

entspr. c(Papain) > 10µg . mL⁻¹ ## entspr. c(Papain) < 0,1-5 µg . mL⁻¹ # entspr. c(Papain) < 0,1 µg . mL⁻¹[109].

Aus der Familie der Glockenblumengewächse wurden 23 verschiedene Arten untersucht, dabei waren nahezu alle Arten der Gattung *Campanula* L. aktiv, *Campanula alliariifolia* WILLD. und *Campanula xylocarpa* KOVANDA hatten dabei die höchsten Fluoreszenzwerte. *Lobelia excelsa* BONPL. war die einzige Art, die innerhalb der Gattung *Lobelia* L. und auch innerhalb der Campanulaceae nicht positiv hinsichtlich der Proteaseaktivität getestet wurde.

IV.2.7. Proteolytische Aktivität in Euphorbiaceae

Tab. 27 Übersicht Euphorbiaceae

Art	Erstautor	Akzessions- nummer des Bot. Gartens	Herkunft	Proteo- lytische Aktivität	Diterpen- ester [Ref.]
Euphorbiaceae					
<i>Acalypha wilkesiana</i>	MÜLL. ARG.	136-07-74-83		##	
<i>Colliguaja integrima</i>	HOOK.	013-24-88-10		0	
<i>Codiaeum variegatum</i>	(L.) RUMPH. ex A. JUSS.	040-40-74-73		0	
Euphorbia					
<i>E. abyssinica</i>	J. F. GMEL	027-92-74-80	Sudan, Äthiopien, Somalia, Eritrea	##	
<i>E. acanthothamnos</i>	HELDL. ex SART.	042-60-74-80	Griechenland	##	+ [140]
<i>E. aff. onoclada</i>	DRAKE	027-84-74-80	Madagaskar	#	+ [145]
<i>E. ammak</i>	SCHWEINF.	027-68-74-80	Arab. Halbinsel	#	
<i>E. amygdaloides*</i>	L.	014-29-74-80	Europa	#	+ [146]
<i>E. amygdaloides L. ssp. amygdaloides</i>		205-86-74-80	Europa	#	+ [145]
<i>E. antisiphilitica</i>	ZUCC.	045-10-74-80	USA, Mexiko	#	
<i>E. aphylla</i>	BROUSS. ex WILLD.	012-94-74-80	Kanarische Inseln	#	
<i>E. avasmontana</i>	DINTER	279-05-83-20	Namibia	#	+ [145]
<i>E. baiouensis</i>	S. CARTER		Kenia	#	+ [145]
<i>E. balsamifera</i>	AITON	078-14-96-40	Kanarische Inseln, Mauretanien, Senegal, Mali, Burkina Faso, Niger	#	- [145]

<i>E. barnhartii</i>	L. CROIZ.	118-02-06-10	SO Asien	##	
<i>E. barrelieri</i>	BGR.	012-20-74-80	Frankreich, Italien, Balkanhalbinsel	#	+ [145]
<i>E. bubalina</i>	BOISS.	012-88-74-80	RSA	#	- [145]
<i>E. buruana</i>	PAX	218-01-98-80	Kenia, Tansania	#	
<i>E. canariensis</i>	(L.) N. E. BR	124-98-74-80	Kanarische Inseln	#	+ [147]
<i>E. candelabrum</i>	BOISS.	203-33-98-84	Ost Afrika, Sudan, Äthiopien	#	
<i>E. capsaintemariensis</i>	RAUH	014-43-74-80	Madagaskar	#	
<i>E. cereiformis</i>	L.	045-44-74-80	RSA	#	+ [145]
<i>E. characias</i> L.ssp. <i>characias</i>	AITON	236-01-83-80	Mittelmeerraum	#	+ [148]
<i>E. characias</i> L.ssp. <i>veneta</i>	DRAKE	001-11-80-10	Mittelmeerraum	##	+ [145]
<i>E. coerulescens</i>	HAW.	057-18-97-10	RSA	#	+ [149]
<i>E. confinalis</i>	R. A. DYER	043-62-74-80	RSA, Mosambik, Simbabwe	##	+ [145]
<i>E. cooperi</i>	N. E. BR.	124-98-74-80	RSA, Simbabwe	#	+ [150]
<i>E. cotinifolia</i>	L.	149-07-95-10	Mexiko, Karibik, Venezuela, Brasilien	#	
<i>E. cyathophora</i>	MURRAY	129-04-04-80	USA	#	- [145]
<i>E. cylindrifolia</i> ssp. <i>cylindrifolia</i>	J. MARN.-LAP. & RAUH	027-93-74-80	Madagaskar	#	
<i>E. cyparissias</i> *	L.	124-91-74-80	Europa	#	+ [99]
<i>E. dawei</i>	N. E. BR.	115-79-74-80	Kongo, Uganda, Burundi, Ruanda, Tansania	#	
<i>E. decaryi</i>	GUILLAUMIN	080-56-74-80	Madagaskar	#	
<i>E. deightonii</i>	CROIZAT	125-04-74-80	Sierra Leone	#	
<i>E. dendroides</i>	L.	124-94-74-80	Kanarische Inseln	#	+ [148]
<i>E. didieroides</i>	DENIS & LEANDRI	078-07-03-40	Madagaskar	#	- [145]
<i>E. dulcis</i>	L.	144-14-02-40	Europa	##	
<i>E. enopla</i>	BOISS.	240-02-99-80	RSA	#	
<i>E. epiphylloides</i>	KURZ	084-28-83-50	Andamanen See, Indien	#	+ [145]
<i>E. epithymoides</i>	L.	012-41-87-10	Europa	##	- [145]
<i>E. esula</i>	L.	027-01-91-20	Eurasien	##	+ [151]
<i>E. evansii</i>	PAX	055-60-74-80	RSA	#	+ [145]
<i>E. falcata</i>	L.	067-13-74-80	Europa,	#	+ [152]
<i>E. fortissima</i>	L. C. LEACH	194-67-92-14	Simbabwe, Sambia	##	+ [153]
<i>E. franckiana</i>	A. BERGER	027-75-74-80	RSA	##	+ [154]
<i>E. francoisii</i>	LEANDRI	231-05-90-84	Madagaskar	#	
<i>E. giessii</i>	LEACH	027-94-74-80	Namibia	##	
<i>E. globosa</i>	(HAW.) SIMS	125-01-74-80	RSA	#	
<i>E. glochidiata</i>	PAX	012-70-74-80	Kenia, Äthiopien, Somalia	#	
<i>E. grandicornis</i>	GOEBEL	027-86-74-80	RSA, Swasiland, Mosambik	#	+ [155]
<i>E. grandidens</i>	HAW.	069-63-74-80	RSA	##	
<i>E. gregaria</i>	MARLOTH	027-72-74-80	RSA, Namibia	#	
<i>E. griffithii</i>	HOOK. f.	115-15-74-80	Himalaya, China	#	

<i>E. halipedicola</i>	L. C. LEACH	080-34-74-80	Mosambik, Simbabwe, Tansania, Malawi	#	+ [145]
<i>E. hamata</i>	(HAW.) SWEET	124-99-74-80	RSA, Namibia	#	- [145]
<i>E. handiensis</i>	BURCHARD	042-62-74-80	Fuerteventura	##	+ [145]
<i>E. heterochroma</i>	PAX	012-24-74-80	Tansania	##	
<i>E. heterodoxa</i>	MÜLL. ARG.	040-01-00-74	Brasilien	##	
<i>E. horrida</i>	BOISS.	072-23-87-70	RSA	#	
<i>E. ingens</i>	E. MEYER ex BOISS	042-59-74-80	RSA, Sambia, Malawi, Bozsuana, Simbabwe, Mosambik	#	+ [156]
<i>E. jansenvillensis</i>	NEL	240-23-99-80	RSA	#	- [145]
<i>E. knuthii</i>	PAX	305-01-97-80	Mosambik, RSA, Swaziland	#	
<i>E. lagunillarum</i>	CROIZAT	084-26-83-50	Venezuela	#	+ [145]
<i>E. lathyris*</i>	L.	025-31-88-10	Vorderasien, Georgien, Iran, Kasachstan, Tibet, Mittelmeerraum	##	+ [157]
<i>E. ledienii</i>	A. BERGER	028-10-01-10	RSA	##	+ [158]
<i>E. leucodendron</i>	DRAKE	353-05-86-14	Madagaskar	##	+ [145]
<i>E. leuconeura</i>	BOISS.	027-89-74-80	Madagaskar	#	+ [159]
<i>E. lophogona</i>	LAM.	007-32-84-10	Madagaskar	##	+ [145]
<i>E. marginata</i>	PURSH.	125-02-74-80	Nordamerika, Europa in Kultur	#	
<i>E. mauritanica</i>	L.	094-53-74-84	RSA	##	+ [145]
<i>E. milii</i> DES MOUL <i>var. bevilanensis</i>	(CROIZAT) URSCH & LEANDRI	084-29-83-50	Madagaskar	#	+ [145]
<i>E. milii</i> DES MOUL <i>var. longifolia</i>	RAUH	125-03-74-80	Madagaskar	##	+ [145]
<i>E. milii</i> DES MOUL <i>var. milii*</i>		140-08-91-14	Madagaskar	#	+ [160]
<i>E. millotii</i>	URSCH & LEANDRI	019-02-94-14	Madagaskar	#	
<i>E. myrsinites</i>	L.	186-54-02-80	Mittelmeerraum, Russland, USA	##	+ [161]
<i>E. neobosseri</i>	RAUH	240-22-99-80	Madagaskar	#	
<i>E. neohumbertii</i> var. <i>neohumbertii</i>	BOIT.	027-90-74-80	Madagaskar	#	+ [145]
<i>E. nicaeensis</i>	ALL.	116-07-81-10	Mittelmeerraum	##	
<i>E. nivulia</i>	HAM.	125-05-74-80	Indien	#	+ [162]
<i>E. obesa</i>	HOOK. f.	012-89-74-80	RSA	#	
<i>E. obtusifolia</i>	POIRET	115-67-74-80	Kanarische Inseln	#	+ [163, 164]
<i>E. officinarum</i>	L.	001-82-74-70	Marokko	#	+ [165]
<i>E. opuntoides</i>	N. E. BR.	255-11-93-30	Angola	##	
<i>E. ornithopus</i>	JACQ.	012-48-74-80	RSA	#	- [145]
<i>E. pedilanthoides</i>	DENIS	188-06-04-80	Madagaskar	#	
<i>E. pentagona</i>	HAW.	014-33-74-80	RSA	#	+ [145]
<i>E. pillansii</i>	N. E. BR.	117-33-79-20	RSA	#	
<i>E. pilosa</i>	L.	069-60-74-80	Europa	##	+ [166]
<i>E. platyclada</i>	RAUH	206-01-97-80	Madagaskar	#	

<i>E. polyacantha</i>	BOISS.	236-03-83-80	Sudan	#	
<i>E. pseudocactus</i>	A. BERGER	012-84-78-80	RSA	#	+ [145]
<i>E. pseudoglobosa</i>	MARLOTH	012-38-74-80	RSA	#	
<i>E. pteroneura</i>	A. BERGER	012-86-74-80	Mexiko	#	
<i>E. resinifera</i>	BERG	042-58-74-80	Marokko	#	+ [166, 167]
<i>E. royleana</i>	BOISS.	125-06-74-80	Indien	#	+ [145]
<i>E. sakarahaensis</i>	RAUH	188-02-04-80	Madagaskar	#	
<i>E. schimperi</i>	C. PRESL	125-07-74-80	Jemen, Saudi Arabien	#	
<i>E. seguieriana</i>	NECK.	069-59-74-80	Europa, Westasien	#	+ [168]
<i>E. similiramea</i>	S. CARTER	014-42-74-80	Kenia, Tansania	#	
<i>E. sipolisii</i>	N. E. BR.	231-04-90-30	Brasilien	#	+ [145]
<i>E. spinosa</i>	L.	202-04-95-10	Kanarische Inseln	#	
<i>E. stellata</i>	WILLD.	206-06-97-80	RSA	#	
<i>E. stenoclada</i>	BAILLON	127-02-74-80	Madagaskar	#	
<i>E. submammilaris</i>	A. BERGER ex PAX	125-13-74-80	RSA	#	
<i>E. sudanica</i>	A. CHEV.	221-04-94-20	Mali	#	
<i>E. taitensis</i>	PAX	027-67-74-80	Kenia	#	
<i>E. texeirea</i>	L. C. LEACH	043-05-90-80	Angola	#	+ [145]
<i>E. tirucalli*</i>	L.	045-11-74-80	Afrika, arab. Halbinsel, Indien	#	+ [169]
<i>E. tortirama</i>	R. A. DYER	028-28-85-70	RSA	#	
<i>E. triangulares</i>	DESF.	042-63-74-80	RSA	#	+ [170]
<i>E. trigona</i>	HAW.	125-16-74-80	Namibia	#	+ [171]
<i>E. tuberifera</i>	L.	136-27-74-83	Angola	##	
<i>E. verrucosa</i>	L.	282-19-80-10	Europa	#	+ [145]
<i>E. viguieri</i>	DENIS	055-66-74-80	Madagaskar	#	+ [145]
<i>E. villosa</i>	WALDST. & KIT. ex. WILLD.	033-03-04-70	Europa	#	+ [172]
<i>E. woodii</i>	N. E. BR.	151-31-74-80	RSA	#	
<i>E. xanti</i>	BOISS.	129-03-04-84	Mexiko	#	
<i>E. xylophylloides</i>	BRONGN. ex. LEM	012-76-74-80	Madagaskar	#	+ [145]
<i>Hippomane mancinella</i>	L.	141-39-74-80		0	
<i>Jatropha curcas</i>	L.	127-54-82-13		0	
<i>Manihot esculenta</i>	CRANTZ	117-19-74-80		#	
<i>Monadenium coccineum</i>	PAX	009-55-74-80		#	
<i>Monadenium guentheri</i>	PAX	009-64-74-80		##	
<i>Monadenium heteropodum</i> var. <i>heteropdum</i>	PAX (N. E. BR.)	009-63-74-80		#	
<i>Monadenium invenustum</i> N.E.Br. var. <i>angustum</i>	BALLY	009-73-74-80		#	
<i>Monadenium lugardae</i>	N. E. BR.	114-96-74-80		##	
<i>Pedilanthus tithymaloides</i>	L. (POIT)	060-37-74-73		##	
<i>Synadenium grantii</i>	HOOK. f.	056-29-74-80		##	

entspr. c (Trypsin) > 1 mg/ ml, # entspr. c (Trypsin) 0,1 µg/ml- 1 mg/ml, RSA Republic of South Africa;
+ Diterpenester nachgewiesen, - keine Diterpenester nachgewiesen

Das größte Augenmerk des Screenings stellte die Familie der Euphorbiaceae dar und innerhalb der Familie, die Gattung *Euphorbia* L.. Insgesamt wurden 129 verschiedene Arten aus 10 Gattungen untersucht, davon entfielen 116 Arten auf die Gattung *Euphorbia*. Als Bezeichnungen der Gattungen wurden die des Botanischen Gartens übernommen. Nach phylogenetischen Untersuchungen wurden in den letzten Jahren die Gattungen *Monadenium* und *Synadenium* zur Gattung *Euphorbia* transferiert [173, 174]. Somit erhöht sich die Anzahl der getesteten Arten der Gattung um 6. Hinsichtlich der Proteaseaktivität konnten alle Arten dieser Gattung das gegebene Substrat in unterschiedlichem Ausmaß umsetzen. Bekannte Arten bei denen proteolytische Enzyme beschrieben wurden wie, Milin aus *E. milii* var. *milii* [16], Euphorbain T1-T4 aus *E. tirucalli* [33], Euphorbain Y1-Y3 aus *E. cyparissias* [27], Euphorbain L aus *E. lathyris* [29] und zwei Proteasen aus dem Latex von *Synadenium grantii* [36] wurden dabei mit untersucht und ebenfalls Proteaseaktivität festgestellt. Auffällig war, dass innerhalb des Proteasescreening die Gattung *Euphorbia* sehr hohe Fluoreszenzwerte zeigte. Die höchsten Aktivitäten waren bei den Arten *Euphorbia mauritanica*, *E. coerulescens* und *E. myrsinites* festzustellen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Latices der Gattung *Euphorbia* über mehrere Zeitpunkte, bezogen auf das Kalenderjahr, aktiv hinsichtlich proteolytischer Aktivität waren. Es ist daher anzunehmen, dass die proteolytische Aktivität im Milchsaft in der Gattung *Euphorbia* konstitutiv vorhanden ist. Sie stellt wahrscheinlich einen Faktor im Verteidigungsmechanismus der Pflanze dar.

Bei den ebenfalls untersuchten Arten konnten *Colliguaja integrima*, *Codiaeum variegatum*, *Hippomane mancinella* und *Jatropha curcas* das gegebene Substrat nicht umsetzen.

IV.3. Bestimmung der Residualaktivität ausgewählter Euphorbien

Alle bisher gefundenen Proteasen aus Latices der Gattung *Euphorbia* zeigten eine Serinproteaseaktivität. Mit der Überlegung, dass die Serinproteaseaktivität ein chemotaxonomisches Merkmal dieser Gattung darstellen könnte, wurden die Latices mit spezifischen Inhibitoren behandelt, um so Rückschlüsse auf den vorliegenden Typ führen zu können. 70 der 116 Euphorbien der Gattung *Euphorbia* wurden daraufhin untersucht.

Tab. 28 Beeinflussung der Proteaseaktivität durch spezifische Inhibitoren

	Einfluss des Serinprotease Inhibitors AEBSF	Einfluss des Aspartat Inhibitors Pepstatin A	Einfluss des Cystein Inhibitors E-64	Einfluss des Metallo Inhibitors EDTA
<i>E. acanthothamnus</i>	*↓	*↓	*↓	—
<i>E. aff.oncoclada</i>	*↓	*↓	—	*↓
<i>E. ammak</i>	*↓	*↑	—	—
<i>E. antisiphilitica</i>	*↓	—	—	—
<i>E. aphylla</i>	*↓	—	—	*↑
<i>E. avasmontana</i>	*↓	—	—	*↑
<i>E. balsamifera</i>	*↓	—	*↓	*↓
<i>E. canariensis</i>	*↓	—	*↑	—
<i>E. cereiformis</i>	*↓	—	—	—
<i>E. characias</i> L.ssp. <i>characias</i>	*↓	*↓	*↓	—
<i>E. characias</i> L.ssp. <i>veneta</i>	*↓	—	—	—
<i>E.coerulescens</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. confinalis</i>	*↓	—	—	—
<i>E. cooperi</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. cotinifolia</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. dawei</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. deightonii</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. dendroides</i>	*↓	—	—	—
<i>E. didieroides</i>	*↓	—	—	*↓
<i>E. epiphylloides</i>	*↓	—	—	—
<i>E. evansii</i>	*↓	—	—	—
<i>E. fortissima</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. franckiana</i>	*↓	*↑	—	*↑
<i>E. francoisii</i>	*↓	—	—	—
<i>E. giessii</i>	*↓	*↓	*↓	—
<i>E. glochidiata</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. grandicornis</i>	*↓	*↑	*↑	*↑
<i>E. grandidens</i>	*↓	—	—	—
<i>E. gregaria</i>	*↓	*↑	*↑	*↑
<i>E. halipedicola</i>	*↓	—	*↑	*↑
<i>E. hamata</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. handiensis</i>	*↓	—	—	—
<i>E. heterochroma</i>	*↓	*↓	—	*↓
<i>E. heterodoxa</i>	*↓	—	—	—
<i>E. ingens</i>	*↓	*↑	*↑	*↑
<i>E. jansenvillensis</i>	*↓	—	*↓	*↑
<i>E. knuthii</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. lagunillarum</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. ledienii</i>	*↓	*↓	—	*↓
<i>E. leucodendron</i>	*↓	—	—	—
<i>E. mauritanica</i>	*↓	—	—	—
<i>E. milii</i> var. <i>bevilanensis</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. milii</i> var. <i>longifolia</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. milii</i> var. <i>milii</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. millotii</i>	*↓	—	—	—

<i>E. nivulia</i>	*↓	—	*↓	—
<i>E. opuntoides</i>	*↓	—	—	—
<i>E. ornithopus</i>	*↓	—	—	—
<i>E. pedilanthoides</i>	*↓	—	—	—
<i>E. pentagona</i>	*↓	*↓	—	*↓
<i>E. pillansii</i>	*↓	—	—	—
<i>E. polyacantha</i>	*↓	—	—	—
<i>E. pseudocactus</i>	*↓	—	—	—
<i>E. pteroneura</i>	*↓	*↓	*↓	—
<i>E. resinifera</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. royleana</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. schimperi</i>	*↓	—	—	—
<i>E. similiramea</i>	*↓	—	—	—
<i>E. sipolisii</i>	*↓	—	—	—
<i>E. spinosa</i>	*↓	—	—	—
<i>E. stenoclada</i>	*↓	—	—	—
<i>E. sudanica</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. taitensis</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. texeirea</i>	*↓	*↓	—	—
<i>E. tirucalli</i>	*↓	*↑	*↑	*↑
<i>E. triangulares</i>	*↓	*↓	*↓	*↓
<i>E. trigona</i>	*↓	—	—	—
<i>E. viguieri</i>	*↓	—	—	—
<i>E. xanti</i>	*↓	*↑	—	*↑
<i>E. xylophylloides</i>	*↓	—	—	—

*signifikante Änderung der Aktivität durch den Einsatz der jeweiligen Inhibitoren; ↓ Hemmung der Aktivität, ↑ Aktivitätssteigerung, - keinen Einfluss [175]

Zu Beginn der Untersuchungen wurden alle isolierten Proteasen aus der Gattung *Euphorbia* als Serinproteasen charakterisiert. Bei den Residualaktivitäten der hier getesteten *Euphorbia* konnte für alle untersuchten Proben eine signifikante Hemmung der Aktivität durch den spezifischen Inhibitor AEBSF festgestellt werden. Bei 28 Arten hatte nur AEBSF Einfluss auf die Aktivität, so dass davon ausgegangen werden könnte, dass es sich um Serinproteaseaktivität handelt. Die Testung der anderen spezifischen Inhibitoren führte zu unterschiedlichen und individuellen Ergebnissen. Der Zusatz der anderen Inhibitoren wirkte nicht nur hemmend sondern auch stimulierend auf die Proteaseaktivität. Besonders der Zusatz von EDTA führt zum Teil (z.B. bei *E. avasmontana* und *E. ingens*) zu Steigerung der Aktivität um 200%. Einige Arten wie *E. triangulares*, *E. taitensis* oder *E. lagunillarum* wurden von allen vier Inhibitoren hemmend beeinflusst.

Eine allgemeine Aussage ist aufgrund der Komplexität für diese Arten nicht möglich. Für eine genaue Zuordnung der Aktivitäten müsste der Latex jeder Art separat gereinigt und die jeweiligen Proteasen isoliert und deren inhibitorisches Profil bestimmt werden. Auch Arten, bei denen bisher nur Serinproteasen isoliert wurden, wie aus *Euphorbia tirucalli* oder *Euphorbia milii*, wurden durch andere als Serinprotease-Inhibitoren in ihrer Aktivität beeinflusst.

IV.4. Reinigung und Charakterisierung einer Proteasefraktion aus *Euphorbia mauritanica* L.

IV.4.1. *Euphorbia mauritanica* L.



Abb. 10 *Euphorbia mauritanica* L.

Die afrikanische Wolfsmilch *Euphorbia mauritanica* (golden spurge (Eng.); geel melkbos (Afr.)) Poison Milk Bush, Pencil Milkbush), ist ein sukkulenter Rutenstrauch, mit nativem Vorkommen in Botswana, Lesotho, Namibia und Süd Afrika - Kape Province, Free State und KwaZulu-Natal. Der Strauch ist dornelos und wird bis 1.5 m hoch. Die Ruten entspringen dem Wurzelstock. Sie sind gelblich-grün, zylindrisch, mit wenigen Seitentrieben und wechselständiger Blattstellung. Die Blütezeit ist von

August bis September. Die Pflanze blüht in gelben Cyathien, die in kompakten Gruppen am Ende junger Triebe stehen. Bei kleinsten Verletzungen tritt reichlich Milchsaft aus. *Euphorbia mauritanica* gilt als toxisch und unbrauchbar als Futterpflanze. Vergiftungserscheinungen mit zum Teil tödlichem Ausgang wurden bei Schafen beobachtet, die mit *Euphorbia mauritanica* als Beifutter gefüttert wurden. Bei den Schafen kam es zu nervösen Schädigungen mit Muskelzittern, Fieber, Diarrhoe, Schaum vor dem Maul und Blutungen. Gefressen wird die Pflanze ohne Folgen nur von Steinböcken (*Raphicerus campestris*) und Klippspringern (*Oreotragus oreotragus*). Der Latex wird traditionell angewendet in der Jagd als Pfeilgift oder beim Fischen (poisoning fishing). Außerdem wird der Milchsaft aufgrund seiner Adhäsivität genutzt [105, 176].

Euphorbia mauritanica stellte auf Grund der hohen proteolytischen Aktivität im Protease-Screening und der Hemmung der Aktivität nur durch den für Serinproteasen spezifischen Inhibitor eine interessante Möglichkeit dar, eine Serinprotease zu isolieren. Des Weiteren waren die gewinnbare Menge Milchsaft und die Möglichkeit, Proben aufgrund der Kultivierung im Gewächshaus über das gesamte Jahr hinweg zu sammeln, von großem Vorteil.

IV.4.1.1. Mikroskopische Untersuchungen des Milchsaftes und des Stängels

Die mikroskopische Untersuchung des Milchsaftes zeigt die für Euphorbien typische stäbchen- bzw. hantelförmige Stärke. Der Schnitt durch die Sprossachse zeigt über den Leitbündeln die ungegliederten Milchsafröhren.

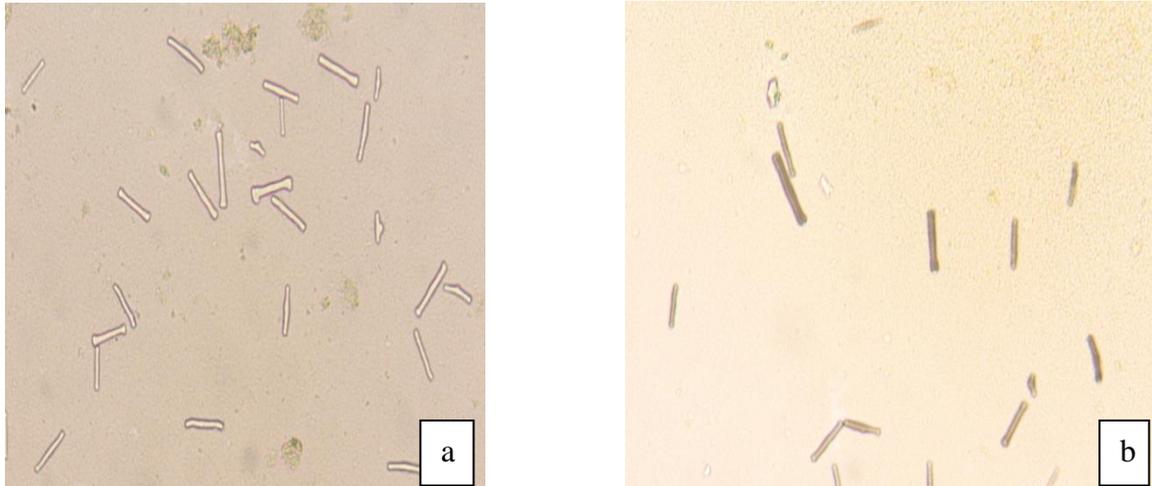


Abb.11 Milchsaft von *Euphorbia mauritanica* L., a) Wasserpräparat b) Wasser/Iod-Kaliumiodid-Lösung; typische stäbchen-/hantelförmige Euphorbiaceenstärke, Vergrößerung 10x40

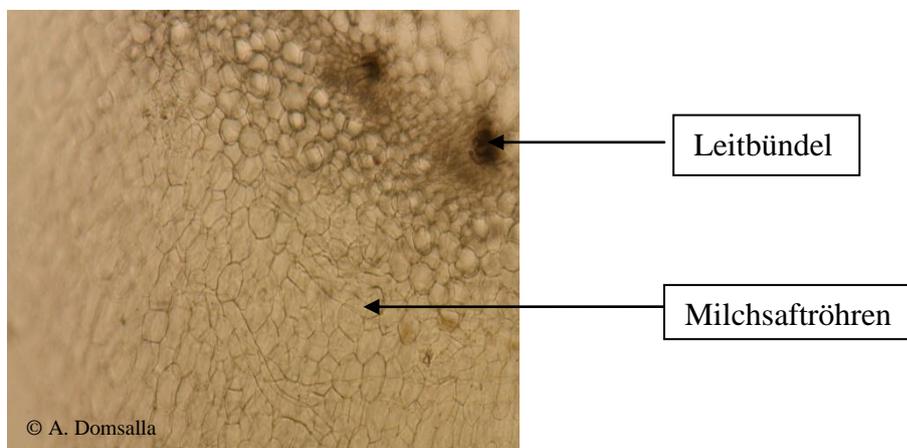


Abb. 12 Milchsafröhren oberhalb des Leitbündelringes, Stängelquerschnitt, aufgehellt mit Chloralhydrat

IV.4.1.2. Nano LC-MS-MS nach tryptischen Verdau von SDS-Gelbanden

Der Rohlatex wurde auf ein SDS-Page aufgetragen und mit Coomassie gefärbt, die gefärbten Banden wurden ausgeschnitten und in der Abteilung für Massenspektrometrie am FMP tryptisch verdaut und mittels Nano LC MS/MS Q TOF analysiert. Nach Abgleich mit den Datenbanken Swissprot und NCBI konnten folgende bekannte Proteine identifiziert werden.

Tab. 29 Identifizierte Proteine nach tryptischen Verdau

Protein	Accessions Nummer	Molekulargewicht
peroxidase precursor	gi 56385009	38 kDa
copper-containing amine oxidase [<i>Solanum lycopersicum</i>]	gi 59668406	64 kDa
SERPIN A 3-2	gi 121531626 (+2)	46 kDa

Proteaseinhibitoren der SERPIN- Familie sind ubiquitär im Pflanzenreich. Allerdings ist nicht viel über die Funktion bekannt. Es gibt Hinweise, dass Serinproteaseinhibitoren den programmierten Zelltod und die Zellalterung beeinflussen. Es wird ihnen weiterhin durch das Vorhandensein in Phloemsäften und Milchsäften eine defensive Funktion zugeschrieben durch die irreversible Hemmung von Verdauungsproteasen der Schädlinge. Ein möglicher direkter Schutz der Pflanze vor Eigenverdau durch eigene Proteasen bzw. das Zusammenspiel von endogener Protease und endogenem Proteaseinhibitor bei der Abwehr von Pathogenen und Frassfeinden wäre eventuell auch eine mögliche Erklärung des Vorhandenseins beider Proteine im Milchsaft.

Bei der Pflanzenverteidigung spielen auch die Aminoxidase und die aus dem Precursor entstehende Peroxidase eine gewisse Rolle. Kupfer Aminoxidasen (EC 1.4.3.6.) katalysieren die oxidative Desaminierung verschiedener biologischer Amine. Dabei entstehen neben den korrespondierenden Aminoaldehyden, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Ammoniak (NH_3). Wasserstoffperoxid agiert dabei als direktes zytotoxisches Agens gegen Pathogene und als second messenger zur Aktivierung von Verteidigungsgenen [177]. Pflanzliche Peroxidasen (EC 1.11.1.) sind in viele pflanzenphysiologische Prozesse involviert. Sie beeinflussen die Bildung von Lignin und Suberin, die Vernetzung von Zellwandkomponenten und Beteiligung am ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) und RNS (Reaktive Stickstoffspezies) Metabolismus. Die reaktiven Spezies stellen dann ähnlich wie Wasserstoffperoxid direkte Agenzien gegen Pathogene dar [178]. Desweiteren wurden viele Peptidfragmente gefunden, die allerdings mit

keiner Sequenz eines bekannten Proteins matchen. Somit sind noch weitere nicht identifizierte Proteine enthalten. Proteasen sind bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

IV.4.1.3. Reinigung der Proteasefraktion aus *Euphorbia mauritanica*

Die Reinigung einer Proteasefraktion aus dem Latex von *Euphorbia mauritanica* erfolgte in drei Schritten. Der gewonnene Latex wurde initial 30 min bei 4°C und $18 \cdot 10^3 \text{ g}$ zentrifugiert und für 24 h bei -18°C eingefroren, durch den Schritt des Einfrierens koagulierte die gesamte kautschukhaltige Fraktion und konnte nach dem Auftauen und erneuter 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C als Koagulum entfernt werden. Um restliche Schwebstoffe zu entfernen, wurde der Latex durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) gefiltert. Die erhaltene Probe wurde 1 zu 10 mit Phosphatpuffer 0,01 M, pH 7,0 verdünnt und der Proteingehalt sowie die Aktivität bestimmt.

IV.4.1.3.1. Ionenaustauschchromatographie

Für die Reinigung der Proteasefraktion wurden verschiedene Ionenaustauscher getestet. Der Versuch mit Carboxymethylcellulose als Kationenaustauscher wurde aufgrund fehlender Bindung der Proteine verworfen, hingegen zeigten die Anionenaustauscher DEAE und Q gute Bindungseigenschaften für die zu separierenden Enzyme. Für die Optimierung wurden Acetat-Puffer (0,01 M, pH 6,0 und pH 5,0) und Phosphat-Puffer (0,01 M, pH 7,0) getestet. Ein optimales Ergebnis hinsichtlich des Puffers lieferte der Phosphatpuffer. Die Probenlösung wurde mit dem Laufpuffer verdünnt und auf die Säule gegeben. Anschließend wurde mit Laufpuffer nichtgebundenes Protein von der Säule gespült, was erkennbar an dem ersten Proteinpeak in Abb. 13 ist. Es wurden Fraktionen von 1,5 ml gesammelt bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 1,5 ml/min. Daraufhin wurde mit steigendem NaCl-Gradienten die gebundenen Proteine eluiert, bei den Fraktionen 25-37 wurde 0,1 M NaCl Zusatz eluiert. Neben dem Proteinpeak ist auch ein Aktivitätspeak zu erkennen mit einem Maximum in Fraktion 26. Die weitere Anhebung der Natriumchlorid-Konzentration auf 0,15 M führte zu einem Peakmaximum sowohl für die Aktivität als auch für den Proteingehalt der gesamten Austauschchromatographie in Fraktion 39. Die weitere Elution mit 0,2 M NaCl Zusatz führte zu einem weiteren Peak (Fraktion 55).

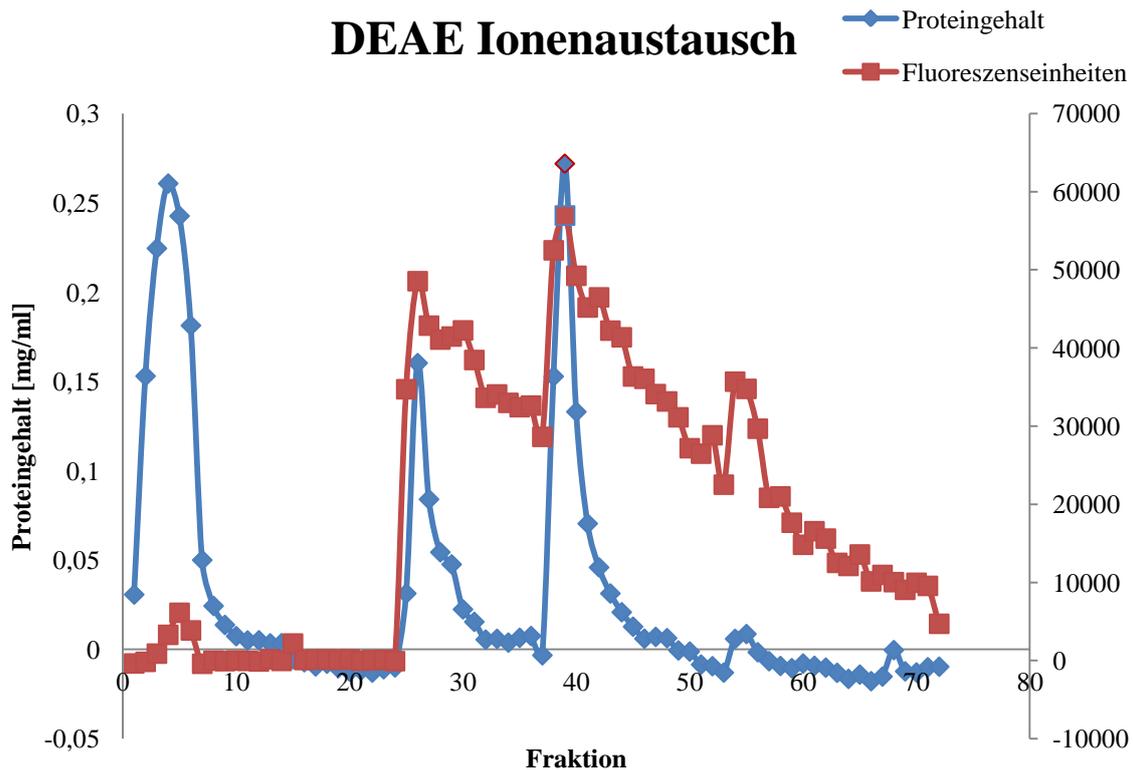


Abb. 13 Proteingehalt und Aktivität nach Anionenaustausch

Gradient NaCl 0-0,2; Fraktion 0-24 Puffer ohne NaCl; Fraktionen 25-37 0,1 M NaCl; Fraktionen 38-53 0,15 M NaCl; Fraktionen 54-72 0,2M NaCl; Flußrate 1,5ml/min; Fraktionsvolumen 1,5ml, AcroSep™ DEAE Ceramic Hyper D F

Die nachfolgende SDS-Page der Fraktionen 4, 26, 39 und 55 zeigte für Fraktion 4 den Urlatex. Die Säulenkapazität war somit erreicht.

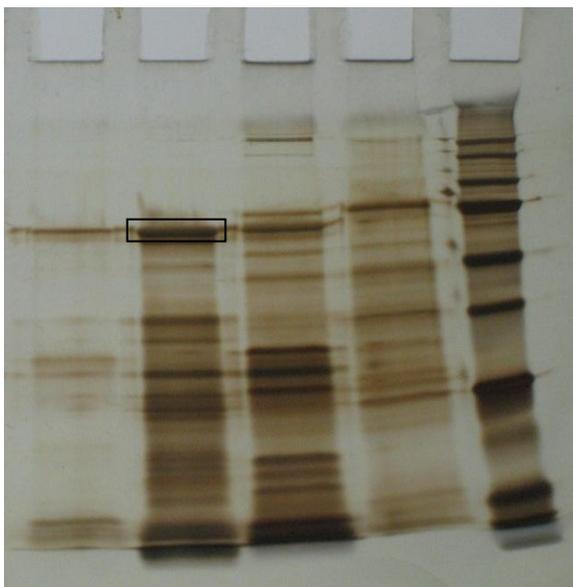


Abb. 14 SDS-PAGE nach Ionenaustauschchromatographie

Silberfärbung, (v.l.n.r. Fraktionen 55, 39, 26, 4; Proteinmarker), 200 V konstant, 34 min.

IV.4.1.3.2. Größenausschlusschromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie wurde die Fraktion 39 aus der Ionenaustauschchromatographie verwendet, 50 µl der Fraktion wurden eingespritzt und das Chromatogramm bei 210 nm online verfolgt. Die drei Peaks wurden separat aufgefangen und als Peak 1, 2 und 3 bezeichnet. Von allen Peaks wurde die Aktivität und der Proteingehalt bestimmt, sowie eine SDS-Page angefertigt. Dabei zeigte Peak 2 in der SDS-Page nur eine erkennbare Bande sowohl bei Coomassie als auch bei Silberfärbung. Peak 1 zeigte mehrere Banden im Gel, ähnlich denen der Fraktion 39, die eingespritzt wurde. Peak 3 konnte im Gel nicht detektiert werden. Bezüglich der Aktivität zeigten sowohl Peak 1 als auch 2 Proteaseaktivität, hingegen konnte Peak 3 das Enzchek-Reagenz nicht umsetzen.

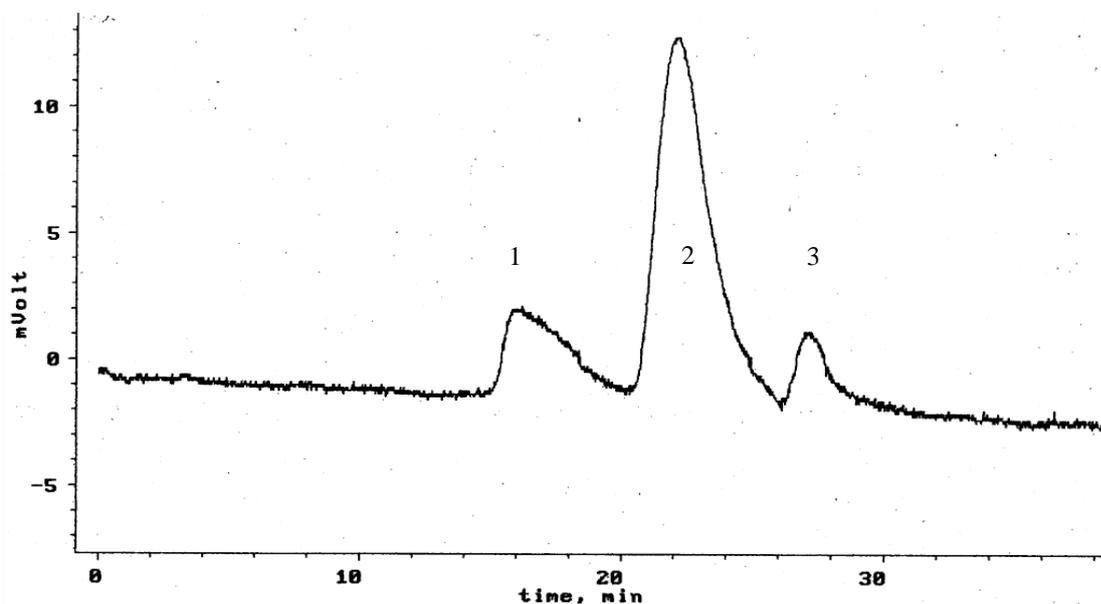


Abb. 15 Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie;
50 µl Fraktion 39 der Ionenaustauschchromatographie, Detektionswellenlänge: 210 nm, Flussrate: 0,150 ml/min,
Laufmittel: 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,0; Peak 1-3

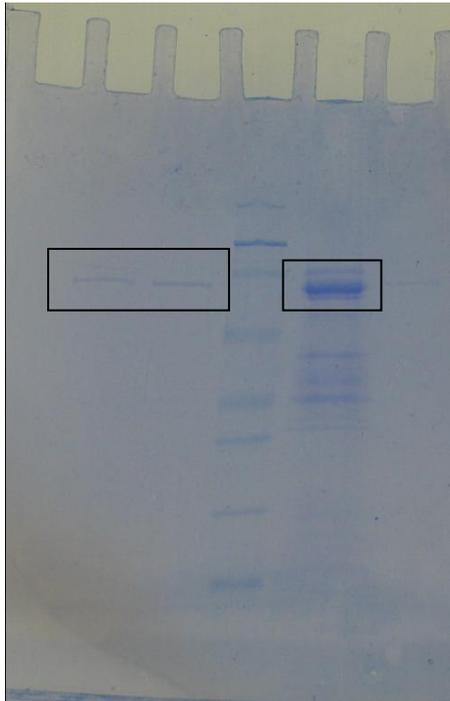


Abb. 16 a)

16 a. SDS-Page, Färbung mit Coomassie- Brilliantblau
(v.l.n.r. Peak 2, Peak 2, PM, Fraktion 39) (Laufzeit: 35 min ,57-30 mA, 200 V konstant);

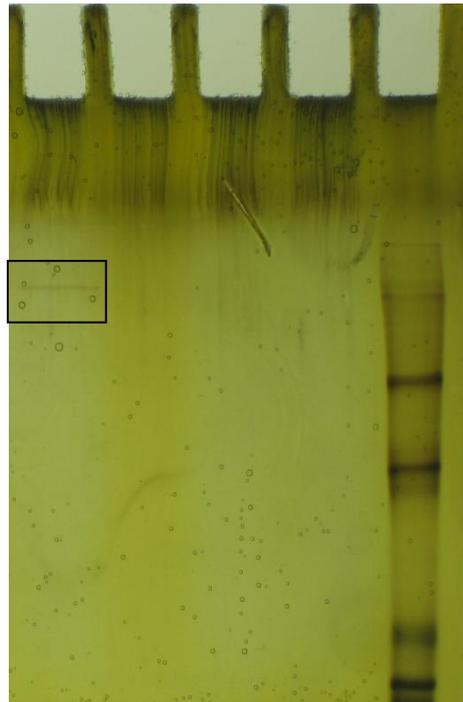


Abb. 16 b)

16 b. SDS-Page, Färbung mit Silber
(v.l.n.r. Peak 2, PM) (Laufzeit: 33 min ,57-28 mA, 200 V konstant)

Tab. 29 Reinigungsübersicht mit dazugehörigen Aktivitäten und Proteingehalt

Reinigungsschritt	Proteingehalt [$\mu\text{g/ml}$]	Aktivität [Fluoreszenz- einheiten]	Spez. Aktivität Fluoreszenzeinheiten/ Proteingehalt der Probe
Urlatex	1637 ± 23	50044 ± 342	$1,22 \pm 0,3$
DEAE Ionenaustausch	226 ± 12	56945 ± 443	$10,07 \pm 0,2$
Größenausschluss	21 ± 2	42940 ± 234	$81,79 \pm 0,2$

Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Messungen mit je 4 Parallelen \pm SD.
Spezifische Aktivität berechnet als Fluoreszenzeinheiten/Proteingehalt der Probe

IV.4.1.4. Charakterisierung der unbekannt Proteasefraktion aus *Euphorbia mauritanica* L.

IV.4.1.4.1. Abschätzung der molekularen Masse

Für die Abschätzung der molekularen Masse wurde anhand der relativen Laufstrecke der einzelnen Proteine des Proteinmarkers eine Kalibriergerade erstellt und aus der resultierenden Geradengleichung die molekulare Masse der Gelbanden der unbekannt Protease abgeschätzt.

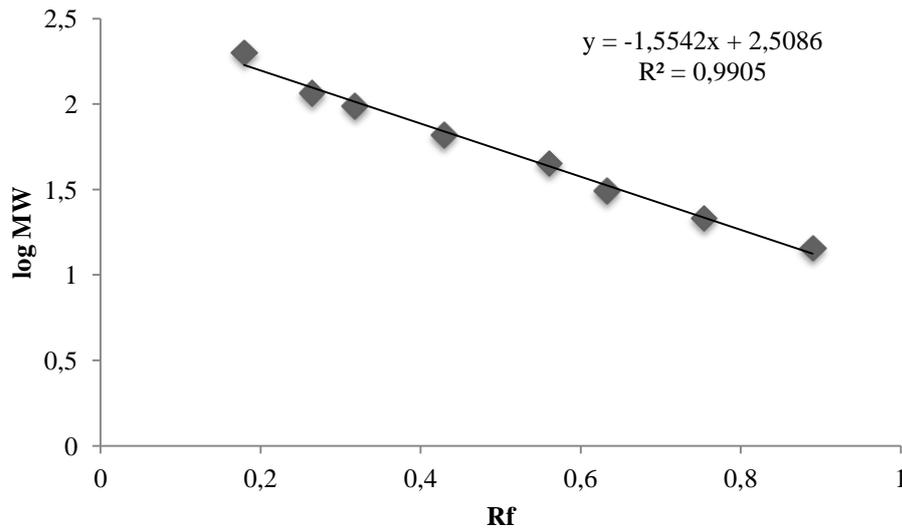


Abb. 17 Kalibriergerade für die Molekulargewichtsbestimmung

(Proteinmarker broad range: Myosin 200 kDa, β -Galktosidase 116,3 kDa, Phosphorylase b 97,4 kDa, bovines Serumalbumin 66,2 kDa, Ovalalbumin 45 kDa, Carboanhydratase 31 kDa, Trypsininhibitor 21,5 kDa, Lysozym 14,4 kDa).

Anhand des R_f Wertes konnte eine Molekulare Masse von $94,65 \pm 1,20$ kDa für die unbekannt Protease ermittelt werden.

IV.4.1.4.2. Zymographie

Für die Zymographie wurde der Latex von *Euphorbia mauritanica* in 3 Verdünnungen aufgetragen, Lane 1 stellt den Rohlatex dar, aufgefangen in 300 μ l PBS-Puffer (Proteingehalt ca. 1500 μ g/ml), Lane 2 stellt eine Verdünnung von 1:10 und Lane 3 von 1:100 dar. Die Banden des Rohlatex sind sehr diffus und es sind kaum einzelne Banden zu erkennen. Die gewählte Proteinkonzentration war zu hoch für eine klare Abgrenzung der Banden. In der Verdünnung 1:10 sind deutlich drei Bereiche zu detektieren. In der Verdünnung 1:100 ist der Proteingehalt zu gering, es konnten nur zwei Bereiche detektiert werden. Das vorliegende Zymogramm zeigt, dass im Latex von *Euphorbia mauritanica* möglicherweise 3 verschiedene Proteasen vorhanden sind, da drei Bereiche zu erkennen sind, bei denen das Casein verdaut wurde.

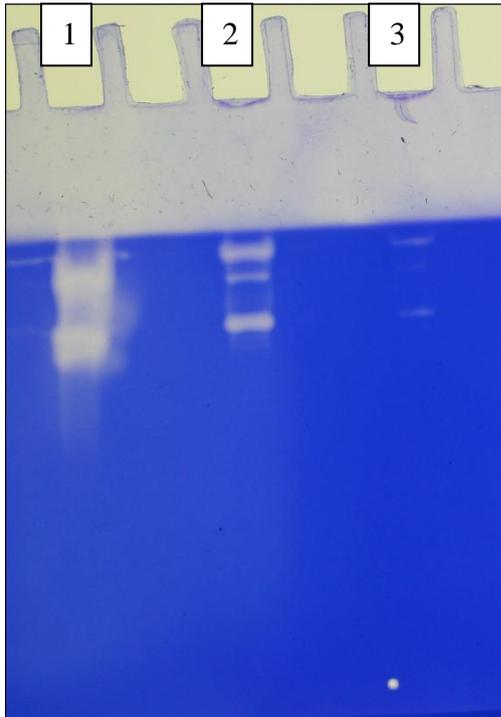


Abb. 18 Zymogramm von *E. mauritanica*

Lane 1 Rohlatex, Lane 2 Verdünnung 1:10, Lane 3 Verdünnung 1:100, Zymogrammgel, 12%, Casein.
I:100 V konstant, t: 35 min

IV.4.1.4.3. Glycoproteinfärbung

Die Färbung der SDS-Page mit dem Glycoprotein-Staining-Kit ergab eine rosa gefärbte Bande für die Positivkontrolle und eine leicht rosa gefärbte Bande für Peak 2, somit kann angenommen werden, dass es sich um ein Glykoprotein handeln könnte.

IV.4.1.4.4. Verhalten gegenüber pH-Wert

Der für die unbekannte Protease optimale pH-Wert für die Umsetzung des Substrates liegt zwischen pH 6,5 und 7,5. Unter einem pH-Wert von 4,5 waren die Unterschiede zum Blindwert nicht signifikant, hingegen konnte im Basischen bis pH 12,0 eine signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals erfasst werden.

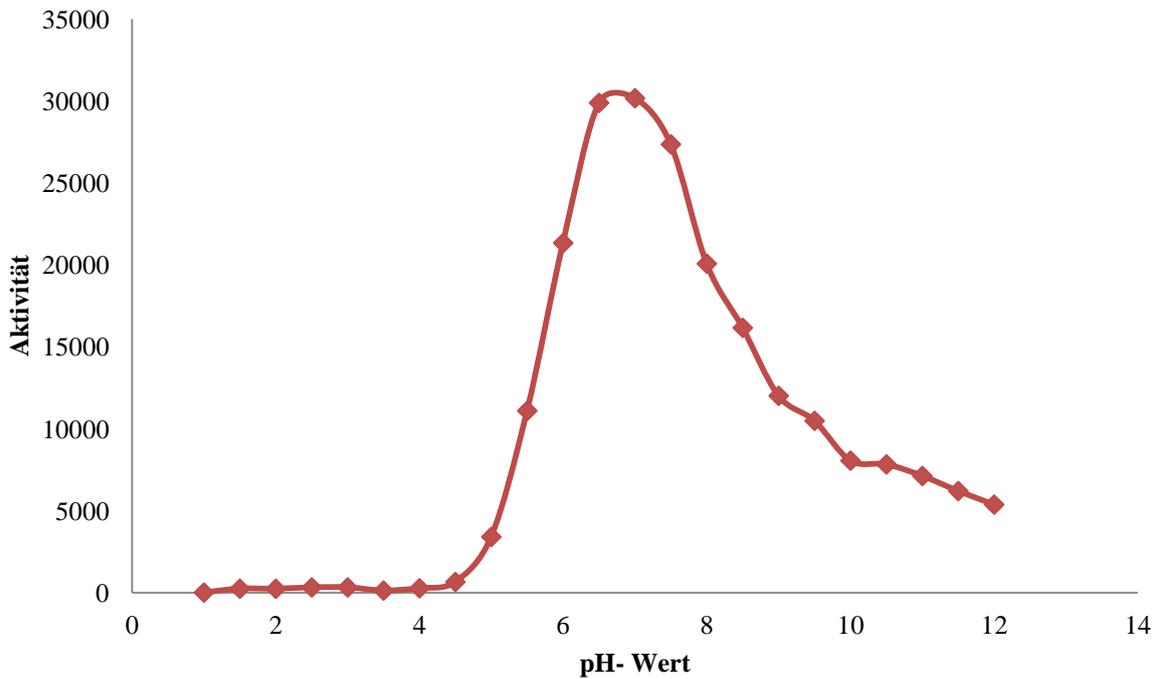


Abb. 19 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH-Optimum zwischen pH 6.5 und 7.5, die Protease konnte das Substrat im Bereich von pH 4.5-12.0 umsetzen, dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Messungen mit je 2 Parallelen (n=6).

IV.4.1.4.5. Temperaturoptimum und Stabilität

Das Temperaturoptimum für die unbekannte Protease liegt im Bereich von 55°C bis 60°C. Bei der Aktivitätsmessung bei der jeweiligen Temperatur konnte im gesamten getesteten Bereich Aktivität ermittelt werden. Hingegen konnte die Protease nach thermischer Behandlung das gegebene Substrat ab einer Temperaturbelastung von 80°C nicht mehr umsetzen.

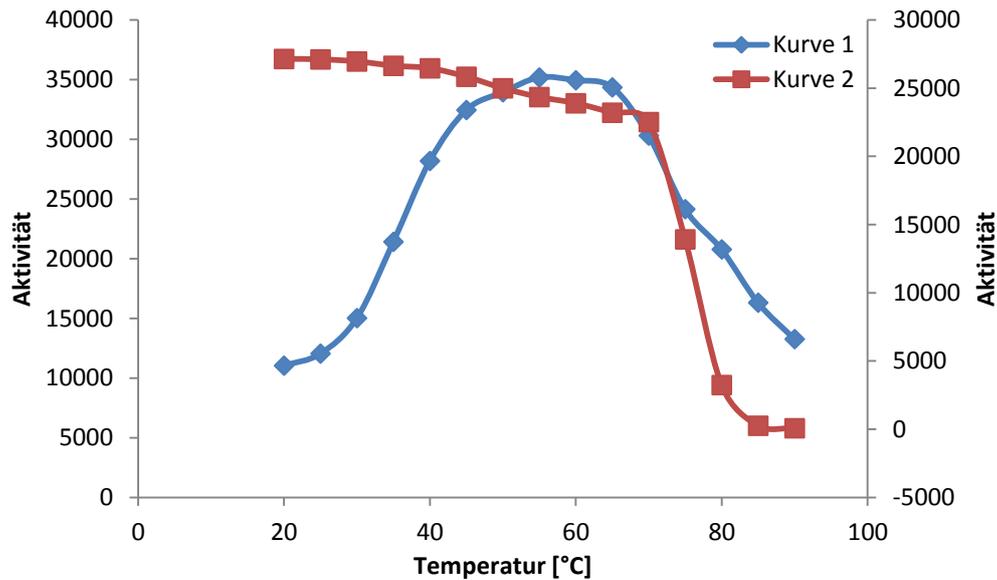


Abb. 20 Verhalten der Aktivität gegenüber Temperaturänderungen

Kurve 1: Probe 15 min bei definierter Temperatur belassen und dann die Aktivität bestimmt.

Kurve 2: Probe thermisch belastet, abkühlt und Aktivität bei 37°C bestimmt. Temperaturoptimum zwischen 55-65°C, Temperaturstabilität von 20-80°C. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Messungen mit je 3 Parallelen.

IV.4.1.4.6. Verhalten gegenüber Solventien

Um die Stabilität gegenüber organischen Solventien und Harnstoff zu testen, wurden DMSO, Methanol, Acetonitril und Harnstoff in verschiedenen Konzentrationen mit der Protease versetzt und die Aktivität nach 30 min Inkubation gemessen und ins Verhältnis mit der unbehandelten Protease gesetzt und die Residualaktivität bestimmt.

Tab. 31 Aktivität der unbekanntten Protease nach Behandlung mit organischen Solventien

Agens	Konzentration (v/v)	Residualaktivität [%]
DMSO	50	62,5
	30	81,2
	10	93,8
Acetonitril	50	86,3
	30	96,4
	10	99,8
Methanol	50	85,3
	30	96,5
	10	99,2
Harnstoff	8 M	65,4
	4 M	75,8
	2 M	84,3
	1 M	86,2

Die kurzzeitige Belastung mit Acetonitril und Methanol führte bei der unbekannt Protease erst bei einer Konzentration von 50% zu einer Reduktion der Proteaseaktivität von 14%. Die anderen getesteten Konzentrationen führten kaum zu einer Reduktion der Aktivität. Die Behandlung mit DMSO zeigte bereits bei 30% iger Lösung eine Abnahme der Aktivität von ca. 20% und eine Konzentration von 50% führte zu einer Aktivitätsminderung von 38%.

Bei den Stabilitätsversuchen mit Harnstoff zeigte sich eine konzentrationsabhängige Minderung der Aktivität. Die 4 M Lösung führte zu einer Aktivitätsminderung von 25% und 8 M Lösung von 35%. Insgesamt ist festzustellen, dass die kurzzeitige Behandlung mit Methanol und Acetonitril in den getesteten Konzentrationen wenig Einfluss auf die Aktivität hatte. DMSO und Harnstoff hatten in den höheren Konzentrationen einen hemmenden Effekt auf die Aktivität.

IV.4.1.4.7. Stabilität der isolierten Fraktion

Die isolierte Protease wurde bei 4°C 12 Monate aufbewahrt. In Abständen wurde die Aktivität bestimmt und es konnte festgestellt werden, dass die Protease keinem Selbstverdau unterliegt. Die festgestellte Aktivität war über den untersuchten Zeitraum gleich hoch.

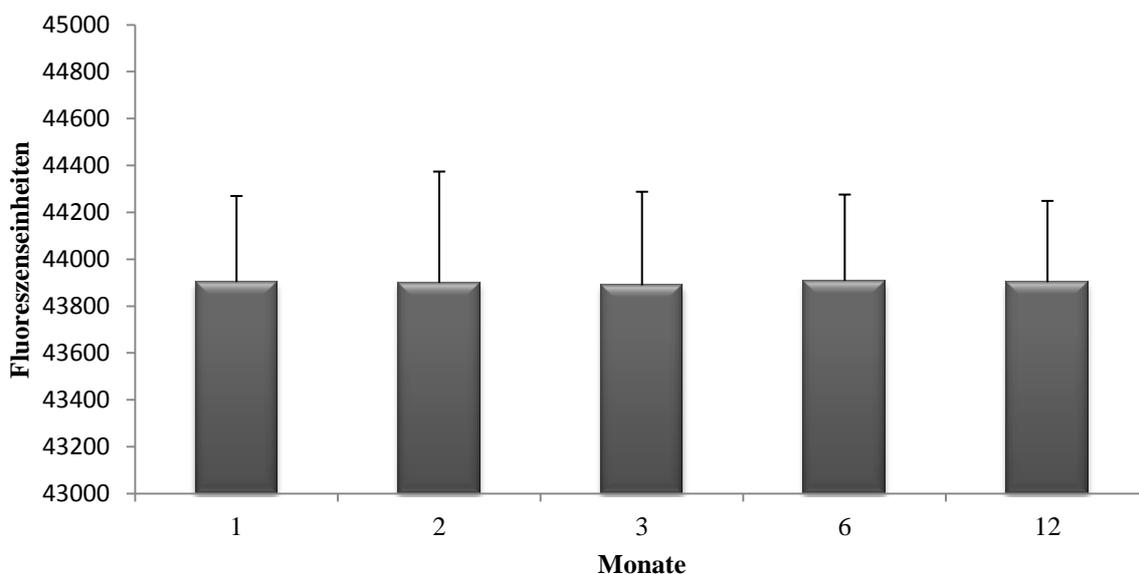


Abb. 21 Lagerungsstabilität der unbekannt Protease, Aktivitätsmessungen über 12 Monate

IV.4.1.4.8. Identifikation der Substratspezifität der unbekanntnen Protease durch Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS

Für die Ermittlung der Substratspezifität der unbekanntnen Protease wurden bekannte globuläre Proteine (Myoglobin (horse heart), Lysozym (hen egg white), β -Lactoglobulin (bovine)) auf eine SDS-Page übertragen und die entsprechenden Banden ausgeschnitten. Die gereinigten Proteine wurden dann durch die Protease verdaut und die entstandenen Spaltstücke mittels MALDI-TOF-MS am Institut für Ernährungswissenschaft analysiert. Für die Kalibrierung wurde der „Peptide calibration standard II“ (Massenbereich von 700-3500 Da) von Bruker Daltonics herangezogen.

IV.4.1.4.8.1. Verdau von Myoglobin (horse heart)

Myoglobin vom Pferdeherz ist ein einkettiges globuläres Protein. Es besteht aus 153 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 16951.49 Da [179]. Der Verdau durch die unbekanntne Protease zeigte, dass vor allem hinter den Aminosäuren Alanin, Leucin und Lysin gespalten wurde. Weitere Spaltstellen waren hinter den Aminosäuren Phenylalanin, Methionin, Isoleucin, Valin und Prolin.

Tab. 32 Verteilung der Spaltstellen auf die Aminosäuren (Myoglobin (horse heart))

	K	L	A	I	P	F	V	M
[%]	26,0	21,9	20,8	11,4	8,3	7,3	4,2	4,2

K Lysin, L Leucin, A Alanin, I Isoleucin, P Prolin, F Phenylalanin, V Valin, M Methionin

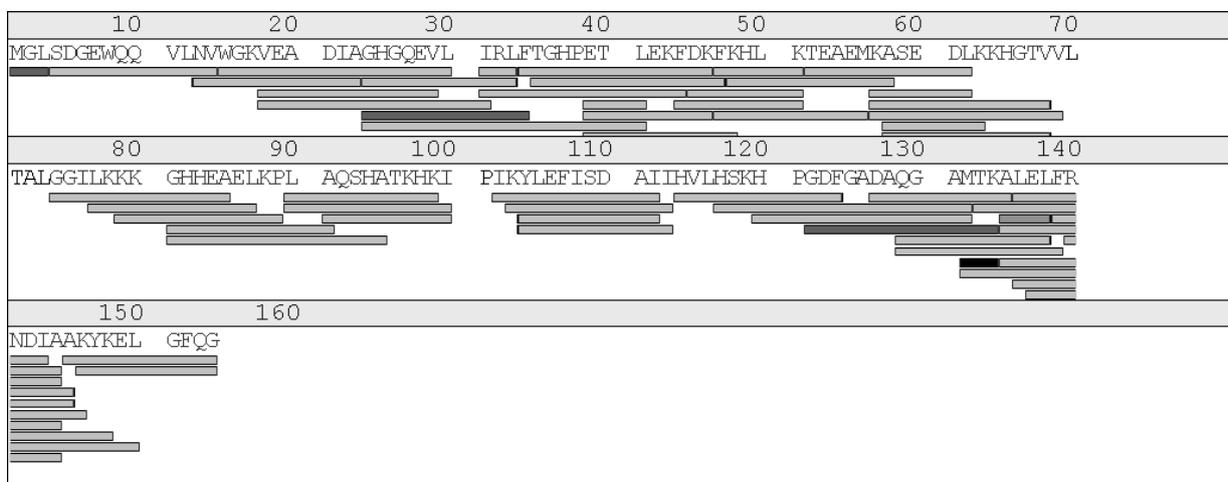


Abb. 22 Identifikation der Spezifität der unbekanntnen Protease durch Verdau von Myoglobin (horse heart) an L, M, V, K, A, F, I, P; Messung 1, sequence coverage: 96,8%, RMSError: 0,58 Da, globale Modifikation: 1 Met (O), partials: 6, Massentoleranz: 1000 ppm

Ein Verdau von Myoglobin mit den Aminosäuren L, M, V, K, A, F, I, P ergab eine Sequenzabdeckung mit den ermittelten Peptiden von 96,8%.

IV.4.1.4.8.2. Verdau von β -Lactoglobulin (bovine)

Bovines β -Lactoglobulin besteht aus 162 Aminosäuren und einer Molekularen Masse von 18,3 kDa. Der Verdau durch die unbekannte Protease zeigte, dass die Aminosäuren Lysin, Leucin und Alanin die bevorzugten Spaltstellen darstellen. Der Verdau mit diesen Aminosäuren ergab eine Sequenzabdeckung von 90,7%.

Tab. 33 Verteilung der Spaltstellen auf die Aminosäuren (β -Lactoglobulin)

	K	L	A
[%]	48,4	32,3	19,3

K Lysin, L Leucin, A Alanin

10	20	30	40	50	60	70
LIVTQIMKGL	DIQKVAGIWIY	SLAMAASDIS	LLDAQSAPLR	VYVEELKPTP	EGDLEILLQK	WENGECAQKK
80	90	100	110	120	130	140
IIAERTKIIPA	VFKIDALNEN	KVLVLDIDYK	KYLLEFCMENS	AEPEQSLACQ	CLVRTPEVDD	EALEKFDKAL
150	160	170				
KALPMHIRLS	FNFTQLEEQC	HI				

Abb. 23 Identifikation der Spezifität der unbekannten Protease durch Verdau von β -Lactoglobulin an L, K, A; sequence coverage: 90,7%, RMS Error:1,04 Da, globale Modifikation: C (Carbamidomethyl), partials: 6, Massentoleranz: 1000 ppm

IV.4.1.4.8.3. Verdau von Lysozym (hen egg white)

Die Glucosidase Lysozym aus dem Hühnereiklar besteht aus 129 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 14,3 kDa. Der Verdau zeigte eine sehr unspezifische Spaltung, die Spaltstellen waren vor allem hinter Alanin und Glycin sowie hinter Leucin, Isoleucin, Valin, Prolin, Lysin und Phenylalanin. Der Verdau hinter diesen Aminosäuren zeigte eine Sequenzabdeckung von 91,5%.

Tab. 34 Verteilung der Spaltstellen auf die Aminosäuren (Lysozym)

	A	G	L	I	V	P	K	F	M
[%]	24,4	20,0	13,3	13,3	11,1	8,9	4,4	4,4	0

A Alanin G Glycin L Leucin I Isoleucin V Valin P Prolin K Lysin F Phenylalanin M Methionin

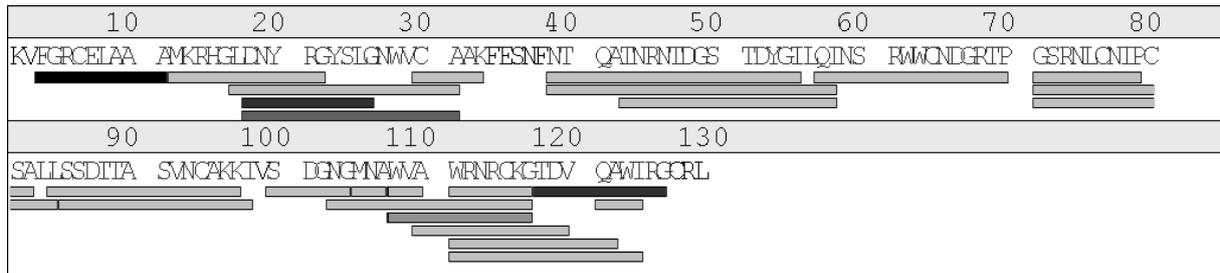


Abb. 24 Identifikation der Spezifität der unbekannt Protease durch Verdau von Lysozym (hen egg white) an L, M, V, K, A, F, I, P, G; sequence coverage: 91,5 %, RMSError: 0,84 Da, globale Modifikation: C (Carbamidomethyl), partials: 6, Massentoleranz: 1000 ppm

IV.4.1.4.8.4. Vergleich der unbekannt Protease mit Trypsin

Für den Vergleich der Spaltmuster von Trypsin und der unbekannt Protease wurde Myoglobin verdaut, es ist zu erkennen, dass das Spaltmuster eine partielle Übereinstimmung aufweist, da beide Enzyme eine Spezifität für die Aminosäure Lysin (K) haben. Bei der unbekannt Protease erfolgt jedoch keine Spaltung an der Aminosäure Arginin, wie es bei Trypsin der Fall ist.

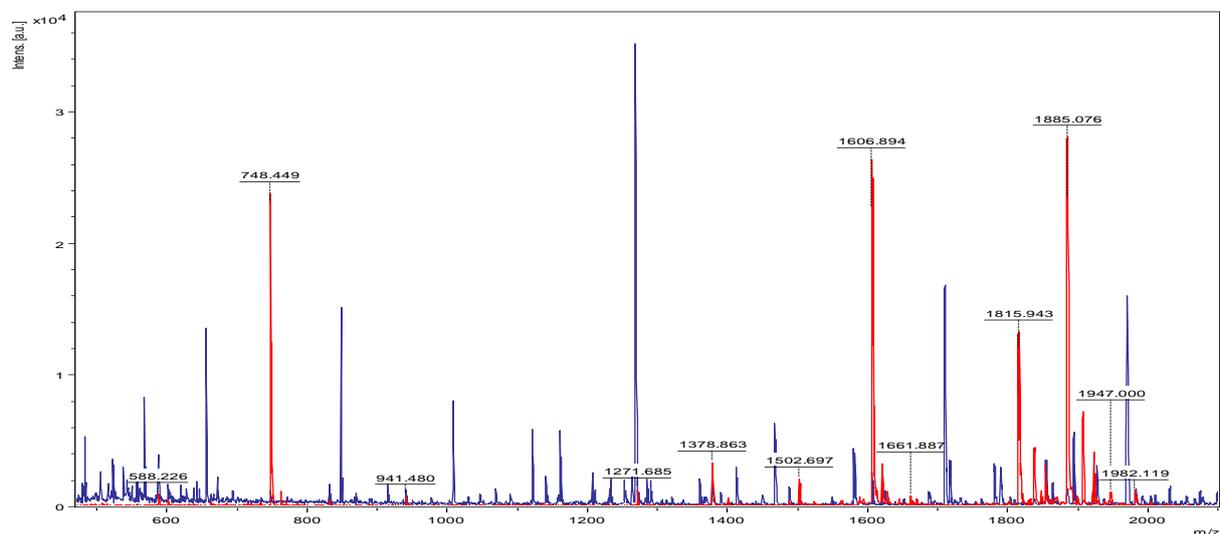


Abb. 25 Vergleich der Spaltmuster von Trypsin (rot) und der unbekannt Protease (blau)

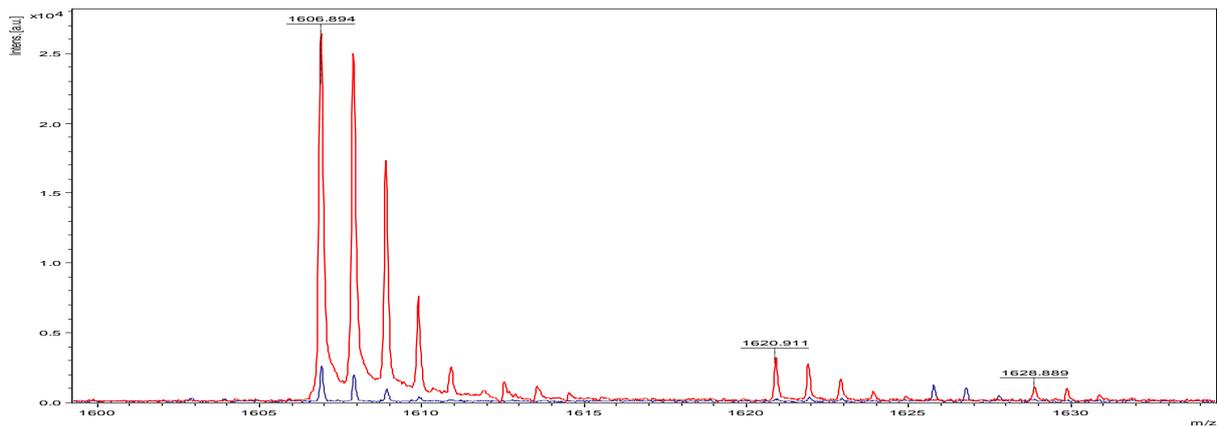


Abb. 26 Vergleich der Spaltmuster von Trypsin (rot) und der unbekannt Protease (blau) im Bereich m/z 1600- 1635

Die unbekannt Protease besitzt eine unspezifische Substratspezifität, die Untersuchung der ermittelten Peptidmassen zeigte eine erhöhte Spezifität der unbekannt Protease für hydrophobe, unpolare Aminosäuren Leucin, Methionin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin, Alanin, Prolin, Glycin sowie für die basische Aminosäure Lysin. Die Spezifität der unbekannt Protease ist abhängig von der Aminosäurezusammensetzung des Testproteins. An den Aminosäuren Leucin, Lysin und Alanin wird bevorzugt gespalten.

IV.4.1.4.9. Untersuchungen zur Substratspezifität anhand synthetischer Substrate

Bei der Untersuchung der unbekannt Protease hinsichtlich der Umsetzung synthetischer Substrate konnten vier der acht gegebenen Substrate eine signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals gegenüber dem Blindwert bewirken. Auffällig war, dass keine Umsetzung erfolgte, wenn Arginin an das 4-Aminomethylcumarin gebunden war, hingegen erfolgte eine Umsetzung, wenn die unpolaren Aminosäuren Leucin, Phenylalanin oder Valin an 4-Aminomethylcumarin gebunden waren. Diese Untersuchung bestätigen die Ergebnisse die bei dem in-Gel-Verdau, unter IV.4.1.4.8. erzielt wurden.

Tab. 35 Übersicht über die Umsetzung synthetischer Substrate durch die unbekannt Protease

Peptidsubstrat	M_r	c [$\mu\text{g/ml}$]	Umsetzung
Boc-Asp-(OBzl)-Pro-Arg-AMC	770,28	10	-
Boc-Val-Pro-Arg-AMC	627,74	10	-
Boc-Val-Leu-Lys-AMC	615,77	10	+*
BZ-Arg-AMC	435,48	10	-
H-Leu-AMC	288,35	10	+*
H-Phe-AMC	322,36	10	+*
MeO-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-AMC	627,69	10	+*

Succ-Ala-Ala-Phe-AMC	564,60	10	+*
Z-Gly-Gly-Arg-AMC	616,07	10	-

+* signifikante Umsetzung, - keine Umsetzung

IV.4.1.4.10. Inhibitorisches Profil der unbekannt Protease

Um die unbekannt Protease einer Klasse von Endopeptidasen zuordnen zu können, wurden spezifische Inhibitoren getestet. Es stellte sich heraus, dass die Inhibitoren für Serinproteasen die Aktivität signifikant auf unter 10% Restaktivität senken konnten. Hingegen hatten die Inhibitoren für Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen keinen signifikanten Einfluss.

Tab. 36 Übersicht über die getestete Inhibitoren mit dazugehörigen Residualaktivitäten

Spezifischer Inhibitor	Restaktivität
Pefabloc (AEBSF)	9,4 ± 2,4
Aprotinin	26,5 ± 1,5
Leupeptin	30,3 ± 1,6
EDTA	105,4 ± 2,1
EGTA	103,5 ± 2,3
Phosphoramidon	97,3 ± 3,2
Pepstatin A	96,4 ± 2,3
E-64	93,2 ± 2,6

Residualaktivitäten nach Behandlung mit den spezifischen Inhibitoren.

Dargestellt sind die Mittelwerte + SD aus 3 unabhängigen Untersuchungen mit jeweils 3Parallelen.

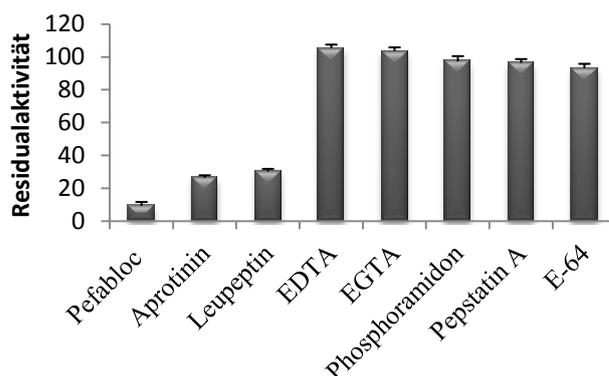


Abb. 27 Inhibitorprofil

Insgesamt betrachtet handelt es sich bei dem gereinigten Enzym, um eine Protease mit einer Masse von ca. 95 kDa und Serin im aktiven Zentrum. Sie ist über einen großen Temperatur- und pH-Bereich stabil. Auch die Lagerung über mehrere Monate bei 4°C wurde ohne Aktivitätsverlust überstanden. Ein Selbstverdau ist damit nur in sehr geringem Ausmaß

vorhanden. Die Substratspezifität ist relativ gering. Bevorzugt wird hinter unpolaren Aminosäuren geschnitten, wobei es eine gewisse Präferenz für die Aminosäuren Leucin, Lysin und Alanin gibt. Aufgrund der Eigenschaften bietet sich die Möglichkeit, die Protease dort einzusetzen, wo es nicht auf die Spezifität ankommt, z.B. in Waschmitteln bzw. dort, wo Proteine unspezifisch zersetzt werden müssen. Da bisher noch keine Proteasen im Latex von *Euphorbia mauritanica* bekannt sind, könnte die charakterisierte Protease in Anlehnung an die bekannten Latexproteasen (siehe Tab. 2-5), Mauritanicain, genannt werden.

IV.4.2. Zellkultur- Untersuchungen

IV.4.2.1. Vorbemerkung

Entzündungsgeschehen im Rahmen von Unfällen mit Milchsäften sind seit langem bekannt. Nach Kontakt mit dem Milchsaft kommt es zu zum Teil starken Reaktionen der Haut. Diese können mit Rötungen, Juckreiz, Schwellungen, Blasenbildung und Ödem einhergehen [106]. Die für diese Reaktionen verantwortlichen Phorbolster bzw. deren Derivate sind als Tumorpromotoren und Procarcinogene bekannt [150]. Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften binden sie an Phospholipidmembran-Rezeptoren. Sie aktivieren zum Beispiel, wie der endogene Aktivator Diacylglycerol (DAG) die Proteinkinase C (PKC). Diese hat dann Einfluss auf die Signaltransduktion, Zelldifferenzierung und das Wachstum. Weiterhin führen Phorbolster zur Freisetzung von Histamin, Zytokinen, Proteasen und der Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit zu den Entzündungszeichen [180]. Auf der anderen Seite beeinflussen Proteasen, vor allem Thrombin, die Entzündungsreaktion. Thrombin agiert als chemotaktisches Agens für polymorphkernige Neutrophile und Monozyten, in dem es die Produktion von Monozytenchemotaktischem-Protein-1 (MCP-1), die Proliferation von Monozyten und die Sekretion von Interleukinen stimuliert. Thrombin erhöht weiterhin die Phagozytoseaktivität von Monozyten. Diese Effekte werden durch die proteolytische Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Proteinase-Aktivierten-Rezeptors-1 (PAR-1) hervorgerufen. Es ist bekannt, dass natürliche Killerzellen, T- Zellen und Monozyten PAR-1 exprimieren [181, 182]. Sowohl Phorbolster als auch die Protease Thrombin stimulieren die Sekretion von Interleukinen [140], wie Il-6, welches für die Entzündungsreaktion von entscheidender Bedeutung ist. Unter anderem induziert Il-6 die Freisetzung von Akut-Phase Proteinen, die Antikörperproduktion und die Aktivierung von T-Zellen. Es hat somit während der akuten Entzündungsreaktion proinflammatorische Eigenschaften [183].

Daher war es ein interessanter Ansatz zu testen, in wie weit die Konzentration von sekretiertem Il-6 verändert wird, wenn die Einzelsubstanzen Thrombin und PMA getestet werden oder deren Kombination. Weiterhin sollte getestet werden, ob auch andere Proteasen in der Lage sind die Il-6 Sekretion zu beeinflussen. Dafür wurden Trypsin und Papain einzeln und in Kombination mit PMA untersucht. Es wurden außerdem Milchsftproben ausgewählter Euphorbien auf die Modulation der Il-6 Sekretion hin untersucht.

IV.4.2.2. Differenzierung von U-937 Zellen

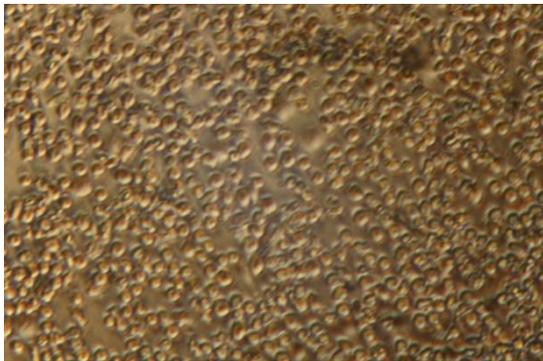


Abb. 28 undifferenzierte U-937 Zellen

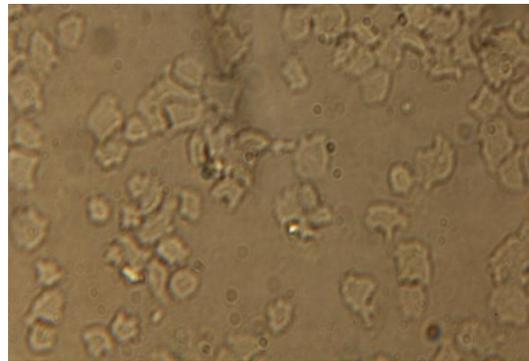


Abb. 29 differenzierte U-937 Zellen nach 4Tage

Die Differenzierung von U-937 und THP-1 Zellen geht mit der Fähigkeit der Anheftung an die Kulturflasche einher. Für die optimale Anheftung wurden die Platten vorher mit Fibronectin beschichtet. Fibronectin erwies sich als effektiveres Beschichtungsreagenz gegenüber Gelatine. Die Zellen wurden über 4 Tage differenziert, der Überstand entfernt und mit vorgewärmtem PBS-Puffer gewaschen, undifferenzierte Zellen wurden dabei entfernt.

IV.4.2.3. Interleukin-6 ELISA

Die Untersuchungen zum Status der Il-6 Sekretion nach Behandlung mit verschiedenen Proteasen, PMA bzw. einer Kombination aus beiden und die Testung von Euphorbien-Latices erfolgte in monozytischen U-937 und THP-1 Zellen. Dabei wurden die Zellüberstände gesammelt und mittels ELISA die Menge an Il-6 bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten an differenzierten und undifferenzierten Zellen. Für die Bestimmung wurde auf jeder Platte eine Konzentrationsreihe von Il-6 Standards mitgeführt und anhand deren Werte eine Kalibriergerade erstellt, die der Kalkulation der einzelnen Messwerte diene.

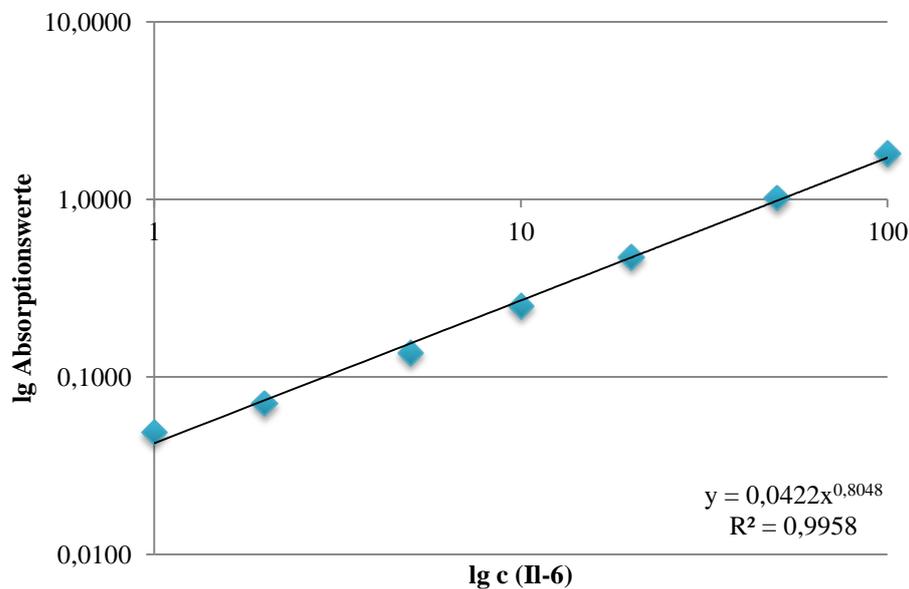


Abb. 30 Kalibriergerade Il-6 ELISA $\lg c$ (IL-6), \log (Absorptionswerte)

IV.4.2.4. Status der Interleukin-6 Sekretion durch Behandlung von Proteasen in undifferenzierten U-937/THP-1 Zellen

Bei der Untersuchung an undifferenzierten U-937 konnte festgestellt werden, dass undifferenzierte U-937 Zellen nicht in der Lage sind, Il-6 in einem signifikanten Ausmaß zu sekretieren (Abb.). Gleiche Ergebnisse zeigten auch Naldini et al. (2000) [140], als sie undifferenzierte U-937-Zellen mit Thrombin behandelten. Desweiteren war festzustellen, dass undifferenzierte THP-1 Zellen aber auch differenzierte THP-1 Zellen in allen Versuchen keine detektierbaren Mengen an Interleukin-6 sekretieren und somit die Zelllinie THP-1 für die vorliegenden Untersuchungen als ungeeignet angesehen wurde.

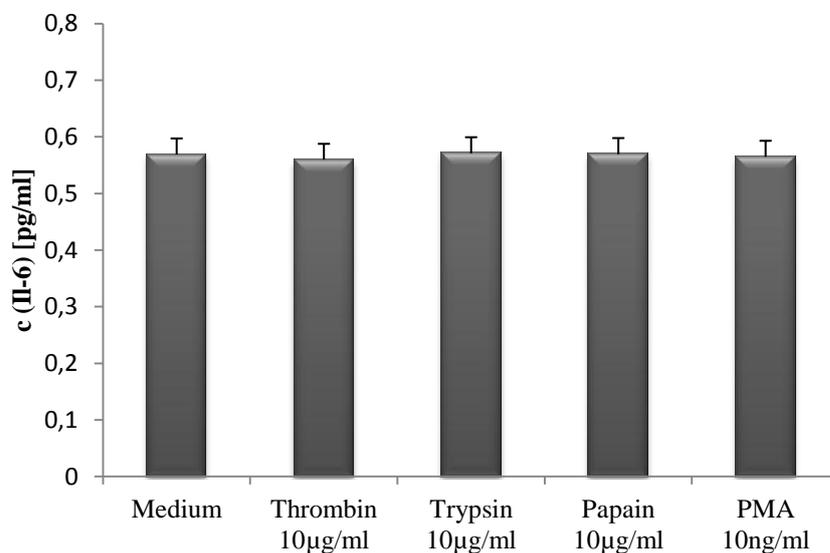


Abb. 31 Il-6 Konzentration nach Behandlung in undifferenzierten U-937 Zellen (72 h)

U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit der jeweiligen Versuchskonzentration bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert, die zellfreien Überstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05)

IV.4.2.5. Status der Interleukin-6 Sekretion durch Behandlung von Proteasen, PMA und deren Kombination in differenzierten U-937

IV.4.2.5.1. Versuch mit Thrombin

Thrombin wurde in Konzentrationen von 1-10 $\mu\text{g/ml}$ getestet und jeweils über 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation. Die Behandlung der differenzierten U-937 Zellen führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Il-6 Konzentrationen nach einer Inkubationszeit von 72 h. Die Inkubation über 24 h und 48 h zeigte keine signifikante Steigerung der Il-6 Konzentrationen gegenüber der Kontrolle. Die Konzentrationsabhängigkeit wurde ebenfalls von Naldini et al. [140] festgestellt und konnte bestätigt werden.

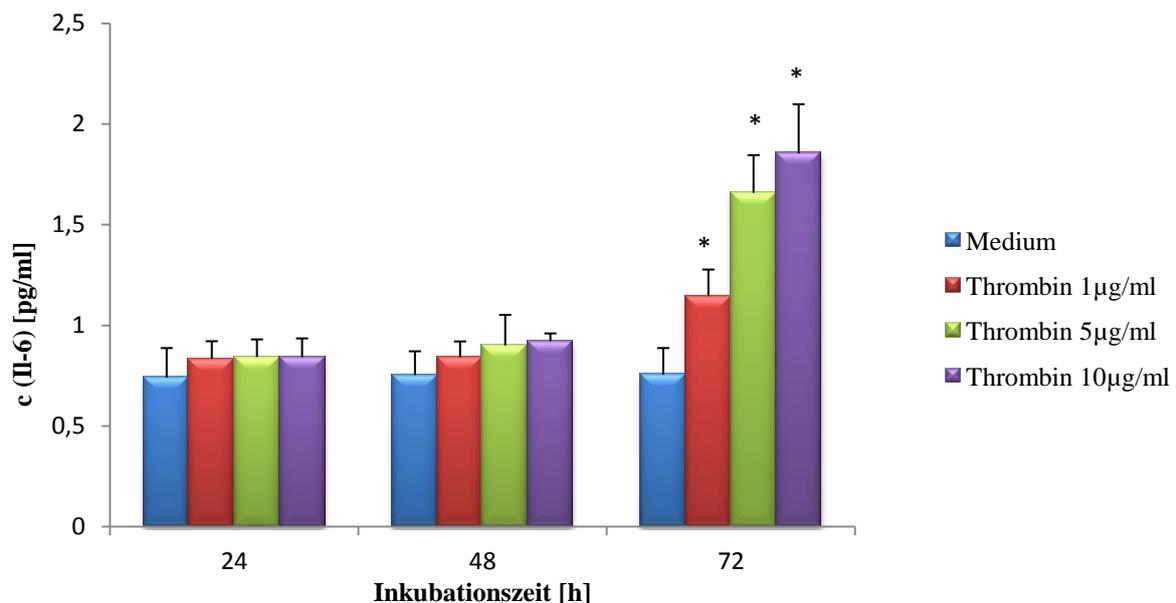


Abb. 32 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Thrombin in differenzierten U-937 Zellen

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreiem Medium ergänzt mit der jeweiligen Thrombinkonzentration bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert, die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, $p=0,05$).

IV.4.2.5.2. Versuch mit Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA)

PMA wurde in Konzentrationen von 0,1 ng/ml bis 10 ng/ml getestet und die Il-6 Konzentration jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Festzustellen war, dass nach 24 h in den getesteten Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle messbar war, nach 48-stündiger Inkubation wurde für 1 ng/ml und 10 ng/ml PMA eine signifikante Erhöhung der Il-6 Konzentration gemessen. Nach 72 h zeigten alle getesteten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der sekretierten Menge an Il-6 gegenüber der Mediumkontrolle. PMA in einer Konzentration von 10 ng/ml führte zu einer 550% Erhöhung der sekretierten Il-6 Konzentration im Vergleich zur Kontrolle.

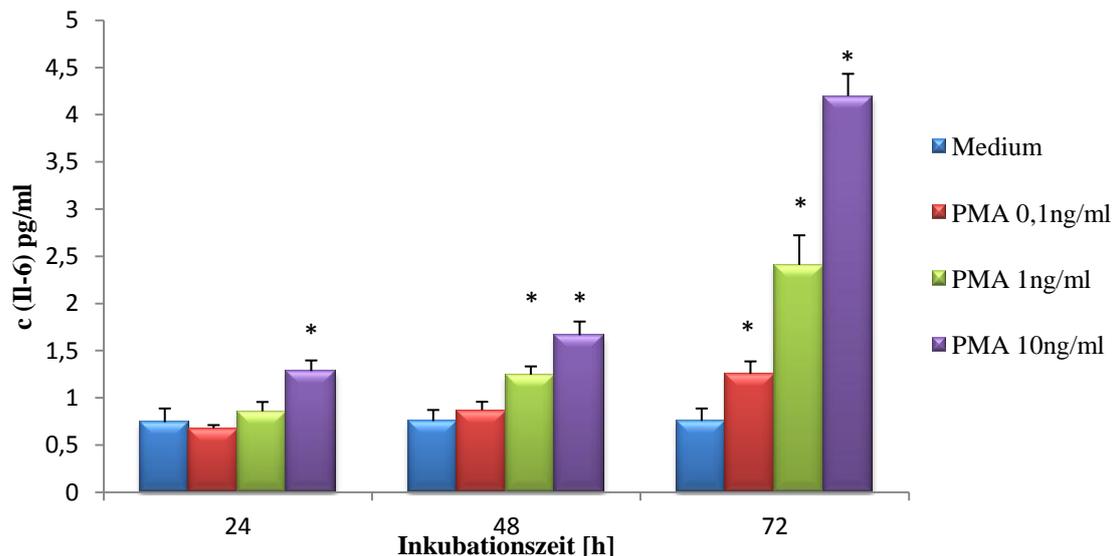


Abb. 33 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit PMA

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit der jeweiligen PMA-Konzentration bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert, die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

IV.4.2.5.3. Kombination PMA 0,1 ng/ml mit Thrombin

Bei der Kombination der in IV.4.2.3.1 verwendeten Thrombinkonzentrationen mit 0,1 ng/ml PMA wurde für eine Inkubationsdauer von 24 h und 48 h kein signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle festgestellt. Nach 72-stündiger Inkubation konnte eine signifikante Erhöhung der sekretierten Menge an Il-6 nachgewiesen werden. Allerdings war das Ausmaß der Kombinationen nicht signifikant höher als die Behandlung der Zellen mit PMA 0,1 ng/ml bzw. Thrombin allein.

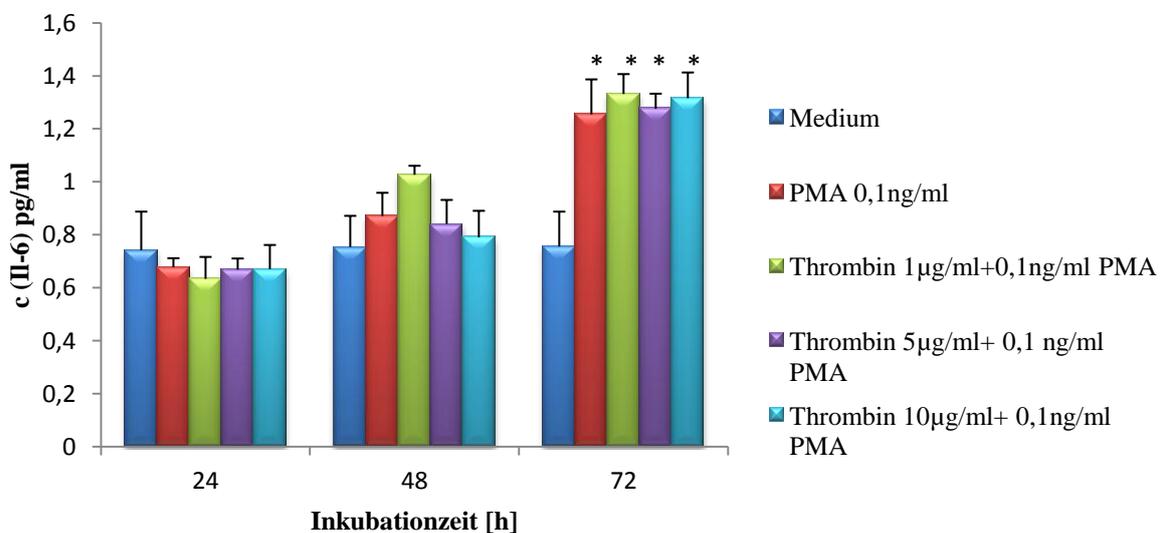


Abb. 34 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit 0,1 ng/ml PMA in Kombination mit Thrombin
 INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit PMA/Thrombin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert, die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

IV.4.2.5.4. Kombination PMA 1 ng/ml mit Thrombin

Die Testung der Kombination der verschiedenen Thrombinkonzentrationen und PMA 1 ng/ml zeigte für die Inkubationsdauer von 24 h keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Nach 48 h Inkubation war gegenüber der Mediumkontrolle für alle Kombinationen eine signifikante Erhöhung feststellbar. Für die Kombination aus 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml Thrombin mit 1,0 ng/ml PMA wurde auch ein signifikanter Unterschied zu PMA allein festgestellt. Die Kombination aus 1,0 ng/ml PMA und 10 µg/ml Thrombin führte zu einer Erhöhung der sekretierten Menge an Il-6 um 236% gegenüber der Mediumkontrolle und um 70% gegenüber der Behandlung mit PMA bzw. um 115% mit Thrombin allein. Nach 72 h Inkubation führte die Kombination von 1,0 ng/ml PMA und 10 µg/ml Thrombin zu einer Erhöhung der Il-6 Konzentrationen um 440% gegenüber der Mediumkontrolle bzw. 120% gegenüber 1,0 ng/ml PMA allein. Die Ergebnisse der anderen Kombinationen waren auch signifikant erhöht, allerdings nur gegenüber der Mediumkontrolle und nicht gegenüber PMA.

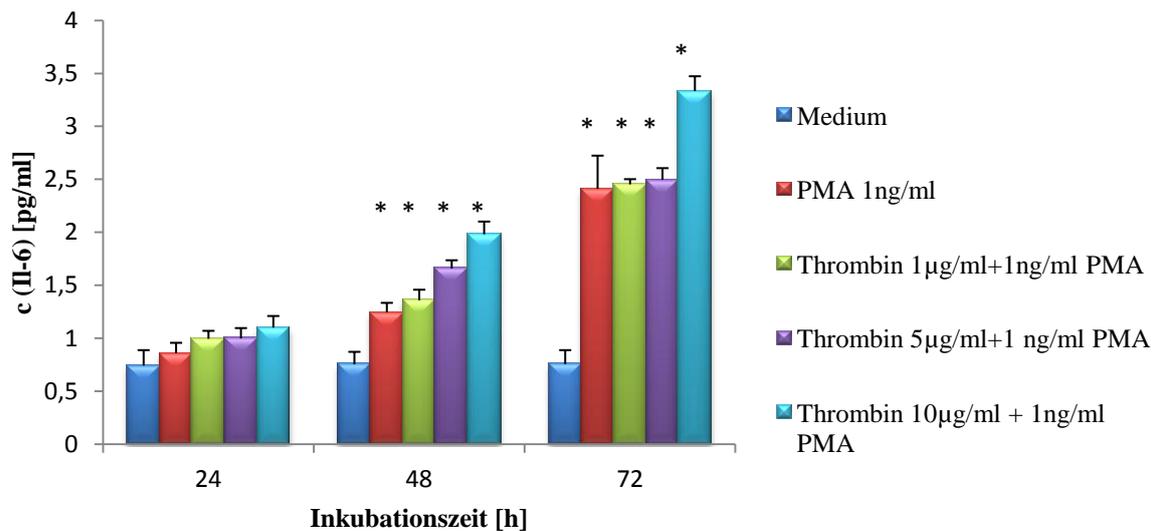


Abb. 35 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit 1 ng/ml PMA in Kombination mit Thrombin

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit PMA/Thrombin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

IV.4.2.5.5. Kombination PMA 10 ng/ml mit Thrombin

Deutliche additive Effekte waren in der Kombination von Thrombin mit 10 ng /ml PMA zu verzeichnen. Signifikante Erhöhungen waren bei allen Kombinationen festzustellen. So führte die Kombination von 1 µg/ml Thrombin mit 10 ng/ml PMA zu Steigerung der sekretierten Menge an Il-6 um 300% nach 24 h, um 450% nach 48 h und um 550% nach 72 h Inkubationszeit gegenüber der Behandlung mit PMA allein. Somit lag die Menge an detektiertem Il-6 um den Faktor 2 bis 3 höher verglichen PMA. Die Konzentration von 5 µg/ml Thrombin kombiniert mit PMA führte ebenfalls zu einer starken Erhöhung der Il-6 Konzentration im Zellüberstand. So waren die festgestellten Mengen für 24 h und 48 h Inkubationszeit mehr als 3-mal und für 72 h mehr als doppelt so hoch wie die detektierten Mengen bei der Testung mit PMA allein. Bei der Kombination von 10 µg/ml Thrombin mit PMA war eine Vervierfachung bzw. eine Verfünffachung der Il-6 Mengen für 24 h respektive 48 h Inkubationsdauer feststellbar gegenüber der alleinigen Testung mit PMA. Nach 72 h war eine Verdopplung der Il-6 Konzentrationen feststellbar.

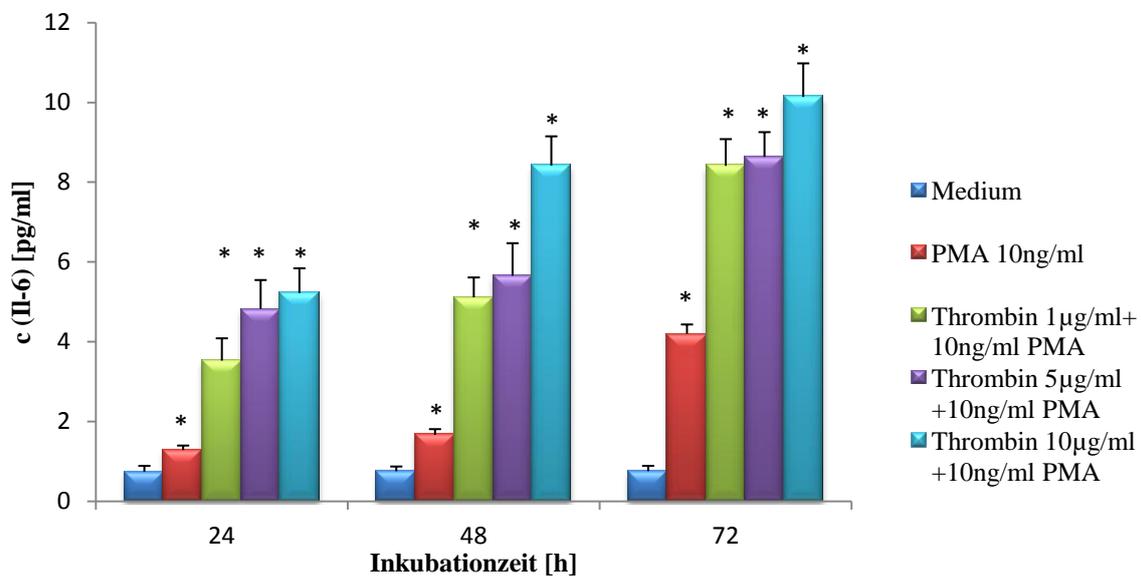


Abb.36 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit 10 ng/ml PMA in Kombination mit Thrombin

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit PMA/Thrombin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

IV.4.2.5.6. Versuch mit Papain

Papain wurde als Vertreter für die Cysteinproteasen in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml getestet. Nach 24-stündiger Inkubation konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Konzentrationen und der Kontrolle festgestellt werden. Nach 48 h Inkubationsdauer erhöhte sich die Il-6 Konzentration gegen über der Mediumkontrolle für 5 bzw. 10 µg/ml Papain signifikant. Die Betrachtung der Ergebnisse für die 72-stündige Inkubation zeigte für alle getesteten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der Il-6 Konzentrationen um mehr als das Doppelte gegenüber dem basalen Level der Mediumkontrolle.

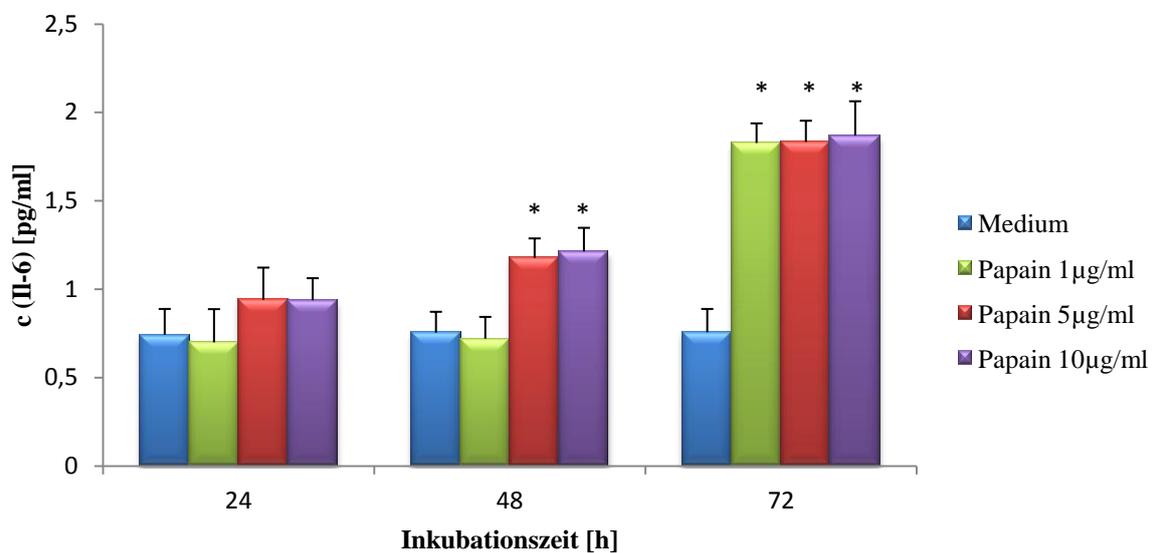


Abb. 37 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Papain

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit der jeweiligen Papain-Konzentration bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

IV.4.2.5.7. Kombination Papain mit PMA

Papain (10 $\mu\text{g/ml}$) wurde weiterhin in Kombination mit 1 bzw. 10 ng/ml PMA getestet. Für die Kombination mit 1 ng/ml PMA konnte jeweils eine moderate Erhöhung der Il-6 Konzentrationen gemessen werden. Eine Verdopplung gegenüber den Einzelkomponenten konnte nicht festgestellt werden. Hingegen führte die Kombination mit 10 ng/ml PMA zu deutlich höheren Il-6 Konzentrationen. Nach 24 h verdoppelte und 48 h verdreifachte sich die sekretierte Menge. Gegenüber der Mediumkontrolle war somit eine Steigerung um das 3- bzw. 8-fache zu verzeichnen. Nach 72 h war die Konzentration gegenüber der Mediumkontrolle ebenfalls um das 8-fache erhöht, im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit PMA jedoch nur eine Steigerung um das 1,5-fache.

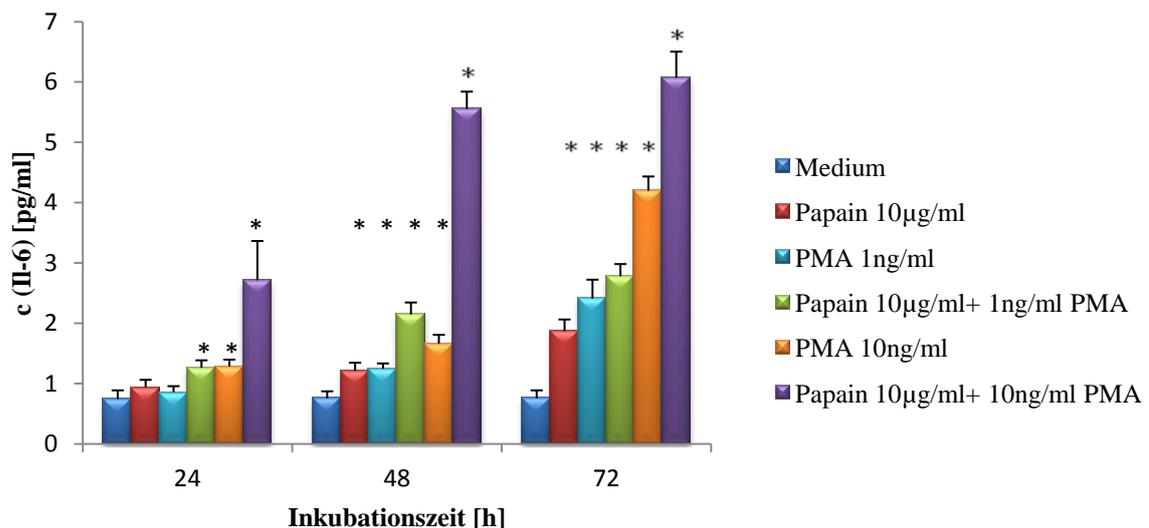


Abb. 38 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit PMA in Kombination mit Papain

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreiem Medium ergänzt mit PMA/Papain bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, $p=0,05$).

IV.4.2.5.8. Versuch mit Trypsin

Die Versuche mit Trypsin wurden mit den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Für Untersuchungen mit Trypsin konnte zwar ein leichter Anstieg der Il-6 Konzentrationen für 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin vermerkt werden. Dieser war aber nicht signifikant gegenüber der Mediumkontrolle.

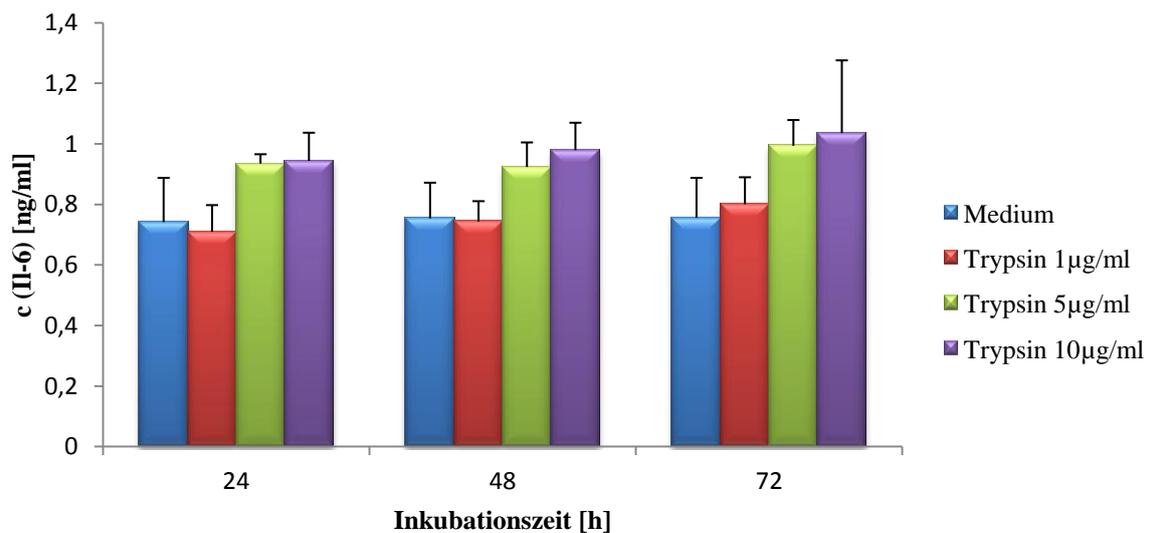


Abb. 39 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Trypsin

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit der jeweiligen Trypsin-Konzentration bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, $p=0,05$).

IV.4.2.5.9. Kombination Trypsin mit PMA

Trypsin 10 µg/ml wurde mit den PMA Konzentrationen 1ng/ml und 10 ng/ml kombiniert. Nach 24 h zeigte die Kombination mit 10 ng/ml PMA eine Steigerung gegenüber den Einzeltestungen von Trypsin um 49% und gegenüber PMA um 17%. Die 72-stündige Inkubation zeigte deutlich Anstiege der festgestellten Il-6 Mengen für die Testung der Kombinationen. Das Ausmaß war aber nur gegenüber der Mediumkontrolle und der Testung mit Trypsin allein signifikant. Die Werte lagen deutlich unter denen, die mit der Einzeltestung der PMA-Konzentrationen erzielt wurden. Nach 48 h konnte für beide Kombinationen ein signifikanter Anstieg verzeichnet werden. Die ermittelten Il-6 Konzentrationen waren nicht signifikant verschieden gegenüber den Einzeltestungen der PMA-Konzentrationen.

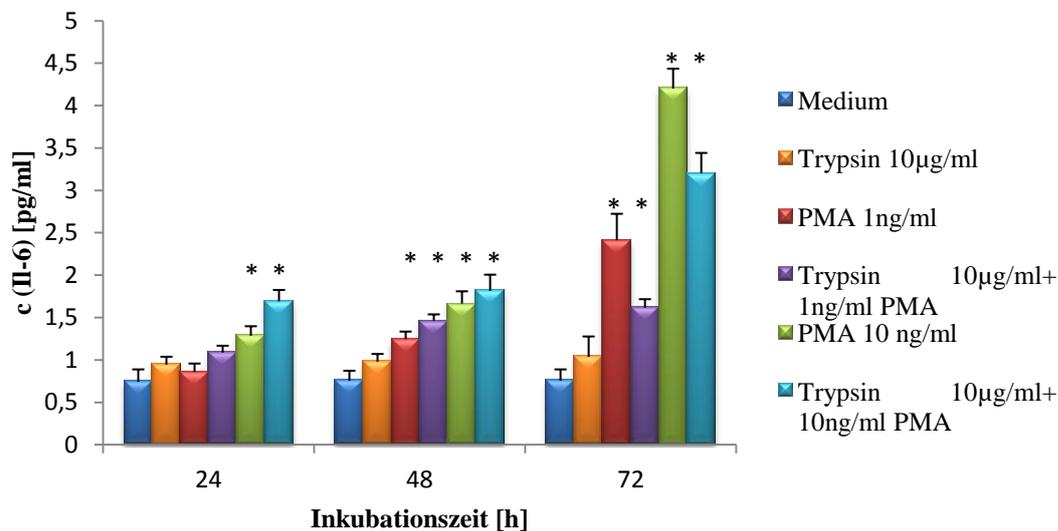


Abb.40 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit PMA in Kombination mit Trypsin

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreiem Medium ergänzt mit PMA/Trypsin, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

IV.4.2.5.10. Il-6 Status nach Behandlung mit Pflanzenlatices

Für die Testung der Pflanzenproben wurden die Latices der jeweiligen Pflanze gesammelt, deren Proteingehalt bestimmt und mit PBS-Puffer auf einen Proteingehalt von 10 µg/ml eingestellt und steril filtriert. Die Proben wurden ebenfalls auf differenzierten U-937 Zellen getestet. Das Ausmaß der Steigerung der Il-6 Sekretion war sehr unterschiedlich, die

Ergebnisse der einzelnen Pflanzen wurden unterteilt in Proben mit moderater (Steigerung um bis zu 400% gegenüber der Mediumkontrolle), mit höherer (Steigerung zwischen 400% bis 1400% gegenüber der Mediumkontrolle) und mit hoher (Steigerung über 1400% gegenüber der Mediumkontrolle) Steigerung der Il-6 Sekretion.

IV.4.2.5.11. Pflanzenproben mit moderater Il-6 Sekretionssteigerung

Die Latices von *Euphorbia balsamifera*, *E. xanti*, *E. pteroneura*, *E. glochidata* und *E. milii var. bevalensis* führten zu einer moderaten Erhöhung der Il-6 Sekretion. Die Untersuchung ergab, dass *Euphorbia balsamifera*, *E. xanti* und *E. pteroneura* die Il-6 Sekretion in den ersten 48 h nicht beeinflussten, erst nach 72 h erhöhten sich die Il-6 Konzentrationen signifikant. Das Ausmaß lag unter dem, das für die Proteasen bzw. PMA oder deren Kombinationen festgestellt wurde. Für die Proben von *Euphorbia glochidata* war über die gesamte Inkubationszeit eine signifikante Erhöhung zu verzeichnen. Für *Euphorbia milii var. bevalensis* konnte nur nach 24 h Inkubation eine Steigerung der Il-6 Sekretion vermerkt werden. Danach sank der Level auf Kontrollniveau ab.

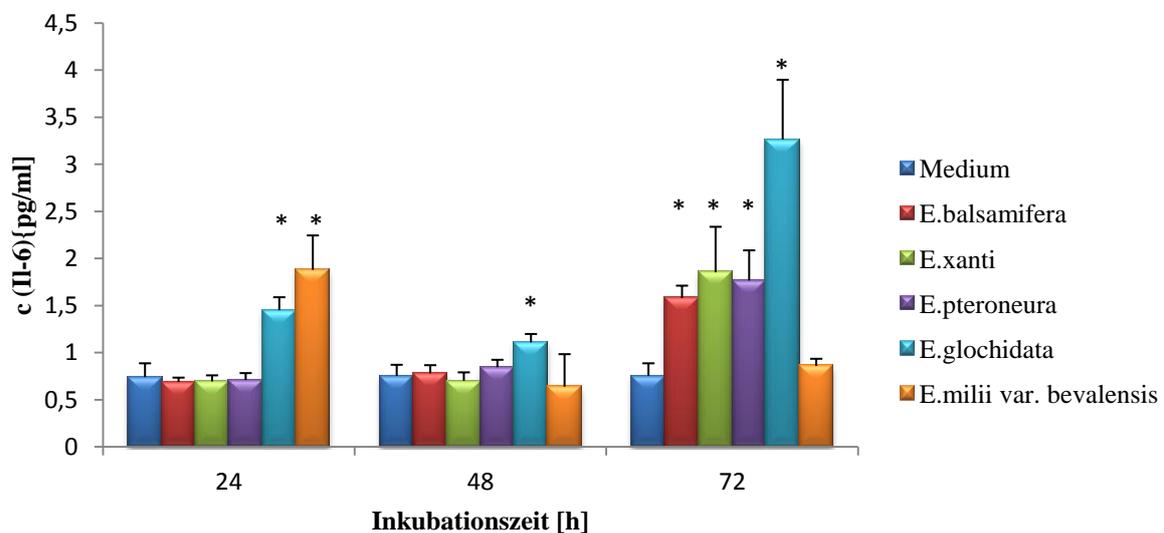


Abb. 41 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Euphorbien-Latices mit moderater Il-6 Sekretionssteigerung

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit Latexproben bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die Il-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

IV.4.2.5.12. Pflanzenproben mit höherer II-6 Sekretionssteigerung

Die Latexprouben mit höheren II-6 Sekretionen zeigten über die gesamte Inkubationsdauer signifikant erhöhte II-6 Konzentrationen. Interessant ist, dass für einige Latices wie von *Euphorbia mauritanica*, *E. giessii*, *E. sudanica* und *E. franckiana* die höchste Konzentration nach 24h Inkubationszeit festzustellen war, danach sank die II-6 Konzentration sowohl nach 48 h also auch nach 72 Stunden. Die Proben von *E. sudanica* zeigten in den ersten 48 h einem konstanten Level der II-6 Sekretion und nach 72 h verdoppelte sich das Ausmaß der II-6 Konzentrationen.

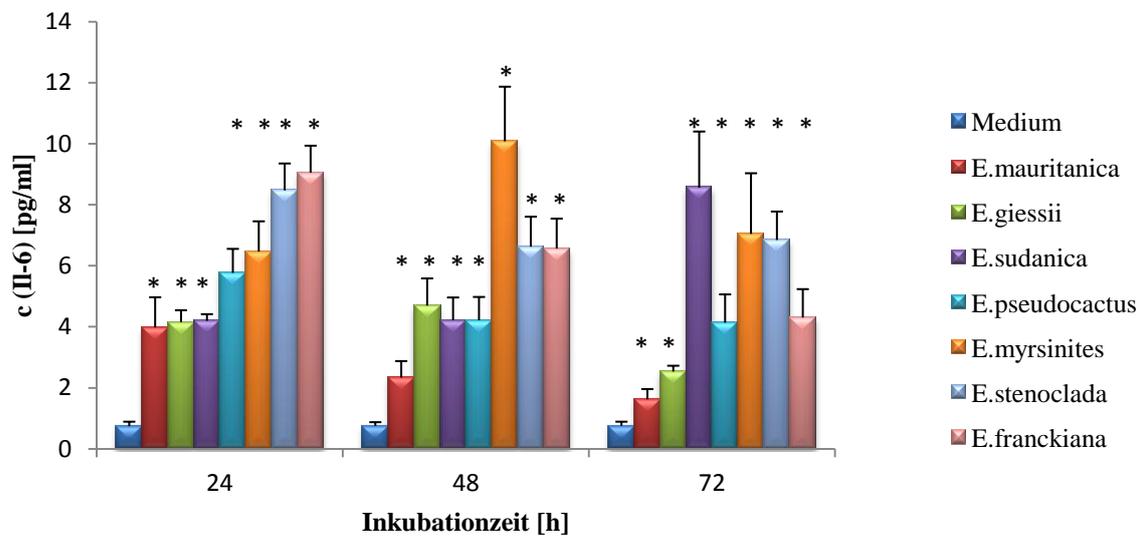


Abb. 42 II-6 Konzentration nach Behandlung mit Euphorbien-Latices mit erhöhter II-6 Sekretionssteigerung

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1h in serumfreiem Medium ergänzt mit Latexprouben bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die II-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

IV.4.2.5.13. Pflanzenproben mit hoher II-6 Sekretionssteigerung

Die Latices von *Euphorbia hamata* und *E. grandicornis* zeigten nach 24 h Inkubationszeit höhere II-6 Konzentrationen als nach 48 h bzw. 72 h, ähnlich wie einige Arten die unter IV.4.2.5.12. besprochen wurden. Für *Synadenium grantii* ebenfalls eine Euphorbiaceae und *Euphorbia milii* var. *milii* waren die höchsten II-6 Konzentrationen der gesamten Versuchsreihe zu ermitteln, dabei lag die Konzentration 60-mal höher als bei der Mediumkontrolle. Für beide Arten war über den gesamten Inkubationszeitraum eine Steigerung der II-6 Sekretion zu beobachten.

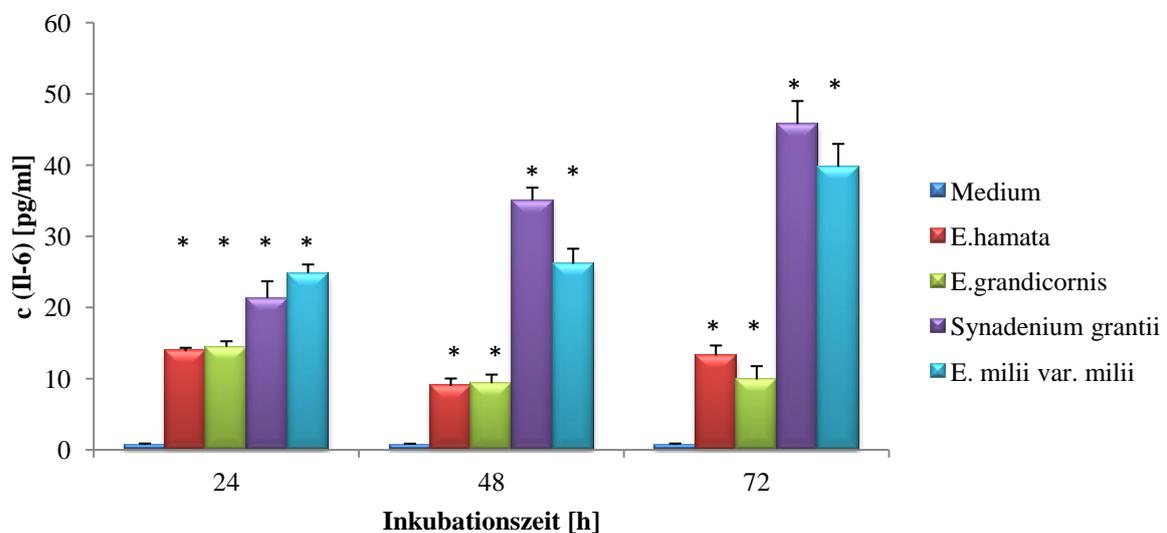


Abb. 43 II-6 Konzentration nach Behandlung mit Euphorbien-Latices mit hoher II-6 Sekretionssteigerung

INF- γ differenzierte U-937 Zellen wurden für 1 h in serumfreien Medium ergänzt mit Latexproben bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, nach 1 h wurde Minimalmedium ergänzt (FBS 1%) und für 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die zellfreien Zellüberstände gepoolt und die II-6 Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit je 3 Parallelen + SD. * Signifikanter Unterschied zur Mediumkontrolle (U-Test, p=0,05).

V. Schlussfolgerungen

V.1. Protease Screening

Proteasen sind ubiquitär, ihr Vorkommen wurde in allen Pflanzenteilen beschrieben, so zum Beispiel in den Samen von *Hordeum vulgare* L. cv. MOREX, *Glycine max* (L.) MERR. und *Oryza sativa* L.; in den Blättern von *Nicotiana tabacum* L., *Phaseolus vulgaris* L. und *Lycopersicon esculentum* L.; in den Speicherwurzeln von *Ipomoea batatas* (L.) Lam.; in Früchten von *Curcubita ficifolia* L. und *Tricosanthes bracteata* (Lam.) Voigt. sowie in den Blättern, Blüten und Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. [5]. Die Funktionen der Proteasen sind dabei mannigfaltig und zum Teil noch nicht verstanden. Sie beeinflussen unter anderem die Microsporogenese in den Antheren [184, 185], den Infektionsprozess von Pflanzenzellen während der Symbiose [186, 187]. Sie sind an der hypersensiblen Antwort nach Infektion mit Pathogen beteiligt, welche ein früher komplexer Prozess ist und zur Nekrose bzw. zum programmierten Zelltod am Ort der Infektion führt, um die Ausbreitung der Pathogen zu verhindern [188, 189]. Weiterhin beeinflussen sie die Differenzierung, den Alterungsprozesse [190], die Proteindegradierung und Mobilisierung von Speicherproteinen [191]. Papain aus dem Latex von *Carica papaya* und die Proteasen aus *Ficus variegata* wurden als direkte Defence-proteasen beschrieben und schützten somit die Pflanze. Der genaue Mechanismus für die Toxizität der Abwehrproteasen ist nicht bekannt [43]. Konno (2011) schrieb darüber:“ Insects attempting to eat plant leafes were instead digested by the plant!“ Es zeigte sich, dass Abwehrproteine eine Unverdaubarkeit bzw. eine Hyperstabilität gegenüber den Verdauungsenzymen von Frassfeinden haben und somit den Organismus schädigen können, von dem sie aufgenommen wurden [9]. Für die Mehrzahl der bisher in Latices gefundenen Proteasen ist allerdings noch keine Funktion beschrieben und bleibt somit ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis von Proteaseaktivität in Milchsäfte durch geführt werden. Um auszuschließen, dass nicht auch Zell- oder Phloemsäfte mitgeführt wurden, wurde exemplarisch für *Scorzonera hispanica*, *Scorzonera cana* und *Scorzonera villosa* neben den Latexproben auch Frischpflanzenextrakt getestet. Es zeigte sich, dass nur die Frischpflanzenextrakte Proteaseaktivität zeigten und die Latexproben ohne Aktivität waren. Dieser Versuch zeigt, dass in jeder Pflanze eventuell abhängig vom Entwicklungs- und untersuchtem Kompartiment, Proteaseaktivität zu finden wäre und es gelang, nur den Milchsaft zu untersuchen.

Die dargestellten Ergebnisse stellen zum Teil eine Momentaufnahme der Proteaseaktivität im Latex der jeweiligen Pflanze zum Zeitpunkt der Testung dar. Dem zufolge müsste die Testung für nicht aktiv getestete Pflanzen zu anderen Zeitpunkten wiederholt werden, so dass eine objektive Betrachtung zum Beispiel über eine Vegetationsperiode bzw. in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums abschließende Ergebnisse bringen würde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur ausgewählte Pflanzen zu mehreren Zeitpunkten getestet. Dabei handelte es sich vor allem um Arten der Gattung *Euphorbia*. Diese zeigten über den gesamten Testungszeitraum proteolytische Aktivität. In der Familie der Campanulaceae zeigte sich bei *Lobelia polyphylla* und *L. salicina*, dass während der Blütezeit keine Aktivität zu ermitteln war. Ein ähnliches Phänomen zeigten auch die Asteraceae *Sonchus congestus* und *S. hierrensis* var. *benehoavensis* und *Warionia saharae*. Bei diesen Arten scheint die festgestellte proteolytische Aktivität nur außerhalb der Blütezeit zu liegen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Proteasen im Latex von Euphorbien konstitutiv sezerniert werden und als Defenceproteasen in Kombination mit den Diterpenderivaten als Abwehrmechanismus gegen Pathogen und Fressfeinde dienen. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität in den beschriebenen Asterales abhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanze und wird offenbar über die Milchröhren zum Ort des Geschehens transportiert. Betrachtet man auch die Stärke der proteolytischen Aktivität, fällt auf, dass die Euphorbienmilchsäfte numerisch betrachtet, sehr viel höhere Fluoreszenzwerte während der Messung ergaben als die der Asterales. Zum Teil lagen die Werte um den Faktor 10-30 höher.

Betrachtet man die Proteaseaktivität der Familien insgesamt, zeigten nur die Vertreter der Papaveraceae bei keiner der betrachteten Arten proteolytische Aktivität. Für eine allgemeine Aussage über die Proteaseaktivität in Papaveraceae war allerdings die Anzahl der untersuchten Arten und Gattungen zu gering. Dem gegenüber stand die Familie der Campanulaceae. Dort waren alle Arten bis auf *Lobelia excelsa* in der Lage, das Substrat umzusetzen. Auf der Ebene der Gattungen konnte für alle getesteten Arten der folgenden Gattungen proteolytische Aktivität festgestellt werden: *Dieffenbachia*, *Asclepias*, *Hoya*, *Carica*, *Maclura*, *Crepis*, *Hieracium*, *Leontodon*, *Pilosella*, *Tragopogon*, *Campanula*, *Musschia* und *Euphorbia*.

Bei der mit über 120 Arten getesteten Gattung *Euphorbia* lässt sich vermuten, dass proteolytische Aktivität im Latex von Euphorbien als chemotaxonomisches Merkmal aufgefasst werden könnte. Durch die Größe dieser Gattung wurden allerdings ca. 6% der Arten getestet.

V.2. Residualwertbestimmung nach Behandlung mit spezifischen Inhibitoren

Für die Untersuchungen der Gattung *Euphorbia* wurden die Latices mit spezifischen Inhibitoren behandelt und die verbleibende Aktivität ermittelt. Benutzt wurden AEBSF als Serin-, E-64 als Cystein-, Pepstatin A als Aspartat- und EDTA als Metalloproteaseinhibitor. Zu Beginn der Arbeit wurden alle bis dato isolierten Proteasen aus Euphorbien als Serinproteasen beschrieben [19]. Die Annahme, dass die gefundenen Aktivitäten während des Screening auf alleinige Serinproteaseaktivität zurück zu führen ist, konnte in den Untersuchungen nicht bestätigt werden. Auffällig war jedoch, dass alle untersuchten Euphorbienlatices durch den spezifischen Serinprotease Inhibitor AEBSF signifikant gehemmt worden. Das Ausmaß der Hemmung war individuell und reichte von zum Beispiel 1% Restaktivität bei *Euphorbia leucodendron* bis hin zu 80% bei *E. antisyphilitica*. Man kann somit davon ausgehen, dass ein Teil der Proteaseaktivität durch Serinproteasen bedingt ist. Nur bei wenigen Arten war AEBSF der einzige Inhibitor, der die Aktivität hemmend beeinflusste. Bei vielen Arten wurde die Proteaseaktivität durch mehr als einen Inhibitor beeinflusst. Es gab auch Arten, die durch alle 4 Inhibitoren signifikant beeinflusst wurden. Dabei führte der Einsatz der Inhibitoren nicht nur zu einer Inhibition der Proteaseaktivität, sondern vor allem bei EDTA zu einer, zum Teil deutlichen Erhöhung um mehr als 200% gegenüber der Probe ohne Zusatz. Es wird vermutet, dass zweiwertige Ionen durch EDTA komplexiert werden, die sonst eine hemmende Wirkung auf die Aktivität haben. Auch Arten bei denen bisher nur Serinproteasen isoliert wurden, wie aus *Euphorbia tirucalli* oder *Euphorbia milii* wurden durch andere als Serinprotease-Inhibitoren in ihrer Aktivität beeinflusst. So führte die Behandlung der Latexproben von *Euphorbia milii* mit AEBSF zu einer Restaktivität von 2% und der Zusatz von Pepstatin A zu einer Reduktion der Aktivität um 50%. Die Hemmung der Aktivität durch AEBSF scheint auch Einfluss auf die vermeintlich saure Protease zu haben, da der Einsatz zu einer kompletten Hemmung führt bzw. der Zusatz von Pepstatin A die Aktivität der Serinprotease unspezifisch beeinflusst. Eine allgemeine Aussage ist aufgrund der Komplexität der Zusammensetzung der Milchsäfte und die Vielzahl von Wechselwirkungen für die Gattung nicht möglich. Für eine genaue Zuordnung der Aktivitäten müsste der Latex jeder Art gereinigt, die jeweiligen Proteasen isoliert und deren inhibitorisches Profil bestimmt werden.

V. 3. Reinigung und Charakterisierung einer Proteasefraktion aus *Euphorbia mauritanica*

Die aus Südafrika stammende *Euphorbia mauritanica* wurde für die Reinigung und Charakterisierung gewählt, da die Proben in Voruntersuchungen durch sehr hohe Aktivitäten auffielen. Außerdem wurde die Aktivität nur durch den für Serinproteasen spezifischen Inhibitor AEBSF gehemmt, so dass man davon ausgehen konnte, dass es sich dabei um Serinprotease Aktivität handelt. Die gewinnbare Menge und die ständige Verfügbarkeit durch den Standort im Gewächshaus, waren darüber hinaus weitere Vorteile dieser Art.

Die Reinigung startete mit der Beseitigung des Kautschukanteils und sämtlicher Schwebstoffe, so dass mit einer klaren Probe weiter gearbeitet werden konnte. Dabei erwies sich das Einfrieren des Rohlatex bei -20°C als effektiv. So konnte der Kautschukanteil nach darauffolgendem Auftauen und Zentrifugieren, als eine Masse entfernt werden. Die anschließende Ionenaustauschchromatographie wurde an einer DEAE-AcroSepTM Ceramic HyperD F Säule durchgeführt. Der schwache Anionenaustauscher DEAE zeigte die beste Proteinbindung bei den gewählten Bedingungen. Der schwache Kationenaustauscher CM zeigte hingegen keine Proteinbindung. Das Säulenmaterial war für die Aufreinigung optimal. Durch die feste Matrix konnte eine konstante Elutionsgeschwindigkeit erreicht werden, auch wenn manuell mit einer Spritze eluiert wurde. Die Elution erfolgte mit steigendem NaCl-Gradienten. Dafür wurde die Säule so lange mit Puffer gespült, bis keine Proteine mehr zu detektieren waren. Die Elution führte im Ergebnis zu 3 Peaks mit jeweiligen Maxima in der Aktivität und im Proteingehalt (siehe Abb. 13). Peak 2 wurde dann aufgrund seiner hohen Aktivität und seines Proteingehaltes weiter aufgereinigt. Dass der Latex von *Euphorbia mauritanica* wahrscheinlich mehr als eine Protease enthält, lässt sich auch aus dem Urlatex angefertigte Zymogramm vermuten. Dort waren mehrere Bereiche mit caseinolytischer Aktivität zu erkennen. Das Auftreten mehrerer Serinproteasen im Latex von Euphorbien ist bekannt und konnte auch schon für die Latices von zum Beispiel *Euphorbia cyparissias*, *E. tirucalli*, *E. lactea* und *Synadenium grantii* gezeigt werden (Tab. 2). Die anschließende Größenausschlusschromatographie zeigte drei Peaks, wobei die SDS-Page zeigte, dass der erste Peak mehrere Banden aufwies. Peak 2 zeigte nur eine Bande im Elektropherogramm. Peak 3 war ohne Aktivität. Die so erhaltene Proteasefraktion 2 wurde dann charakterisiert. Das Reinigungsprozedere entsprach dem anderer Serinproteasen, die aus Euphorbien isoliert wurden [16, 28]. Verwendete Säulenmaterialien und die Optimierung von Laufbedingungen erfolgten empirisch.

Die bei der Größenausschlusschromatographie erhaltene Fraktion (Peak 2) wurde auf ihre Eigenschaften und ihre Stabilität hin untersucht. Die individuellen Parameter sind vergleichbar mit denen anderer Serinproteasen, die in Euphorbienlatices gefunden wurden (siehe Tab. 2). Die Stabilität hinsichtlich des Umgebungs-pH-Wertes ist bemerkenswert, so konnte die unbekannte Protease das Substrat in einem Bereich von pH 4,5 bis 12 umsetzen. Das Verhalten gegenüber sauren und die Stabilität gegenüber basischen Einflüssen ist ein gemeinsames Merkmal der bisher gereinigten Euphorbienproteasen, z. B. Milin aus *Euphorbia milii* weist ebenfalls einen Aktivitätsbereich von pH 5,5 bis 12,0 auf. Mit einem pH-Optimum um pH 7 (pH 6,5-7,5) zeigt die unbekannte Protease ebenfalls eine gemeinsame Eigenschaft mit den Proteasen anderer Euphorbien (*Euphorbia pseudochamaesyce*, *E. lathyris*, *E. pulcherrima*, *E. lactea*). Das festgestellte Temperatur-Optimum von 55-65°C und die Stabilität gegenüber thermischer Belastung bis zu einer Temperatur von 80°C zeigen wiederum Gemeinsamkeiten mit den isolierten Proteasen. Weiterhin zeigte sich die unbekannte Protease stabil gegenüber der kurzzeitigen Behandlung mit organischen Solventien. In Bezug auf die Untersuchungen zur Substratspezifität zeigte die unbekannte Protease eine gewisse Präferenz, hinter den Aminosäuren Leucin, Lysin und Alanin zu schneiden, aber auch hinter unpolaren Aminosäuren wie Methionin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin, Prolin und Glycin. Es zeigt sich somit eine Unspezifität, die abhängig vom Substrat ist. Beim Vergleich mit Trypsin und dem Verdau von Myoglobin erkennt man mit dem Schnitt hinter Lysin das Spaltpattern von Trypsin. Die Argin Schnittstelle des Trypsins ist allerdings nicht vorhanden. Das bestätigte auch die Testung von synthetischen Peptidsubstraten.

Die gereinigte Protease zeigt eine hohe Stabilität gegenüber thermischen Belastungen, einen breiten Aktivitätsbereich hinsichtlich des Umgebungs-pH-Wertes und eine Stabilität gegenüber organischen Solventien, sowie eine gewisse Präferenz für Spaltungsstellen. Diese Eigenschaften könnte man nutzen, wo Substrate umgesetzt werden müssen, die reich an den Aminosäuren sind, die den Spaltpräferenzen entsprechen. So wäre vorstellbar, da beim Abbau von β -Casein durch Chymosin während der Käseherstellung bevorzugt hinter Leucin (Leu 192-Tyr 193, Leu 165-Ser 166, Leu 163-Ser 164, Leu 139-Leu 140, Leu 127-Thr 128), Alanin (Ala 189-Phe 190) und Glutamin (Gln 167-Ser 168) gespalten wird [192], dass die gereinigte Protease ebenfalls hinter 6 der 7 Spaltstellen schneiden würde. Man hätte somit eine pflanzliche Alternative zum gentechnisch hergestellten Chymosin bzw. zum natürlichen Lab. Ob das Casein aber so abgebaut wird, das auch Käse daraus entstehen könnte, ist fraglich, da die unbekannte Protease wahrscheinlich zu unspezifisch ist. Ein anderes mögliches Substrat,

das zum Beispiel lysinreich ist, wäre Fibrin bzw. Fibrinogen. Serineproteasen spielen in der Hämostase eine entscheidende Rolle und haben sowohl koagulatorische als auch antikoagulatorische Eigenschaften. Dahin gehend wurden auch schon proteasehaltige Fraktionen aus den Milchsäften von *Calotropis gigantea* R. BR. (Asclepiadaceae), *Synadenium grantii* HOOK. f. (Euphorbiaceae), *Wirghtia tinctoria* R. BR. (Apocynaceae) und *Asclepias curassavica* L. (Asclepiadaceae) untersucht und zeigten dabei koagulierende Eigenschaften in humanem Blut, fibrinogenolytische Aktivität, Thrombin ähnliche Aktivität und fibrinolytische Aktivität [92, 193, 194]. Der Einfluss in der Hämostase könnte auch den traditionellen Einsatz von diversen Pflanzenlatices bei blutenden Wunden aber auch den Einsatz zur Wundheilung erklären.

Der Einsatz als Waschmittelzusatz zum unspezifischen Proteinabbau ist aufgrund der Stabilität und der Eigenschaften möglich.

V.4. Modulation der Interleukin-6 Sekretion in monozytären Zellen durch Proteasen, PMA und deren Kombination

Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten sind primär Il-6 produzierende Zellen. Das multifunktionale Zytokin ist pleiotropisch und spielt eine wichtige Rolle in diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Il-6 reguliert die Expression von immunologischen und inflammatorischen Genen. Es beeinflusst die Hämatopoese, die Antikörperproduktion in B-Zellen, die T-Zell Aktivierung, die Differenzierung von Plasmazellen, das Hepatozytenwachstum und triggert die Sekretion von Akut-Phase-Proteinen [195]. Differenzierte monozytäre U-937 Zellen sekretieren Il-6 nach Stimulation mit Thrombin [181], einer Serinprotease, die ebenfalls eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen und in der Blutgerinnungskaskade spielt. Entzündung und Koagulation gehen dabei Hand in Hand und werden von diversen Faktoren beeinflusst, wie z. B. Thrombin. Die Signaltransduktion erfolgt dabei unter anderem durch Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PAR). Von den 4 PAR-Rezeptoren ist PAR-1 in differenzierten U-937 Zellen nachgewiesen worden [181]. Die Ergebnisse von Naldini et al. (1998) konnten bestätigt werden, so wurden signifikante Interleukin-6 Konzentrationen in differenzierten aber nicht in undifferenzierten U-937 Zellen nach Stimulation mit Thrombin gemessen. Die Differenzierung der Zellen geht mit einer gesteigerten PAR-1 Expression einher. Thrombin zeigte eine konzentrationsabhängige Steigerung der sekretierten Il-6 Mengen nach einer Inkubation von 72 h. Die in Euphorbien enthaltenen Diterpenderivate führen ebenfalls zu einer Ausschüttung von

Zytokinen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PMA ebenfalls konzentrationsabhängig die Il-6 Sekretion beeinflusst. Auch hier waren die Effekte nach 72 h Inkubationszeit am stärksten. Die Steigerung der Il-6 Konzentrationen war bei PMA (10 ng/ml) mit 550% deutlich höher als nach Stimulation mit Thrombin (10 µg/ml) mit 250%, gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Kombination beider Stimuli führte in den Konzentrationen von PMA (10 ng/ml)/ Thrombin (1, 5, 10 µg/ml) zu enormer Steigerung der Il-6 Konzentrationen gegenüber der Stimulation mit den Einzelkomponenten. So konnte nach 24 h eine Verdrei- bis Vervielfachung der Il-6 Mengen verzeichnet werden, in Vergleich zu nach alleiniger PMA Stimulation. Auch die weitere Inkubation zeigte ähnliche Steigerungen. Somit konnte gezeigt werden, dass es bei Kombination beider Stimuli zu einer synergistischen Steigerung der sekretierten Il-6 Mengen kommt. Die beobachteten Effekte sind mehr als additiv. Das lässt schlussfolgern, dass neben dem Angriff von Thrombin am PAR-1 Rezeptor und PMA an der Proteinkinase C noch andere Mechanismen an der Il-6 Sekretion beteiligt sein müssen. Bei den Versuchen mit Trypsin einzeln oder auch in Kombination mit PMA konnten diese ausgeprägten Effekte nicht gezeigt werden. Trypsin als Serinprotease hat zwar ebenfalls eine aktivierende Wirkung an Proteinase-aktivierten Rezeptoren, allerdings mit der höchsten Affinität zu den PAR-2 Rezeptoren. Trypsin aktiviert mit geringerer Affinität auch PAR-1 und PAR-3 [196]. Die Affinität scheint aber so schwach zu sein, dass es nur zu einer geringen Steigerung der Il-6 Konzentrationen und nur in Kombination mit PMA kam. Die Cysteinprotease aus *Carica papaya* wurde ebenfalls im Zellsystem allein und in Kombination mit PMA getestet. Interessanterweise konnte Papain in den getesteten Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Il-6 Konzentrationen bewirken. Das Ausmaß verstärkte sich dann auch in der Kombination mit PMA deutlich, so dass auch signifikante Änderungen gegenüber der Einzeltestung gezeigt werden konnten. Die Il-6 Konzentrationen lagen aber unter der von Thrombin in Kombination mit PMA. Das die Stimulation mit Papain ebenfalls zu einer deutlichen Sekretionssteigerung führte, hingegen die Stimulation mit Trypsin kaum, könnte vermuten lassen, dass die Aktivierung des PAR-1 Rezeptors keine entscheidende Rolle spielt oder die Affinitäten der einzelnen Proteasen zum Rezeptor sehr unterschiedlich sind. Wenn PAR-1 eine Rolle spielt, sind auch Cysteinproteasen wie Papain in der Lage, diesen zu aktivieren. Zur Klärung des Mechanismus der Steigerung der Il-6 Sekretion gerade in Bezug auf die Kombination sind weitere Untersuchungen notwendig.

V.4.1. Il-6 Konzentration nach Latexbehandlung ausgewählter Euphorbien

Nach Kontakt mit dem Milchsaft vieler Euphorbien, kommt es mitunter zu starken Entzündungsreaktionen mit Rötungen, Blasenbildung und Juckreiz einhergehen. Il-6 ist ein bei Entzündungsprozessen ausgeschüttetes Zytokin, das viele proinflammatorische Reaktionen hervorruft. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, sind sowohl Diterpenderivate als auch Proteasen in der Lage, die Sekretion von Il-6 zu steigern. In vielen Euphorbienmilchsäften ist diese Kombination natürlicher Weise vorhanden. Die Testung von Pflanzenmilchsäften in differenzierten U-937 Zellen führte zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Il-6 Konzentrationen. Bei den Euphorbien die zu einer moderater Interleukin-6 Sekretion führten, zeigte *E. balsamifera* erst nach 72 h eine signifikante Steigerung gegenüber der Kontrolle. *E. balsamifera* gehörte im Proteasescreening zu den schwach aktiven Pflanzen. Diterpenester sind im Latex dieser Art auch nicht gefunden worden [145]. Die schwache Proteaseaktivität und die fehlenden Diterpene sind vermutlich für die geringe Steigerung der Sekretion verantwortlich. *E. glochidata* zeigte hohe Aktivität im Proteasescreening und zeigte über die gesamte Inkubationszeit eine signifikante Steigerung der Il-6 Sekretion. Diese Art wurde bisher noch nicht auf Diterpenderivate hin untersucht. Ob die hohe proteolytische Aktivität für die Steigerung verantwortlich ist, bleibt noch ungeklärt. Eine Vorhersage aus der Zusammensetzung der Milchsäfte, dass hohe Aktivität gepaart mit Diterpenderivaten zu hohen Il-6 Konzentrationen führen, niedrige proteolytische Aktivität mit Diterpenen zu geringeren und ohne Diterpene zu noch geringeren, konnte nicht getroffen werden. Die Sekretion war individuell verschieden. So zeigte *E. hamata* in der keine Diterpenderivate aber eine hohe Aktivität gefunden wurden, eine relativ hohe Il-6 Konzentration. Im Milchsaft von *Euphorbia milii* var. *milii* wurden Diterpenester nachgewiesen, die Aktivität dagegen war moderat, die induzierte Freisetzung von Il-6 aber eine der Höchsten, die getestet wurde. Eine allgemeine Aussage ist aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Milchsäfte nur bedingt möglich. Weitere Untersuchungen dazu sind notwendig. Ein Mechanismus der Entzündungsauslösung durch Euphorbienmilchsäfte kann aber in den Il-6 Induktionen gesehen werden.

VI. Zusammenfassung

Proteasen spielen sowohl in physiologischen, pathophysiologischen aber auch in industriellen Prozessen eine entscheidende Rolle, so dass die Suche nach neuen Proteasen mit unterschiedlichen Spezifitäten von Bedeutung ist. 311 Pflanzen aus 91 Gattungen aus 11 verschiedenen Familien wurden auf das Vorhandensein proteolytischer Aktivität im Latex untersucht. 75% der untersuchten Pflanzen wurden positiv getestet. Hinsichtlich der Stärke der Aktivität zeichneten sich vor allem die Familien der Euphorbiaceae, Caricaceae und Moraceae durch aus. Die Familie der Asteraceae hingegen fiel durch relativ geringe proteolytische Stärke auf. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass in der Gattung *Euphorbia* die proteolytische Aktivität konstitutiv ist und über das gesamte Jahr nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu zeigten einige Asteraceae und Campanulaceae, dass die gemessene Aktivität vom Entwicklungszustand der Pflanze abhängig ist. Die Untersuchungen deuten auf unterschiedliche Funktionen der Latexproteasen hin. In Euphorbien stellen sie Abwehrproteine dar und sind in Verbindung mit Diterpenderivaten am „Defence-System“ der Pflanze beteiligt. In den beschriebenen Asteraceae und Campanulaceae spielen sie anscheinend in Entwicklungsprozessen eine Rolle.

Das anschließende Screening der Gattung *Euphorbia* zur Ermittlung des Proteasetyps zeigte, dass Serinproteaseaktivität in allen getesteten Arten feststellbar ist. Dabei reichte die Restaktivität nach Behandlung mit AEBSF von 1-80%. Auch andere Inhibitoren hatten einen Einfluss auch die proteolytische Aktivität. Die Annahme, dass die proteolytische Aktivität in der Gattung *Euphorbia* ausschließlich auf Serinproteasen beruht, bestätigte sich nicht. Vielmehr hatten in einigen Arten alle getesteten Inhibitoren einen Einfluss auf die Aktivität. Auch Latices, aus denen bisher Serinproteasen isoliert wurden, scheinen Proteasen anderer Typen zu enthalten.

Aus dem Latex von *Euphorbia mauritanica* L. konnte nach Kautschukabtrennung und anschließender DEAE-Ionenaustauschchromatographie und Größenausschlusschromatographie eine Proteasefraktion isoliert werden. Die bisher unbekannte Protease Mauritanicin hat eine molekulare Masse von ca. 95 kDa, ein Temperaturoptimum von 55-65°C und ein pH-Optimum von pH 6,5-7,5. Sie zeigt Aktivität über einen pH-Bereich von pH 4,5-12 und ist bis 80°C stabil. Die Protease hat eine gewisse Präferenz, hinter den Aminosäuren Leucin, Lysin und Alanin zu schneiden, aber auch hinter unpolaren Aminosäuren wie Methionin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin, Prolin und Glycin. Die Testung mit spezifischen Inhibitoren zeigte, dass es sich um Serinproteaseaktivität handelt.

Der Kontakt mit Euphorbienlatices führt zum Teil zu starken Entzündungsreaktionen. Für diese Reaktion werden vor allem Diterpenester verantwortlich gemacht. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass Proteasen zu einer vermehrten Sekretion von Il-6 führen. So konnten die Serinprotease Thrombin, die Cysteinprotease Papain und der Diterpenester PMA die Sekretion von Il-6 konzentrationsabhängig und zeitabhängig beeinflussen. Bei der Kombination von PMA mit der jeweiligen Protease konnte eine starke Erhöhung der Il-6 Konzentrationen beobachtet werden. Ein natürliches Vorkommen von Proteasen und Diterpenestern bieten die Milchsäfte der Gattung Euphorbia. Die Testung von Pflanzenlatices im Zellsystem führte zur Il-6 Sekretion, die von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich stimuliert wurde. Eine synergistische Sekretion durch Diterpenester und Proteasen scheint durch den Latex einiger Arten ausgelöst zu werden.

VII. Summary

Proteolytic enzymes have important functions in physiological and pathophysiological processes, and are frequently used in industrial processes. The search for new proteases with different specificities is always on. In the present work 311 plants from 91 genera from 11 plant families were examined for the presence of proteolytic activity in the latex. 75% of the studied plants were tested positive for the presence of proteolytic activity. Regarding the strength of the activity the families of Euphorbiaceae, Moraceae, and Caricaceae showed the highest fluorescence values. The families of Asteraceae in contrast, had relatively low proteolytic activity. Furthermore, it was found that in the genus *Euphorbia*, the proteolytic activity is constitutive, and could be found throughout the year. In contrast, some Asteraceae and Campanulaceae showed that the observed activity is dependent on the developmental state of the plant. The investigations showed the different functions of latex proteases. In *Euphorbia*, they represent defence proteins and are associated with Diterpene derivatives in the defence system of the plant. In Asteraceae and Campanulaceae they appear to play a role in development processes. The subsequent screening of the genus *Euphorbia* for determining the type of protease showed that serine protease activity was detected in all tested species. The residual activity after treatment with AEBSF ranged from 1-80%. Other inhibitors had also an influence on the proteolytic activity. The assumption that the proteolytic activity in the genus *Euphorbia* is based exclusively on serine proteases was not confirmed. In some species all tested inhibitors had an effect on the activity. Latex serine proteases have been isolated from also indicate the presence of other protease types.

From the latex of *Euphorbia mauritanica* L. a protease fraction was isolated after the removal of gum and subsequent DEAE- ion exchange and size exclusion chromatography. The unknown protease Mauritanicain has a molecular mass of approximately 95 kDa, an optimum temperature of 55-65°C and a pH optimum of pH 6.5-7.5. It shows activity over a pH range from pH 4.5 to 12 and is stable up to 80°C. The protease has a preference to cut behind the amino acids leucine, lysine and alanine, but also behind non polar amino acids like methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, proline and glycine. The testing with specific inhibitors showed serine protease activity.

The contact with latices of genus *Euphorbia* sometimes leads to severe inflammatory reactions. For this reaction primarily diterpene esters are responsible. It could also be shown that proteases lead to an increased secretion of the proinflammatory cytokine Il-6 in acute inflammation in differentiated U-937 cells. The serine protease thrombin, the cysteine

protease papain and the diterpene ester PMA affect the secretion of II-6 in a concentration and time dependent manner. With the combination of PMA with the respective protease a strong increase in II-6 concentrations was observed. Proteases and diterpene esters naturally occur in the latices of the genus *Euphorbia*. The testing of *Euphorbia*-latices resulted in individual levels of II-6 secretion in the cell system. A synergistic secretion by diterpene esters and proteases is probable to be induced by the latex of some species.

VIII. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Mechanismus der Katalyse durch Serinproteasen
- Abb. 2 Blasenbildung im Bereich des Kinns nach Kontakt mit *Euphorbia helioscopia* L.
- Abb. 3 Reaktion der Proteinbestimmung mit BCA
- Abb. 4 Prinzip der Umsetzung des Substrats des Enzchek Protease Assay Kit green
Fluorescence (Invitrogen)
- Abb. 5 Versuchsprinzip in-Gel-Verdau mit anschließender Maldi-MS
- Abb. 7 Massenspektrum des Peptidstandards
- Abb. 8 Reduktion des XTT zum Formazan
- Abb. 9 Trypsin in Konzentrationen von 0,1 µg/ml- 10 mg/ml nach 2h Inkubation
- Abb. 10 *Euphorbia mauritanica* L.
- Abb.11 Milchsaft von *Euphorbia mauritanica* L., a) Wasserpräparat b) Wasser/Jod-
Kaliumjodidlösung
- Abb. 12 Milchsafttröhren oberhalb des Leitbündelringes, Stängelquerschnitt
- Abb. 13 Proteingehalt und Aktivität nach Kationenaustausch
- Abb. 14 SDS-PAGE nach Ionenaustauschchromatographie
- Abb. 15 Chromatogramm der Größenausschlußchromatographie
- Abb. 16 a. SDS-Page Färbung mit Coomassie
- Abb. 16 b. SDS-Page Silberfärbung
- Abb. 17 Kalibriergerade für die Molekulargewichtsbestimmung
- Abb. 18 Zymogramm von *E. mauritanica*
- Abb. 19 Aktivitätsverlauf in Abhängigkeit vom pH-Wert
- Abb. 20 Verhalten der Aktivität gegenüber Temperaturänderungen
- Abb. 21 Lagerungsstabilität der unbekannt Protease
- Abb. 22 Identifikation der Spezifität der unbekannt Protease durch Verdau von Myoglobin
- Abb. 23 Identifikation der Spezifität der unbekannt Protease durch Verdau von
β-Lactoglobulin
- Abb. 24 Identifikation der Spezifität der unbekannt Protease durch Verdau von Lysozym
- Abb. 25 Vergleich der Spaltpmuster von Trypsin (rot) und der unbekannt Protease (blau)
- Abb. 26 Vergleich der Spaltpmuster von Trypsin (rot) und der unbekannt Protease (blau) im
Bereich m/z 1600- 1635
- Abb. 27 Inhibitorprofil
- Abb. 28 undifferenzierte U-937 Zellen
- Abb. 29 differenzierte U-937 Zellen nach 4 Tagen

Abb. 30 Kalibriergerade Il-6 ELISA

Abb. 31 Il-6 Konzentration: undifferenzierten U-937 Zellen,

Abb. 32 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Thrombin

Abb. 33 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit PMA

Abb. 34 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit 0,1 ng/ml PMA in Kombination mit
Thrombin

Abb. 35 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit 1 ng/ml PMA in Kombination mit
Thrombin

Abb. 36 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit 10 ng/ml PMA in Kombination mit
Thrombin

Abb. 37 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Papain

Abb. 38 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit 10 ng/ml PMA in Kombination mit Papain

Abb. 39 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Trypsin

Abb. 40 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit 10 ng/ml PMA in Kombination mit Trypsin

Abb. 41 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Euphorbien Latices mit moderater Il-6
Sekretionssteigerung

Abb. 42 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Euphorbien Latices mit erhöhter Il-6
Sekretionssteigerung

Abb. 43 Il-6 Konzentration nach Behandlung mit Euphorbien Latices mit hoher Il-6
Sekretionssteigerung

IX. Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Übersicht über Milchsaft führende Pflanzenfamilien
- Tab. 2 Serin Proteasen und deren biochemische Eigenschaften
- Tab. 3 Cystein-Proteasen und deren biochemische Eigenschaften
- Tab. 4 Aspartat-Protease und deren biochemische Eigenschaft
- Tab. 5 Metallo Protease und deren biochemischen Eigenschaften
- Tab. 6 Übersicht über proteasehaltige Latices ohne Zuordnung
- Tab. 7 Arbeitsschema für das Universelle Protease Substrat Roche®
- Tab. 8 Überblick zu Protease-Inhibitoren
- Tab. 9 Arbeitsschema zur Bestimmung der Residualaktivität
- Tab. 10 Übersicht zu Peptidsubstraten
- Tab. 11 Zusammensetzung des Peptidstandards
- Tab. 12 Arbeitschema SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung
- Tab. 13 Arbeitsschema zur Silberfärbung
- Tab. 14 Arbeitsschema zur Zymogrammentwicklung
- Tab. 15 Arbeitsschema zur Glykoproteinfärbung
- Tab. 16 Übersicht angewendeter Ionenaustauscher
- Tab. 17 Übersicht der verwendeten Puffer
- Tab. 18 Arbeitschema zum IL-6 ELISA
- Tab. 19 Übersicht über die untersuchten Familien mit Anzahl der untersuchten Gattungen und Arten
- Tab. 20 Übersicht Araceae
- Tab. 21 Übersicht Apocynaceae
- Tab. 22 Übersicht Asclepiadaceae
- Tab. 23 Übersicht Caricaceae, Clusiaceae und Convolvulaceae
- Tab. 24 Übersicht Moraceae und Papaveraceae
- Tab. 25 Übersicht Asteraceae
- Tab. 26 Übersicht Campanulaceae
- Tab. 27 Übersicht Euphorbiaceae
- Tab. 28 Beeinflussung der Proteaseaktivität durch spezifische Inhibitoren
- Tab. 29 Identifizierte Proteine nach tryptischen Verdau
- Tab. 30 Reinigungsübersicht mit dazugehörigen Aktivitäten und Proteingehalt
- Tab. 31 Aktivität der unbekanntenen Protease nach Behandlung mit organischen Solventien
- Tab. 32 Verteilung der Spaltstellen auf die Aminosäuren (Myoglobin (horse heart))

Tab. 33 Verteilung der Spaltstellen auf die Aminosäuren (β -Laktoglobulin)

Tab. 34 Verteilung der Spaltstellen auf die Aminosäuren (Lysozym)

Tab. 35 Übersicht über die Umsetzung synthetischer Substrate durch die unbekannte Protease

Tab. 36 Übersicht Inhibitoren

X. Literaturverzeichnis

- [1] Poldermans B. Proteolytic Enzymes. In: Proteolytic Enzymes in Industry: Production and Applications. Weinheim: VCH Publishers; 1990.
- [2] Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998;62:597-635.
- [3] Barrett A, Rawlings N, Woessner J. Handbook of Proteolytic Enzymes. New York: Academic Press; 1998.
- [4] Lottspeich F, Zorbas H. Bioanalytik. Heidelberg Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 1998.
- [5] Antão CM, Malcata FX. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry* 2005;43:637-50.
- [6] Theodorou LG, Bieth JG, Papamichael EM. The catalytic mode of cysteine proteinases of papain (C1) family. *Bioresource Technology* 2007;98:1931-9.
- [7] Laurence H P. The catalytic mechanism of aspartic proteinases. *FEBS Letters* 1987;214:8-12.
- [8] Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2010;1803:20-8.
- [9] Konno K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry* 2011;72:1510-30.
- [10] Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Basel: Birkhäuser Verlag Basel; 1966.
- [11] Anurag AA, Kotaro K. Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 2009;40:311-31.

- [12] Legner EF. Rubber and other latex products
(<http://www.faculty.ucr.edu/~legnerref/botany/rubber.htm>)
- [13] Teuscher E, Melzig MF, Lindequist U. Biogene Arzneimittel. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2004.
- [14] Morcelle SR, Caffini NO, Priolo N. Proteolytic properties of *Funarium clausum* latex. *Fitoterapia* 2004;75:480-93.
- [15] Priolo N, del Valle SM, Arribere MC, Lopez L, Caffini N. Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *Journal of Protein Chemistry* 2000;19:39-49.
- [16] Yadav SC, Pande M, Jagannadham MV. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochemistry* 2006;67:1414-26.
- [17] Hansson A, Veliz G, Naquira C, Amren M, Arroyo M, Arevalo G. Preclinical and clinical studies with latex from *Ficus glabrata* hbk, a traditional intestinal anthelmintic in the amazonian area. *Journal of Ethnopharmacology* 1986;17:105-38.
- [18] Nallamsetty S, Kundu S, Jagannadham MV. Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*. *Journal of Protein Chemistry* 2003;22:1-13.
- [19] Domsalla A, Melzig MF. Occurrence and Properties of Proteases in Plant Latices. *Planta Medica* 2008;74:699-711.
- [20] Pande M, Dubey VK, Yadav SC, Jagannadham MV. A novel serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchanani*: Purification and biochemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54:10141-50.
- [21] Pande M, Dubey VK, Jagannadham MV. Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptolepain, a novel glycosylated serine protease from *Cryptolepis buchanani*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 2007;63:74-7.
- [22] Lynn KR. Parthenain, a protease from *Parthenium argentatum*. *Phytochemistry* 1988;27:1987-91.

- [23] Rudenskaya GN, Bogacheva AM, Preusser A, Kuznetsova AV, Dunaevsky YE, Golovkin BN, Stepanov VM. Taraxalisin – a serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb s.l. *FEBS Letters* 1998;437:237-40.
- [24] Patel AK, Singh VK, Jagannadham MV. Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (Morning Glory). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:5809-18.
- [25] Patel AK, van Oosterwijk N, Singh VK, Rozeboom HJ, Kalk KH, Siezen RJ, Jagannadham MV, Dijkstra BW. Crystallization and preliminary X-ray analysis of carnein, a serine protease from *Ipomoea carnea*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 2009;65:383-5.
- [26] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Two proteases from the latex of *Elaeophorbia drupifera*. *Phytochemistry* 1985;24:2843-5.
- [27] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Three serine proteases from the latex of *Euphorbia cyparissias*. *Phytochemistry* 1985;24:925-8.
- [28] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Isolation and characterization of proteases from *Euphorbia lactea* and *Euphorbia lactea cristata*. *Phytochemistry* 1986;25:807-10.
- [29] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Isolation and characterization of euphorbain 1, a proteinase from the latex of *Euphorbia lathyris*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1983;746:154-9.
- [30] Yadav RP, Patel AK, Jagannadham MV. Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin-like serine protease from *Euphorbia neriifolia* Linn. *Process Biochemistry* 2011;46:1654-62.
- [31] Shimada M, Uchikoba T, Yonezawa H, Arima K, Kaneda M. Isolation and characterization of a Cucumisin-like serine protease from the latex of *Euphorbia pseudochamaesyce* Fisch. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology and Biophysiology* 2000;4:223-31.
- [32] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Euphorbain p, a serine protease from *Euphorbia pulcherrima*. *Phytochemistry* 1984;23:682-3.

- [33] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Four serine proteases from the latex of *Euphorbia tirucalli*. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology* 1985;63:1093-6.
- [34] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Purification and characterization of hevain, a serine protease from *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 1984;23:963-4.
- [35] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Hevains: Serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 1986;25:2279-82.
- [36] Menon M, Vithayathil PJ, Raju SM, Ramadoss CS. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'. *Plant Science* 2002;163:131-9.
- [37] Renuka Prasad KM, Virupaksha TK. Purification and characterization of a protease from jackfruit latex. *Phytochemistry* 1990;29:1763-6.
- [38] Rudenskaya G, Bogdanova E, Revina L, Golovkin B, Stepanov V. Macluralisin- a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Planta Medica* 1995;196:174-9.
- [39] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Ficin E, a serine-centred protease from *Ficus elastica*. *Phytochemistry* 1986;25:1559-61.
- [40] Kumari M, Sharma A, Jagannadham MV. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry* 2011.
- [41] Singh VK, Patel AK, Moir AJ, Jagannadham MV. Indicain, a dimeric serine protease from *Morus indica* cv. K2. *Phytochemistry* 2008;69:2110-9.
- [42] Tripathi P, Tomar R, Jagannadham MV. Purification and biochemical characterisation of a novel protease streblin. *Food Chemistry* 2011;125:1005-12.
- [43] Konno K, Hirayama C, Nakamura M, Tateishi K, Tamura Y, Hattori M, Kohno K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal* 2004;37:370-8.
- [44] Thakurta PG, Biswas S, Chakrabarti C, Sundd M, Jagannadham MV, Dattagupta JK. Structural basis of the unusual stability and substrate specificity of ervatamin C, a plant cysteine protease from *Ervatamia coronaria*. *Biochemistry* 2004;43:1532-40.

- [45] Patel BK, Jagannadham MV. A high cysteine containing thiol proteinase from the latex of *Ervatamia heyneana*: purification and comparison with ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51:6326-34.
- [46] Kundu S, Sundd M, Jagannadham MV. Structural characterization of a highly stable cysteine protease ervatamin C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999;264:635-42.
- [47] Chakrabarti C, Biswas S, Kundu S, Sundd M, Jagannadham MV, Dattagupta JK. Crystallization and preliminary X-ray analysis of ervatamin B and C, two thiol proteases from *Ervatamia coronaria*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 1999;55:1074-5.
- [48] Morcelle SR, Trejo SA, Canals F, Aviles FX, Priolo NS. Funastrain c II: A cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*. *Protein Journal* 2004;23:205-15.
- [49] Sequeiros C, Torres MJ, Trejo SA, Esteves JL, Natalucci CL, Lopez LMI. Philibertain g I, the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (Apocynaceae). *Protein Journal* 2005;24:445-53.
- [50] Cavalli SEV, Arribere MC, Cortadi A, Caffini NO, Priolo NS. Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (Asclepiadaceae). *Journal of Protein Chemistry* 2003;22:15-22.
- [51] Cavalli SV, Cortadi A, Arribere MC, Conforti P, Caffini NO, Priolo N. Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (Asclepiadaceae). *Biological Chemistry* 2001;382:879-83.
- [52] Arribere MC, Cortadi AA, Gattuso MA, Bettiol MP, Priolo NS, Caffini NO. Comparison of asclepiadaceae latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. cysteine peptidases. *Phytochemical Analysis* 1998;9:267-73.
- [53] Trejo SA, Lopez LMI, Cimino CV, Caffini NO, Natalucci CL. Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from latex of *Asclepias fruticosa* L. (Asclepiadaceae). *Journal of Protein Chemistry* 2001;20:469-77.

- [54] Liggieri C, Arribere MC, Trejo SA, Canals F, Aviles FX, Priolo NS. Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Protein Journal* 2004;23:403-11.
- [55] James Brockbank W, Lynn KR. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (Milkweed). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 1979;578:13-22.
- [56] Tablero M, Arreguín R, Arreguín B, Soriano M, Sánchez RI, Rodríguez Romero A, Hernández-Arana A. Purification and characterization of multiple forms of Asclepain g from *Asclepias glaucescens* H.B.K.. *Plant Science* 1991;74:7-15.
- [57] Winnick T, Davis AR, Greenberg DM. Physicochemical properties of the proteolytic enzyme from the latex of the milkweed, *Asclepias speciosa* Torr. some comparisons with other proteases : Iii. Kinetics of the heat inactivation of Papain, Bromelin, and Asclepain. *Journal of General Physiology* 1940;23:301-8.
- [58] Pal G, Sinha NK. Isolation, crystallization, and properties of calotropins DI and DII from *Calotropis gigantea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1980;202:321-9.
- [59] Pal GP, Sinha NK, Saenger W. Crystallizations and preliminary X-ray studies of calotropins DI and DII. *Journal of Molecular Biology* 1981;153:1157-9.
- [60] Sengupta A, Bhattacharya D, Pal G, Sinha NK. Comparative studies on calotropins DI and DII from the latex of *Calotropis gigantea*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1984;232:17-25.
- [61] Kumar Dubey V, Jagannadham MV. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry* 2003;62:1057-71.
- [62] Obregón WD, Arribere MC, Morcelle del Valle S, Liggieri C, Caffini N, Priolo N. Two New Cysteine Endopeptidases Obtained from the Latex of *Araujia hortorum* Fruits. *Journal of Protein Chemistry* 2001;20:317-25.
- [63] Oliver-Salvador MC, Gonzalez-Ramirez LA, Gavira JA, Soriano-Garcia M, Garcia-Ruiz JM. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of mexicain. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2004;60:2058-60.

- [64] Gavira JA, Gonzalez-Ramirez LA, Oliver-Salvador MC, Soriano-Garcia M, Garcia-Ruiz JA. Structure of the mexicain-E-64 complex and comparison with other cysteine proteases of the papain family. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 2007;63:555-63.
- [65] Walraevens V, Vandermeers-Piret MC, Vandermeers A, Gourlet P, Robberecht P. Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Biological Chemistry* 1999;380:485-8.
- [66] Walraevens V, Jaziri M, Vanbeeumen J, Schnek AG, Kleinschmidt T, Looze Y. Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1993;374:501-6.
- [67] Demoraes MG, Termignoni C, Salas C. Biochemical- characterization of a new cystein endopeptidase from *Carica candamarcensis* L. *Plant Science* 1994;102:11-8.
- [68] Gomes MTR, Mello VJ, Rodrigues KC, Bemquerer MP, Lopes MTR, Faca VM, Salas CE. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogens for mammalian cells. *Planta Medica* 2005;71:244-8.
- [69] Gomes MTR, Ribeiro HA, Lopes MTP, Guzman F, Salas CE. Biochemical comparison of two proteolytic enzymes from *Carica candamarcensis*: Structural motifs underlying resistance to cystatin inhibition. *Phytochemistry* 2010;71:524-30.
- [70] Gravina de Moraes M, Termignoni C, Salas C. Biochemical characterization of a new cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis* L.. *Plant Science* 1994;102:11-8.
- [71] Ribeiro Gomes MT, Teixeira RD, Lopes Ribeiro HdA, Turchetti AP, Junqueira CF, Paz Lopes MT, Salas CE, Pinto Nagem RA. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of CMS1MS2: a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* latex. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* 2008;64:492-4.
- [72] Fonseca KC, Morais NCG, Queiroz MR, Silva MC, Gomes MS, Costa JO, Mamede CCN, Torres FS, Penha-Silva N, Beletti ME, Canabrava HAN, Oliveira F. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. *hislopii* latex. *Phytochemistry* 2010;71:708-15.

- [73] Perello M, Arribere MC, Caffini NO, Priolo NS. Proteolytic enzymes from the latex of *Ficus pumila* L. (Moraceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense* 2000;19:257-62.
- [74] Sugiura M, Sasaki M. Studies on proteinases from *Ficus carica* var. *horaishi*. 1. Purification and enzymatic properties of proteinases. *Yakugaku Zasshi* 1971;91:457- 66.
- [75] Sugiura M, Sasaki M. Studies on proteinases from *Ficus carica* var. *horaishi*. 2. Physicochemical properties of Ficin A, B, C and D. *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 1973;93:63-7.
- [76] Sugiura M, Sasaki M. Studies on proteinases from *Ficus carica* var. *horaishi*. 5. Purification and properties of a sugar-containing proteinase (Ficin S). *Biochimica et Biophysica Acta* 1974;350:38-47.
- [77] Chetia D, Nath LK, Dutta SK. Extraction, purification and physico-chemical properties of a proteolytic enzyme from the latex of *Ficus hispida* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999;61 29-33.
- [78] Devaraj KB, Gowda LR, Prakash V. An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry* 2008;69:647-55.
- [79] Ahmed F, Urooj A. Traditional uses, medicinal properties, and phytopharmacology of *Ficus racemosa*: A review. *Pharmaceutical Biology* 2010;48:672-81.
- [80] Kumar R, Singh KA, Tomar R, Jagannadham MV. Biochemical and spectroscopic characterization of a novel metalloprotease, cotinifolin from an antiviral plant shrub: *Euphorbia cotinifolia*. *Plant Physiology and Biochemistry* 2011;49:721-8.
- [81] Chary MP, Reddy SM. Protease activity of some latex bearing plants. *National Academy of Sciences Science Letters* 1983;6:183-84
- [82] Kyndt T, Van Damme EJM, Van Beeumen J, Gheysen G. Purification and characterization of the cysteine proteinases in the latex of *Vasconcellea* spp.. *FEBS Journal* 2007;274:451-62.
- [83] Demir Y, Alayli A, Yildirim S, Demir N. Identification of protease from *Euphorbia amygdaloides* latex and its use in cheese production. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 2005;35:291-9.

[84] Robbins BH, Lamson PD. Further studies on the proteolytic enzyme content of latex from the fig and other related trees. *Journal of Biological Chemistry* 1934;106:725-8.

[85] Castaneda M, Balcazar MR, Gavarron FF. The proteolytic activity of the latex of *Euphorbia cereifera*. *Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 1943;3: 65-72

[86] Lynn KR, Clevette-Radford NA. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. *Phytochemistry* 1987;26:939-44.

[87] Gonashvili SG, Gonashvili MS. Proteolytic enzymes of some Georgian plants. *Rastitel'nye Resursy* 1968;4:356-65.

[88] Jaffe WG. A new vegetable proteolytic enzyme of the papain class. *Revista Brasileira de Biologia* 1943;3:149-57.

[89] Kramer DE, Whitaker JR. Ficus enzymes. II. Properties of the proteolytic enzymes from the latex of *Ficus carica* var. *kadota*. *Journal of Biological Chemistry* 1964;239:2178-83

[90] Singh D, Singh A. Biochemical alteration in freshwater fish *Channa punctatus* due to latices of *Euphorbia royleana* and *Jatropha gossypifolia*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2002;12:129-36.

[91] Sgarbieri VC, Gupte SM, Kramer DE, Whitaker JR. Ficus Enzymes:I. Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* latices. *Journal of Biological Chemistry* 1964;239:2170-7.

[92] Rajesh R, Shivaprasad HV, Gowda CDR, Nataraju A, Dhananjaya BL, Vishwanath BS. Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: A special emphasis on clot inducing and dissolving properties. *Planta Medica* 2007;73:1061-7.

[93] Jaffé WG. Hurain, a new plant protease from *Hura crepitans*. *Journal of Biological Chemistry* 1943;149:1-7.

[94] John KS, Bhat SG, Rao U. Biochemical characterization of sap (latex) of a few Indian mango varieties. *Phytochemistry* 2003;62:13-9.

- [95] Nath LK, Dutta SK. Extraction and study of certain physico-chemical properties of a new proteolytic enzyme from the latex of *Jatropha curcas* L.. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 1988; 50:125-27.
- [96] Nath LK, Dutta SK. Extraction and purification of Curcain, a protease from the latex of *Jatropha curcas* L.. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1991;43:111-4.
- [97] Robbins BH. A proteolytic enzyme in Ficin, the anthelmintic principle of leche de higuero. *Journal of Biological Chemistry* 1930;87:251-7.
- [98] Williams DC, Sgarbier.Vc, Whitaker JR. Proteolytic activity in genus ficus. *Plant Physiology* 1968;43:1083-8.
- [99] Blaschek W, Hänsel R, Keller K, Reichling J, Rimpler H, Schneider GH. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Folgeband 2: Drogen A-K*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1998.
- [100] Buddensiek V. *Sukkulente Euphorbien*. Stuttgart: Eugen Ulmer GmbH &Co; 1998.
- [101] Heel BH. *Gebrauchsinformation: Euphorbium comp. Nasentropfen SN Spray*. Baden-Baden 2011.
- [102] Boericke W, Beha DJB. *Handbuch der homöopathischen Materia medica : quellenorientierte Neuübersetzung* Stuttgart Haug 2004.
- [103] Nellis DW. *Poisonous plants and animals of Florida and the Caribbean Florida*: Pineapple Press Inc; 1997.
- [104] Davis C, Parson P. *Growing Milkweed a plant with prospective anticancer properties*. Rural Industries Research and Development Corporation 2002;02:1-10.
- [105] Neuwinger HD. Plants used for poison fishing in tropical Africa. *Toxicon* 2004;44:417-30.
- [106] Wilken K, Schempp C. Toxische Phytodermatitis nach Kontakt mit *Euphorbia helioscopia* L. (Sonnenwend-Wolfsmilch). *Der Hautarzt* 2005;56:955-8.

- [107] Eberle MM, Erb C, Flammer J, Meyer P. Dermatitis und Konjunktivitis nach Kontakt mit dem Saft der *Euphorbia myrsinites* (Wolfsmilchsaft) - Eine Kasuistik. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 1999;215:203,4.
- [108] Bradford MM. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
- [109] Sytwala S. Untersuchungen der Latices der Asteraceae und Campanulaceae hinsichtlich proteolytischer Aktivität. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2011.
- [110] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985;150:76-85.
- [111] Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* 1988;175:231-7.
- [112] Siler DJ, Cornish K. Measurement of protein in natural rubber latex. *Analytical Biochemistry* 1995;229:278-81.
- [113] Schickaneder E, Hösel W, Eltz Hvd, Geuß U. Casein-resorufon, a new substrate for a highly sensitive protease assay. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1988;330:360-.
- [114] Sally S T. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry* 1984;143:30-4.
- [115] 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. *Analytical Biochemistry* 1997;251:144-52.
- [116] Thompson VF, Saldaña S, Cong J, Goll DE. A BODIPY fluorescent microplate assay for measuring activity of Calpains and other proteases. *Analytical Biochemistry* 2000;279:170-8.
- [117] Menges DA, Ternullo DL, Tan-Wilson AL, Gal S. Continuous assay of proteases using a microtiter plate fluorescence reader. *Analytical Biochemistry* 1997;254:144-7.

- [118] Domsalla A, Gorick C, Melzig MF. Proteolytic activity in latex of the genus *Euphorbia* - a chemotaxonomic marker? *Pharmazie* 2010;65:227-30.
- [119] Rawel HM. PP-Präsentation: Ergebnisse des In-Gel-Verdaus der unbekanntenen Protease. 2011.
- [120] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
- [121] Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry* 1985;151:369-74.
- [122] Ohsawa K, Ebata N. Silver stain for detecting 10-femtogram quantities of protein after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 1983;135:409-15.
- [123] Switzer III RC, Merrill CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1979;98:231-7.
- [124] Nielsen BL, Brown LR. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1984;141:311-5.
- [125] Bischoff KM, Shi L, Kennelly PJ. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 1998;260:1-17.
- [126] Wilkesman J, Kurz L. Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology* 2009;3:175-84.
- [127] Leber TM, Balkwill FR. Zymography: A single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical Biochemistry* 1997;249:24-8.
- [128] Fernandezresa P, Mira E, Quesada AR. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Analytical Biochemistry* 1995;224:434-5.
- [129] Raser KJ, Posner A, Wang KKW. Casein zymography: A method to study μ -Calpain, M-Calpain, and their inhibitory agents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995;319:211-6.

- [130] Misenheimer TM, Hahr AJ, Harms AC, Annis DS, Mosher DF. Disulfide connectivity of recombinant C-terminal region of human thrombospondin 2. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:45882-7.
- [131] Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, Kowalak JA, Bengoeches JA, Zipfel PF, Elsasser TH, Cuttitta F, Complement factor H Is a serum-binding protein for Adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:12292-300.
- [132] piercenet. Instructions Pierce® Glycoprotein Staining Kit
<http://piercenet.com/instructions/2160855.pdf>
- [133] Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer* 1976;17:565-77.
- [134] Kong ZL, Miwa M, Murakami H, Shinohara K. Establishment of a macrophagelike cell line derived from U-937, human histiocytic lymphoma, grown serum-free. *In Vitro Cellular & Developmental Biology : Journal of the Tissue Culture Association* 1990;26:949-54.
- [135] Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line THP-1. *International Journal of Cancer* 1980;26:171-6.
- [136] Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Research* 1982;42:1530-6.
- [137] Drexler HG, Quentmeier H, MacLeod RAF. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. *Leukemia* 2004;18:227-32.
- [138] Ganten D, Ruckpaul K. *Grundlagen der Molekularen Medizin*: Springer Berlin Heidelberg; 2008.
- [139] Weng A. *Investigations on saponins as membran-transfer-enhancers for proteins*. Berlin: Freie Universität Berlin; 2009.
- [140] Naldini A, Carney DH, Pucci A, Pasquali A, Carraro F. Thrombin regulates the expression of proangiogenic cytokines via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *General Pharmacology: The Vascular System* 2000;35:255-9.

- [141] Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Journal of Immunological Methods* 1995;179:95-103.
- [142] Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research* 1988;48:4827-33.
- [143] Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods* 1991;142:257-65.
- [144] AppliChem G. AppliCations Nr. 12 Cell Proliferation Assay XTT. 2010.
- [145] Handrik M. Untersuchungen zum Nachweis von Diterpenalkoholen in Milchsäften von Euphorbiaceae. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; 2009.
- [146] Barile E, Corea G, Lanzotti V. Diterpenes from *Euphorbia* as potential leads for drug design. *Natural Product Communications* 2008;3:1003-20.
- [147] Marco JA, SanzCervera JF, Yuste A. Ingenane and lathyrane diterpenes from the latex of *Euphorbia canariensis*. *Phytochemistry* 1997;45:563-70.
- [148] Corea G, Di Pietro A, Dumontet C, Fattorusso E, Lanzotti V. Jatrophone diterpenes from *Euphorbia* spp. as modulators of multidrug resistance in cancer therapy. *Phytochemistry Reviews* 2009;8:431-47.
- [149] Fred JE. The irritant toxins of Blue *Euphorbia* (*Euphorbia coerulescens* Haw.). *Toxicon* 1978;16:51-7.
- [150] Gschwend.M, Hecker E. Tumor-promoting compounds from *Euphorbia cooperi*: di- and triesters of 16-hydroxy-12-desoxy-phorbol. *Tetrahedron Letters* 1970:567-70.
- [151] Liu LG, Meng JC, Wu SX, Li XY, Zhao XC, Tan RX. New macrocyclic diterpenoids from *Euphorbia esula*. *Planta Medica* 2002;63:244-8.
- [152] Aynehchi Y, Hakimzadeh MZ. Chemical examination of *Euphorbia falcata* L. *Pharmaceutical Biology* 1978;16:121-4.

- [153] Kinghorn AD, Evans FJ. Skin irritants of *Euphorbia fortissima*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1975;27:329-33.
- [154] Kinghorn AD, Evans FJ. Isolation of phorbol from *Euphorbia franckiana*. *Phytochemistry* 1975;14:585-6.
- [155] Redei D, Hajdu Z, Fargo P, Hohmann J. New phorbol analogues from *Euphorbia grandicornis*. *Planta Medica* 2009;75:989-.
- [156] Opferkuch HJ, Hecker E. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). IV. Skin irritant and tumor promoting diterpene esters from *Euphorbia ingens* E. Mey. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1982;103:255-68.
- [157] Bicchi C, Appendino G, Cordero C, Rubiolo P, Ortelli D, Veuthey J-L. HPLC-UV and HPLC-positive-ESI-MS analysis of the diterpenoid fraction from caper spurge (*Euphorbia lathyris*) seed oil. *Phytochemical Analysis* 2001;12:255-62.
- [158] Sosath S, Ott HH, Hecker E. Irritant principles of the spurge family (Euphorbiaceae). 13. Oligocyclic and macrocyclic diterpene esters from latices of some *Euphorbia* species utilized as source plants of honey. *Journal of Natural Products* 1988;51:1062-74.
- [159] Vogg G, Mattes E, Rothenburger J, Hertkorn N, Stefan A, Sandermann Jr H. Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L. *Phytochemistry* 1999;51:289-95.
- [160] Marston A, Hecker E. Active principles of the Euphorbiaceae. VII. Milliamines H and I, peptide esters of 20-deoxy-5 epsilon-hydroxyphorbol from *Euphorbia milii*. *Planta Medica* 1984;50:319-22.
- [161] Öksüz S, Gürek Fh, Gil RR, Pengsuparp T, Pezzuto JM, Cordell GA. Four diterpene esters from *Euphorbia myrsinites*. *Phytochemistry* 1995;38:1457-62.
- [162] Ravikanth V, Niranjan Reddy VL, Prabhakar Rao T, Diwan PV, Ramakrishna S, Venkateswarlu Y. Macrocyclic diterpenes from *Euphorbia nivulia*. *Phytochemistry* 2002;59:331-5.
- [163] Betancur-Galvis L, Checa J, Marco JA, Estornell E. Jatrophone diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia* with inhibitory activity on the mammalian mitochondrial respiratory chain. *Planta Medica* 2003;69:177-8.

- [164] Marco JA, Sanz-Cervera JF, Checa J, Palomares E, Fraga BM. Jatrophone and tigliane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia*. *Phytochemistry* 1999;52:479-85.
- [165] Daoubi M, Marquez N, Mazoir N, Benharref A, Hernandez-Galan R, Munoz E, Collado IG. Isolation of new phenylacetylglucosyl derivatives that reactivate HIV-1 latency and a novel spirotriterpenoid from *Euphorbia officinarum* latex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007;15:4577-84.
- [166] Girin MA, Paphassarang S, David-Eteve C, Chaboud A, Raynaud J. Determination of ingenol in homoeopathic mother tinctures of *Euphorbia* species by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1993;637:206-8.
- [167] Hergenbahn M, Kusumoto S, Hecker E. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). V. Extremely skin-irritant and moderately tumor-promoting diterpene esters from *Euphorbia resinifera* Berg. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1984;108:98-109.
- [168] Upadhyay RR, Zarintan MH, Ansarin M. Isolation of ingenol from the irritant and cocarcinogenic latex of *Euphorbia seguieriana*. *Planta Medica* 1976;30:32-4.
- [169] Fürstenberger G, Hecker E. On the active principles of the spurge family (Euphorbiaceae). XI. [1] The skin irritant and tumor promoting diterpene esters of *Euphorbia tirucalli* L. originating from South Africa. *Zeitschrift für Naturforschung Section C: Biosciences* 1985;40:631-46.
- [170] Gschwend M, Hecker E. Tumor promoting compounds from *Euphorbia triangularis*-mono- and diesters of 12-Desoxy-phorbol. *Tetrahedron Letters* 1969:3509-12.
- [171] Tada M, Seki H. Toxic diterpenes from *Euphorbia trigona* (Saiunkaku, an indoor foliage plant in Japan). *Agricultural and Biological Chemistry* 1989;53:425-30.
- [172] Vasas A, Hohmann J, Forgo P, Szabó P. New tri- and tetracyclic diterpenes from *Euphorbia villosa*. *Tetrahedron Letters* 2004;60:5025-30.
- [173] Bruyns PV, Mapaya RJ, Hedderson T. A new subgeneric classification for *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and psbA-trnH sequence data. *Taxon* 2006;55:397-420.

- [174] Steinmann VW, Porter JM. Phylogenetic Relationships in Euphorbieae (Euphorbiaceae) Based on ITS and ndhF Sequence Data. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 2002;89:453-90.
- [175] Garshasebi A. Untersuchungen zum Nachweis von proteolytischen Enzymen in Milchsäften der Gattung Euphorbia. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2010.
- [176] Mitich L. The succulent euphorbias: poisonous and medicinal. *The Euphorbia Journal* 1984; 2:61-7.
- [177] Rea G, Metoui O, Infantino A, Federico R, Angelini R. Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiology* 2002;128:865-75.
- [178] Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 2009;60:377-90.
- [179] Zaia J, Annan RS, Biemann K. The correct molecular weight of myoglobin, a common calibrant for mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1992;6:32-6.
- [180] Goel G, Makkar HPS, Francis G, Becker K. Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology* 2007;26:279-88.
- [181] Naldini A, Sower L, Bocci V, Meyers B, Carney DH. Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 1998;177:76-84.
- [182] Sower LE, Froelich CJ, Carney DH, Fenton JW, Klimpel GR. Thrombin induces IL-6 production in fibroblasts and epithelial cells - Evidence for the involvement of the seven-transmembrane domain (STD) receptor for alpha-thrombin. *Journal of Immunology* 1995;155:895-901.
- [183] Yoshizaki K, Nishimoto N, Mihara M, Kishimoto T. Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody. *Springer Seminars in Immunopathology* 1998;20:247-59.

- [184] Kobayashi T, Kobayashi E, Sato S, Hotta Y, Miyajima N, Tanaka A, Tabata S. Characterization of cDNAs induced in meiotic prophase in lily microsporocytes. *DNA research : An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 1994;1:15-26.
- [185] Taylor AA, Horsch A, Rzepczyk A, Hasenkampf CA, Riggs CD. Maturation and secretion of a serine proteinase is associated with events of late microsporogenesis. *Plant Journal* 1997;12:1261-71.
- [186] Ribeiro A, Akkermans ADL, Vankammen A, Bisseling T, Pawlowski K. A nodule-specific gene encoding a subtilisin-like protease is expressed in early stages of actinorhizal nodule development. *Plant Cell* 1995;7:785-94.
- [187] Laplaze L, Ribeiro A, Franche C, Duhoux E, Auguy F, Bogusz D, Pawlowski K. Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa* ag12. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2000;13:113-7.
- [188] Tornero P, Conejero V, Vera P. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1996;93:6332-7.
- [189] Tornero P, Conejero V, Vera P. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:14412-9.
- [190] Wang YT, Yang CY, Chen YT, Lin Y, Shaw JF. Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets. *Plant Physiology and Biochemistry* 2004;42:663-70.
- [191] Muntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 2001;52:1741-52.
- [192] Visser S, Slangen C. On the specificity of chymosin it's action bovine b-Casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 1977;31:120-33.

- [193] Rajesh R, Nataraju A, Gowda CDR, Frey BM, Frey FJ, Vishwanath BS. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. *Biochimie* 2006;88:1313-22.
- [194] Shivaprasad HV, Rajesh R, Nanda BL, Dharmappa KK, Vishwanath BS. Thrombin like activity of *Asclepias curassavica* L. latex: Action of cysteine proteases. *Journal of Ethnopharmacology* 2009;123:106-9.
- [195] Biswas S, Chakrabarti C, Kundu S, Jagannadham MV, Dattagupta JK. Proposed amino acid sequence and the 1.63 Å X-ray crystal structure of a plant cysteine protease, ervatamin B: some insights into the structural basis of its stability and substrate specificity. *Proteins* 2003;51:489-97.
- [196] Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergenolle N, Luger TA, Hollenberg MD. Proteinase-Activated Receptors: Transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocrine Reviews* 2005;26:1-43.

XI. Publikationsverzeichnis

Übersichtsarbeiten

Domsalla A, Melzig MF. Occurrence and properties of proteases in plant latices.

Planta Medica 2008;74,7:699-711

Orginalarbeiten

Domsalla A, Goerick C, Melzig MF. Proteolytic activity in latex of the genus Euphorbia - a

chemotaxonomic marker? Pharmazie 2010;65,3; 227-230

Posterpräsentationen

Domsalla A, Melzig MF. Screening of plant latices for proteolytic activity, DPhG

Landesgruppentagung "Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor." Berlin, 2008

Domsalla A, Melzig MF. Screening method for detecting proteases in plant latices. Planta

Medica 2008;74:1088-1088, 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, Athen,

2008

Domsalla A, Melzig MF. Proteolytic activity in the genus Euphorbia. Planta Medica 2009,

75:903-903, 57th International Congress and Annual Meeting oft he Society for Medicinal

Plant and Natural Product Research, Genf, 2009

Domsalla A, Garshasebi A, Melzig MF. Inhibitory profile of latex-proteases in the genus

Euphorbia. Planta Medica 2010,76:1269-1269, 58 th International Congress and Annual

Meeting oft he Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlin, 2010

Domsalla A, Melzig MF. Latex proteases in the genus Euphorbia; Drugs from natural

sources: The potential of Brazilian plants used in traditional medicine, German House of

Science and Innovation, Sao Paulo, 2010

Domsalla A, Sytwala S, Melzig MF. Proteolytic activity in latices of Asteraceae and

Campanulaceae. Planta Medica 2011,77:1382-1382, 59th International Congress and Annual

Meeting oft he Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Antalya, 2011

XII. Curriculum Vitae

„Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.“

XIII. Danksagung

Prof. Dr. M.F. Melzig danke ich für die Überlassung dieses interessanten und vielfältigen Themas. Weiterhin möchte ich mich für sein stetiges Interesse, seine Anregungen und seine Förderung, sowie für seine hervorragende Betreuung, bedanken.

Für die Untersuchungen des In-Gel-Verdau der unbekannt Protease und das Erstellen des Zweitgutachtens danke ich Prof. Dr. H. M. Rawel und Tina Buchholz vom Institut für Ernährungswissenschaft, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Bergholz-Rehbrücke.

Herrn Dr. E. Krause und Frau H. Stefanowitz vom FMP Abteilung Massenspektrometrie danke ich für die Untersuchungen ausgewählter SDS-Gelbanden mittels Tryptischen Verdau und anschließender Analyse.

Des Weiteren möchte den Diplomanden Sonja Sytwala, Arash Garshasebi und Martin Handrick für die Unterstützung und die Generierung von Ergebnissen für diese Arbeit danken.

Cornelia Görick danke ich besonders für wertvolle Tipps und Tricks, die die tägliche Arbeit im Labor erleichterten, danke für die Hilfe beim Probensammeln im Garten, für die Lösung von Problem an der HPLC und die Korrekturarbeit der vorliegenden Arbeit. Danke für Alles. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die herzliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Stefan Böttger danke ich für viele konstruktive Auseinandersetzungen und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und den Praktika.

Frau Dr. Lazar-Schurreit danke ich für die vielen angenehmen Praktikumsstunden und der Interpretation der lichtmikroskopischen Aufnahmen.

Dem Direktor, den Mitarbeitern und Gärtnern des Botanischen Gartens Berlin, vor allem Herrn Kriemelke und Frau Gasper, danke ich für den Zugang und die Nutzung der Pflanzen. Dem Dahlem Centre for Plant Science (DCPS) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und die Ermöglichung des Studiums.

Am meisten danke ich meiner Partnerin Silke für ihre fortwährende und liebevolle Unterstützung, ihre Geduld und Zuversicht und die vielzähligen Stunden der Betreuung unserer Tochter Emma während der Entstehung dieser Arbeit.

XIV. Eidesstattliche Erklärung

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

Berlin, 27.04.2012

André Domsalla