Untersuchungen zur proteolytischen Aktivität pflanzlicher Milchsäfte und deren Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Apotheker Martin Flemmig

aus Mölln

2015

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2010 bis Mai 2015 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: apl. Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel

Disputation am: 22.06.2015

Inhaltsverzeichnis

A	bkür	rzungsv	verzeichnis	IV
1.	Ein	leitung		1
	1.1	Milch	nsaft – Latex	1
	1.2	Euph	orbiaceae JUSS	2
	1.3	Prote	asen	
		1.3.1	Einsatz von Proteasen als Therapeutika	
		1.3.2	Einsatz von Proteasen in anderen Bereichen	4
		1.3.3	Funktion der im Milchsaft enthaltenen Proteasen	5
		1.3.4	Isolierte Proteasen aus Euphorbiaceae	6
	1.4	Hämo	ostase und Fibrinolyse	7
		1.4.1	Fibrin(ogen)	
		1.4.2	Plasmin(ogen)	9
		1.4.3	Plasminogen-Aktivatoren	10
		1.4.4	Andere fibrinolytische Proteasen	14
	1.5	Zielse	etzung	16
2.	Ma	terial		
	2.1	Gerät	e	17
		2.1.1	Chromatographie	17
		2.1.2	Elektrophorese	17
		2.1.3	MALDI-TOF-MS	
		2.1.4	Sonstige Geräte	
	2.2	Chem	nikalien und Substanzen	19
		2.2.1	Allgemein	19
		2.2.2	Kits	20
		2.2.3	Elektrophorese	20
		2.2.4	Protease-Inhibitoren	22
		2.2.5	Proteasen	22
	2.3	Verbr	auchsmaterial	22
		2.3.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	
		2.3.2	Elektrophorese	
	2.4	Biolo	gisches Material	
3.	Met	thoden		
	3.1	Gewi	nnung von Latex	
	3.2	Gewi	nnung von Plasma	
	3.3	Prote	in – Gehaltsbestimmungen	
		3.3.1	BCA – Assay	

		3.3.2	Bradford Assay	. 27
	3.4	Protea	ase – Aktivitätsbestimmungen	. 27
		3.4.1	Allgemeine proteolytische Aktivität	. 27
		3.4.2	Aktivität gegenüber einem spezifischen Peptidsubstrat für Plasmin	. 27
		3.4.3	Plasminogen-Aktivator Aktivität	. 28
	3.5	Trübu	ingsmessungen mit Fibrin(ogen)	. 29
		3.5.1	Gerinnung von Fibrinogen	. 29
		3.5.2	Gerinnungshemmung durch Fibrin(ogen)olyse	. 29
	3.6	Trübu	ingsmessungen mit Plasma	. 30
		3.6.1	Calciumunabhängige Gerinnungsauslösung	. 30
		3.6.2	Beeinflussung der Recalcifizierungszeit	. 30
	3.7	Fibrin	n(ogen)-Platten-Tests	. 31
		3.7.1	Fibrinogen-Agarose-Platte	. 31
		3.7.2	Fibrin-Agarose-Platte	. 31
	3.8	Auflö	sung von Plasma-Gerinnseln	. 31
	3.9	Elekt	rophorese	. 32
		3.9.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	. 32
		3.9.2	Bestimmung der Molekülmassen	. 34
		3.9.3	Isoelektrische Fokussierung	. 34
		3.9.4	Bestimmung des Fibrinogen-Abbaus	. 36
		3.9.5	Zymographie	. 36
		3.9.6	Proteinfärbung	. 38
	3.10) MAL	DI-TOF Massenspektrometrie	. 39
		3.10.1	Molekülmassenbestimmung und Reinheitsprüfung	. 39
		3.10.2	In-Gel Verdau	. 40
	3.1	l Isolat	ion von Mauritanicain	. 43
		3.11.1	Probenvorbereitung	. 43
		3.11.2	Ionenaustausch-Chromatographie	. 43
		3.11.3	Ultrafiltration	. 44
		3.11.4	Größenausschluss-Chromatographie	. 44
	3.12	2 Bestin	nmung der Protease-Klasse	. 45
	3.13	3 Bestin	nmung der Temperaturabhängigkeit	. 45
	3.14	4 Bestin	nmung der pH Abhängigkeit	. 46
4.	Erg	gebnisse	e und Diskussion	. 47
	4.1	Scree	ning	. 47
		4.1.1	Allgemeine proteolytische Aktivität	. 47
		4.1.2	Aktivität gegenüber einem spezifischen fluorogenen Substrat für Plasmin	. 48
		4.1.3	Vergleich der Zusammensetzung durch Elektrophorese	. 56
	4.2	Isolat	ion von Mauritanicain	. 58

4.3 Char	akterisierung von Mauritanicain		
4.3.1	Molekülmasse		
4.3.2	Reinheitsprüfungen		
4.3.3	Substratspezifität		
4.3.4	Temperaturabhängigkeit		
4.3.5	pH-Wert Abhängigkeit		
4.3.6	Isoelektrischer Punkt		
4.3.7	Protease-Klasse		
4.4 Unter	rsuchungen zum Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse		
4.4.1	Trübungsmessungen		
4.4.2	Fibrinogen-Platten-Test		
4.4.3	Fibrin-Platten-Test		
4.4.4	Zymographie		
4.4.5	Spaltstellenanalyse durch Elektrophorese		
4.4.6	Spaltstellenanalyse durch In-Gel Verdau		
4.4.7	Plasminogen-Aktivator Aktivität		
4.4.8	Auflösung von Plasma-Gerinnseln		
5. Schlussfol	gerungen		
6. Zusamme	nfassung / Summary		
Literaturver	zeichnis		
Abbildungsv	erzeichnis		
Tabellenverz	zeichnis		
Publikations	verzeichnis		
Danksagung			
Lebenslauf			
Eidesstattlic	he Erklärung		

Abkürzungsverzeichnis

AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
APS	Ammoniumper(oxodi)sulfat
Aqua bidem.	Aqua bidemineralisata
AS	Aminosäure
α2-Μ	α2-Makroglobulin
α2-PI	α2-Antiplasmin
BCA	Bicinchoninsäure
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BSA	bovines Serum Albumin
C.	Cnidoscolus
E.	Euphorbia
E-64	trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FPA / FPB	Fibrinopeptid A/B
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HWZ	Halbwertzeit
IAA	2-Iodacetamid
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
ME	β-Mercaptoethanol
MS	Massenspektrometrie
PA	Plasminogen-Aktivator
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1
PBS	Phosphate Buffered Saline

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
PLG	Plasminogen
PLM	Plasmin
pNA	para-Nitroanilin
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
subsp.	Unterart (sub specie)
TCA	Trichloressigsäure
ТСЕР	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
t-PA	Tissue plasminogen activator
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
var.	Varietät (varietas)

Aminosäuren

Alanin	Ala	А
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	Ν
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	С
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	Н
Isoleucin	Ile	Ι
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	М
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	Р
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	Т
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. Einleitung

1.1 Milchsaft – Latex

Der Latex, der im deutschsprachigen Raum besser unter dem Namen Milchsaft bekannt ist, bezeichnet eine wässrige Suspension oder Emulsion, die in Milchröhren von etwa 9 % aller bedecktsamigen Pflanzen vorzufinden ist, verteilt auf etwa 40 Pflanzenfamilien [1]. Dabei ist das Vorkommen in tropischen Regionen erhöht, so enthalten im tropischen Afrika 15 - 30 % der Arten Milchsaft, im tropischen Amerika 20 - 35 % [1]. Der Milchsaft ist, wie der Name sagt, in vielen Fällen ein nicht transparenter weißer Saft, der aber in einigen Fällen auch klar und / oder gefärbt sein kann [2]. Die Milchröhren können sich auf alle Pflanzenteile verteilen, meistens kommen sie jedoch im Stamm und Blättern, aber auch in Wurzeln vor [2]. Bei Verletzung der Pflanze tritt der Latex aus. Dies geschieht je nach Art in unterschiedlichem Ausmaß. Das Austreten des Latex stoppt nach einiger Zeit.

Die Inhaltsstoffe können je nach Art sehr unterschiedlich zusammengesetzt sein. So ist z.B. das Vorkommen von Alkaloiden, Cardenoliden, Furanocumarinen, Phenolen, Proteinen, Terpenen und Stärke beschrieben [2]. Weitgehend bekannte Inhaltsstoffe sind z.B. das als starkes Analgetikum eingesetzte Alkaloid Morphin aus *Papaver somniferum* L., der zur Produktion von Gummi u.a. aus *Hevea brasiliensis* (WILLD. EX A.JUSS.) MÜLL.ARG. gewonnene Kautschuk, ein Polyterpen, sowie das Diterpen Phorbol, dessen z.T. tumorpromovierende Ester in diversen Arten der Familie Euphorbiaceae gefunden wurden und zur Zelldifferenzierung (Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)) eingesetzt werden [2, 3]. Die enthaltenen Proteine gliedern sich wiederrum u.a. in Proteasen, Oxidasen, Lektine, Chitin-bindende Proteine, Chitinasen, Lipasen, Glucosidasen und Phosphatasen. Der bekannteste Vertreter ist hier wohl das Papain aus *Carica papaya* L., eine Cystein-Protease. Auch Protease-Inhibitoren sind beschrieben [2].

Die Funktion des Latex ist nicht geklärt. Sehr wahrscheinlich ist eine Beteiligung an der Abwehr von Herbivoren. So kann zum einen der Latex die Beißvorrichtungen von Insekten verkleben, zum anderen können Inhaltsstoffe wie z.B. die erwähnten Diterpenester, toxisch für den Fraßfeind sein [1, 3]. Enthaltene Proteine mit Chitinase und Lysozym Aktivität können u.a. an der Abwehr von Bakterien und Pilzen beteiligt sein [2, 4]. Pharmazeutisch genutzt wird Milchsaft in der traditionellen Medizin gegen viele verschiedene Krankheiten, wie z.B. bei Entzündungen, Hauterkrankungen, als Abführmittel und gegen Parasiten und Mikroorganismen [5]. Beispiele sind der Latex von Euphorbia emirnensis BAKER (Euphorbiaceae) der gegen Hautparasiten und Warzen Verwendung findet. Euphorbia granulata FORSSK. (Euphorbiaceae) wird äußerlich bei Schlangenbissen und Skorpionstichen, innerlich als Anthelminthikum angewandt. Für letzteres wird auch Euphorbia trichophylla BAKER (Euphorbiaceae) genutzt. Euphorbia scordiifolia JACQ. (Euphorbiaceae) wird bei schmerzenden Zähnen und Stichen der Tsetsefliege verwendet. Zur Desinfektion bei Mundinfektionen wird der Latex von Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) genutzt [5]. Euphorbium bezeichnet den getrockneten Latex von Euphorbia resinifera O.BERG (Euphorbiaceae) und enthält u.a. den stark reizenden Diterpenester Resiniferatoxin [6]. Im Handel befinden sich homöopathische Zubereitungen mit Euphorbium, die z.B. bei Rhinitis und Sinusitis angewandt werden [7]. Euphorbia peplus L. (Euphorbiaceae) wird seit langem traditionell u.a. bei Hauterkrankungen eingesetzt [8]. Ingenolmebutat ist ein Diterpenester, welcher aus dessem Latex isoliert wird und zur Therapie der aktinischen Keratose als Fertigarzneimittel im Handel ist [8, 9]. Ein weiteres Anwendungsgebiet, über das häufig berichtet wird, ist die Nutzung von Milchsaft zur Blutstillung und Wundheilung nach Verletzungen. Einige Beispiele hierfür sind Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), Calotropis procera (AITON) DRYAND. (Apocynaceae), Pedilanthus tithymaloides (L.) POIT. (Synonym von Euphorbia tithymaloides L.) (Euphorbiaceae), Euphorbia caducifolia HAINES (Euphorbiaceae), Jatropha gossypiifolia L. (Euphorbiaceae), Holarrhena pubescens WALL. EX G.DON (Apocynaceae), Calotropis gigantea (L.) DRYAND. (Apocynaceae), Ipomoea carnea JACQ. (Convolvulaceae) und Euphorbia neriifolia L. (Euphorbiaceae) [10-14].

1.2 Euphorbiaceae JUSS.

Die zur Ordnung Malpighiales gehörenden Wolfsmilchsgewächse zählen laut der Datenbank "The Plant List" mit derzeit über 6500 Arten in 228 Gattungen und drei Unterfamilien (Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae) zu einer der größten bedecktsamigen Pflanzenfamilien [15, 16]. Sie wurde erstmals von Antoine-Laurent de Jussieu im Jahr 1789 näher beschrieben [17]. Der lateinische Name stammt aber vermutlich bereits aus dem ersten Jahrhundert nach Christus und bezieht sich auf den Leibarzt von König Juba II. von Mauretanien. Den Gelehrten Plinius der Ältere erinnerte eine von ihm entdeckte Pflanze an jenen Leibarzt namens "Euphorbus", aufgrund ihres riesigen und sagenhaften Erscheinungsbildes. Dabei handelte es sich vermutlich um *Euphorbia officinarum* L. oder

Euphorbia resinifera O.BERG [18]. Der deutsche Name geht hingegen auf den beißenden Geschmack des häufig enthaltenen Latex zurück [19]. Dabei enthalten längst nicht alle Arten Milchsaft. Der Habitus ist sehr vielfältig, es kommen Bäume oder baumartige Pflanzen neben Sträuchern und krautigen Pflanzen vor. Es gibt sukkulente und nicht-sukkulente Arten. Häufig vorkommende Nebenblätter können teilweise zu Dornen umgewandelt sein. Die Familie ist vor allem in gemäßigten, subtropischen und tropischen Gebieten beheimatet [20]. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Pflanzen der Gattung *Euphorbia* L. untersucht. Diese Gattung stellt mit etwa 2000 Arten nicht nur die größte Gattung innerhalb der Familie dar, sondern auch die Größte aller Bedecktsamer. Der Artenreichtum spiegelt sich auch in einer großen Variabilität wider. Bekannt für diese Gattung ist eine große Vielfalt an Xerophyten. Typisch ist der Blütenstand Cyathium, ein Pseudanthium [21].

1.3 Proteasen

Proteasen (Peptidasen, Proteinasen) spalten hydrolytisch Peptidbindungen und zählen daher nach der Klassifizierung der Enzyme Commission (EC) zur Klasse 3, den Hydrolasen. Sie bilden hier die Unterklasse 4, der diverse Unter-Unterklassen zugeordnet sind, die sich zum einen von der Art der zu katalysierenden Reaktion ableiten und zum anderen von der Beschaffenheit des aktiven Zentrums der Protease. Darin enthalten sind Exopeptidasen, die das Substrat am Amino- oder Carboxy-Terminus angreifen, sowie Endopeptidasen, die das Substrat innerhalb der Proteinkette spalten [22]. Eine weitere Klassifizierung für Peptidasen erfolgt in der MEROPS Datenbank (http://merops.sanger.ac.uk/). Dabei wird eine Protease zunächst nach der im aktiven Zentrum für die Katalyse hauptverantwortlichen Struktur (Aminosäuren Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Serin, Threonin oder Metallion) eingeteilt, diese dann aber noch weiter in Clans und Familien spezifiziert. Hierbei werden, wenn erwiesen, evolutionäre Strukturverwandtschaften oder aber bestimmte Struktureigenschaften in der katalytischen Region berücksichtigt [23].

Proteasen sind beteiligt an vielen komplexen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie z.B. Proteinabbau, Hämostase, Fibrinolyse, Zellwachstum und Migration, Entzündung und Tumorwachstum [22].

1.3.1 Einsatz von Proteasen als Therapeutika

Im Vergleich zur gesamten Anzahl an Arzneistoffen, ist der Anteil an Proteasen gering. Einsatz finden sie z.B. in Kombination mit Amylasen und Lipasen bei Verdauungsbeschwerden. Verwendet wird häufig das Pankreatin, welches ein aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen isoliertes Gemisch dieser Enzyme darstellt [24]. Eine aus Aspergillus oryzae (AHLBURG) E. COHN gewonnene Protease wird bei gleicher Indikation genutzt, ebenso wie die Protease Pepsin in Form von Arzneiweinen traditionell angewendet wird [22, 25]. Zur Auflösung von Fibrin-Gerinnseln werden Plasminogen-Aktivatoren eingesetzt, die im Kapitel 1.4.3 näher beschrieben werden [26]. Nach Informationen des Paul Ehrlich Instituts (http://www.pei.de/DE/arzneimittel; letzter Aufruf 04/2015) sind in Deutschland außerdem diverse proteolytische Blutgerinnungsfaktoren (bzw. teilweise deren Zymogene) als Arzneimittel zugelassen. Thrombin ist ein Bestandteil von Fibrinkleber und kommt u.a. als Gewebekleber zur Förderung des Verschlusses oder zur Nahtsicherung nach Operationen zum Einsatz. Gerinnungsfaktor IX ist zugelassen zur Behandlung und Prävention von Blutungen bei Hämophilie B. Bei einem angeborenen Faktor VII Mangel, kann dieser zur Behandlung von Blutungsstörungen substituiert werden. Der Faktor X wird zusammen mit anderen Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, Protein C und S) z.B. als Antidot bei einer Überdosierung mit Vitamin K-Antagonisten verwendet. Protein C, welches nach Aktivierung als Protease fungiert, findet auch alleine einen Einsatz. Unter anderem zur Therapie entzündlicher Erkrankungen wird Bromelain eingesetzt. Dabei handelt es sich um aus Ananas comosus MERR (Bromeliacae) isolierte Cystein-Proteasen. Zu unterscheiden sind Stamm- und Frucht-Bromelain, häufig wird auch ein Extrakt aus Stamm und unreifen Früchten als Bromelain bezeichnet. Letzterer enthält eine komplexe Mischung aus verschiedenen Proteasen und anderen Enzymen, sowie Protease-Inhibitoren und weitere Bestandteile [27]. Ebenfalls finden auf diesem Gebiet Anwendung die Cystein-Protease Papain aus Carica papaya L. (Caricaceae), sowie die Serin-Proteasen Trypsin und Chymotrypsin [27]. Die aus diversen Clostridium Arten stammenden Botulinumtoxine besitzen eine Metallo-Protease Aktivität und werden z.B. bei Dystonien und in der kosmetischen Behandlung eingesetzt [24].

1.3.2 Einsatz von Proteasen in anderen Bereichen

Neben einer pharmazeutischen Anwendung, finden Proteasen vor allem einen Einsatz in anderen Bereichen. In Waschmitteln werden sie neben Amylasen, Cellulasen und Lipasen zur unterstützenden Entfernung von Flecken angewendet [28]. Hier sind insbesondere Proteasen mit einer Temperaturstabilität und Aktivität in basischen pH Bereichen erforderlich. Verwendet werden hauptsächlich die Subtilisine, die u.a. aus *Bacillus* Arten isoliert werden. So besitzen Subtilisin Carlsberg und Subtilisin BPN' ein Optimum ihrer proteolytischen Aktivität bei einem pH-Wert von 10 und einer Temperatur von 60 °C [22]. Andere Protease-Anwendungen sind z.B. Lederbehandlung, Soja- und Milchprodukteverarbeitung und Abwasserbehandlung [29]. Bei der Lederbehandlung werden Pankreasenzyme wie Trypsin alleine oder in Kombination mit anderen Proteasen aus *Bacillus* und *Aspergillus* Arten u.a. zur Enthaarung und zum Beizen verwendet [22]. Bei der Herstellung von Käse wird vor allem das Labenzym Chymosin eingesetzt, die Protease hat eine hohe Spezifität für das Milchprotein Casein. Neben dem aus Kälbermagen isolierten sowie biotechnologisch hergestelltem Chymosin finden aber auch Proteasen aus Mikroorganismen wie z.B. *Rhizomucor* und *Bacillus* Arten Anwendung [22]. Auch Proteasen pflanzlicher Herkunft werden zur Käseherstellung erforscht und eingesetzt [30]. Weitere Anwendungsgebiete für Proteasen in der Lebensmittelindustrie sind z.B. die Verbesserung der Dehnbarkeit und Festigkeit bei der Teigwarenproduktion, die Reduzierung des bitteren Geschmacks von proteinhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln und die Zartmachung von Fleisch [22, 31].

1.3.3 Funktion der im Milchsaft enthaltenen Proteasen

Proteolytische Enzyme spielen auch in der Pflanzenphysiologie eine wichtige Rolle. Sie scheinen an verschiedenen intra- und extrazellulären Prozessen wie Seneszenz, Abbau von Speicherproteinen zur Bereitstellung für die Keimung der Samen, Entwicklung und Reifung von Früchten sowie weiteren regulatorischen Mechanismen beteiligt zu sein [32, 33]. Die Rolle der Proteasen im Milchsaft ist bisher nicht geklärt. Vermutet wird häufig die Beteiligung am Verteidigungsmechanismus der Pflanze. So könnten sie einerseits an der Förderung der Gerinnung des bei Verletzung der Pflanze austretenden Latex und anschließendem Wundverschluss beteiligt sein. Dadurch könnte auch ein Eindringen von Pathogenen verhindert werden [1, 2, 34]. Andererseits könnten die enthaltenen Proteasen auch selber toxisch auf den Fraßfeind wirken. So zeigte eine Fütterung von Seidenraupenlarven mit den Latex-Cystein-Proteasen Ficin (aus Ficus carica L. (Moraceae)), Papain und Bromelain toxische oder wachstumshemmende Effekte. Ähnliche Effekte wurden bei Larven beobachtet, die sich von Feigen- oder Papayablättern ernähren mussten. Dagegen zeigte sich kein Effekt bei mit dem Cystein-Protease Inhibitor E-64 behandelten Blättern [2, 35]. Der Protease AMP48 aus dem Latex von Artocarpus heterophyllus LAM. (Moraceae) konnten bakterio- und fungistatische Wirkungen nachgewiesen werden [36].

1.3.4 Isolierte Proteasen aus Euphorbiaceae

Die meisten bisher aus Latex isolierten und charakterisierten Proteasen sind Cystein- und Serin-Proteasen. Proteasen wurden bisher hauptsächlich aus Latices der Familien Apocynaceae, Euphorbiaceae und Moraceae isoliert. Eine Übersicht hierzu wurde von Domsalla und Melzig erstellt [34]. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Arten der Familie Euphorbiaceae untersucht wurden, soll die Tab. 1 eine Übersicht über alle in der Literatur zu findenden, bisher aus dieser Familie isolierten und charakterisierten Proteasen geben.

Protease	Herkunft	Masse [kDa]	IEP	pH Optimum	Temp. Opt.	Protease - Klasse	Ref.
Cotinifolin	Euphorbia cotinifolia L.	79,76	7,7	7,0 - 8,0	50 °C	Metallo	[37]
				(Azocasein)			
Curcain	Jatropha curcas L.	22	-	5,6 - 6,0	45-60°C	-	[34, 38]
Eumiliin	Euphorbia milii var. hislopii (N.E.Br) Ursch&Leandri	30	-	8,0 (Casein)	-	Cystein	[39]
EuP-82	Euphorbia lactea HAW.	82	5,1	11 (Fibrinogen)	35 °C	Serin	[40, 41]
Euphorbain	Elaeophorbia						[42]
d ₁	<i>drupifera</i> (THONN.)	117	5,8 - 7,5 (5)	6,3 + 7,8	-	Serin	
d ₂	Stapf. ^a	65	5,2 - 9,1 (5)	6,5 + 7,8 (Azocollagen)	-	Serin	
Euphorbain	Euphorbia lathyris L.						[43]
1		43	4,9	7 -7,5 (Azocollagen)	-	Serin	
Euphorbain	Euphorbia lactea HAW.						[44]
la ₁		66	7,0	la ₁ : 7,5	-	Serin	
la ₂		44	5,0 - 6,4 (3)	(Azocollagen)		Serin	
la ₃		33	4,5			-	
Euphorbain	Euphorbia lactea f.						[44]
lc	cristata HAW.	70	5,0 - 8,0 (5)	8,3 (Azocollagen)	-	Serin	
Euphorbain	Euphorbia pulcherrima						[45]
р	WILLD. EX KLOTZSCH.	74	4,7	7,0 (Azocasein)	-	Serin	
Euphorbain	Euphorbia tirucalli L.						[46, 47]
t ₁		74	5,0 - 5,5 (4)	7,5	-	Serin	
t ₂		74	4,7 - 5,2 (4)	7 - 7,5	-	Serin	
t ₃		74	-	7,5 - 8,0	-	Serin	
t ₄		74	4,0 - 5,0 (4)	6 - 6,5	-	Serin	
Euphorbain	Euphorbia cyparissias L.		5.0	5.0		a .	[48]
y ₁		67	5,2	5,2	-	Serin	
y ₂		33	5,2	5,5	-	Serin	
y 3		6/	6,3	/,0 (Azocollagen)	-	Serin	
Euphorbia protease B	Euphorbia pseudochamaesyce FISCH. & C.A.MEY ^b	82	-	7,5 (Casein)	-	Serin	[49]

Tab. 1: Charakterisierte Proteasen in der Familie Euphorbiaceae

Protease	Herkunft	Masse [kDa]	IEP	pH Optimum	Temp. Opt.	Protease - Klasse	Ref.
E. supina	Euphorbia supina RAF. ^c	80	-	8,0	-	Serin	[50]
protease B				(Casein)			
Hevain	Hevea brasiliensis						[51, 52]
а	(WILLD. EX A.JUSS.)	69	4,3 - 5,7 (4)	6,6	-	Serin	
b	MÜLL.ARG.	58	4,8 - 5,3 (4)	6,3	-	Serin	
1		80	4,9 - 6,9 (6)	6,3 + 7,7 (CGN)	-	Serin	
Hirtin	Euphorbia hirta L.	34	-	7,2	50 °C	Serin	[53]
				(p-tos- GPRNA)			
LGP	<i>Synadenium grantii</i> Ноок ^{г.°}	34,4	-	-	-	Serin	[54]
Miliin	Euphorbia milii	79	4,3	7,5 + 11	60 °C	Serin	[55]
Milin	Des Moul.	51,4	7,2	8,0	60 °C	Serin	[56]
				(Casein)			
Neriifolin	Euphorbia neriifolia L.	35,24	5,7	8,5	55 °C	Serin	[57]
Neriifolin S		94	6,8	9,5	45 °C	Serin	[58]
				(Casein)			
Nivulian-II	Euphorbia nivulia BUCH	43,67	-	6,6	45 °C	Cystein	[59, 60]
	HAM.			(Casein)			
Protease	Euphorbia amygdaloides	54	-	5	60 °C	-	[61]
	L.			(Casein)			
Prunifoline	Euphorbia prunifolia JACQ. ^e	57	-	7,0 (Casein)	55 °C	Serin	[62]
Two	Synadenium	76 ± 2	-	7,0	60 °C	Serin	[63]
proteases	<i>grantii</i> Ноок f. ^d			(Azocasein)			

^aSynonym von *Euphorbia drupifera* THONN., ^bSynonym von *Euphorbia humifusa* WILLD, ^cSynonym von *Euphorbia maculata* L., ^dSynonym von *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS, ^eSynonym von *Euphorbia heterophylla* L., IEP Spalte: Zahlen in Klammern = Anzahl der geladenen Formen; CGN = N-Carbobenzoxyglycine 4-Nitrophenylester, p-tos-GPRNA = N-p-tosyl-Gly-Pro-Arg para-nitroanilide

1.4 Hämostase und Fibrinolyse

Physiologisch herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Blutgerinnung (Hämostase) und der Auflösung von Blutgerinnseln (Fibrinolyse). Pathologisch äußern sich Störungen dieses Gleichgewichts neben einer erhöhten Blutungsneigung aufgrund von z.B. angeborenem Mangel an bestimmten Gerinnungsfaktoren, vor allem in einer Verstopfung von Gefäßen durch Bildung eines Gerinnsels (Thrombus) unterschiedlicher Genese. Thrombotische Erkrankungen führen zur Unterversorgung der umliegenden Gewebe und damit zu teils irreparablen Schäden bis hin zum Tod. Myokardinfarkt, tiefe Beinvenenthrombose mit der möglichen Folge einer Lungenembolie sowie ein ischämischer Schlaganfall gehören zu den Hauptursachen für Mortalität und Langzeitbehinderungen [64].

Die Blutgerinnung ist ein Zusammenspiel zwischen der Aggregation von Thrombozyten und einem komplexen Mechanismus zur Aktivierung von Gerinnungsfaktoren. Die Hämostase endet in einer Spaltung von Fibrinogen durch Thrombin zu Fibrinmonomeren, welche zu einem Fibrinnetzwerk polymerisieren. Der aktivierte Gerinnungsfaktor XIII stabilisiert dieses Netzwerk durch Quervernetzung des Fibrins. Zur Auflösung des Fibrins wird die Protease Plasmin benötigt. Diese hat ein Proenzym, das Plasminogen, welches keine enzymatische Aktivität besitzt. Plasminogen-Aktivatoren (PA) sind für eine Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin verantwortlich (Abb. 1) [26, 65].



Abb. 1: Fibrinbildung und Fibrinolyse (stark vereinfachte schemachtische Darstellung)

1.4.1 Fibrin(ogen)

Fibrinogen ist ein lösliches Dimer aus jeweils drei Ketten, der A α -, B β - und γ -Kette, welche über Disulfidbrücken verbunden sind. Die sechs N-terminalen Enden sind in der Mitte konzentriert und bilden die sogenannte E-Domäne. Die C-terminalen Enden der B β - und γ -Ketten bilden eine globuläre Struktur, die D-Domäne, aus der das C-terminale Ende der Aa-Kette herausragt. Beide Domänen sind verknüpft über gewickelte Spulen (coiled coils), die Teile von α-Helices der drei Ketten enthalten. Thrombin katalysiert die Bildung von Fibrin durch Abspaltung der Fibrinopeptide A und B (FPA, FPB), wodurch neue Endgruppen entstehen: Gly-Pro-Arg (GPR) in der α -Kette, sowie Gly-His-Arg (GHR) in der β -Kette. Beide tragen eine positive Ladung und werden auch Knöpfe / Knäufe (knobs) genannt, die zu Polymerisation nicht-kovalente Interaktionen einer über mit negativ geladenen Löchern / Höhlen (*holes*) in der C-terminalen Region der γ - (α - γ) oder β - Kette (β - β) anderer Fibrin Monomere führen. Die Spaltung von FPA scheint primär stattzufinden und das lineare Wachstum des Fibrin-Polymers zu fördern, gefolgt von einer langsameren Abspaltung des FPB, um dickere Fasern durch seitliches Wachstum zu ermöglichen [66]. Der Gerinnungsfaktor XIIIa stabilisiert Fibrin durch Einführung kovalenter Gln-Lys Querverbindungen. Dies geschieht zunächst zwischen den C-terminalen Enden der y-Ketten und langsamer zwischen den α-Ketten [66, 67].

Domäne / Region	Position	Massenmittel* [Da]
Aα-Kette (P02671)		
Signalpeptid	1 - 19	2113,62
Aα-Kette (Isoform 1)	1 - 866 20 - 866	94973,04 92877,43
Aα-Kette (Isoform 2)	1 - 644 20 - 644	69756,67 67589,99
Fibrinopeptid A	20 - 35	1536,57
α-Kette (Isoform 1)	36 - 866	91358,87
α-Kette (Isoform 2)	36 - 644	66142,50
Bβ-Kette (P02675)		
Signalpeptid	1 - 30	3631,65
Bβ-Kette	1 - 491 31 - 491	55928,15 52314,52
Fibrinopeptid B	31 - 44	1569,61
β-Kette	45 - 491	50762,93
γ-Kette (P02679)		
Signalpeptid	1 - 26	3046,64
γ-Kette	1 - 453 27 - 453	51511,66 48483,03

Tab. 2: Zusammensetzung Fibrinogens nach Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/; letzter Aufruf: 04/2015)

*Werte ohne Modifikationen einzelner Aminosäuren

1.4.2 Plasmin(ogen)

Plasminogen (PLG, Profibrinolysin) ist das Zymogen des Plasmins. Es besteht aus 791 Aminosäuren (ohne Signalpeptid) und hat eine Molekülmasse von 88,4 kDa. Das einkettige enzymatisch inaktive PLG wird durch Plasminogen-Aktivatoren (PA) aktiviert, sie katalysieren die Spaltung zwischen Arg561 und Val562, wodurch die zweikettige Serin-Protease Plasmin (PLM) entsteht. Die größere Kette besteht aus 5 Kringeldomänen, die kleinere Kette enthält eine katalytische Triade mit His603, Asp646 und Ser741 [68]. Das native PLG hat N-terminal einen Glutaminsäurerest (Glu-PLG), jedoch existieren auch Formen mit z.B. N-terminalem Lysin (Lys-PLG), die durch Hydrolyse von beispielsweise Arg67-Met68, Lys76-Lys77 oder Lys78-Val78 entstehen [69]. Glu-PLG hat eine geschlossene

Konformation, währenddessen Lys-PLG eine offenere Konformation besitzt und demzufolge ein bevorzugtes Substrat von PA's ist [68]. Plasmin katalysiert die Bildung von Lys-PLG [70]. Lysin-Bindungsstellen, vor allem in den Kringeldomänen 1 und 4, sind verantwortlich für eine spezifische Bindung an Fibrin, sowie für Interaktionen mit Zelloberflächenrezeptoren und anderen Proteinen, einschließlich des im Plasma zirkulierenden Inhibitors α 2-Antiplasmin (α 2-plasmin inhibitor, α 2-PI) [71-73]. Ein weiterer natürlicher Inhibitor von Plasmin ist das α 2-Makroglobulin (α 2-M) [73].

Wie in Abb. 2 dargestellt, spaltet Plasmin initial weite C-terminale Teile der (A) α -Kette sowie N-terminale Teile der (B) β -Kette des Fibrin(ogen)s, was zu Fragment X führt. Dadurch werden die gewickelten Spulen freigelegt und Fragment X zu Fragment Y (bestehend aus der E- und einer D-Region) und einem D-Fragment gespalten. Fragment Y wird anschließend durch Plasmin zu einem D- und E-Fragment weiter hydrolysiert. War das Fibrin bereits quervernetzt, also kovalent verbunden, entstehen D-Dimere statt einzelner D-Fragmente, sowie weitere Fibrin-Abbauprodukte (FDP, fibrin degradation products) [66, 67, 72-74]. Daneben sind weitere Spaltpositionen möglich [72]. Plasmin baut neben Fibrin und Fibrinogen auch weitere Plasmaproteine ab, wie die Gerinnungsfaktoren V, VIII, IX, XI und XII, Insulin und Wachstumshormone [75].



Abb. 2: Fibrin(ogen)olyse durch Plasmin

Abbildung nach Cesarman-Maus / Hajjar [72]

1.4.3 Plasminogen-Aktivatoren

Plasminogen-Aktivatoren (PA) aktivieren das fibrinolytische Enzym Plasmin. Daneben spielen sie eine wichtige Rolle in einigen physiologischen Prozessen, wie Gewebewachstum

und Umgestaltung (remodelling), Wundheilung, Angiogenese und Embryogenese [76]. Im Menschen kommen zwei Plasminogen-Aktivatoren natürlich vor: der gewebsspezifische PA (t-PA) und die hauptsächlich in Hinsicht auf Fibrinolyse im Urogenitaltakt agierende Urokinase (u-PA).

Plasminogen-Aktivatoren sind die einzigen etablierten Arzneistoffe, die zur Auflösung von entstandenen Blutgerinnseln bei Herzinfarkt, Schlaganfall, tiefer Beinvenenthrombose und Lungenembolie, in Kombination mit gerinnungshemmenden Arzneistoffen, eingesetzt werden. Im Laufe der letzten 85 Jahre wurden viele Versuche unternommen einen PA zu finden, der zuverlässig einen Thrombus auflösen kann, ohne dabei schwerwiegende unerwünschte Wirkungen zu haben. Jedoch sind leider nur wenige PA's bisher für einen therapeutischen Einsatz zugelassen (* in Tab. 3). Es gibt im Grunde zwei Typen von Plasminogen-Aktivatoren, die wiederum in drei Generationen unterteilt werden können.

	Nicht	Fibrin-spezifisch
	Fibrin-spezifisch	
1. Generation		Saruplase (scu-PA)
	Urokinase (tcu-PA)*	
	Streptokinase*	
2. Generation		Alteplase (rt-PA)*
		APSAC
3. Generation		Duteplase
		Reteplase*
		Tenecteplase*
		Desmoteplase
		Staphylokinase
		Lanoteplase
		Monteplase
		Pamiteplase
		Amediplase
Andere		TSV-PA
		Haly-PA
		LV-PA
		GHRP-scu-PA-32K
		GHRP-SYQ-K2S

Fab. 3: Einteilung	g der	Plasminogen-A	Aktivatoren
--------------------	-------	---------------	-------------

APSAC, acylated plasminogen streptokinase activator complex; GHRP, Gly-His-Arg-Pro; LV, Lachesis muta muta venom; scu, single-chain urokinase; SYQ, Ser-Tyr-Gln; tcu, two-chain urokinase; TSV, Trimeresurus stejnegeri venom; * in Deutschland zur Lysetherapie im Handel. Tabelle nach Flemmig/Melzig [26]

Plasminogen-Aktivatoren der ersten Generation aktivieren frei zirkulierendes PLG zu Plasmin. Dadurch kann es zu schweren unerwünschten Blutungen kommen, da neben Fibrin auch freies Fibrinogen und weitere Gerinnungsfaktoren abgebaut werden (siehe 1.4.2). Dies geschieht trotz Inhibierung von freiem Plasmin durch seinen Inhibitor α 2-Antiplasmin, da nach Gabe eines Plasminogen-Aktivators der ersten Generation, eine Erschöpfung der Menge des Inhibitors im Plasma auftreten kann [64]. Dennoch finden Urokinase und Streptokinase einen therapeutischen Einsatz.

Zur zweiten Generation gehört u.a. der natürliche t-PA. Er wird von Endothelzellen gebildet und ins Blut konstitutiv sowie rezeptorvermittelt freigesetzt, der gesamte Mechanismus der Bildung und Freisetzung ist jedoch bisher nicht geklärt [77, 78]. Die Serin-Protease t-PA hat eine Molekülmasse von 70 kDa und besteht aus 530 Aminosäuren [79, 80]. Eine katalytische Triade bilden His322, Asp371 und Ser478 [80]. Sowohl t-PA als auch PLG binden an Fibrin, erst dann erhält t-PA eine erweiterte Affinität zur Katalyse der Spaltung von PLG zu PLM. Letzteres ist durch die Bindung an Fibrin von einer Inhibition durch a2-PI geschützt und kann damit lokal am Thrombus wirken [81, 82]. Es gibt fünf Domänen (Finger-, EGF-, Kringel-1+2, Protease-Domäne), davon scheinen die Finger- und Kringel 2-Domäne für die erhöhte Affinität zu Fibrin verantwortlich zu sein [83-86]. Es findet eine Bindung an spezifische Lysin-Reste im intakten Fibrin oder an C-terminale Reste von bereits partiell durch Plasmin abgebautem Fibrin statt [87, 88]. Ein ähnlicher Mechanismus findet zwischen den Kringel 1 und 4 Domänen des PLGs und Fibrins statt [71, 88]. Ein Nachteil von t-PA ist seine kurze Halbwertzeit (HWZ) von etwa 6 min. Verantwortlich zu sein scheinen u.a. Gln42 - Lys49 in der Finger-Domäne, Tyr67 in der EGF-Domäne, sowie ein Oligosaccharid an Asn117 in der Kringel 1 Domäne [89-92]. Der physiologische Inhibitor PAI-1 (Plasminogen-Aktivator Inhibitor 1) interagiert mit Lys296 - Arg299 in der Protease-Domäne [93]. Aus diesem Grund muss das in der Therapie immer noch als Standard eingesetzte, rekombinant hergestellte t-PA, die Alteplase (rt-PA), in hohen Dosen, nach initialer Bolusgabe infundiert werden. Dadurch ist die Fibrinspezifität nicht mehr in jedem Fall gegeben und das Risiko unerwünschter Blutungen steigt [94, 95].

Die dritte Generation der Plasminogen-Aktivatoren sollte möglichst eine höhere Halbwertzeit und gleichzeitig eine Fibrinspezifität aufweisen. Es handelt sich um Abwandlungen von t-PA, mit modifizierten Aminosäuren, Fehlen bestimmter Domänen oder anderen Abweichungen (Abb. 3).



Abb. 3: Humane und tierische Plasminogen-Aktivatoren mit ihren funktionellen Domänen und Mutationen

hellgraue Schattierung = strukturähnlich zu t-PA; dunkelgraue Schattierung = strukturähnlich zu Urokinase; weiße Linien = Mutationen in der Aminosäuresequenz; diagonale Linien = Struktur abweichend von t-PA und Urokinase; weitere Linien unterteilen die Domänen; S-S = zeigt die Disulfidbrücke, die das zweikettige nach Spaltung des einkettigen Moleküls zusammenhält (weitere S-S Brücken werden nicht gezeigt). F, Finger; EGF, epidermal growth factor; K, Kringel; L, Linker-Region; P, Protease; scu, single-chain urokinase; TSV, Trimeresurus stejnegeri venom; GHRP, Gly-His-Arg-Pro; SYQ = Ser-Tyr-Gln. Abbildung nach Flemmig/Melzig [26]

In der Therapie eingesetzt wird z.B. Reteplase (r-PA), bei der die HWZ zwar erhöht ist, allerdings die Fibrinbindung und Aktivität weniger ausgeprägt sind. Eine zweimalige Bolusgabe erleichtert die Anwendung [96-99]. Tenecteplase (TNK-tPA) hat ebenfalls eine

erhöhte HWZ. Es besitzt außerdem eine Resistenz gegen PAI-1 und behält die Fibrinspezifität des t-PA [100, 101]. Eine einmalige Bolusgabe genügt und es treten weniger schwere Blutungen als unter t-PA Therapie auf [102, 103]. Obwohl weitere Varianten erforscht wurden und werden (Abb. 3), haben bisher in Deutschland keine Weiteren eine Zulassung (http://www.pharmnet-bund.de; letzter Aufruf 04/2015). Viele dieser Varianten haben Vorund Nachteile gegenüber den etablierten Plasminogen-Aktivatoren, die hier in diesem Rahmen nicht weiter erläutert werden sollen, sondern auf die Literatur verwiesen wird [26]. Daneben wurden und werden weitere Plasminogen-Aktivatoren erforscht, die noch keiner Generation zuzuordnen sind, darunter z.B. welche aus Schlangengift (TSV-PA, Haly-PA, LV-PA) oder aus dem Speichel von Vampir-Fledermäusen (Desmoteplase) [26].

1.4.4 Andere fibrinolytische Proteasen

Auch aus Milchsaft wurden bereits Proteasen isoliert, die fibrin(ogen)olytische Aktivität zeigen. Diese sind die aus Latex von Euphorbiaceae Arten isolierten Proteasen Eumiliin, EuP-82, Hirtin, und LGP (siehe Tab. 1), sowie die Proteasen Pergularain e I aus *Pergularia extensa* (JACQ.) N.E. BR. (Synonym von *Pergularia daemia* (FORSSK.) CHIOV.) (Apocynaceae), AMP48 aus *Artocarpus heterophyllus* LAM. (Moraceae), Crinumin aus *Crinum asiaticum* L. (Amaryllidaceae) und drei Proteasen aus *Calotropis procera* (AITON) DRYAND. (Apocynaceae) [36, 104-106]. Neben diesen aus Milchsaft isolierten und charakterisierten Proteasen wurden diverse Latices oder proteolytisch aktive Fraktionen dieser untersucht, die alle im Verlauf der Arbeit Erwähnung finden, hier aber nicht näher beschrieben werden sollen, da es sich nicht um einzelne reine Proteasen handelt.

Auch Proteasen anderer Herkunft wurden auf fibrinolytische Aktivität hin untersucht. Hier sollen nur einige Beispiele genannt werden. Bromelain (siehe 1.3.1) soll z.B. *in vitro* Plasminogen zu Plasmin aktivieren und die Thrombin-induzierte Gerinnselbildung inhibieren [27]. Kitamase, eine Metallo-Protease aus Blättern der *Aster yomena* (KITAM.) HONDA (Asteraceae), zeigt fibrin(ogen)olytische Eigenschaften [107]. Auch einer Serin-Protease aus *Petasites japonicus* (SIEBOLD & ZUCC.) MAXIM. (Asteraceae) konnten diese Eigenschaften nachgewiesen werden [108]. ATFE-I und -II sind zwei Proteasen aus den Blättern von *Allium tuberosum* ROTTLER EX SPRENG. (Amaryllidaceae) und spalten vor allem die A α -Kette von Fibrinogen [109]. Eine aus *Spirodela polyrrhiza* (L.) SCHLEID. (Araceae) isolierte Protease baut neben der A α -, auch die B β -Kette ab und verlängert die Plasmagerinnungszeit [110]. Lebetase aus dem Gift der Levanteotter *Macrovipera lebetina* LINNAEUS oder Fibrolase aus dem Gift der Schlange Agkistrodon contortrix LINNAEUS sind direkt wirkende fibrinolytische Enzyme [111, 112]. Alfimeprase ist ein Abwandlungsprodukt der Fibrolase [113]. Viele weitere Enzyme aus Schlangengiften mit Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse werden erforscht [114]. Lumbrokinasen sind Enzyme aus dem Waldregenwurm Lumbricus rubellus HOFFMEISTER [115]. MEF-2 wurde aus der Fangschrecke Tenodera sinensis SAUSSURE isoliert [116]. Microplasmin besitzt nur die katalytische Domäne des humanen Plasmins und soll weniger durch a2-PI inhibiert werden. Auch TAL6003 ist eine weitere Plasmin Variante, die Kringel Domänen 2 - 5 fehlen hier [113]. Fu-P ist ein fibrinolytisches Enzym des aus Sprossachsen von Chrysanthemum L. isolierten Pilzes Fusarium sp. CPCC480097 [117]. Subtilisin DJ-4 und CK wurden aus *Bacillus* Arten isoliert, Nattokinase (Subtilisin NAT, NK) entsteht bei der Fermentierung von Sojabohnen mit Bacillus subtilis COHN [117, 118]. Nattokinase soll neben einer direkten fibrinolytischen Aktivität, u.a. auch die Freisetzung von t-PA und die Produktion von Plasmin erhöhen, sowie PAI-1 und die Thrombozytenaggregation inhibieren [119]. Thrombinase ist ein direkt fibrinolytisches Enzym aus Bacillus sphaericus [120]. Weitere fibrinolytische Enzyme mikrobieller Herkunft sind in der Literatur zusammengefasst [121].

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte ein möglicher Einfluss von Latices verschiedener Arten der Pflanzenfamilie Euphorbiaceae JUSS. auf die Auflösung von Blutgerinnseln (Fibrinolyse) hin untersucht werden. Im gleichen Zuge musste dafür eine Förderung der Blutgerinnung (Hämostase) ausgeschlossen werden.

Für das Pflanzenmaterial sollte auf eine Kollektion an Arten der Familie Euphorbiaceae JUSS. des Botanischen Gartens Berlin zurückgegriffen werden, an der bereits seit 2006 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Melzig geforscht wird.

Da das Vorhandensein von Proteasen in Milchsäften bekannt ist, bestand der Fokus auf der Untersuchung einer proteolytischen Beeinflussung der Fibrinolyse. Dazu sollte auf eine mögliche Plasminogen-Aktivator Aktivität, sowie auf eine direkte hydrolytische Beeinflussung von Fibrinogen und / oder Fibrin hin getestet werden. Zusätzlich zu Versuchen zur Gerinnung von reinem Fibrin(ogen) sollte die Gerinnung von Blutplasma untersucht werden, um eine Beeinflussung durch weitere im Plasma vorhandene Substanzen, wie z.B. Protease-Inhibitoren zu berücksichtigen.

Neben der Untersuchung der Latices sollte der Einfluss einer erstmals von Dr. André Domsalla aus dem Latex von *Euphorbia mauritanica* L. isolierten Protease nach gleicher Methodik auf die Beeinflussung der Hämostase und Fibrinolyse untersucht werden. Bevor Untersuchungen zum genannten Ziel stattfinden konnten, sollte zunächst die Protease isoliert und eine weitere Charakterisierung vorgenommen werden. Dabei war vor allem auch eine Untersuchung zur Reinheit des isolierten Produktes erforderlich. Zusätzlich zu allgemeinen Versuchen zur Fibrinolyse, sollte eine detailliertere Analyse des möglichen Spaltverhaltens dieser Protease gegenüber Fibrin(ogen) erfolgen.

Weiterhin war das Ziel das Wissen über im Latex vorkommende Proteine, sowie deren mögliche Nutzung, zu erweitern.

2. Material

In der vorliegenden Arbeit wurden aus Gründen der besseren Lesbarkeit Zeichen zur Kennzeichnung von Warennamen weggelassen. Das bedeutet nicht, dass diese Warennamen frei von Rechtsansprüchen Dritter sind. Außerdem wird bei allen im Folgenden genannten Firmen auf die Nennung der Rechtsform verzichtet.

2.1 Geräte

2.1.1 Chromatographie

Größenausschluss-Chromatographie:

Detektor:	UV-VIS L-4250, Merck Hitachi, Tokyo (J)
Interface:	D-7000, Merck Hitachi, Tokyo (J)
Pumpe:	L-6000, Merck Hitachi, Tokyo (J)
Säule:	Discovery BIO GFC (30 cm x 4.6 mm, 5 μ m, 150 Å), SUPELCO, Bellefonte (USA)
Software:	D-7000 HPLC-System-Manager, Merck, Darmstadt
Ionenaustauso	ch-Chromatographie:
Pumpe:	HPLC Pump 64, Knauer, Berlin
Säule:	AcroSep DEAE Ceramic HyperD F, Pall, Ann Arbor (USA)

2.1.2 Elektrophorese

Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad Laboratories, München

Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories, München

Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, München

Power Pack P25, Biometra, Göttingen

Power Supply 0 - 1200 V, CAMAG, Berlin

Power Supply E122, Consort, Turnhout (BE)

Kamera Powershot G5 (7,2 - 28,8 mm 1 : 2,0 - 3,0), Canon, Krefeld

DESAGA CabUVIS inkl. Digidoc Aufsatz mit UV-Filter, SARSTEDT, Nümbrecht

2.1.3 MALDI-TOF-MS

AUTOFLEX-III LRF200-CID, Bruker Daltonic, Bremen MTP 384 target plate polished steel T F, Bruker Daltonic, Bremen MTP AnchorChip TM 800/384 T F, Bruker Daltonic, Bremen Smartbeam-Laser 200, Bruker Daltonic, Bremen Software Biotools (Vers. 3.2), Bruker Daltonic, Bremen Software Flex-Analysis (Vers. 3.3), Bruker Daltonic, Bremen Software Sequence editor (Vers. 3.2), Bruker Daltonik, Bremen

2.1.4 Sonstige Geräte

Analysenwaage Sartorius analytic AC210P, Sartorius, Göttingen

Analysenwaage Sartorius CP224S-0CE, Sartorius, Göttingen

Brutschrank B502, Heraeus Instruments, Hanau

Hamilton-Pipette, Hamilton Bonaduz, Bonaduz (CH)

Kolbenhubpipetten Eppdendorf Research/Reference, Eppendorf, Hamburg

Magnetrührer IKAMAG RCT, IKA-Werke, Staufen

Mikroplatten Reader Tecan infinite 200, Tecan, Crailsheim

Mikroplatten Reader Tecan Spectra Fluor, Tecan, Crailsheim

pH-Meter sympHony SP70P, VWR, Darmstadt

Reinstwasseranlage Labostar UV 2, Siemens, Barsbüttel

Schüttler MS1 / MS2, IKA-Werke, Staufen

Schüttler Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia (USA)

Schüttler SLT Shaker, Elmech, Celle

Thermomixer HLC MKR13, DITABIS, Pforzheim

Thermo Shaker Grant Bio PHMT-PSC24, Grant Instruments, Cambridge (UK)

Ultraschallbad Sonorex RK 100, BANDELIN electronic, Berlin Waage Sartorius portable PT1200, Sartorius, Göttingen Zentrifuge Biofuge pico, Heraeus Instruments, Hanau Zentrifuge Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Hanau Zentrifuge mit Kühlung Mikro 200 R, Hettich Lab Technology, Tuttlingen Zentrifuge Z 233 M-2, HERMLE Labortechnik, Wehingen

2.2 Chemikalien und Substanzen

Alle im Rahmen der Versuche hergestellten Puffer wurden mit analytisch reinem Wasser $(0,055 \ \mu\text{S/cm}$ bei 25 °C, zusätzlich gefiltert durch 0,2 μ m) hergestellt, das der oben genannten Reinstwasseranlage entnommen wurde.

2.2.1 Allgemein

Acetonitril, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Albumin, from bovine serum, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Ammoniumhydrogencarbonat, Carl Roth, Karlsruhe

Agarose, Serva Electrophoresis, Heidelberg

Boc-Val-Leu-Lys-AMC, Bachem, Bubendorf BL (CH)

α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Diammoniumhydrogencitrat, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Dihydroxyacetophenon, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Essigsäure, Fisher Scientific, Schwerte

Ethanol, Carl Roth, Karlsruhe

Calciumchlorid Dihydrat, Merck Chemicals, Schwalbach

Dinatriumhydrogenphosphat, Carl Roth, Karlsruhe

Fibrinogen, human, plasminogenfrei, Enzyme Research Laboratories, South Bend (USA)

Methanol HPLC Reinheit, Fisher Scientific, Schwerte

Natriumacetat-trihydrat, Merck, Darmstadt Natriumcarbonat, Merck, Darmstadt Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt Natriumchlorid, AppliChem, Darmstadt Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, Carl Roth, Karlsruhe Natriumhydroxid Plätzchen, Merck Chemicals, Schwalbach Paraffin wax, Fluka, Buchs (CH) Peptid Standard II, Bruker Daltonic, Bremen Protein Standard I + II, Bruker Daltonic, Bremen Salzsäure 37%, Merck, Darmstadt Trifluoressigsäure (TFA), Acros Organics, Geel, (B) Trinatriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt Trishydroxymethylaminomethan, Merck Chemicals, Schwalbach

Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford (USA)

BCA-Assay, Thermo Scientific, Rockford (USA)

EnzChek Protease Assay Kit green fluorescence, Invitrogen, Darmstadt

In-Gel Tryptic Digestion Kit, Thermo Scientific, Rockford (USA)

2.2.3 Elektrophorese

SDS-/NATIVE-PAGE

Acrylamide/Bis-Lsg. 37,5:1 (30 % w/v), 2,6 % C, Serva Electrophoresis, Heidelberg Ammoniumpersulfate, Serva Electrophoresis, Heidelberg Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining solution, Bio-Rad Laboratories, München Dodecylsulfate-Na-Salt, Serva Electrophoresis, Heidelberg Glycine, Serva Electrophoresis, Heidelberg Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad Laboratories, München 2-Mercaptoethanol, Sigma Aldrich, Taufkirchen Native Sample Buffer, Bio-Rad Laboratories, München Resolving Gel Buffer, Bio-Rad Laboratories, München SDS Solution 10 % (w/v), Bio-Rad Laboratories, München Silver Stain Oxidizer Concentrate, Bio-Rad Laboratories, München Silver Stain Developer, Bio-Rad Laboratories, München Silver Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories, München

- Broad Range MW-Standard, Bio-Rad Laboratories, München

- Precision Plus Protein Dual Color, Bio-Rad Laboratories, München

Stocking Gel Buffer, Bio-Rad Laboratories, München

N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamine, Serva Electrophoresis, Heidelberg Isoelektrische Fokussierung

IEF Sample Buffer, Bio-Rad Laboratories, München

IEF Standards (pI range: 4.45 - 9.6), Bio-Rad Laboratories, München

IEF Anode Buffer (10x), Bio-Rad Laboratories, München

IEF Cathode Buffer (10x), Bio-Rad Laboratories, München

5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat, Carl Roth, Karlsruhe

Trichloressigsäure, Alfa Aesar, Karlsruhe

Zymographie

Zymogram Sample Buffer, Bio-Rad Laboratories, München

10x Zymogram Development Buffer, Bio-Rad Laboratories, München

10x Zymogram Renaturation Buffer, Bio-Rad Laboratories, München

2.2.4 Protease-Inhibitoren

Aprotinin from bovine lung, Sigma Aldrich, Taufkirchen

E-64, Interchim, Montluçon (F)

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Carl Roth, Karlsruhe

Pefabloc SC (AEBSF), Roche, Mannheim

Pepstatin A from microbial source, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Phosphoramidon-dinatrium, Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.2.5 Proteasen

Papain aus Carica papaya L. Latex, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Pepsin (EC.3.4.23.1) aus Schweine Magenschleimhaut, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Plasmin aus humanem Plasma, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Trypsin aus Schweinepankreas, Carl Roth, Karlsruhe

Thermolysin von Bacillus thermoproteolyticus ROKKO, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Thrombin aus humanem Plasma, Sigma Aldrich, Taufkirchen

Tissue Plasminogen Activator (t-PA) aus humaner Melanomzelllinie, Calbiochem/Merck, Darmstadt

2.3 Verbrauchsmaterial

2.3.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

BD Plastipak Einmal-Spritze 20 mL Luer-Lock, Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)

Cellstar 6 Well Cell Culture Plate, steril, Greiner Bio-One, Frickenhausen

Cellstar Serological Pipette 5 / 10 / 25 mL, Greiner Bio-One, Frickenhausen

Filter Whatman FP 30/0,2 CA, GE Healthcare, Solingen

Gelfärbeschalen, MINI, Carl Roth, Karlsruhe

Gel-Load Filterspitzen 20 µL, tief sitzender Filter, natur, Greiner Bio-One, Frickenhausen

GELoader Tips 0,5-20 µL, Eppendorf, Hamburg

Microtubes 0,6 mL, MCT-060-C-S, Axygen, Union City (USA)

Mikrotiterplatte transparent, Rotilabo-Mikrotest-Platte F-Profil, Carl Roth, Karlsruhe

Mikrotiterplatte schwarz, F96 MicroWell, Nunc, Roskilde (DK)

Multi Safe Seal Tubes 1,5 mL, Carl Roth, Karlsruhe

Pipettenspitzen epT.I.P.S. Std. 50-1000 µL, 500-2500 µL, 100-5000 µL, Eppendorf, Hamburg

Pipette Tip Micropoint 0,1-10 µL, VWR, Darmstadt

Reaction Tubes 2 mL, Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sapphire Low Retention Pipette Tips 10 µL, Greiner Bio-One, Frickenhausen

Sterican Kanülen 0,8 x 120 mm 21G x 4 ³/₄, B. Braun, Melsungen

Universal tips yellow 2-200 µL, VWR, Darmstadt

Vivaspin 500 Polyethersulfon 50 MWCO, Sartorius Stedim, Göttingen

2.3.2 Elektrophorese

Ready Gel IEF, precast polyacrylamide gel, pH 3-10, 10-well, 30 μ l, 8.6 x 6.8 cm (W x L), Bio-Rad Laboratories, München

Mini-PROTEAN TGX, precast polyacrylamide gel, 4-15%, 10-well, 30 µl, 8.6 \times 6.7 cm (W x L), Bio-Rad Laboratories, München

2.4 Biologisches Material

<u>Pflanzen</u>

Alle untersuchten Pflanzen stammen aus dem Botanischen Garten der Freien Universität Berlin. *Euphorbia mauritanica* L. wurde zusätzlich im Gewächshaus des Instituts für Pharmazie aus Stecklingen herangezogen, die vom Botanischen Garten zur Verfügung gestellt wurden.

Alle Art-, Gattungs- und Familiennamen, sowie die Erstbeschreiber der Pflanzen sind nach den, zum Zeitpunkt der schriftlichen Anfertigung dieser Arbeit, geltenden Bezeichnungen in der Datenbank "The Plant List" (http://www.theplantlist.org/, letzter Aufruf 28.04.15) benannt. Aufgrund phylogenetischer Untersuchungen wurden sowohl einige Gattungen der untersuchten Arten in den letzten Jahren nun anderen Gattungen zugeordnet, als auch einige

Artnamen geändert. Da im Botanischen Garten Berlin teilweise noch die nun als Synonym geltenden alten Bezeichnungen Verwendung finden, sind diese im Folgenden in eckigen Klammern mit aufgeführt. Des Weiteren sind zu jeder untersuchten Pflanze einmalig in Tab. 15 die Akzessionsnummern des Botanischen Gartens Berlin angegeben. Alle untersuchten Arten gehören der Familie Euphorbiaceae JUSS. an, die Namen ihrer gültigen wissenschaftlichen Erstbeschreiber werden mindestens in Tab. 15 genannt, sind aber häufig zur Vereinfachung in darauffolgenden Abschnitten nicht mehr erwähnt.

<u>Blutplasma</u>

Für die Untersuchungen mit Blutplasma wurde Blut von Schlachtschweinen (*Sus scrofa domestica* L.) verwendet, welches von der Lehr- und Versuchsanstalt für Tierzucht und Tierhaltung e.V. (LVAT), Teltow-Ruhlsdorf, zur Verfügung gestellt wurde.

3. Methoden

3.1 Gewinnung von Latex

Zur Gewinnung des Latex wurde die Pflanze mit einem sauberen Skalpell, je nach Größe der Pflanze, angeritzt oder angestochen (Abb. 4). Der austretende Milchsaft wurde in einem kleinen Reaktionsgefäß aufgefangen, welches mit einem bestimmten Volumen an Puffer vorgefüllt war. Je nach Verwendungszweck und Menge an austretendem Milchsaft, erfolgten die Probenahmen auch mehrfach an unterschiedlichen Stellen der Pflanze, jedoch immer am gleichen Pflanzenteil. Die Reaktionsgefäße wurden mehrmals umgeschwenkt und auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm (18626 x g) für 30 - 60 min bei 4 °C. Dabei kam es zu einer Trennung der Bestandteile mit einem möglichst klaren Überstand bzw. in einigen Fällen zu einer möglichst klaren Zwischenphase. Diese klare bis leicht getrübte Phase wurde für die weiteren Versuche verwendet und ist im Folgenden als Latex bezeichnet, abzugrenzen vom Rohlatex.



Abb. 4: Anritzen einer Pflanze zur Gewinnung von Latex

3.2 Gewinnung von Plasma

Die Gewinnung von Schweineplasma, im Folgenden als Plasma bezeichnet, erfolgte aus frischem Blut vom Schwein (Herkunft siehe 2.4). Vom Schweineblut wurden je 45 mL in mit 5 mL Citratpuffer (3,8 %) gefüllte Tubes gegeben und 5 - 10 x umgeschwenkt. Nach spätestens 1 h wurden die Tubes bei 2500 x g zentrifugiert, um das Plasma vom Hämatokrit

zu trennen. Bei unzureichender Trennung wurde der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert, anschließend das Plasma bis zur Verwendung in Gefäßen zu je 2 mL bei -80 °C eingefroren.

3.3 Protein – Gehaltsbestimmungen

Zur Bestimmung von Gesamtprotein in Proben kommen standardmäßig verschiedene optische Verfahren zum Einsatz, die jeweils unterschiedliche Strukturen der Proteine nachweisen. Da das Vorkommen bestimmter Aminosäuren sowie Seitenketten in Proteinen stark variiert, sind die Methoden mit einem gewissen Fehler behaftet und nicht direkt miteinander vergleichbar [122]. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich der BCA-Assay aufgrund der schnellen und einfachen Durchführbarkeit, sowie der geringen Störanfälligkeit angewendet. Daneben kam auch die Methode nach Bradford zum Einsatz. Beide Methoden sind im Folgenden kurz beschrieben.

3.3.1 BCA – Assay

Für den BCA-Assay verwendet man ein Gemisch aus Kupfersulfat und Bicinchoninsäure. Die Cu²⁺- Ionen werden im alkalischen Milieu durch bestimmte enthaltene Aminosäuren (Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan) und Peptidbindungen zu Cu⁺- Ionen reduziert [123]. Zwei Moleküle Bicinchoninsäure bilden mit Cu⁺-Ionen einen violetten Komplex, der photometrisch vermessen werden kann [124].

Es wurde ein Kit der Firma Thermo Scientific verwendet und gemäß der Vorschrift für 96well Mikrotiterplatten vorgegangen. Dabei wurden zu 25 μ L Probe 200 μ L eines Gemisches aus 50 Teilen Reagenz A (alkalische Bicinchoninsäurelösung) und einem Teil Reagenz B (4 %ige Kupfersulfatlösung) gegeben. Die transparenten 96well Platten wurden für 30 s geschüttelt und anschließend bei 37 °C über 30 min inkubiert. Nach 5 minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei 560 nm im Mikroplatten Reader. Als Standard diente die polynomische Regression einer BSA-Lösung im Konzentrationsbereich von 20 - 2000 μ g/mL. Vor allem aufgrund von häufigen leicht getrübten Untersuchungslösungen, wurde neben einem Blindwert zusätzlich ein Kontrollwert gemessen, bei dem an Stelle des BCA-Reagenzes lediglich Puffer zugefügt wurde.

3.3.2 Bradford Assay

Bei der Gehaltsbestimmung von Proteinen nach Bradford wird als Reagenz Coomassie Brilliant Blau G-250 verwendet. Kationische und unpolare Seitenketten in Proteinen bilden mit dem Reagenz in saurer Lösung einen blauen Farbkomplex [125].

Auch hier wurde ein Kit der Firma Thermo Scientific verwendet. Für eine Bestimmung in 96well Platten wurden 10 μ L Probe mit 300 μ L Reagenz versetzt (100 - 1500 μ g/mL), 30 s geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm. Bei sehr geringem Proteingehalt (1 - 25 μ g/mL) wurden jeweils 150 μ L von Probe und Reagenz wie oben behandelt. Eine Auswertung erfolgte ebenfalls gegen einen BSA-Standard.

3.4 Protease – Aktivitätsbestimmungen

3.4.1 Allgemeine proteolytische Aktivität

Zur Untersuchung auf eine mögliche proteolytische Aktivität diente das EnzChek Protease Assay Kit. Dieses enthält den fluoreszierenden Farbstoff BODIPY-FL (4,4-Difluoro-5,7dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-S-indacen-3-propionsäure), welcher durch Bindung an Casein in seiner Fluoreszenz gemindert ist (Quenching). Durch proteolytische Spaltung kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz (Dequenching) [126].

Das Reagenz wurde gemäß der Herstellervorschrift gelöst und verdünnt, dann mit leichten Abweichungen von der Vorschrift wie folgt verfahren: 25 μ L Probe wurden mit 100 μ L Reagenz in einer schwarzen 96well Mikrotiterplatte versetzt, für 30 s geschüttelt und 60 min bei 37 °C unter Vermeidung von Licht inkubiert. Im Mikroplattenreader erfolgte nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 485 nm, die Messung der Emission bei 535 nm. Als Positivkontrolle diente die Serin-Protease Trypsin.

3.4.2 Aktivität gegenüber einem spezifischen Peptidsubstrat für Plasmin

Als spezifische Peptidsubstrate sind kleine Aminosäureketten (i.d.R. 1 - 5 AS) definiert, die meist eine bestimmte Sequenz eines Proteins widerspiegeln oder von dieser abgeleitet sind, von denen bekannt ist, dass bestimmte Proteasen für sie eine hohe Spezifität besitzen. Diese Peptide sind an Farbstoffe gebunden, die dadurch gequencht sind, ähnlich wie bereits unter 3.4.1 beschrieben. Man spricht auch von chromogenen oder fluorogenen Substraten [127,

128]. Ein Peptidsubstrat mit den Aminosäuren Valin, Leucin und Lysin gilt, im Gegensatz zu anderen Peptidsubstraten, als besonders spezifisch für eine Spaltung durch Plasmin [129].

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse von Untersuchungen an einem spezifischen Substrat gezeigt, das an 7-Amino-4-methylcumarin (AMC) gebunden ist (Abb. 5). AMC ist ein Fluoreszenzfarbstoff und eignet sich daher sehr gut auch für leicht getrübte Lösungen. Versuche mit einem an para-Nitroanilin (pNA) gekoppelten Substrat führten aus diesem Grund für die Zwecke dieser Arbeit nicht zum Erfolg. Die Durchführung erfolgte analog zu 3.4.1, die Exzitationswellenlänge betrug 360 nm, die Emissionswellenlänge 465 nm. Die Konzentration des Substrats Boc-Val-Leu-Lys-AMC betrug 10 μM.



Abb. 5: Schematische Darstellung der Aktivitätsmessung von Milchsaft mit einem spezifischen Peptidsubstrat

3.4.3 Plasminogen-Aktivator Aktivität

Eine Spaltung von Plasminogen zu Plasmin durch eine zugesetzte Probe sollte ermittelt werden. Da für die Aktivität der humanen Plasminogen-Aktivatoren Fibrin erforderlich ist bzw. es die Aktivität stark erhöht, wurde in diesem Assay zusätzlich Fibrin aus Fibrinogen durch Thrombin erzeugt.

Der Versuch wurde in Anlehnung an die Methode von Longstaff und Whitton durchgeführt [130]. Zu 10 μ L Probe wurden 10 μ L humanes Plasminogen (4 mg/mL), 10 μ L humanes Thrombin (6,4 U/mL) und 10 μ L humanes plasminogenfreies Fibrinogen (2,5 mg/mL) zugesetzt. Nach Zugabe von 100 μ L des spezifischen Substrats Boc-Val-Leu-Lys-AMC (10 μ M) wurde analog zu 3.4.2 verfahren. Der ermittelte Wert wurde verglichen mit den Ergebnissen ohne Zusatz von Plasminogen, um den direkten Einfluss auf das Substrat zu berücksichtigen. Als Positivkontrolle diente t-PA (0,25 μ g/mL).
3.5 Trübungsmessungen mit Fibrin(ogen)

Der Einfluss von Proben auf Fibrin(ogen) sollte durch eine zeitliche Messung der Trübung einer Lösung untersucht werden. Dazu wurde die Trübung in einer Mikrotiterplatte photometrisch durch Messung der Absorption bei 560 nm an mehreren Punkten im Well erfasst. Die Methodik scheint in ähnlicher Weise auch von anderen Gruppen verwendet worden zu sein, allerdings ausschließlich für einen Test auf thrombinartige Wirkung, durch Gerinnung von reinem Fibrinogen zu Fibrin in Abwesenheit von Thrombin [104, 105, 131-133].

3.5.1 Gerinnung von Fibrinogen

Thrombin spaltet vom Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B ab, was zu einer Entstehung von unlöslichem Fibrin und dadurch zur Trübung der Lösung führt.

Je nach Versuch wurden 5 μ L (Mauritanicain) bzw. 15 μ L (Latices) Probe mit 75 μ L einer Fibrinogen-Lösung in einer 96well Platte versetzt, 30 s geschüttelt und die Absorption bei 560 nm über 30 min bei einer Temperatur von 37 °C gemessen. Dabei betrug die Konzentration der Fibrinogen-Lösung, soweit nichts anderes angegeben ist 2,5 mg/mL. Für jede Probe wurde ein Kontrollwert mitgeführt, indem statt des Fibrinogens nur Puffer hinzugesetzt wurde, um eine evtl. bereits vorhandene Trübung der Probe-Lösung zu berücksichtigen. Thrombin diente als Positiv-Kontrolle.

3.5.2 Gerinnungshemmung durch Fibrin(ogen)olyse

Plasmin spaltet neben Fibrin auch Fibrinogen und verhindert damit eine Gerinnung zu Fibrin. Inkubiert man also eine Fibrinogen-Lösung mit Plasmin und fügt anschließend Thrombin hinzu, kommt es zu einer verminderten Gerinnung und dadurch zu einer geringeren Trübung der Lösung. Ebenso kann ein Lyse des entstandenen Fibrins die Minderung der Trübung im Vergleich zum Kontrollwert verursachen.

Es wurden über 30 min eine Mischung aus 5 μ L (Mauritanicain) bzw. 15 μ L (Latices) Probe und 75 μ L Fibrinogen (2,5 mg/mL) bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 μ L Thrombin (6,4 U/mL). Die Lösung wurde 30 s geschüttelt und die Absorption bei 560 nm über 30 min verfolgt. Neben einem Blindwert ohne Probe-Lösung wurde jeweils ein Kontrollwert ohne Zugabe von Thrombin mitgeführt, um Trübungen in der Probe-Lösung zu berücksichtigen. Als Vergleich diente eine Messung mit Probenpuffer statt Probenzusatz. Des Weiteren wurden Versuche durchgeführt, bei denen wie oben beschrieben vorgegangen wurde, jedoch die Zugabe von Thrombin gleich zu Anfang, also ohne vorherige Inkubation des Fibrinogens mit der Probe, erfolgte.

3.6 Trübungsmessungen mit Plasma

Ein Einfluss von Proben auf die Gerinnung von Plasma erfolgte durch Messung eines entstehenden Plasma-Gerinnsels. Calcium ist für die natürliche Gerinnung notwendig. Zur Verhinderung einer Gerinnung bei der Gewinnung des Plasmas, wurde dieses zuvor mit Citrat im Komplex gebunden. Durch Ergänzung von Calcium im Überschuss, steht dieses wieder zur Verfügung, so dass eine Gerinnung erfolgen kann. Die Detektion der Gerinnung erfolgte bei allen Untersuchungen durch photometrische Trübungsmessung in einer Mikrotiterplatte. Weitere Methoden wären eine visuelle Detektion oder die Verwendung eines Koagulometers, wie bei der Untersuchung anderer Latices in der Literatur zu finden ist [54, 134, 135].

3.6.1 Calciumunabhängige Gerinnungsauslösung

Eine Auslösung der Gerinnung, die ohne den Cofaktor Calcium erfolgt, wurde ermittelt durch Mischung von 30 μ L Probe mit 30 μ L Plasma und anschließender Inkubation der Lösung bei 37 °C über 30 min unter Messung der Absorption bei 560 nm.

3.6.2 Beeinflussung der Recalcifizierungszeit

Die Beeinflussung der Gerinnungszeit von humanem Plasma in Gegenwart von Calcium erfolgte durch Inkubation von 30 μ L Probe mit 30 μ L Plasma für 30 min bei 37 °C und anschließender Zugabe von 30 μ L CaCl₂ (25 mM). Die Absorption bei 560 nm wurde über 30 min bei 37 °C gemessen. Ebenso wurden Versuche durchgeführt, bei denen CaCl₂ gleich zu Anfang mit zugesetzt wurde. Bei allen Versuchen erfolgte eine Berücksichtigung einer evtl. vorhandenen Trübung der Probenlösung durch Messung eines Kontrollwertes ohne Zusatz von CaCl₂. Des Weiteren diente ein Blindwert mit Probenpuffer statt Probe als Referenz für eine normale Recalcifizierungszeit.

3.7 Fibrin(ogen)-Platten-Tests

Unter Platten-Test ist eine Methode zu verstehen, bei der das Substrat einer Protease z.B. in Kombination mit Agarose auf einer Platte verteilt wird. Durch Ausstanzen kleiner Löcher, in die die zu analysierende Protease gegeben wird, lässt sich ein möglicher Abbau des Substrates verfolgen. Diese Methode zur Messung einer fibrinolytischen Aktivität wurde bereits 1952 erstmals von Astrup und Müllertz beschrieben und im Laufe der Jahre mit diversen Modifikationen bei der Suche nach fibrinolytisch aktiven Substanzen standardmäßig durchgeführt [136, 137].

3.7.1 Fibrinogen-Agarose-Platte

Für die Herstellung eines Agarose-Fibrinogen Gels wurden 24 mg Agarose in 1 mL 10 mM Phosphatpuffer (pH 7) suspendiert und unter Schütteln auf 85 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf 45 °C abgekühlt. Parallel wurde eine Lösung von 1 mL Fibrinogen (4 mg/mL) auf ebenfalls 45 °C gebracht. Durch vorgewärmte Pipettenspitzen wurden beide Lösungen vermischt und auf eine Platte mit einem Durchmesser von 3,5 cm aufgebracht. Nach Aushärten der Platte für 1 h bei Raumtemperatur, konnten 3 - 4 Löcher (d = 6 mm) ausgestanzt werden. Nach Auftragen von 7,5 µL Testsubstanz wurde die Platte für ein bestimmtes Zeitintervall inkubiert. Als Positivkontrolle diente Thrombin.

3.7.2 Fibrin-Agarose-Platte

Die Herstellung und Durchführung erfolgte analog zu 3.7.1, jedoch wurden zu 980 µL Fibrinogen-Lösung (4 mg/mL), unmittelbar vor dem Vermischen mit der Agarose-Lösung, 20 µL einer Thrombin-Lösung (25 U/mL) hinzugegeben. Die Aushärtung, bei der eine Trübung des Gels erfolgt, wurde wie auch die Inkubation mit den Proben im Trockenschrank bei 37 °C durchgeführt. Plasmin diente als Positivkontrolle.

3.8 Auflösung von Plasma-Gerinnseln

Plasma gerinnt nach Zugabe von Ca^{2+} innerhalb weniger Minuten. Ein mögliches Auflösen eines entstandenen Gerinnsels durch Probenzusatz wurde mit der folgenden Methode untersucht. 160 µL Plasma wurden mit 20 µL Calciumchlorid (0,25 M) in einem Reaktionsgefäß vermischt und über Nacht stehen gelassen. Da sich im Plasma auch diverse Protease-Inhibitoren befinden, sollten die Plasma-Gerinnsel vor Zugabe der Probelösung gewaschen werden. Hierzu wurde die durchgehend trübe Masse aus geronnenem Plasma mit einem Spatel umgerührt, wobei ein sichtbares, weißes, zusammenhängendes Gerinnsel am Spatel neben einer sonst nun relativ klaren Flüssigkeit verblieb. Der Gerinnsel-Klumpen wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend dreimalig mit 200 μ L PBS gewaschen. In einem 600 μ L Reaktionsgefäß wurde das Gerinnsel mit 100 μ L Probelösung versetzt und für 24 h bei einer Temperatur von 37 °C belassen. Die Detektion erfolgte visuell und wurde durch abfotografieren dokumentiert.

3.9 Elektrophorese

Bei der Elektrophorese geht es im Allgemeinen um die Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen von der Ladungsgröße, der Molekülmasse, der Struktur des Moleküls sowie vom Trägermedium ab.

3.9.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode, bei der die Trennung der Proteine in einer Gelmatrix erfolgt. Hierzu werden die Proteine mit einem Probenpuffer vermischt und in eine Geltasche aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Proteine im elektrischen Feld. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt hier auch von der Größe der Gelporen ab. Kleine Proteine wandern schneller durch die Gelmatrix als größere Proteine.

3.9.1.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Dies gelingt durch Zusatz von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) zum Proben- sowie Laufpuffer. Das SDS lagert sich an die Proteine an, so dass nun alle Proteine eine, mit vernachlässigbaren Unterschieden, negative Nettoladung besitzen. Eine Auftrennung erfolgt daher nach Molekülmasse, sowie nach Art der Faltung des Proteins. Letzterer Einfluss wird durch Denaturierung des Proteins eliminiert, einerseits bereits durch das SDS, sowie andererseits durch Hitzedenaturierung. Der Zusatz eines Reduktionsmittels (z.B. β -Mercaptoethanol) bewirkt eine Spaltung von Disulfidbrücken und damit die Freilegung eventuell vorhandener Untereinheiten bzw. Komplexe, sofern diese durch Disulfidbindungen verknüpft waren [138].

Die SDS-PAGE erfolgte in Anlehnung an die Methode von Laemmli [139]. Es kamen 10 und 12 %ige Gele zum Einsatz, deren Zusammensetzung in Tab. 4 angegeben ist. Die Proben wurden i.d.R. 1:1 mit Proben-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 25 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol) gemischt und für 5 min bei 95 °C unter Schütteln erhitzt. Anschließend wurden die Proben zum Abkühlen auf Eis gelegt. Das Gel wurde in die innere Kammer eingespannt und diese mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) befüllt. Nach spülen der Taschen mit demselben Puffer wurden je nach Probe und Taschengröße 10 - 30 μ L aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde ein Protein-Standard mitgeführt (siehe 3.9.2). Die äußere Kammer wurde ebenfalls mit dem Laufpuffer befüllt und anschließend eine konstante Spannung angelegt (i.d.R. 100 o. 200 V). Dabei erfolgte eine ständige Kühlung der Gelkammer. Der Lauf wurde gestoppt sobald das Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte. Eine Detektion der Banden erfolgte mit Coomassie- oder Silber-Färbung (siehe 3.9.6).

Zur Detektion von Disulfidbrücken oder zur Vermeidung von Bindungsbrüchen durch Hitzeeinwirkung, wurde bei einigen Experimenten der Zusatz von β -Mercaptoethanol (ME) bzw. eine Hitzedenaturierung (Δ) unterlassen. Diese Gele sind dann mit dem Zusatz "ohne Δ " bzw. "ohne ME" deklariert.

Resolving Gel	10 %	12 %
Aqua bidem.	2,05 mL	1,675 mL
1,5 M Tris	1,25 mL	1,25 mL
Acrylamid/Bis (30 %)	1,65 mL	2 mL
SDS (10 %)	50 µL	50 µL
APS (10 %)	25 μL	25 μL
TEMED (10 %)	25 μL	25 μL
Stacking Gel		
Aqua bidem.	1,525 mL	1,525 mL
0,5 M Tris	0,625 mL	0,625 mL
Acrylamid/ Bis (30 %)	332,5 μL	332,5 μL
SDS (10 %)	25 μL	25 µL
APS (10 %)	12,5 μL	12,5 µL
TEMED (10 %)	25 μL	25 μL

Tab. 4: Zusammensetzung eines Gels (1 mm) für die SDS-PAGE

3.9.1.2 Native-PAGE

Bei der Native-PAGE soll die Faltung der Proteine, sowie evtl. vorhandene Disulfidbrücken erhalten bleiben. Im Unterschied zur SDS-PAGE, erfolgte daher hier kein Erhitzen der Proben, sowie keine Zugabe von SDS und β -Mercaptoethanol zum Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 25 % Glycerol, 1 % Bromphenolblau) bzw. zum Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin). Auch die Gele enthielten keinerlei SDS-Zusatz, entsprachen ansonsten aber der gleichen Zusammensetzung wie in Tab. 4 für SDS-Gele. Daneben wurden fertige Gradientgele verwendet (4 - 15 %). Auch die weiteren Laufbedingung sowie die Detektion entsprachen dem der SDS-PAGE (3.9.1.1).

3.9.2 Bestimmung der Molekülmassen

Zur Bestimmung der Molekülmasse der Protein-Banden diente ein Standard (Tab. 5). Es wurde in einem Koordinatensystem für jedes Standard-Protein der Logarithmus der Molekülmasse gegen die Laufstrecke bzw. den Rf-Wert aufgetragen. Aus der resultierenden Geradengleichung konnte so die Molekülmasse für die Proben-Banden errechnet werden. Neben dem Standard in Tab. 5 wurde für einige Untersuchung ein weiterer Standard mit den Molekülmassen 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa verwendet.

Protein	Herkunft	Molekülmasse [kDa]
Myosin	Kaninchen-Skelettmuskel	200
β-Galactosidase	Escherichia coli	116,25
Phosphorylase b	Kaninchen-Muskel	97,4
BSA	Rinder-Plasma	66,2
Ovalbumin	Hühnereiweiß	45
Carboanhydrase	Rinder-Erythrozyten	31
Trypsininhibitor	Sojabohne	21,5
Lysozym	Hühnereiweiß	14,4
Aprotinin	Rinder-Pankreas	6,5

Tab. 5: Proteinstandard für die SDS-PAGE (Zusammensetzung kann je nach Charge variieren)

3.9.3 Isoelektrische Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung ist auch eine Variante der Elektrophorese, sie wird u.a. benutzt um den Isoelektrischen Punkt (IEP) von Proteinen zu bestimmen. Dabei wird das Protein auf ein durch Ampholyten erzeugtes pH-Gradient Gel aufgetragen. Das Prinzip der Trennung beruht darauf, dass die momentane Ladung eines Proteins durch den pH-Wert der Umgebung (in diesem Fall die Gelmatrix) bestimmt wird. Ist der pH-Wert der Gelmatrix größer als der IEP des Proteins, ist die resultierende Nettoladung negativ. Das Protein wandert in diesem Fall in Richtung Anode. Umgekehrt wäre bei niedrigerem pH-Wert und damit positiver Nettoladung, eine Wanderung zur Kathode zu beobachten. Entspricht der pH-Wert der Umgebung dem IEP, kann das Protein sich nicht mehr im elektrischen Feld bewegen [140]. Mit Hilfe von Standardproteinen (Tab. 6) lässt sich so der IEP des Proteins bestimmen. Gleichzeitig bekommt man eine Information darüber, ob sich in einer Probe, die zuvor in einer SDS-PAGE nur eine Bande zeigte, Isoenzyme gleicher Größe, aber mit unterschiedlichem IEP verbergen.

Protein	Isoelekrischer Punkt
Cytochrom c	9,6
Lentil lectin	8,2
	8,0
	7,8
Human hemoglobin C	7,5
Human hemoglobin A	7,1
Equine myoglobin	7,0
	6,8
Human carbonic anhydrase	6,5
Bovine carbonic anhydrase	6,0
β-Lactoglobulin B	5,1
Phycocyanin	4,75
	4,65
	4,45

Tab. 6: Zusammensetzung des Standards zur Isoelektrischen Fokussierung

Das Gel wurde in die innere Kammer eingespannt und die Kammer mit Kathodenpuffer (20 mM Lysin, 20 mM Arginin) befüllt. Nach Spülen der Taschen mit demselben Puffer wurden 20 μ L der zuvor 1:1 mit Probenpuffer (50 % Glycerol) verdünnten Lösung auf das Gel aufgetragen. Der Standard konnte laut Herstellerangaben direkt aufgetragen werden (1 μ L), wurde jedoch zuvor 1:10 mit Aqua bidem. verdünnt. Die äußere Kammer wurde mit dem Anodenpuffer (7 mM Phosphorsäure) befüllt. Anschließend wurde für verschiedene Zeitintervalle eine konstante Spannung angelegt (100 V, 60 min; 250 V, 60 min; 500 V,

30 min). Die Protein-Banden wurden mit der Silber-Färbung (siehe 3.9.6.2) sichtbar gemacht. Dabei erfolgte die Fixierung in diesem Fall mit 3,5 % Sulfosalicylsäure, 10 % TCA und 30 % Methanol für 1 h, gefolgt von einem mehrfachen Wechsel einer Lösung aus 12 % TCA, und 30 % Methanol für mindestens 2 h.

3.9.4 Bestimmung des Fibrinogen-Abbaus

Der Einfluss von Proben auf die A α -, B β - und γ -Kette des Fibrinogens wurde u.a. mittels SDS-PAGE beobachtet. Dazu wurde Fibrinogen mit teils unterschiedlichen Konzentrationen einer Probe inkubiert und anschließend die Reaktionslösung auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, um einerseits eine Konzentrationsabnahme einzelner Ketten und anderseits die Zunahme von Spaltprodukten zu beobachten. Das Grundprinzip der Methode wurde bereits häufig bei der Suche nach fibrinolytisch aktiven Substanzen angewandt und in dieser Arbeit mit leichten Modifikationen übernommen [53, 54, 141].

Zu zwei Teilen einer Fibrinogen-Lösung (1,25 mg/mL) wurde ein Teil der zu untersuchenden Probe gegeben und nach Durchmischung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von gleichem Volumenanteil Probenpuffer und die weitere Probenvorbereitung und SDS-PAGE wie unter 3.9.1.1 beschrieben, sowie die Detektion der Banden mit Coomassie-Färbung (3.9.6.1). Nach gleicher Vorschrift, jedoch mit Pufferlösung statt Zusatz von Fibrinogen, wurden Kontrollgele angefertigt, um evtl. detektierte Banden der im Latex enthaltenen Proteine nicht als Bruchstücke des Fibrinogens zu deuten.

3.9.5 Zymographie

Die Zymographie ist eine Methode, die es erlaubt, neben der Auftrennung von Proteinen, eine Aussage über die proteolytische Aktivität gegenüber einem bestimmten Substrat zu bekommen. Dabei wird das Substrat zusammen mit Acrylamid zu einem Gel copolymerisiert [142]. Nach der Auftrennung der Proteine und anschließender Inkubation, wird das gesamte Gel gefärbt. Durch langsames Entfärben, werden die Bereiche zuerst sichtbar, in denen die Proteinkonzentration aufgrund des Abbaus des Substrates am geringsten ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Abbau von Fibrin bzw. von Fibrinogen durch Zymographie untersucht werden. Orientiert wurde sich an einer Methode von Kim et al. [143]. Dazu wurden Proben in drei verschiedenen Gelen (siehe Tab. 7) unter gleichen Laufbedingungen getrennt. Das Acrylamid-Gel diente als Vergleich und wurde nach der

Elektrophorese direkt in eine Fixierlösung gegeben und wie unter 3.9.6 beschrieben gefärbt. Nach dem Gießen der Trenn- bzw. der Sammel-Gele wurde jeweils mindestens 30 min gewartet. Das Fibrin-Gel wurde nach Gießen des Trenn-Gels für 15 min bei 37 °C und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Trenn-Gel	Acrylamid-Gel	Fibrinogen-Gel	Fibrin-Gel
Aqua bidem.	2,05 mL	1,8 mL	1,8 mL
1,5 M Tris	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL
Acrylamid/Bis (30 %)	1,65 mL	1,65 mL	1,65 mL
SDS (10 %)	50 µL	50 µL	50 µL
APS (10 %)	25 μL	25 μL	25 μL
TEMED (10 %)	25 μL	25 μL	25 μL
Fibrinogen*	-	250 μL	250 μL
Thrombin**	-	-	5 μL
Sammel-Gel			
Aqua bidem.	1,525 mL	1,525 mL	1,525 mL
0,5 M Tris	0,625 mL	0,625 mL	0,625 mL
Acrylamid/ Bis (30 %)	332,5 μL	332,5 μL	332,5 μL
SDS (10 %)	25 μL	25 μL	25 μL
APS (10 %)	12,5 μL	12,5 μL	12,5 μL
TEMED (10 %)	25 μL	25 μL	25 μL

Tab. 7: Zusammensetzung eines Gels (1 mm) für die Zymographie

*25 mg/mL, ** 120 U/mL

Nach 1:1 Verdünnung der Proben mit Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 25 % Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau, 5 % β -Mercaptoethanol) erfolgte die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 100 V in einem Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) unter Eiswasser-Kühlung. Anschließend wurden die Gele für 30 min in einer Renaturierungs-Lösung (2,5 % Triton X-100) leicht geschüttelt und daraufhin über Nacht in einem Entwicklungspuffer (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,02 % Brij-35) bei 37 °C inkubiert. Die Färbung der Proteine erfolgte unter leichtem Schütteln für 1 h in Coomassie-Brilliantblau R-250 Lösung (siehe 3.9.6.1), gefolgt von einer Entfärbung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) bis klare Banden auf blauem Hintergrund zu sehen waren.

Ebenfalls wurden Zymogramme unter nativen Laufbedingung hergestellt. Dabei entsprachen Lauf- und Probenpuffer denen der Native-PAGE (siehe 3.9.1.2), d.h. ohne SDS und ME-Zusatz.

3.9.6 Proteinfärbung

3.9.6.1 Coomassie-Färbung

Die Farbstoffe Coomassie-Brilliantblau R-250 bzw. G-250 lagern sich an kationische und unpolare Seitenketten in Proteinen und machen diese dadurch im Gel sichtbar [122].

Die Färbung der Gele erfolgte durch Bedeckung der Gele mit der Färbelösung (0,1 % Coomassie-Brilliantblau R-250, 10 % Essigsäure, 40 % Methanol). Unter leichtem Schütteln wurden die Gele für mind. 8 h in der Lösung belassen. Anschließend erfolgte eine Entfärbung des Hintergrundes mit einer Entfärber-Lösung (10 % Essigsäure, 40 % Methanol), bis blaue Banden auf hellem Hintergrund zu sehen waren [144].

3.9.6.2 Silber-Färbung

Die Silber-Färbung ist im Vergleich zur Coomassie-Färbung empfindlicher [145, 146]. Silberionen lagern sich an negative Bereiche der Proteine an, durch Zugabe eines Reduktionsmittels entsteht elementares Silber, die Proteinbanden werden durch graue bzw. schwarze Banden sichtbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Silver-Stain Kit der Firma Bio-Rad eingesetzt, welches sich von der Methode von Merril et al. ableitet [147]. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Vorschrift für Mini-Gele. Dabei wurde nach der Elektrophorese und Fixierung, das Gel für 5 min in einer Oxidations-Lösung (10 % der Oxidizer Solution: Kaliumdichromat, Salpetersäure) inkubiert. Dieser sowie alle weiteren Schritte erfolgten unter leichtem Schütteln. Es folgte eine 15 minütige Waschung mit Aqua bidem. unter mehrmaligem wechseln des Lösungsmittels. Nach 20 min Inkubation in einer Silbernitrat-Lösung (10 % der Silver Reagent Solution) und einem weiteren Waschschritt von 30 s erfolgte die Färbung durch Zugabe der Entwicklungs-Lösung (Developer 32 g/L: Natriumcarbonat, Paraformaldehyd). Nach 5 min oder bei Auftreten von graubraunen Präzipitaten wurde die Entwicklungs-Lösung erneuert. Beim Erreichen der gewünschten Intensität der Banden stoppte die Reaktion nach Zugabe von 5 %iger Essigsäure.

3.10 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization) kombiniert mit einem Flugzeitanalysator (TOF, time of flight), ist eine bestimmte Form der Massenspektrometrie, die sich vor allem für Proteine und Peptide eignet. Dabei wird zunächst das zu untersuchende Protein in einer im Überschuss vorhandenen Matrix auf einer Metallplatte kokristallisiert. Durch Laserbeschuss im Hochvakuum wird die Probe mit der Matrix in die Gasphase überführt, dabei kommt es zur Ladungsübertragung von Matrix auf die Probe und damit zur Ionisation der Probe. Nach Beschleunigung im elektrischen Feld kann durch Messung der Flugzeit auf die Masse zurückgeschlossen werden. Dabei hängt die Flugzeit jedoch auch von der Ladung der Probe ab. Mehrfach geladene Proben haben entsprechend kürzere Flugzeiten und erscheinen demzufolge im Massenspektrum (Masse/Ladung (m/z)) bei geringeren Werten [148, 149].

Alle MALDI-TOF Messungen konnten am Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam unter der Anleitung von apl. Prof. Dr. H. M. Rawel durchgeführt werden.

3.10.1 Molekülmassenbestimmung und Reinheitsprüfung

MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde u.a. verwendet, um die Molekülmasse von Proteinen zu bestimmen. Hierzu wurde das Gerät mit einem Standard kalibriert (Tab. 8) und die Molekülmasse mit der Software Bruker Flex-Analysis detektiert und errechnet. Des Weiteren diente die Methode auch der Reinheitsprüfung nach der Isolation von Mauritanicain.

Zur Messung wurde die Probe 1:1 mit Matrix-Lösung vermischt und 0,5 - 1 μ L auf ein Stahltemplate aufgetragen. Die Matrix-Lösung setzte sich zusammen aus 7,6 mg 2,5-Dihydroxyacetophenon, 375 μ L Ethanol und 125 μ L Diammoniumhydrogencitrat (18 mg/mL). Für den Standard wurden je 1/3 Standard-Lösung, Matrix-Lösung und TFA (2%) gemischt. Nach dem Trocknen der Lösungen erfolgte die Messung.

Protein		Mittelwert m/z		
Unterer Massenbe	ereich (Bruker l	Protein Standard I)		
Insulin	$[M+H]^+$	5734.51		
Ubiquitin I	$[M+H]^+$	8565.76		
Cytochrom C	$[M+H]^+$	12360.97		
Myoglobin	$[M+H]^+$	16952.30		
Cytochrom C	[M+2H] ²⁺	6180.99		
Myoglobin	$[M+2H]^{2+}$	8476.65		
Oberer Massenbereich (Bruker Protein Standard II)				
Trypsinogen	$[M+H]^+$	23982		
Protein A	$[M+H]^+$	44613		
BSA	$[M+H]^+$	ca. 66500		
Protein A	$[M+2H]^{2+}$	22307		
BSA	[M+2H] ²⁺	ca. 33300		

Tab. 8: Standard A für die MALDI-TOF-MS

3.10.2 In-Gel Verdau

Bei der Methode des In-Gel Verdaus wird zunächst ein Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt, die zu untersuchende Proteinbande ausgeschnitten und durch Zugabe einer Protease das enthaltene Protein in einzelne Bruchstücke gespalten, welche durch MALDI-TOF-MS untersucht werden können. Diese Methode des proteolytischen Verdaus in einem Gel bietet verschiedene Möglichkeiten (Abb. 6). Zum einen kann sie benutzt werden, um ein Protein in einer Probe zu identifizieren, indem es durch eine bekannte Protease, beispielsweise Trypsin, gespalten wird. Die Spaltstellen der Protease müssen dabei bekannt sein, durch Abgleich mit Datenbanken kann anhand der Bruchstücke eine Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung mit einem bestimmten Protein vorhergesagt werden (Peptidmassenfingerprint). Zum anderen kann ein bekanntes Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt werden und nach Ausschneiden der Bande, dieses durch eine unbekannte Protease verdaut werden. Anhand der Bruchstücke lässt sich nun ein Spaltmuster der unbekannten Protease erstellen und mit anderen bekannten Proteasen vergleichen.



Abb. 6: Schematische Darstellung des In-Gel Verdaus

Für den In-Gel Verdau wurde ein Kit der Firma Thermo Scientific verwendet. In Anlehnung an die Herstellervorschrift wurde wie folgt verfahren: Mit einem Skalpell wurde die gewünschte Bande aus einem mit Coomassie gefärbten SDS-PAGE Gel ausgeschnitten. Nach Zerschneiden der Bande in kleine Würfel, wurden diese in ein 0,6 mL Reaktionsgefäß überführt und bei Bedarf bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Es folgte die Zugabe von 200 µL Entfärber-Lösung (alle Lösungen siehe Tab. 9). Unter Schütteln wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert, die Lösung entfernt und die letzten beiden Schritte wiederholt. Zu den Gelstücken wurde 30 µL Reduzierungspuffer gegeben, für 10 min bei 60 °C inkubiert und diese nach Entfernung der Lösung mit 30 µL Alkylierungspuffer bei Raumtemperatur für 1 h im Dunkeln belassen. Auch diese Lösung wurde entfernt und die Gelstücke erneut zweimalig mit 200 µL Entfärber-Lösung für je 15 min bei 37 °C gewaschen. Nach Entfernung der Lösung wurden die Gelstücke durch Zugabe von 50 µL Acetonitril für 15 min dehydratisiert und anschließend für ca. 10 min an der Luft weiter getrocknet. Nun erfolgte die Zugabe von 15 µL der entsprechenden Protease-Lösung, sowie 25 µL Verdaupuffer. Der proteolytische Verdau fand unter Schütteln für 4 h bei 37 °C oder alternativ bei 30 °C über Nacht statt. Die Lösung wurde anschließend in ein neues 0,6 mL Reaktionsgefäß überführt und die Gelstücke zur Inaktivierung und Extraktion mit 10 µL TFA (1 %) für 5 min bei Raumtemperatur belassen und darauffolgend die Lösungen vereint, sowie bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Lösung	Zusammensetzung
Entfärber	80 mg NH ₄ HCO ₃ + 20 mL Acetonitril + 20 mL Aqua dem.
Verdau-Puffer	$10 \text{ mg NH}_4\text{HCO}_3 + 5 \text{ mL Aqua dem.}$
Reduzierungspuffer	4 μ L Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) + 30 μ L Verdau-Puffer
Alkylierungspuffer	7 μL 2-Iodacetamid (IAA) (10 %) + 28 μL Verdau-Puffer
Trypsin	Modifiziertes Trypsin: 1,5 µL modifizierte Trypsin-Lösung* (0,15 µg Trypsin) + 13,5 µL Verdau-Puffer *10 %ige wässrige Lösung aus 1 µg/mL modifiziertem Trypsin in HCl (3,15 %)
Mauritanicain	$4 \ \mu L (40 \ \mu g/mL) + 11 \ \mu L Verdau-Puffer$
Thrombin	1,5 μL (120 U/mL) + 13,5 μL Verdau-Puffer
Plasmin	1,5 μL (150 μg/mL) + 13,5 μL Verdau-Puffer

Tab. 9: Zusammensetzung der Lösungen für den In-Gel Verdau

Zur Detektion der entstandenen Spaltprodukte des proteolytischen Verdaus wurden die Probelösungen nach dem Auftauen 1:1 mit Matrix-Lösung gemischt. 0,5 μ L der Mischung wurden auf eine MALDI-Stahlplatte aufgetragen und anschließend bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Als Matrix-Lösung diente in diesem Fall eine gesättigte Lösung aus α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in einer Mischung aus 30 μ L Acetonitril und 70 μ L 0,1 % TFA. Zur Gerätekalibrierung und Berechnung der Molekülmassen (Software Bruker Flex-Analysis) der entstandenen Peptidspaltprodukte diente ein Kalibrierungsstandard (Tab. 10)

Protein	[M+H] ⁺ Mono isotopisch*	[M+H] ⁺ Mittelwert*
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

Tab. 10: Standard B für die MALDI-TOF-MS (In-Gel Verdau (Bruker Peptide Calibration Standard II))

*Massen in Da

Zur Analyse eines Spaltmusters einer unbekannten Protease wurde ein theoretischer Verdau nach ausgewählten Aminosäuren der Sequenz des zu verdauenden Proteins mit dem Programm Bruker Sequence editor durchgeführt. Die Massen der theoretisch entstandenen Bruchstücke wurden dann mit den praktisch gemessenen Massen durch das Programm Bruker BioTools verglichen und daraus eine prozentuale Übereinstimmung errechnet, sowie manuell die Häufigkeit für die Spaltung nach einzelnen Aminosäuren bestimmt. Im Falle der Analyse eines unbekannten Proteins durch Verdau mit einer bekannten Protease, wurden die gemessenen Massen mit Datenbanken, unter Berücksichtigung der Modifikationen vor dem Verdau, verglichen.

3.11 Isolation von Mauritanicain

3.11.1 Probenvorbereitung

Die Probennahme aus *Euphorbia mauritanica* L. erfolgte ähnlich wie unter 3.1 beschrieben. 12 Reaktionsgefäße (2 mL) waren mit jeweils 1 mL Phosphatpuffer (10 mM, pH 7) befüllt und auf Eis gelagert. Die Pflanze wurde leicht angeritzt und unmittelbar der austretende Milchsaft aufgefangen. Dies geschah an mehreren Stellen der Pflanze, bis die Lösung keine Lichtdurchlässigkeit mehr zeigte. Die Reaktionsgefäße wurden umgeschwenkt und wieder auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 1 h bei 14000 rpm (18626 x g) und einer Temperatur von 4 °C. Die Proben wurden für 12 - 24 h bei -20 °C eingefroren und nach dem Auftauen erneut wie oben zentrifugiert. Die leicht getrübten Überstande wurde in einem 15 mL Reaktionsgefäß vereinigt. Der Latex wurde dann durch einen Spritzenvorsatzfilter aus Celluloseacetat (0,2 µm, d = 30 mm) gegeben, so dass eine klare Lösung zur weiteren Aufarbeitung zur Verfügung stand, die als LatexF bezeichnet wurde.

3.11.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Eine erste Auftrennung des LatexF erfolgte durch eine Ionenaustausch-Chromatographie an einer Dieethylaminoethyl(DEAE)-Säule (AcroSep DEAE Ceramic HyperD F). Das Prinzip beruht hier darauf, dass die negativ geladenen Bestandteile der Probe an die positiv geladene Matrix binden. Durch Zugabe eines Salzes, das kontinuierlich in seiner Konzentration erhöht wird, werden je nach Bindungsstärke die Bestandteile der Probe verdrängt und eluiert. Dadurch kommt es zu einer Auftrennung.

10 mL des LatexF wurden mit einer Spritze auf die Säule geladen und anschließend schrittweise Lösungen von Natriumchlorid (NaCl) in Phosphatpuffer (Tab. 11) durch eine Pumpe mit einer Flussrate von 1,5 mL/min gegeben. Es wurden Fraktionen von je 1,5 mL aufgefangen.

Fraktion	c NaCl [mol/L] in 10 mM Phosphatpuffer
0 - 15	0
16 - 30	0,05
31 - 42	0,1
43 - 57	0,15
58 - 66	0,2
67 - 82	0,4
83 - 90	1

Tab. 11: Pufferkonzentrationen für die Ionenaustausch-Chromatographie

3.11.3 Ultrafiltration

Zur Konzentrierung bestimmter Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie, sowie zum Abtrennen unerwünschter Bestandteile, erfolgte eine Zentrifugation durch einen Filter mit bestimmter Ausschlussgröße (cut-off). Dabei wurde für die Isolation von Mauritanicain eine Membran aus Polyethersulfon mit einem cut-off der Größe 50 kDa gewählt.

500 μ L der entsprechenden Fraktion wurden auf die Filtereinheit (Vivaspin 500) in einem 2 mL Reaktionsgefäß gegeben und für 12 min bei 12500 rpm (16630 x g) und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, gefolgt von zweimaligem Waschen der Probe mit 10 mM Phosphatpuffer (pH 7) unter gleichen Bedingungen. Das resultierende Konzentrat wurde zu 55 μ L mit demselben Puffer verdünnt.

3.11.4 Größenausschluss-Chromatographie

Bei dieser Form der Chromatographie werden die Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Kleine Moleküle dringen tiefer in die Poren der stationären Phase ein und werden später eluiert als größere Moleküle.

Verwendet wurde eine Säule mit einer Matrix aus kugelförmigen porösen Kieselerde-Partikeln (5 µm) und einem Porendurchmesser von 150 Å (Discovery BIO GFC (30 cm x 4.6 mm)). 50 μ L Probe wurden auf die Säule gegeben und mit einer konstanten Flussrate von 0,15 mL/min eluiert. Der Verlauf der Auftrennung wurde bei 210 nm UV-photometrisch verfolgt und Fraktionen in Reaktionsgefäße aufgefangen.

3.12 Bestimmung der Protease-Klasse

Eine Möglichkeit der Klassifizierung von Proteasen orientiert sich anhand des für die Reaktion verantwortlichen katalytischen bzw. aktiven Zentrums. Dieses wird bestimmt durch Inkubation mit spezifischen Inhibitoren.

Zu 25 μ L Probe wurden 50 μ L eines Inhibitors gegeben, homogenisiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Substrates für die Aktivitätsmessung (vgl. 3.4.1). Bestimmt wurde die Restaktivität nach 1 h bei 37 °C, verglichen mit Proben ohne Inhibitor Zusatz. Zur Positivkontrolle dienten Proteasen, die den jeweiligen Klassen angehören, als Blindwert wurde statt der Probe nur Puffer hinzugefügt. Die Referenzproteasen wurden in einer Konzentration von 100 μ g/mL eingesetzt.

Inhibitor	Protease- Klasse	Konzentration	Referenzprotease
Aprotinin	Serin-	31 µM	Trypsin
AEBSF-HCl	Serin-	63 mM	Trypsin
EDTA	Metallo-	0.6 mM	Thermolysin
Phosphoramidon	Metallo	0.1 mM	Thermolysin
Pepstatin A	Aspartat-	20 µM	Pepsin
E-64	Cystein-	70 µM	Papain

Tab. 12: Inhibitoren zur Bestimmung der Protease-Klasse

3.13 Bestimmung der Temperaturabhängigkeit

Die Temperatur kann einen großen Einfluss auf die Aktivität von Enzymen haben. Jedes Enzym hat einen oder mehrere Temperaturoptima. Dabei kann sich das / die Temperatur-Optimum / Optima je nach Substrat unterscheiden.

Für die Bestimmung sollte vor allem darauf geachtet werden, dass die Temperatur unbedingt ununterbrochen eingehalten wird, da ein Substratumsatz häufig bereits innerhalb kurzer Zeit stattfinden kann. Dazu wurden 50 µL Probe, sowie 100 µL Substrat (BODIPY-FL-Casein) zunächst separat für 10 min bei der jeweiligen Temperatur gelagert. Daraufhin wurden die Lösungen vereint und für weitere 10 min inkubiert, gefolgt von einer Messung der Fluoreszenz gemäß 3.4.1.

Die Stabilität einer Probe gegenüber Temperatureinfluss sollte ebenfalls bestimmt werden. Zu diesem Zwecke wurden 50 μ L Probe für 20 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Abkühlung auf Raumtemperatur, gefolgt von der Zugabe von 100 μ L Substrat BODIPY-FL-Casein und Messung der proteolytischen Aktivität bei 37 °C nach 1 h (3.4.1).

3.14 Bestimmung der pH Abhängigkeit

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes für die Umsetzung eines bestimmten Substrats, bedarf es verschiedener Puffersysteme, die sich um maximal eine pH-Einheit unterscheiden sollten. Da für die Aktivitätsmessung mehrere Lösungen unterschiedlicher pH-Werte zusammengemischt werden, muss zunächst der pH-Wert der Mischung ermittelt werden. Dazu wurden 25 µL Probenpuffer (Phosphatpuffer pH 7), 75 µL EnzChek-Substratpuffer (Tris-Puffer pH 7,8), sowie 200 µL eines Puffersystems in eine Mikrotiter-Platte pipettiert, 2 min geschüttelt und bei 37 °C für mindestens 10 min inkubiert. Anschließend wurde mit einer kombinierten Glaselektrode der pH-Wert direkt im Well gemessen. Die verwendeten Puffer und die aus der Mischung bei 37 °C resultierenden pH-Werte sind in Tab. 13 angegeben.

Puffer	pH-Werte
Glycin / HCl	2,5; 2,8; 3,3; 3,6
CH ₃ COOH / CH ₃ COO ⁻ Na ⁺	4,3; 4,9; 5,5; 5,6
Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄	6,0; 6,2; 6,6; 7,2; 7,8; 8,3
NaHCO ₃ / Na ₂ CO ₃	9,4; 9,7; 9,9; 10,3; 10,9
NaH ₂ PO ₄ / NaOH	11,3; 11,7; 11,9; 12,7

Tab. 13: Puffersysteme für die Bestimmung der pH Abhängigkeit

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität wurden $25 \,\mu\text{L}$ Probe mit $200 \,\mu\text{L}$ einer Pufferlösung für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 75 μL des Substrats BODIPY-FL-Casein. Nach weiterer Inkubation von 1 h bei gleicher Temperatur wurde die Fluoreszenz, wie unter 3.4.1 beschrieben, gemessen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Screening

Eine große Anzahl von Pflanzen der Familie Euphorbiaceae JUSS. wurde im Verlauf dieser Arbeit auf proteolytische Aktivität gegenüber zwei Substraten getestet. Dabei wurde zum einen auf allgemeine proteolytische Aktivität hin untersucht und zum anderen auf eine spezifische Aktivität gegenüber einem kleinen Peptidsubstrat, das eine vom Fibrin(ogen) abgeleitete Sequenz imitiert. Dieses Substrat wird im Gegensatz zu anderen sehr spezifisch von Plasmin gespalten, dem natürlichen Fibrin abbauenden Enzym.

4.1.1 Allgemeine proteolytische Aktivität

Der Milchsaft aus Arten der Familie Euphorbiaceae besitzt häufig proteolytische Aktivität [34]. Domsalla hat dies für 129 Arten dieser Familie untersucht [150, 151]. Dabei zeigten alle Arten der Gattung Euphorbia eine proteolytische Aktivität, die unterschiedlich ausgeprägt war. Domsalla stellt daher die Hypothese auf, dass eine proteolytische Aktivität im Milchsaft dieser Gattung konstitutiv vorhanden sei, sie stelle wahrscheinlich einen Faktor im Verteidigungsmechanismus der Pflanze dar [150]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nochmals Arten der Familie Euphorbiaceae auf diese Aktivität hin untersucht. Die Latices wurden hierfür nach der unter 3.1 beschriebenen Methode in einem PBS-Puffer gewonnen. Es wurden zusätzlich 15 Arten getestet, die noch nicht von Domsalla untersucht worden sind, unter denen 11 Arten eine proteolytische Aktivität aufwiesen (Tab. 14). Von den untersuchten Arten wurden für Hura crepitans L., Cnidoscolus aconitifolius (MILL.) I. M. JOHNST und Jatropha podagrica HOOK. bereits in der Literatur das Vorhandensein einer proteolytischen Aktivität beschrieben [152-154]. Auffallend ist, dass für keine der 3 untersuchten Arten der Gattung Jatropha mit der durchgeführten Methode eine Aktivität nachzuweisen ist, obwohl wie beschrieben eine proteolytische Aktivität bei Jatropha podagrica HOOK in der Literatur erwähnt wurde. Auch Jatropha curcas L., die von Domsalla untersucht wurde, zeigte keine Aktivität [150]. Doch gerade aus dem Latex von Jatropha curcas L. wurde bereits eine Protease isoliert [38, 155]. Möglicherweise spielen hier weitere Faktoren wie z.B. das äußere Umfeld eine Rolle. So wurde bei Vorversuchen zum Screening auf proteolytische Aktivität eine zufällige Beobachtung gemacht. Zwei unterschiedliche Pflanzen der gleichen Art Euphorbia ledienii A.BERGER, die an voneinander verschiedenen Standorten lokalisiert waren, zeigten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der proteolytischen Aktivität. Die Standort-Durschnittstemperatur, das Alter der Pflanzen, sowie der Zyklus des Gießens und Düngens der Pflanzen waren ebenfalls bei beiden unterschiedlich. Für die in Tab. 14 und Tab. 15 aufgeführten Ergebnisse des Screenings wurde der Latex immer der gleichen Pflanze entnommen.

Pflanze	Akzessionsnummer	Relative proteolytische Aktivität
Acalypha hispida BURM. F.	136-07-74-83	+
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i> (MILL.) I. M. JOHNST.	158-01-07-80/2	+++
<i>E. aprica</i> BAILL.	219-19-11-30	+++
E. bisellenbeckii BRUYNS [M. ellenbeckii N. E. BR.]	009-60-74-80	+
E. geroldii RAUH	240-18-99-30	++
E. guillauminiana BOITEAU	219-21-11-30	++
<i>E. neostolonifera</i> BRUYNS [<i>M. stoloniferum</i> S. CARTER]	206-07-97-80	+++
E. piscatoria AITON	075-01-96-10/1	+
<i>E. succulenta</i> (SCHWEICK.) BRUYNS [<i>M. stapelioides</i> PAX]	027-59-74-80	++
E. susannae MARLOTH	130-01-11-80	+++
Homalanthus populifolius GRAHAM	008-29-74-80/1	-
Hura crepitans L.	260-76-93-80	++
Jatropha integerrima JACQ.	117-05-03-80	-
Jatropha multifida L.	117-21-74-80	-
Jatropha podagrica HOOK.	005-09-09-80	-

Tab. 14: Allgemeine proteolytische Aktivität gegenüber BODIPY-FL-Casein

-= keine, += proteolytische Aktivität (+<++<+++) Median n = 4, *E*. = *Euphorbia*, [] = Synonym-Bezeichnung des Botanischen Gartens Berlin

4.1.2 Aktivität gegenüber einem spezifischen fluorogenen Substrat für Plasmin

Das Ziel dieser Arbeit war es u.a. herauszufinden, ob und welche milchsafthaltigen Pflanzen des Botanischen Gartens Berlin, fibrinolytisch aktive Proteasen enthalten. Um dies in möglichst kurzer Zeit für eine Vielzahl der dort vorzufindenden Arten durchzuführen, wurde ein einfach durchzuführendes Verfahren angewendet. Dabei wurde ein an AMC gekoppeltes Tripeptid aus den Aminosäuren Valin, Leucin und Lysin (Boc-Val-Leu-Lys-AMC) verwendet.

Dieses hat sich im Vergleich zu anderen Substraten als besonders spezifisch für eine Spaltung durch Plasmin erwiesen [129]. 122 Arten der Familie Euphorbiaceae wurden mit dieser Methode auf eine Aktivität gegenüber diesem Substrat getestet. Um die einzelnen Latices miteinander vergleichen zu können, wurden die ermittelten Fluoreszenzwerte auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen, so dass die Fluoreszenz pro ug Latex-Protein erhalten wurde (relative Aktivität). Die Ergebnisse des Screenings sind in Tab. 15 aufgelistet. Von 122 untersuchten Arten waren im Median 36 inaktiv, 45 zeigten im Vergleich aller untersuchten Arten eine schwache Aktivität, 22 eine mittlere und 19 eine starke Aktivität gegenüber Boc-Val-Leu-Lys-AMC. Die Tabelle zeigt den Median der Ergebnisse an vier verschiedenen Messtagen mit einer jeweiligen Dreifachbestimmung. Die relative Aktivität ist die einzige Methode, um die Latices, deren einzelne Proteinzusammensetzung unbekannt ist, miteinander zu vergleichen. Dies sagt allerdings nichts über die Aktivität der in jedem Latex möglicherweise in ihrer Art unterschiedlich vorhandenen Proteasen aus. So kann die relative proteolytische Aktivität der Latices zweier Arten LA und LB identisch sein, letztlich aber LA eine viel aktivere spezifischere Protease enthalten als LB. In diesem Fall wäre in LA sehr wenig Protease A neben viel sonstigem Protein enthalten, in LB dagegen viel Protease B neben wenig sonstigem Protein.

Pflanze	Akzessions- nummer	Relative Aktivität (F·ml·µg ⁻¹) ^a	Spann- weite
Acalypha hispida BURM. F.	136-07-74-83	30	53
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i> (MILL.) I. M. JOHNST.	158-01-07-80/2	52	37
Colliguaja integerimma HOOK	013-24-88-10	2	9
E. abyssinica J. F. GMEL	067-13-74-80	1	3
<i>E. acanthothamnos</i> HELDR. & SART. EX. BOISS	057-18-97-10	0	2
E. alluaudii DRAKE [E. leucodendron DRAKE]	027-94-74-80	5	7
E. alluaudii subsp. oncoclada (DRAKE) F.FRIEDMANN & CREMERS [E. oncoclada DRAKE]	001-11-80-10	2	2
<i>E. ammak</i> SCHWEINF.	124-91-74-80	0	1
E. amygdaloides L.	028-10-01-10	8	17

 Tab. 15: Ergebnisse des Screenings auf proteolytische Aktivität gegenüber dem Plasmin-spezifischen

 Substrat Boc-Val-Leu-Lys-AMC

Pflanze	Akzessions- nummer	Relative Aktivität (F·ml·µg ⁻¹) ^a	Spann- weite
E. amygdaloides L. subsp. amygdaloides	144-14-02-40	4	11
E. antisyphilitica ZUCC.	240-02-99-80	8	8
E. aphylla Brouss. ex. Willd.	080-34-74-80	5	6
<i>E. aprica</i> BAILL.	219-19-11-30	4	22
<i>E. atoto</i> G. FORST [<i>E. taitensis</i> BOISS.]	027-67-74-80	0	2
E. avasmontana DINTER	124-93-74-80	0	2
E. balsamifera AITON	236-01-83-80	9	56
E. bisellenbeckii BRUYNS [M. ellenbeckii N. E. BR.]	009-60-74-80	0	0
E. buruana PAX	027-86-74-80	0	0
E. caerulescens HAW.	042-59-74-80	0	1
<i>E. canariensis</i> L.	329-07-86-10	0	1
E. candelabrum TRÉMAUX EX. KOTSCHY	125-04-74-80	0	1
E. cereiformis L.	027-89-74-80	2	4
E. characias L. subsp. characias	194-67-92-14	7	12
E. confinalis R. A. DYER	084-26-83-50	3	32
E. cooperi N. E. BR. EX. A. BERGER	124-98-74-80	0	0
E. cotinifolia L.	055-60-74-80	8	19
E. cylindrifolia MARN. LAP. & RAUH	027-84-74-80	47	56
E. cyparissias L.	025-31-88-10	5	5
<i>E. dawei</i> N. E. BR.	129-04-04-80	1	7
E. decaryi Guillaumin	124-99-74-80	20	31
E. decaryi var. cap-saintemariensis (RAUH) CREMERS [E. cap-saintemariensis RAUH]	078-07-03-40	5	6
E. deightonii CROIZAT	125-01-74-80	0	1
<i>E. dendroides</i> L.	353-05-86-14	1	6
E. didiereoides Denis ex. Leandri	240-23-99-80	6	5
<i>E. enopla</i> BOISS.	080-56-74-80	3	8
E. epiphylloides Kurz	027-93-74-80	7	6
E. epithymoides L.	072-23-87-70	3	21
<i>E. esula</i> L.	069-63-74-80	11	26
<i>E. evansii</i> PAX	042-62-74-80	1	1

Pflanze	Akzessions- nummer	Relative Aktivität (F·ml·µg ⁻¹) ^a	Spann- weite
<i>E. falcata</i> L.	149-07-95-10	22	50
E. fortissima L. C. LEACH	084-28-83-50	0	0
E. franckiana A. BERGER	014-20-74-80	0	0
<i>E. francoisii</i> Leandri	012-70-74-80	32	41
E. geroldii RAUH	240-18-99-30	52	73
E. giessii L. C. LEACH	279-05-83-20	1	1
E. globosa (HAW.) SIMS	255-09-93-20	26	168
E. glochidiata PAX	027-68-74-80	0	0
E. grandicornis GOEBEL EX. N. E. BR.	027-72-74-80	2	4
E. grandidens HAW.	042-60-74-80	0	7
E. gregaria MARLOTH	125-02-74-80	20	41
E. guentheri (PAX) BRUYNS [M. guentheri PAX]	009-64-74-80	1	0
E. guillauminiana BOITEAU	219-21-11-30	111	103
E. halipedicola L. C. LEACH	084-29-83-50	3	5
E. hamata (HAW.) SWEET	012-24-74-80	0	1
E. handiensis BURCHARD	027-01-91-20	15	65
E. heterochroma PAX	125-03-74-80	6	16
E. heterodoxa MUELL. ARG.	078-14-96-40	0	1
E. heteropodum PAX [M. heteropodum N. E. BR.]	009-63-74-80	1	6
<i>E. horrida</i> BOISS.	045-44-74-84	0	1
<i>E. illirica</i> Lam. [<i>E. villosa</i> Waldst. & Kit. ex. Willd]	033-03-04-70	3	3
E. ingens E. MEY. EX. BOISS.	045-10-74-80	0	4
<i>E. invenusta</i> (N. E. BR.) BRUYNS [<i>M. invenustum</i> N. E. BR.]	009-73-74-80	1	3
<i>E. jansenvillensis</i> NEL	012-94-74-80	4	10
E. knuthii PAX	014-43-74-80	0	2
E. lacei CRAIB [E. barnhartii CROIZAT]	124-94-74-80	3	3
E. lagunillarum CROIZAT	231-05-90-84	0	0
E. lamarckii SWEET [E. obtusifolia POIRET]	115-67-74-80	9	12
E. ledienii A. BERGER	014-29-74-80	8	20

Pflanze	Akzessions- nummer	Relative Aktivität (F·ml·µg ⁻¹) ^a	Spann- weite
<i>E. leuconeura</i> BOISS.	225-01-07-80	26	49
E. lomelii V. W. STEINM. [Pedilanthus macrocarpus BENTH.]	240-12-99-80	1	2
E. lophogona LAM.	205-86-74-80	45	38
<i>E. lugardae</i> (N. E. Br.) BRUYNS [<i>M. lugardae</i> N. E. Br.]	114-96-74-80	1	3
E. marginata PURSH	094-53-74-84	13	16
<i>E. mauritanica</i> L.	125-08-74-80	49	77
<i>E. milii</i> Des Moul. var. <i>bevilaniensis</i> (Croizat) Ursch & Leandri	043-62-74-80	1	0
E. milii DES MOUL. var. milii	027-75-74-80	6	10
<i>E. millotii</i> Ursch & Leandri	218-01-98-80	4	17
<i>E. neococcinea</i> BRUYNS [<i>M. coccineum</i> PAX]	009-55-74-80	1	6
<i>E. neostolonifera</i> BRUYNS [<i>M. stoloniferum</i> S. CARTER]	206-07-97-80	3	6
E. nivulia Buch Ham.	125-05-74-80	0	0
<i>E. obesa</i> Ноок. г.	144-02-01-70	1	3
<i>E. officinarum</i> L.	059-66-74-80	2	6
E. opuntioides WELW. EX HIERN	255-11-93-30	0	1
E. ornithopus JACQ.	012-48-74-80	7	24
E. pedilanthoides DENIS	188-06-04-80	23	27
E. pentagona HAW.	014-37-74-80	7	39
<i>E. pillansii</i> N. E. BR.	117-33-79-20	5	7
<i>E. pilosa</i> L.	069-60-74-80	13	24
E. piscatoria AITON	075-01-96-10/1	8	25
E. platyclada RAUH	206-01-97-80	1	2
E. polyacantha BOISS.	236-03-83-80	0	15
E. pseudocactus A. BERGER	012-84-78-80	0	0
E. pseudoglobosa MARLOTH	012-38-74-80	9	25
E. pteroneura A. BERGER	012-86-74-80	0	1
<i>E. resinifera</i> O. BERG	042-58-74-80	8	17
<i>E. royleana</i> BOISS.	125-06-74-80	0	1
E. sakarahaensis RAUH	188-02-04-80	9	39
E. schimperi C. PRESL	125-07-74-80	21	7

Pflanze	Akzessions- nummer	Relative Aktivität (F·ml·µg ⁻¹) ^a	Spann- weite
<i>E. seguieriana</i> NECK.	069-59-74-80	20	20
E. similiramea S. CARTER	014-42-74-80	0	0
E. sipolisii N. E. BR.	231-04-90-30	3	8
E. spinosa L.	202-04-95-10	1	4
E. stenoclada BAILL.	067-14-74-80	58	561
E. submamilaris A. BERGER EX. PAX	125-13-74-80	3	4
<i>E. succulenta</i> (SCHWEICK.) BRUYNS [<i>M. stapelioides</i> PAX]	027-59-74-80	3	12
E. sudanica A. CHEV.	221-04-94-20	1	3
E. susannae MARLOTH	130-01-11-80	6	10
<i>E. tirucalli</i> L.	037-14-95-20	0	0
E. tithymaloides subsp. smallii (MILLSP.) V. W. STEINM. [Pedilanthus tithymaloides subsp. smallii DRESSLER]	115-09-74-80	4	6
E. triangularis DESF. EX. A. BERGER	042-63-74-80	1	3
E. umbellata (PAX) BRUYNS [Synadenium grantii HOOK. F.]	056-29-74-80	0	1
<i>E. verrucosa</i> L.	118-02-06-10	11	14
E. viguieri DENIS	078-15-96-40	26	27
E. xanti Engelm. ex. Boiss.	129-03-04-84	1	8
E. xylophylloides BRONGN. EX. LEM.	080-66-74-80	4	26
Homalanthus populifolius GRAHAM	008-29-74-80/1	0	1
Hura crepitans L.	260-76-93-80	1	1
Jatropha curcas L.	127-54-82-13	0	0
Jatropha integerrima JACQ.	117-05-03-80	0	0
Jatropha multifida L.	117-21-74-80	0	0
Jatropha podagrica HOOK.	005-09-09-80	0	1
Manihot esculenta CRANTZ	117-19-74-80	1	1

^a Median der relativen proteolytische Aktivität gegenüber Boc-Val-Leu-Lys-AMC, n = 4, *E*. = *Euphorbia*, F = Fluoreszenzintensität, [] = Synonym-Bezeichnung des Botanischen Gartens Berlin

Wie schon beim Screening auf allgemeine proteolytische Aktivität, zeigen auch hier die Pflanzen der Gattung *Jatropha* keine Aktivität. Interessanterweise zeigte auch *E. umbellata* (PAX) BRUYNS, die besser unter dem Synonym *Synadenium grantii* HOOK. F. bekannt ist,

keine Umsetzung des Substrates, obwohl für beide in der Literatur eine fibrinolytische Aktivität beschrieben ist. Allerdings ist für beide auch eine verstärkende Wirkung auf die Gerinnung beschrieben [10, 11]. Teilweise beziehen sich Untersuchungen auf isolierte Latex-Proteasen, die Zusammensetzung des reinen Latex ist dagegen sehr komplex und das gleichzeitige Vorhandensein von Protease-Inhibitoren möglich [2, 54, 156].

Die Ergebnisse zwischen den einzelnen Messtagen schwanken teils stark, die Gründe dafür mögen daran liegen, dass es sich um Proben aus einem lebenden Organismus handelt, die den ständigen Veränderungen des Metabolismus durch beispielsweise Biosynthese, Katabolismus und Genexpression ausgesetzt sind. Die physiologischen Funktionen der Proteasen im Latex sind nicht geklärt, eine Beteiligung an der Abwehr von Herbivoren ist beschrieben [1]. Die komplexe Zusammensetzung kann möglicherweise an unterschiedlichen Tagen variieren. Auffällig war, dass bei einigen Arten die proteolytische Aktivität an aufeinander folgenden Tagen stark reduziert war. Denkbar wäre hier eine Induktion der Synthese von Protease-Inhibitoren, aufgrund der vorausgegangenen Verletzung. Eine veränderte Genexpression von Latex-Proteinen sowie weiterer Substanzen nach Verletzung von Pflanzen ist auch in der Literatur beschrieben [1]. So zeigte z.B. Ficus carica L. (Caricaceae) eine zehnfach erhöhte Genexpression einer Peroxidase, einem Trypsin-Inhibitor und einer Chitinase, nachdem die Pflanze verletzt wurde [1, 157]. Ein weiteres Beispiel ist die mRNA Expression von Hevein, einem Chitin-bindenden Protein aus Hevea brasiliensis (WILLD. EX A.JUSS.) MÜLL.ARG. (Euphorbiaceae), die ebenfalls nach Verletzung erhöht war [1, 158]. Für die Zielsetzung des Screenings sind die Ergebnisse dennoch wertvoll und ausreichend. Es kann eindeutig eine Tendenz ersehen werden, dass bestimmte Arten Aktivitäten zeigen und dadurch für weitere Untersuchungen interessant sind.

Zum einen aus den Ergebnissen des Screenings abgeleitet, zum anderen aufgrund weiterer Faktoren, wie z.B. Standort und Verfügbarkeit, wurden 12 Pflanzen für weitere Untersuchungen zum Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse ausgewählt. Diese sind nochmals in Tab. 16 zusammengefasst aufgeführt, sowie in Abb. 7 abgebildet. Es wurden ausschließlich Pflanzen verwendet, die sich im Gewächshaus befanden, um einen Einfluss der jahreszeitabhängigen Wetterschwankungen gering zu halten. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dabei außerdem Pflanzen gewählt, die am gleichen Standort vorzufinden waren.

Pflanze	Akzessions- nummer	Relative Aktivität (F·ml·µg ⁻¹) ^a	Spann- weite
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i> (MILL.) I. M. JOHNST.	158-01-07-80/2	52	37
E. cylindrifolia Marn. Lap. & Rauh	027-84-74-80	47	56
<i>E. decaryi</i> GUILLAUMIN	124-99-74-80	20	31
E. francoisii Leandri	012-70-74-80	32	41
E. globosa (HAW.) SIMS	255-09-93-20	26	168
E. gregaria MARLOTH	125-02-74-80	20	41
E. lophogona LAM.	205-86-74-80	45	38
<i>E. mauritanica</i> L.	125-08-74-80	49	77
E. pedilanthoides DENIS	188-06-04-80	23	27
E. schimperi C. PRESL	125-07-74-80	21	7
<i>E. stenoclada</i> BAILL.	067-14-74-80	58	561
E. viguieri Denis	078-15-96-40	26	27

Tab. 16: Übersicht über die 12 für weitere Untersuchungen ausgewählten Arten

^a Median der relativen proteolytische Aktivität gegenüber Boc-Val-Leu-Lys-AMC, n = 4, E. = *Euphorbia*, F = Fluoreszenzintensität



C. aconitifolius I.M. JOHNST.



E. globosa (HAW.) SIMS



E. pedilanthoides DENIS



E. cylindrifolia MARN. LAP. & RAUH



E. gregaria MARLTOH



E. schimperi C. PRESL



E. decaryi GUILLAUMIN



E. lophogona LAM.



E. stenoclada BAILL.



E. francoisii LEANDRI



E. mauritanica L.



E. viguieri DENIS

Abb. 7: Bilder der 12 für weitere Untersuchungen ausgewählten Arten

Die unter 4.1 aufgeführten Ergebnisse des Screenings auf proteolytische Aktivität gegenüber BODIPY-FL-Casein, sowie Boc-Val-Leu-Lys-AMC wurden in einer Diplomarbeit von Michael Kubasch untersucht, die unter Anleitung und Betreuung im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist [159].

4.1.3 Vergleich der Zusammensetzung durch Elektrophorese

Die verschiedenen Latices sollten auf ihre Proteinzusammensetzung untersucht werden. Dafür wurde eine SDS-PAGE unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen angefertigt. Der Proteingehalt der Proben wurde auf 200 μ g/mL eingestellt. Die Abb. 8 zeigt, dass die Zusammensetzung der Proteine zwischen den Latices sehr heterogen ist.



Abb. 8: SDS-PAGE der durch das Screening für weitere Untersuchungen ausgewählten Latices 10 % SDS Gel, durchgeführt unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen, 53 min, 46,5 - 13 mA, 200 V, Silber-Färbung

Übereinstimmungen sind bei *E. cylindrifolia* und *E. decaryi* zu sehen. Beiden enthalten mehrere Proteinbanden auf gleicher Höhe ab einer Molekülmasse ≥ 30 kDa. Auch der Latex von E. pedilanthoides weist bei etwa 39 kDa, 57 kDa und 64 kDa Proteinbanden gleicher Masse wie die beiden genannten Latices auf. Hier fehlt allerdings die Bande im Bereich 79 - 85 kDa. In diesem Bereich besitzen dagegen E. viguieri und E. stenoclada zwei Banden. E. viguieri zeigt ebenfalls die Bande bei 39 kDa. Auch E. globosa, E. mauritanica, E. schimperi und E. gregaria weisen Banden zwischen 38 - 42 kDa auf. Banden zwischen 64 - 85 kDa sind außerdem bei E. mauritanica und E. globosa auf ähnlicher Laufhöhe. Neben den teilweise übereinstimmenden oder auf ähnlicher Höhe liegenden Banden sind allerdings auch diverse weitere Banden in den jeweiligen Latices vorhanden. Das Proteinspektrum scheint also sehr unterschiedlich zu sein. Jedoch kann eine SDS-PAGE auch nur bedingt die wahre Zusammensetzung wiedergeben. So kann es während der Probenvorbereitung zu Veränderungen kommen. Ein Eigenverdau oder auch ein Verdau durch andere enthaltene Proteasen ist möglich. Dazu wurde versucht die Proben kontinuierlich kühl zu lagern. Während der Denaturierung durch Hitze kann es dagegen kurz zu einem Anstieg von Verdauungsvorgängen kommen. Selbst für die Banden gleicher Molekülmasse kann mit dieser Methode nicht klar gesagt werden, dass diese auch identisch sind. Hierzu bedarf es weiterer Methoden. Zunächst wäre eine zweidimensionale Elektrophorese sinnvoll, bei der die Proteine im ersten Schritt nach ihrer Ladung und in einem zweiten Schritt nach der Molekülmasse getrennt werden. So können Proteine gleicher Größe, aber unterschiedlicher Nettoladung voneinander getrennt werden. Anschließend sollte ein tryptischer Verdau einzelner Proteinbanden erfolgen und die Bruchstücke miteinander verglichen werden. Somit kann genau auf Übereinstimmungen zwischen der Proteinzusammensetzung der Latices verschiedener Arten geschlossen werden. Diese aufwendige Analytik war allerdings nicht Ziel dieser Arbeit, sondern ist Gegenstand anderer Forschungsarbeit.

4.2 Isolation von Mauritanicain

Die Isolation von Mauritanicain aus *Euphorbia mauritanica* L. erfolgte ausgehend von der Methode von Domsalla [150]. Die Methode wurde in einigen Schritten verändert und optimiert.

Der Rohlatex wurde durch Anritzen der Pflanze in mit Puffer befüllte Reaktionsgefäße aufgefangen. Nach Zentrifugation, Lagerung bei -20 °C und erneuter Zentrifugation konnte der leicht getrübte Latex abgenommen werden. Eine Filtration durch Celluloseacetat führte zu

einer klaren, als LatexF bezeichneten Lösung, die für eine Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) herangezogen werden konnte. Nach der Durchführung der IEC wurde von jeder Fraktion der Proteingehalt, sowie die allgemeine proteolytische Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. Dabei zeigt Fraktion 44 den höchsten Gehalt und die höchste proteolytische Aktivität gegenüber BODIPY-FL Casein.



Abb. 9: Proteingehalt und proteolytische Aktivität nach Ionenaustausch-Chromatographie des LatexF von *Euphorbia mauritanica* L.

Schrittweise Erhöhung der NaCl Konzentration von 0,05 - 1,0 M

Eine SDS-PAGE der Fraktionen 3, 6, 17, 32, 44, 58, 68, 72 und 83, bei denen ein Maximum auftrat, wurde angefertigt, um die Trennung der Proteine zu verfolgen (Abb. 10). Der Übergang ist häufig fließend, mehrere Fraktionen enthalten Proteine gleicher Größe, aber in unterschiedlichem Ausmaß.



Abb. 10: SDS-PAGE bestimmter Fraktionen nach Auftrennung des LatexF durch Ionenaustausch-Chromatographie

12 % SDS-Gel, 58 min, 43,5 - 13,5 mA, 200 V, Silber-Färbung

Fraktion 44 wurde durch eine Größenausschluss-Chromatographie (SEC) weiter aufgetrennt, wobei drei Peaks detektiert werden konnten (Abb. 11 A). Peak 1 zeigte dabei eine hohe proteolytische Aktivität, so dass davon ausgegangen wurde, dass das Protein mit der größten Molekülmasse in Fraktion 44, für die hohe Aktivität dieser verantwortlich ist. Nach Abb. 10 besitzt dieses eine Masse im Bereich zwischen 66 - 97 kDa. Daher wurde eine Ultrafiltration mit einer Ausschlussgröße von 50 kDa durchgeführt, um einerseits alle Proteine mit einer geringeren Molekülmasse abzutrennen und andererseits die Probe zu konzentrieren. Eine SEC des Konzentrats ergab einen Hauptpeak und einen kleinen Nebenpeak (Abb. 11 B). Der Hauptpeak wurde zwischen der Retentionszeit 14,4 - 17,4 min aufgefangen und zur Reinheitskontrolle erneut einer SEC unterzogen (Abb. 11 C).



Abb. 11: Größenausschluss-Chromatographie zur Isolation von Mauritanicain

A: Fraktion 44, B: Fraktion 44 nach Ultrafiltration, C: Peak 1 aus B (14,4 - 17,4 min) Injektionsvolumen: 50 μL; Detektionswellenlänge: 210 nm (1 mV = Absorption / 1000); Flussrate: 0,15 mL/min; Laufpuffer: 10 mM Phosphatpuffer pH 7; Säule: Discovery BIO GFC 30 cm x 4.6 mm I.D. 5 μm 150 Å Das Chromatogramm zeigte nun nur noch einen Peak an. Zwar war der Hauptpeak bei Domsalla Peak 2 und bei einer anderen Retentionszeit von der Säule eluiert, jedoch sind beide Chromatogramme nicht direkt vergleichbar. Es wurde zwar die gleiche Säule benutzt, die HPLC-Anlage war hingegen eine andere. Eine Analyse des Peak 2 aus Abb. 11 A ergab nur eine geringe proteolytische Aktivität. Daher wurde die Fraktion, die sich aus dem erwähnten Retentionszeitintervall ergibt, auch aufgrund der im Folgenden gezeigten weiteren Untersuchungen, als reine Fraktion eines Proteins angesehen und dieses als das von Domsalla beschriebene Mauritanicain bezeichnet. Durch die beschriebenen Methoden ließ sich aus dem anfangs aufgefangenen Milchsaft in etwa 120 µg Mauritanicain isolieren. Durch Aufreinigung weiterer sich aus der IEC ergebenen benachbarten Fraktionen, die ebenfalls Mauritanicain enthalten, ließe sich die Menge noch weiter erhöhen.

Weitere Fraktionen der IEC wurden erstmals ebenfalls untersucht, dabei stellte sich Fraktion 68 als weiteren interessanten Kandidaten für Untersuchungen zur Fibrinolyse heraus, was aber bisher erst in Vorversuchen untersucht wurde und daher nicht Eingang in diese Arbeit findet. Andere Fraktionen stellten sich dagegen als uninteressant für weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit heraus.

4.3 Charakterisierung von Mauritanicain

Domsalla beschrieb 2012 erstmalig die Isolierung und Charakterisierung von Mauritanicain [150]. Demnach sei Mauritanicain eine Serin-Protease mit einer Molekülmasse von 95 kDa, einem Temperaturoptimum von 55 - 65 °C, sowie einer optimalen Umsetzungsrate des Substrats Casein bei pH 6,5 - 7,5. Außerdem habe die Protease eine Präferenz für eine Spaltung hinter den Aminosäuren Lysin, Leucin und Alanin, sei jedoch insgesamt unspezifisch [150]. Mauritanicain zeige bei einer Lagerung über 12 Monate bei 4 °C keinen Aktivitätsverlust und habe auch bei 30 minütiger Behandlung mit Acetonitril (bis 50 % v/v), DMSO (bis 30 % v/v), Methanol (bis 50 % v/v) und Harnstoff (2 M) nur einen Verlust der Aktivität von weniger als 20 % [150].

Mauritanicain sollte für Versuche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt werden und musste dazu mehrfach erneut isoliert werden. Zur Überprüfung der Identität wurde jeweils die Molekülmasse bestimmt. Da die Ergebnisse nach den ersten Isolationen Abweichungen von den postulierten 95 kDa aufwiesen, wurde zunächst erneut eine Bestimmung der Molekülmasse durchgeführt und darauffolgend weitere Charakteristika überprüft.

4.3.1 Molekülmasse

Die Molekülmasse wurde sowohl durch Gelelektrophorese, als auch durch MALDI-TOF-MS bestimmt.

4.3.1.1 Gelelektrophorese

Die Auswertung erfolgte durch Abmessen der Rf-Werte der Standardproteine (Tab. 5, Seite 34) und logarithmischer Auftragung dieser in ein Koordinatensystem gegen die jeweiligen Molekülmassen. Durch Einsetzen des Rf-Wertes der Probe in die resultierende Gleichung konnte die Molekülmasse des isolierten Produktes bestimmt werden. Die Abb. 12 zeigt die SDS-PAGE zweier Messungen. Dabei wurde bei A gegenüber B die Laufzeit erhöht, um eine bessere Auftrennung des Markers im Bereich der gesuchten Masse zu erzielen. Die Molekülmasse nach A beträgt 72,9 kDa und nach B 71,1 kDa.



Abb. 12: SDS-PAGE zur Molekülmassenbestimmung von Mauritanicain Coomassie-Färbung, A: 55 min, 46-20 mA, 200 V B: 40 min, 39-19 mA, 200 V

4.3.1.2 MALDI-TOF MS

Eine Bestimmung der Molekülmasse erfolgte außerdem mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie. Das Massenspektrum von Mauritanicain (Abb. 13) zeigt eine Masse von 72,74 kDa.



Abb. 13: Massenspektrum (MALDI-TOF) von Mauritanicain

Damit lag die Molekülmasse im gleichen Bereich wie bei der Bestimmung durch SDS-PAGE ermittelt wurde. Dieser Wert stimmt allerdings, wie bereits erwartet (s.o.), nicht mit dem von Domsalla beschriebenen und von ihm, durch SDS-PAGE, bestimmten Wert von 95 kDa überein. Dies kann zwei Gründe haben:

- 1. Es handelt sich um Abweichungen bei der Auswertung aufgrund experimenteller Verbesserungen zur Methode von Domsalla.
- 2. Es handelt sich um eine andere Protease, als die von Domsalla beschriebene.

Um herauszufinden, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft, wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung unternommen. Dabei handelt es sich teilweise um Methoden, die dementsprechend auch von Domsalla durchgeführt wurden [150].

4.3.2 Reinheitsprüfungen

Die Ergebnisse der Molekülmassenbestimmungen durch SDS-PAGE lassen zunächst vermuten, dass es sich um eine reine Lösung mit nur einem enthaltenen Protein handelt. Bestätigt wird dies durch das Massenspektrum, was zwar 3 Peaks bei 72,7/36,4/24,3 kDa anzeigt, jedoch handelt es sich bei den letzteren Beiden Peaks sehr wahrscheinlich um die Mehrfachladungen z = 2 und z = 3 nach Ionisation von Mauritanicain (Abb. 13). Durch Auftrennung größerer oder konzentrierter Mengen von Mauritanicain in einer SDS-PAGE, als dies für die Größenbestimmung getan wurde, waren im Gel mehrere Banden sichtbar, so dass doch mit einer nicht genügenden Aufreinigung gerechnet werden musste (Abb. 14 A).



Abb. 14: SDS-PAGE und Massenspektren nach In-Gel Verdau zur Reinheitsprüfung A: Das Gel zeigt die SDS-PAGE unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen des Proteinmarkers sowie einer konzentrierten Probe von Mauritanicain.

B: Die Massenspektren zeigen die durch einen In-Gel Verdau der entsprechenden Banden aus A detektierten Fragmente.

Der Verdacht bestand jedoch, dass es sich bei den Banden unterhalb von 73 kDa um Abbauprodukte handelt, die vermutlich unter den Bedingungen der SDS-PAGE entstehen, da im Massenspektrum keine weiteren Peaks auftraten. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde daher ein In-Gel Verdau der drei intensivsten Banden angefertigt. Als Protease für den proteolytischen Verdau wurde Trypsin eingesetzt. Die entstandenen Bruchstücke wurden miteinander verglichen (Abb. 14 B + Abb. 15). Dabei ist zu sehen, dass mehrere Bruchstücke bei allen 3 Proteinbanden identisch sind. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass alle 3 Banden von einem Protein stammen. Andererseits könnte es sich auch um verschiedene Proteine handeln, die evolutionär vom gleichen Protein abstammen.

Daneben wurde eine Elektrophorese unter nativen Bedingungen durchgeführt (Abb. 16 A), um zu sehen, ob die drei Banden der SDS-PAGE evtl. doch durch einen Eigenverdau des Mauritanicains entstanden sind und nicht während der Probenvorbereitung zur SDS-PAGE.




Die Abbildung zeigt verschiedene Abschnitte der Massenspektren, in denen eine Übereinstimmung zu sehen ist. Die Intensität der Signale ist unterschiedlich und nicht mit angegeben. (1 - 3 = Banden abnehmender Größe des Gels aus Abb. 14 A)



Abb. 16: Reinheitsprüfung von Mauritanicain durch Elektrophorese A: Native-PAGE: Mauritanicain, BSA; Gradientgel: 4 - 15 %, 200 V, 46 min

B: SDS-PAGE: Mauritanicain, Marker; 10 % SDS-Gel, 100 V, 147 min

Die Abb. 16 A zeigt für Mauritanicain nur eine einzelne Bande an. Dies spricht wiederrum dafür, dass es sich nur um ein einzelnes Protein handelt. Allerdings lässt das im selben Gel

aufgetragene BSA vermuten, dass die Molekülmasse bei > 132 kDa liegen muss. BSA zeigt zwei Banden im Gel, die vermutlich dem Monomer und Dimer zuzuordnen sind. Es könnte sich also bei Mauritanicain auch um ein Dimer handeln. Dann könnte es sich bei dem Peak im Massenspektrum bei 73 kDa auch um eine Zweifachladung handeln oder aber nur das Monomer wird ionisiert. Allerdings eignet sich die Native-PAGE nicht um eine Molekülmasse zu bestimmen. Durch Verzicht auf SDS, Hitzedenaturierung und β-Mercaptoethanol wird das Laufverhalten der Proteine neben der Molekülmasse auch durch die Ladung, sowie die Faltung des jeweiligen Proteins durch z.B. Disulfid-, Wasserstoff-Brücken, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen beeinflusst. Denkbar wäre aber auch ein Komplex aus mehreren Untereinheiten oder Abbauprodukten, die durch sekundäre Bindungsarten zusammengehalten werden. Daher wurde in einem nächsten Schritt eine SDS-PAGE durchgeführt, bei der die Proben unterschiedlich behandelt wurden. Es wurde abwechselnd auf den Zusatz von β-Mercaptoethanol, sowie auf eine Hitzedenaturierung verzichtet (Abb. 16 B). Ein Protein aus mehreren Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden ist demnach nicht wahrscheinlich, da der Zusatz von β-Mercaptoethanol keinen wesentlichen Einfluss auf die Anzahl der Banden hat. Ein Unterschied zeigt sich allerdings zwischen einer Behandlung mit bzw. ohne Hitzedenaturierung. Ohne ein Erhitzen für 5 min bei 95 °C sind zwei intensive Banden bei 72 kDa und 52 kDa zu sehen, mit Erhitzung dagegen bei gleicher Intensität nur die Bande mit einer Molekülmasse von 72 kDa. Jedoch muss auch hier bedacht werden, dass ohne die Hitzedenaturierung die Faltung des Proteins einen Einfluss auf das Laufverhalten hat und somit die Molekülmassen für die entsprechenden, ohne Hitze behandelten, Proben nicht exakt zu bestimmen sind. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von zwei Banden könnte sein, dass die Bande bei 52 kDa ein Abbauprodukt des Proteins bei 72 kDa sein könnte, das durch eine Instabilität gegenüber SDS entsteht. Dieses Produkt könnte dann bei einer Behandlung mit Hitze durch Eigenverdau weiter aufgespalten werden.

Die bisher aus der Familie Euphorbiaceae charakterisierten Proteasen weisen Molekülmassen von 22 - 117 kDa auf, wobei die meisten im Bereich zwischen 60 - 80 kDa liegen, gefolgt von einer zweiten Häufung im Bereich 30 - 45 kDa (siehe Tab. 1, Seite 6). Damit würde Mauritanicain auf den ersten Blick in dieses Schema passen. Allerdings, vergleicht man die Methoden der Bestimmung der Molekülmassen untereinander, ergeben sich doch diverse Abweichungen bei den Eigenschaften der Proteine. So besitzt z.B. Cotinifolin eine Masse von etwa 80 kDa, ermittelt durch Massenspektrometrie. Eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zeigt dagegen ausschließlich Banden im Bereich 25 - 30 kDa. Cotinifolin

scheint also aus mehreren Untereinheiten zu bestehen [37]. Bei Euphorbain d₁ und d₂, mit durch Größenausschluss-Chromatographie (SEC) bestimmten Massen von angeblich 117 kDa und 65 kDa, sollen nach einer SDS-PAGE hauptsächlich Banden im Bereich von 30 kDa detektiert werden [42]. Auch Euphorbain la₁, la₂ und la₃ sollen in der SDS-PAGE mehrere Banden aufweisen [44]. So sei bei Euphorbain la₁ neben der durch SEC bestimmten Bande bei 66 kDa, eine weitere Bande bei 46 kDa zu sehen. Euphorbain lc zeigt in der SEC einen Peak bei 70 kDa an, nach SDS-PAGE seien Massen von 68 kDa, 41 kDa und 32 kDa im Gel sichtbar [44]. Auch Euphorbain y₁ und y₃ sollen in der SDS-PAGE neben den Banden bei 67 kDa weitere Banden im Bereich 30 - 60 kDa zeigen [48]. Das von der Molekülmasse dem Mauritanicain sehr ähnliche Euphorbain p (74 kDa), zeigt in der Gelelektrophorese eine Hauptbande bei 35 kDa, sowie 2 Nebenbanden bei 20 kDa und 15 kDa. Die Autoren vermuten ein aus mehreren Ketten bestehendes Protein [45]. Auch die Hevaine a, b und 1 sollen in der SDS-PAGE jeweils mehrere Banden haben, während bei der SEC nur ein einzelner Peak für jede Protease vorhanden gewesen sein soll [51, 52]. All die genannten Beobachtungen sind Beispiele dafür, dass es sich bei diesen Proteasen entweder um aus mehreren Untereinheiten bestehende Proteine handelt, ein Selbstverdau oder aber eine Instabilität gegenüber den Bedingungen der SDS-PAGE besteht. Eine Parallele zu Mauritanicain ist lediglich bei Euphorbain la₁ und lc zu sehen. Bei beiden ist wenigstens die, in dem Fall durch SEC bestimmte Masse, auch in der SDS-PAGE zu sehen. Dass weitere Banden auftreten könnte die gleichen Ursachen haben, wie die für Mauritanicain postulierten (s.o.). Dagegen ist Neriifolin S ein offensichtliches kovalent verbundenes Dimer. Diese Protease zeigt in der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Masse von 94 kDa, bei Zusatz eines Reduktionmittels liegt die Masse im Gel bei 47 kDa [58]. Das angebliche Homodimer EuP-82 soll dagegen nicht kovalent verbunden sein, da β-Mercaptoethanol wohl keinen Einfluss auf das 82 kDa große Dimer hat, jedoch unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-PAGE das Monomer bei 41 kDa zu sehen ist. Eine MALDI-TOF MS Analyse ergibt einen Peak bei 34,8 kDa, die Autoren vermuten eine Trennung des Dimers durch Versetzung mit sauren Reagenzien oder durch den Ionisierungsprozess [40, 41]. Warum die Masse des Monomers im Massenspektrum von der ermittelten Masse in der SDS-PAGE abweicht, wird nicht erläutert. LGP (34 kDa), Neriifolin (35 kDa) und Nivulian-II (44 kDa) sind dagegen Beispiele, bei denen sowohl die durch Massenspektrometrie, als auch die durch Gelelektrophorese bestimmten Molekülmassen nahezu übereinstimmen [54, 57, 160]. Abschließend kann nicht eindeutig geklärt werden, warum ohne Hitzedenaturierung bei Mauritanicain eine weitere intensive Bande im Gel sichtbar ist. Einiges spricht aber dafür, dass es sich bei Mauritanicain um eine Protease mit einer Molekülmasse von 73 kDa handelt, welche unter bestimmten Umständen als nicht kovalent gebundenes Dimer vorliegt.

4.3.3 Substratspezifität

4.3.3.1 In-Gel Verdau

Zur Überprüfung der Substratspezifität wurde ein In-Gel Verdau von β -Lactoglobulin durch Mauritanicain durchgeführt. Domsalla fand eine bevorzugte Spaltung beim Verdau dieses Proteins für die Aminosäuren Lysin, Leucin und Alanin [150]. Diese Präferenz konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Während bei Domsalla die häufigste Spaltung hinter Lysin stattfand, ist dieser Trend durch Untersuchungen in dieser Arbeit nicht zu erkennen.

Tab. 17: In-Gel Verdau	von β-Lacto	globulin (L, A	A, K) durc	h Mauritanicain
------------------------	-------------	----------------	------------	-----------------

Bedingungen		Aminosäure [%]				
	Leucin	Alanin	Lysin	Abdeckung [%]		
Domsalla 30 °C über Nacht	32,7	24,5	42,9	88,3		
Flemmig 30 °C über Nacht	35,1	32,4	32,4	64,8		

Massenbereich 0 - 6000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 500 ppm

Um die Spezifität zu präzisieren, sollte erstmalig ein zeitlicher Verlauf der Proteolyse untersucht werden. Hierzu wurde ein Verdau bei 37 °C für die Zeiträume 30, 60, 120, 240 min, sowie für ca. 16 h durchgeführt. Das Ergebnis für die Aminosäuren Leucin, Alanin und Lysin (Tab. 18 und Abb. 17) zeigt nicht direkt einen Unterschied zu den in Tab. 17 stehenden Ergebnissen an. Es zeigt allerdings, dass bereits nach 30 min mit einer hohen Sequenzabdeckung Spaltungen nach diesen drei Aminosäuren erfolgt sind. Dabei ist Leucin mit 45 % deutlich stärker vertreten. Mit der Zeit nimmt die Sequenzabdeckung ab, was dafür spricht, das auch hinter anderen Aminosäuren eine Spaltung stattfindet. Das zeigt aber auch, dass definitiv zunächst die erwähnten drei Aminosäuren bevorzugt wurden. Nach Inkubation für 37 °C über Nacht sind weitere Spaltungen erfolgt, in der Summe liegt jetzt wieder Leucin als bevorzugte Aminosäure für eine Spaltung an erster Stelle. Die Sequenzabdeckung ist dabei

hoch. Schließt man in den theoretischen Verdau weitere Aminosäuren ein, wird deutlich, dass vor allem Isoleucin auch zu den bevorzugten Spaltstellen gehört (Tab. 19 und Abb. 18).

Aminosäuren [%]								
Zeit [min]	Leucin	Alanin	Lysin	Sequenz- Abdeckung [%]				
30	45,0	25,0	30,0	76,5				
60	41,7	25,0	33,3	39,5				
120	36,7	36,7	26,7	44,4				
180	35,0	35,0	30,0	40,1				
240	35,7	35,7	28,6	27,8				
üN	50,0	18,8	31,3	85,8				

Tab. 18: In-Gel Verdau von β-Lactoglobulin durch Mauritanicain in verschiedenen Zeiträumen (L, A, K)

Massenbereich 0 - 6000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 500 ppm, Verdau bei 37 °C

Tab. 19: In-Gel Verdau vo	ι β-Lactoglobulin in v	verschiedenen Zeiträumen	(div. Aminosäuren)
---------------------------	------------------------	--------------------------	--------------------

Aminosäuren [%]										
Zeit [min]	L	А	K	V	Ι	М	G	Р	F	Sequenz- Abdeckung [%]
30	28,1	13,5	18,8	6,3	10,4	3,1	7,3	8,3	4,2	87,0
60	23,8	15,0	17,5	7,5	13,8	2,5	6,3	6,3	7,5	82,7
120	29,7	26,6	17,2	3,1	13,8	6,3	6,3	7,8	9,4	78,4
180	19,7	21,2	10,6	3,0	16,7	6,1	6,1	6,1	4,5	70,4
240	25,9	14,8	14,8	7,4	11,1	7,4	9,3	9,3	0,0	58,0
üN	29,3	14,1	13,1	13,1	8,1	5,1	3,0	9,1	5,1	95,1

Massenbereich 0 - 6000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 500 ppm, Verdau bei 37 °C

	10	20	30	40	50	60	70	80	
	LIVTQTMKGL	DIQKVAGTWY	SLAMAASDIS	LLDAQSAPLR	VYVEELKPTP	EGDLEILLQK	WENGECAQKK	IIAEKTKIPA	_
30 min	90	100	110	120	130	140	150	160	_
50 11111	VEKIDALNEN	KVLVLDTDYK	KYLLECMENS	AEPEOSLACO	CLVRTPEVDD	EALEKEDKAL	KALPMHIRLS	FNPTOLEEOC	_
								THE LODDY O	
	170								
	HI								
									_
	10	20	30	40	50	60	70	80	
	LIVTQTMKGL	DIQKVAGTWY	SLAMAASDIS	LLDAQSAPLR	VYVEELKPTP	EGDLEILLQK	WENGECAQKK	IIAEKTKIPA	
	90	100	110	120	130	140	150	160	
60 min	VFKIDALNEN	KVLVLDTDYK	KYLLFCMENS	AEPEOSLACO	CLVRTPEVDD	EALEKFDKAL	KALPMHIRLS	FNPTOLEEOC	
	170								-
	нт								
	111								
	10	20	30	40	50	60	70	80	-
	LIVTOTMKGI	DIOKVAGTWV	STANAAGDIG	LIDAOGADID	VYVEELKDTD	EGDLETLLOK	WENGECLOKK	TTAEKTKTDA	-
	PIALÓI MUGR	DIQUVAGIWI	2 THUMAD 1 2	TIDYÖSYL PK	VIVEEDREIF	EGDIFITIŐU	WENGECHQILL	TIABRIRIFA	
	90	100	110	120	130	140	150	160	_
120 min	VEKIDALNEN	KATATDADAR	KVLLECMENS	AFPEOSLACO	CLVRTPFVDD	FATEREDRAT	KALDMHIRLS	FNRTOLEFOC	-
120 11111				ADI DØDINCØ	CHARTERDD	BADBICI DICAD		INI IQUEEQC	
	170								
	HI								
	10	20	30	40	50	60	70	80	
	LIVTQTMKGL	DIQKVAGTWY	SLAMAASDIS	LLDAQSAPLR	VYVEELKPTP	EGDLEILLQK	WENGECAQKK	IIAEKTKIPA	
	0.0	100	110	100	100	140	150	1.00	_
180 min	90	100	IIU WWW DOWDNO	120	130	14U	150	16U	-
100 11111	VEKIDALNEN	KATATDIDIK	KILLECMENS	AEPEQSLACQ	CTAKLEFADD	EALEKEDKAL	KALPMHIRLS	FNFLÖTFFÖC	
	170								-
	цт								-
	111								
	10	20	30	40	50	60	70	80	-
	LIVTOTMKGL	DIOKVAGTWY	STUDADASDIS	LLDAOSAPLR	VYVEELKPTP	FGDLETLLOK	WENGECAOKK	ΤΤΔΕΚΨΚΤΡΔ	
		DIÄUMUOIMI	5		• • • • • • • • • • • • • • • •				
	90	100	110	120	130	140	150	160	
240 min	VFKIDALNEN	KVLVLDTDYK	KYLLFCMENS	AEPEQSLACQ	CLVRTPEVDD	EALEKFDKAL	KALPMHIRLS	FNPTQLEEQC	
	170								-
	170								-
	111								
	10	2.0	30	40	50	60	70	80	
	LIVTOTMKGL	DIOKVAGTWY	SLAMAASDIS	LLDAOSAPLE	VYVEELKPTP	EGDLETILOK	WENGECAOKK	IIAEKTKIPA	-
		2121010101				SODDIDION			
	0.0	100	110	120	120	140	150	160	_
üher	90	TOO	LIU	12U	TON	EALEVEDUNT	L20	ENDBOI FEOC	
aber	VERTDALINEN	VATATDIDIK	KILLFCPIENS	ALPEQSLACQ	CTARIBEADD	CALENFURAL	VAPLUITERS	LNEIGTFFŐC	
Nacht									
itaent									_
	170								
	нт								

Verdau an L, A, K; mögliche verpasste Spaltungen = 6; Massenbereich: 0 - 6000 Da

Abb. 17: In-Gel Verdau von β-Lactoglobulin durch Mauritanicain in verschiedenen Zeiträumen (L, A, K) Erstellt mit Bruker Biotools (Vers. 3.2) und Sequence editor (Vers. 3.2)



Verdau an L, M, V, K, A, F, I, P, G; mgl. verpasste Spaltungen = 6; Massenbereich: 0 - 6000

Abb. 18: In-Gel Verdau von β-Lactoglobulin in verschiedenen Zeiträumen (div. Aminosäuren) Erstellt mit Bruker Biotools (Vers. 3.2) und Sequence editor (Vers. 3.2)

4.3.4 Temperaturabhängigkeit

Mauritanicain zeigte vom Messbeginn bei 20 °C bis zu einer Temperatur von 80 °C eine proteolytische Aktivität gegenüber Casein (Abb. 19). Ab Werten > 70 °C sank die Aktivität allerdings drastisch ab, bei 75 °C ist bereits weniger als 20 % Restaktivität vorhanden. Das Optimum der Umsetzung des Substrats fand in einem Bereich von 55 - 65 °C statt. Eine Lagerung für 20 min bei verschiedenen Temperaturen hatte von 20 - 70 °C keinen Einfluss

auf die proteolytische Aktivität. Auch hier führte aber der Einfluss von > 70 °C zu einer starken Aktivitätsminderung.



Abb. 19: Temperaturabhängigkeit von Mauritanicain gegenüber BODIPY-FL Casein Proteolytische Aktivität von Mauritanicain während (Optimum), sowie nach Lagerung bei bestimmter Temperatur (Stabilität); n = 3

Damit zeigte Mauritanicain hier ein nahezu gleiches Verhalten gegenüber verschiedenen Temperaturen wie auch von Domsalla beschrieben [150]. Einen Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Aktivität wurde nur für einen Teil der aus der Familie Euphorbiaceae isolierten Latex Proteasen durchgeführt. Bei ihnen liegt das Optimum einer Umsetzung der jeweiligen Substrate zwischen 35 - 60 °C (vgl. Tab. 1, Seite 6). Neben diesen Proteasen und Mauritanicain zeigen auch Latex Proteasen aus anderen Pflanzenfamilien ein Aktivitätsoptimum in diesem Bereich, sowie eine relativ hohe Temperaturstabilität [34]. Eine hohe Temperaturstabilität erscheint logisch, da viele milchsafthaltige Pflanzen in subtropischen und tropischen Gebieten beheimatet sind [1, 20].

4.3.5 pH-Wert Abhängigkeit

Gegenüber pH Veränderungen ist ein starker Einfluss auf die proteolytische Aktivität Mauritanicains gegenüber Casein zu beobachten. Die Aktivität liegt < pH 5 und > pH 9 bei unter 40 %. Der optimale pH-Wert für eine Umsetzung des Caseins bei 37 °C ist in einem Bereich von pH 5,5 - 6,5 zu beobachten (Abb. 20).



Abb. 20: pH-Abhängigkeit von Mauritanicain gegenüber BODIPY-FL Casein bei 37 °C n = 6

Damit weichen die Ergebnisse überraschend von denen Domsallas ab. Dieser fand ein Optimum zwischen pH 6,5 - 7,5 [150]. Domsalla nutzte zwar teilweise andere Puffersysteme, was auch einen Einfluss auf die Aktivität haben könnte, jedoch weichen die Systeme erst bei pH > 7,5 voneinander ab. Ob diese Abweichungen aufgrund experimenteller Abweichungen oder aufgrund der Isolation eines anderen Produktes zustanden kommt, kann nicht geklärt werden. Eine experimentelle Abweichung scheint jedoch wahrscheinlicher zu sein. Es könnte z.B. sein, dass Domsalla die pH-Werte der Puffer bei Raumtemperatur eingestellt hat. Bekanntlich besitzen einige Puffer eine starke Temperaturabhängigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurden die pH Werte der Puffer bei 37 °C bestimmt. Ebenfalls wurde bei der Messung des pH-Wertes die Mischung der drei einzelnen Puffer Komponenten im Reaktionsgefäß berücksichtigt (Proben-, Substrat-, Bestimmungspuffer).

Ein pH Optimum in diesem Bereich besitzen auch andere aus der Familie Euphorbiaceae charakterisierte Proteasen: Curcain, Hevain a, b und l, Euphorbain d_1 , d_2 , t_4 und y_2 , Miliin, sowie Nivulian-II. Teilweise wurden jedoch andere Substrate zur Bestimmung verwendet (siehe Tab. 1, Seite 6), was einen Einfluss auf das pH Optimum haben kann. So zeigt z.B. Euphorbain y_2 ein Optimum bei pH 5,2 gegenüber einer Proteolyse von Azocollagen, dagegen ist die Umsetzung von Azocasein am höchsten zwischen pH 6,5 - 7 [48].

4.3.6 Isoelektrischer Punkt

Mauritanicain wurde erstmalig in dieser Arbeit einer Isoelektrischen Fokussierung in einem pH-Gradienten Gel unterzogen, anschließend wie unter 3.9.2 beschrieben fixiert und mit Silber angefärbt.

Der Vergleich mit den Standardproteinen (Abb. 21) ergibt einen IEP von ungefähr 6,5. Die aus Milchsaft in der Familie Euphorbiaceae isolierten Proteasen, deren IEP bestimmt wurde, liegen im Bereich von pH 4 - 8,3 (vgl. Tab. 1, Seite 6). Die isoelektrischen Punkte von Euphorbain d₁ (6,5), Euphorbain la₂ (6,4) und Euphorbain y₃ (6,3) sind dem IEP von Mauritanicain am ähnlichsten [42, 44, 48]. Weitere Eigenschaften dieser Proteasen, wie das pH Optimum sowie die Molekülmasse, unterscheiden sich allerdings teilweise in Bezug auf Mauritanicain. Wie unter 4.3.5 erwähnt, kann das pH Optimum je nach Substrat abweichen. Lediglich Euphorbain y₃ besitzt mit 67 kDa auch eine ähnliche Molekülmasse wie Mauritanicain mit 73 kDa (vgl. 4.3.1).



Abb. 21: Isoelektrische Fokussierung von Mauritanicain und Standardproteinen

Lane 1: 20 µL Mauritanicain (20 µg/mL), Lane 2: 1 µL Proteinstandard (1:10 Verdünnung), Silber-Färbung

4.3.7 Protease-Klasse

Mauritanicain wurde mit verschiedenen Protease-Inhibitoren versetzt und anschließend die proteolytische Aktivität bestimmt. Jeder Protease-Inhibitor ist dabei spezifisch für eine bestimmte Protease-Klasse Das Verhältnis zur Aktivität ohne Inhibitor Zusatz ergibt die Restaktivität (Abb. 22).



Abb. 22: Restaktivität von Mauritanicain nach Inkubation mit Inhibitoren * signifikante Aktivitätsminderung (Wilcoxon $\alpha = 0.05$; $n \ge 4$)

Mauritanicain wird nur durch die Serin-Protease Inhibitoren Aprotinin und AEBSF-HCl signifikant in seiner Aktivität gemindert. Nach diesen Versuchen zur Folge ist Mauritanicain also in die Klasse der Serin-Proteasen einzuordnen, was die Ergebnisse von Domsalla bestätigt [150]. Das Ergebnis überrascht nicht, bisher sind die meisten isolierten Latex-Proteasen der Klasse Serin- und Cystein-Proteasen zuzuordnen. Bei den aus Milchsaft isolierten Cystein-Proteasen handelt es sich fast ausschließlich um Proteine mit einer Molekülmasse von 20 - 30 kDa, bei den isolierten Serin-Proteasen dagegen hauptsächlich um welche im Massenbereich 60 - 80 kDa [34, 60]. Auch besitzen Cystein-Proteasen aus Latex nahezu alle einen Isoelektrischen Punkt > pH 9 [34]. Die Wahrscheinlichkeit, dass Mauritanicain mit einer Molekülmasse von 73 kDa und einem IEP von etwa 6,5 den Cystein-Proteasen angehört, war daher gering. Aspartat-Proteasen wurden zwar in diversen Pflanzenarten gefunden, jedoch ist aus Latex bisher erst eine einzige isoliert und charakterisiert worden [34, 161, 162]. Ebenso wurde bisher nur eine Metallo-Protease aus Latex isoliert [37].

4.4 Untersuchungen zum Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse

Ein Einfluss auf die Hämostase und / oder Fibrinolyse wurde durch verschiedene *in vitro* Methoden untersucht. Dabei dienten als Testsubstanzen je nach Versuch zum einen die Latices der durch das Screening (siehe 4.1.2) besonders interessant erscheinenden Species (Tab. 16), sowie zum anderen die aus *Euphorbia mauritanica* L. isolierte Protease Mauritanicain. Die Latices der zwölf verschiedenen Arten wurden für alle folgenden Versuche in einem 50 mM Tris-Puffer pH 7,4 aufgefangen.

4.4.1 Trübungsmessungen

4.4.1.1 Gerinnungsauslösung

Ob eine Probe zur Auslösung einer Gerinnung führt, wurde u.a. durch eine Trübungsmessung ermittelt. Dabei kamen zwei Methoden zum Einsatz. Zum einen wurde die Probe mit einer Lösung von humanem Fibrinogen inkubiert, zum anderen erfolgte die Inkubation der Probe mit Plasma vom Schwein. Die Gerinnung wurde durch Trübung der Lösung und damit Zunahme der Extinktion angezeigt. Als Positivkontrolle kam im Falle der Fibrinogen-Lösung Thrombin zum Einsatz, für den Versuch mit Plasma diente hierzu Calciumchlorid.

Inkubation von Mauritanicain mit Fibrinogen

Es kamen Lösungen des Fibrinogens in unterschiedlicher Konzentration zum Einsatz (0,5 - 25 mg/mL). Die Absorption der Lösung bei 560 nm wurde über jeweils 30 min gemessen. Bei keiner der eingesetzten Konzentrationen führte Mauritanicain zu einer Trübung der Lösung, exemplarisch für Fibrinogen 5 mg/mL in Abb. 23 dargestellt. Mauritanicain führte also in diesem Versuch nicht zu einer Spaltung des Fibrinogens, die dem Thrombin ähnlich ist und damit eine Gerinnung auslösen würde.



Abb. 23: Vergleich des Einflusses von Mauritanicain und Thrombin auf Fibrinogen (5 mg/mL) Während Thrombin zur Gerinnung des Fibrinogens führt, hat Mauritanicain keinen Einfluss; T = 37 °C (alle Werte sind signifikant, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05)

Inkubation verschiedener Latices mit Fibrinogen

Der Versuch lief analog zu Mauritanicain mit verschiedenen Fibrinogen Konzentrationen. Eine Trübung während der Inkubation war für keinen der zwölf Latices zu detektieren. Damit ist bei keinem der Latices in der eingesetzten Konzentration (200 µg/mL) im Zeitraum von 30 min eine thrombinartige Gerinnungsauslösung nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Inkubation von Mauritanicain mit Plasma

Plasma wurde unverdünnt mit vier verschiedenen Konzentrationen von Mauritanicain versetzt und ebenfalls eine Absorption bei 560 nm gemessen. Damit sollte eine calciumunabhängige Gerinnungsauslösung untersucht werden. Als Positivkontrolle diente Calciumchlorid.

In keiner der eingesetzten Konzentrationen von Mauritanicain ($80 \mu g/mL$, $16 \mu g/mL$, $8 \mu g/mL$, $0,16 \mu g/mL$) kam es zu einem Anstieg der Trübung und demzufolge zu keiner calciumunabhängigen Gerinnungsauslösung, exemplarisch in Abb. 24 zu sehen.



Abb. 24: Einfluss von Mauritanicain auf Citratplasma

Als Positivkontrolle dient Calciumchlorid, das eine Gerinnung des Plasmas auslöst; T = 37 °C (alle Werte sind signifikant, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05)

Inkubation verschiedener Latices mit Plasma

Keiner der untersuchten zwölf Latices führte in der eingesetzten Konzentration (200 µg/mL) zu einem Anstieg der Trübung während einer 30 minütigen Inkubation mit Citratplasma und damit zu keiner calciumunabhängigen Gerinnung (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst hat also in den eingesetzten Konzentrationen sowohl keiner der untersuchten Latices, als auch Mauritanicain bei den oben durchgeführten Versuchen eine thrombinartige und calciumunabhängige Wirkung auf die Gerinnung. Beim Vergleich mit anderen Latices, proteolytisch aktiven Latex-Fraktionen oder isolierten Latex-Proteasen findet man ein heterogenes Bild. Einige zeigen eine thrombinartige und calciumunabhängige Gerinnung, viele zeigen aber vor allem in Gegenwart von Calcium eine verkürzte Plasmagerinnungszeit (Gerinnungsverstärkung). Einige Autoren nehmen teilweise korrekterweise auch in letzterem Fall eine mögliche thrombinartige Wirkung an, da z.T. auch calciumunabhängige Versuche fehlen. Dies wird jedoch dann erst im nächsten Kapitel 4.4.1.2 besprochen. Eine Fibrinbildung bei der Inkubation mit einer reinen Fibrinogen-Lösung zeigt die aus Pergularia extensa (JACQ.) N.E. BR. (Synonym von Pergularia daemia (FORSSK.) CHIOV.) (Apocynaceae) isolierte Cysteinprotease Pergularain e I [104]. Gleiches wurde für den Latex von Calotropis gigantea (L.) DRYAND. (Apocynaceae) beobachtet. Die Autoren vermuten daher für diesen eine thrombinartige Wirkung [132, 163, 164]. Für bestimmte Fraktionen aus dem Latex von Calotropis procera (AITON) DRYAND. (Apocynaceae) wird aus gleichem Grund ebenfalls u.a. eine thrombinartige Wirkung angenommen [133]. Eine Gerinnselbildung aus reinem Fibrinogen konnte auch bei einer Inkubation mit einer enzymreichen Fraktion aus dem Latex von Asclepias curassavica L. (Apocynaceae) beobachtet werden, genau wie eine calciumunabhängige Gerinnselbildung von humanem Plasma [165]. Der Latex von Cnidoscolus urens (L.) ARTHUR (Euphorbiaceae) führt mit steigender Konzentration ebenfalls zu einer calciumunabhängigen Gerinnung von Plasma [135]. Eine thrombin- sowie eine plasminartige Wirkung wird einer proteolytisch aktiven Fraktion aus Cryptostegia grandiflora ROXB. EX R.BR. (Apocynaceae) nachgesagt, enthaltene Cystein-Protease(n) soll(en) aus Fibrinogen ein Gerinnsel erzeugen, welches mit der Zeit wieder aufgelöst wird [137]. Die gleichen Beobachtungen wurden auch für Latices der erwähnten Arten Pergularia extensa, Asclepias curassavica und Calotropis gigantea, sowie für den Latex von und Cynanchum pauciflorum R.BR. (Synonym von Cynanchum tunicatum (RETZ.) ALSTON) (Apocynaceae) gemacht [131]. Möglicherweise ist eine thrombinartige Wirkung der Grund, warum diese Latices traditionell zur Blutstillung bei Wunden eingesetzt werden. Daneben werden aufgrund von blutstillenden Eigenschaften auch traditionell z.B. die Latices der Euphorbiaceae Arten Jatropha curcas L., Jatropha gossypiifolia L., Pedilanthus tithymaloides (L.) POIT. (Synonym von Euphorbia tithymaloides L.) und Euphorbia caducifolia HAINES angewendet [10-13].

4.4.1.2 Gerinnungshemmung / Fibrinolyse

Zur Untersuchung, ob die Proben eine fibrin(ogen)olytische Aktivität besitzen, wurde ebenfalls eine Trübungsmessung verwendet. Dazu wurden die Proben mit der Testlösung versetzt und nach Zugabe der gerinnungsauslösenden Substanzen Thrombin (Fibrinogen-Lösung) bzw. Ca²⁺ (Plasma), die Trübung der Lösung im Vergleich zu einer Lösung ohne Probenzusatz ermittelt. Dabei erfolgte zum einen eine direkte Zugabe der Proben, zum anderen eine 30 minütige Vorinkubation der Proben mit der Testlösung.

Inkubation von Mauritanicain mit Fibrinogen und Thrombin

Zunächst wurde Mauritanicain mit verschiedenen Konzentrationen von Fibrinogen vorinkubiert. Dabei führte die Vorinkubation mit 2,5 mg/mL Fibrinogen und anschließender Zugabe von Thrombin (6,4 U/mL) zu einer deutlich geringeren Trübung der Lösung (Abb. 25 C), im Vergleich zur Vorinkubation mit Puffer statt mit Mauritanicain und anschließender Thrombin Zugabe. Bei einer Fibrinogen Konzentration von 5 mg/mL kam es zunächst zu einem schnelleren Anstieg der Trübung, am Endpunkt war aber auch hier eine deutlich geringere Trübung zu sehen (Abb. 25 B). Für die Konzentration 0,5 mg/mL wurde

eine sichtbar vollständige, aufgrund der Schwankungen des Kontrollwertes aber nicht signifikante Gerinnungshemmung ermittelt. Dagegen führte die Inkubation von Mauritanicain mit 25 mg/mL Fibrinogen zu einem nicht signifikanten schnelleren Anstieg der Trübung im Vergleich zum Kontrollwert.



Abb. 25: Einfluss von Mauritanicain (80 μg/mL) auf die Thrombin-induzierte Gerinnung nach Vorabinkubation mit unterschiedlichen Fibrinogen Konzentrationen A = 25 mg/mL, B = 5 mg/mL, C = 2,5 mg/mL, D = 0,5 mg/mL Fibrinogen; T = 37 °C

*signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05

Weiterhin wurden verschiedene Konzentrationen von Mauritanicain auf eine Gerinnungshemmung einer Fibrinogen-Lösung der Konzentration 2,5 mg/mL getestet. Es wurden neben der Ausgangskonzentration von 80 μ g/mL folgende Verdünnungen dieser zu jeweils 5 μ L eingesetzt: 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000. Die Ergebnisse sind in Abb. 26 dargestellt. Während die unverdünnte Probe (Abb. 26 A) zu einer deutlichen Gerinnungshemmung führt, nimmt die Gerinnungshemmung ab einer Verdünnungen von 1:10 kontinuierlich ab. Paradoxerweise zeigt Mauritanicain in einer Konzentration von 16 μ g/mL

und 8 µg/mL zunächst einen stärkeren Anstieg der Trübung als bei der Kontrolle Thrombin. Ähnliches konnte auch bereits in Abb. 25 A+B detektiert werden. Der Endpunkt liegt für die Mauritanicain Konzentration von 16 µg/mL nur geringfügig niedriger als bei der Kontrolle, die Gerinnungshemmung ist im Vergleich zu niedrigeren Mauritanicain Konzentrationen unerwartet geringer. Die Protease scheint also bei einem bestimmten Verhältnis von Fibrinogen zu Mauritanicain zu einem schnelleren Anstieg der Gerinnung zu führen. Bei höheren und niedrigeren Konzentrationen der Protease ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Der schnellere Anstieg ist nur in Gegenwart von Thrombin vorhanden, da wie unter 4.4.1.1 gezeigt, eine alleinige Inkubation von Mauritanicain mit verschiedenen Konzentrationen an Fibrinogen zu keiner Auslösung der Gerinnung führt. Eine mögliche Erklärung könnten die Thrombin-Bindungsstellen am Fibrin sein. Diese sind zum einen in der E-Domäne, zum anderen in der D-Domäne lokalisiert. Die Bindungsstelle in der D-Domäne befindet sich an der C-terminalen y-Kette [166]. Wie sich in späteren Versuchen herausstellen wird (siehe 4.4.5), spaltet Mauritanicain zunächst die A α -, dann die B β - und erst zuletzt die γ -Kette des Fibrinogens. Möglicherweise ist durch einen Abbau der Aa- und BB-Kette aufgrund der Vorinkubation, die Bindungsregion für Thrombin in der γ -Kette besser zugänglich, so dass Thrombin besser wirken kann. Es käme damit zunächst zu einem verstärkten Anstieg der Gerinnung. Aufgrund des aber bereits zum Teil abgebauten Fibrin(ogen)s, liegt am Endpunkt die Trübung dennoch unterhalb der Kontrolle. Bei höheren Mauritanicain Konzentrationen könnte dagegen auch die y-Kette bereits abgebaut sein, so dass Thrombin nicht mehr am Fibrinogen binden kann. Bei niedrigeren Konzentrationen könnte der fibrin(ogen)olytische Effekt überwiegen.





Konzentration Mauritanicain: A = 80 μ g/mL, B = 16 μ g/mL, C = 8 μ g/mL, D = 1,6 μ g/mL, E = 0,8 μ g/mL, F = 0,16 μ g/mL, G = 0,08 μ g/mL ; T = 37 °C; *signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05

Eine direkte Zugabe von Mauritanicain, ohne vorherige Inkubation mit Fibrinogen, führt hingegen zu etwas abweichenden Ergebnissen (Abb. 27). Eine Konzentration von 80 µg/mL führt zu einer deutlichen Trübungsminderung, im Vergleich zur Vorinkubation ist diese allerdings etwas schwächer ausgeprägt. Bei einem Einsatz von 16 und 8 µg/mL Mauritanicain kommt es in diesem Fall zu keinem schnelleren Anstieg der Trübung, im Gegenteil ist hier eine klare Minderung der Trübung im Verlauf und Endpunkt zu messen. Für die Konzentrationen 1,6 und 0,8 µg/mL sind die Abweichungen zur Kontrolle gering. Ab einer 1:500 Verdünnung von Mauritanicain ist keine Änderung der Trübung vorhanden. Ein Unterschied zu den Experimenten mit vorheriger Inkubation von Fibrinogen mit Mauritanicain war zu erwarten. Die Hemmung der Gerinnung bei den hohen und niedrigen Konzentration von Mauritanicain wird vermutlich daher schwächer ausgeprägt sein, da die 30 min fehlen, in denen das zur Gerinnung benötigte Fibrinogen abgebaut werden konnte, um eine Gerinnung zu verhindern. Dies geschieht nun parallel zur Entstehung von Fibrin und wird evtl. daher insgesamt schwächer ausgeprägt sein. Gleichzeitig mit der Entstehung des Fibrins, könnte auch hier selbiges wieder durch Mauritanicain abgebaut werden. Ein hier nicht zu beobachtender schnellerer Anstieg der Gerinnung für die Konzentrationen 16 µg/mL und 8 µg/mL, könnte wiederrum mit der oben beschriebenen Bindungsaffinität des Thrombins zu erklären sein. Da durch die wegfallende Vorinkubation noch keine Teile der Aα- und Bβ-Kette des Fibrinogens abgebaut werden konnten, ist auch eine verstärkte Bindung von Thrombin an C-terminale Regionen der y-Kette, im Vergleich zur Kontrolle, nicht anzunehmen.

Untersuchungen zum Einfluss auf die Gerinnung von Fibrinogen zu Fibrin in Gegenwart von Thrombin konnten in der Literatur für andere Latices, bzw. daraus isolierte proteolytisch aktive Fraktionen oder Proteasen nicht gefunden werden. Die Autoren testen lediglich, ob die jeweilige Probe, selber, also in Abwesenheit von Thrombin, eine Gerinnung einer Fibrinogen-Lösung erwirken kann, wie bereits in Kapitel 4.4.1.1 beschrieben.



Abb. 27: Direkte Inkubation von Fibrinogen 2,5 mg/mL mit Thrombin und verschiedenen Konzentrationen von Mauritanicain

Konzentration Mauritanicain: A = 80 μ g/mL, B = 16 μ g/mL, C = 8 μ g/mL, D = 1,6 μ g/mL, E = 0,8 μ g/mL, F = 0,16 μ g/mL, G = 0,08 μ g/mL; T = 37 °C; *signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05

Inkubation von Mauritanicain mit Plasma und Calcium

Der Einfluss auf die Gerinnung von Plasma wurde ebenfalls mit verschiedenen Konzentrationen an Mauritanicain durchgeführt. Dabei wurde auch hier zunächst das Plasma für 30 min bei 37 °C mit der entsprechenden Verdünnung der Protease vorinkubiert. Zur Gerinnungsauslösung erfolgte ein Zusatz an Calciumchlorid (25 mM). Die Ergebnisse in Abb. 28 zeigen bei einer Konzentration von 80 μ g/mL eine sichtbare Minderung der Trübung und damit eine verminderte Gerinnung. Für die Konzentrationen 16 μ g/mL und 8 μ g/mL ist dagegen ein schnellerer Anstieg der Trübung zu sehen, nach 30 min liegen die Werte auf gleichem Niveau wie bei der Kontrolle. Für weitere Verdünnungen Mauritanicains ist keine Trübungsminderung nachweisbar. Eine direkte Mischung von Mauritanicain, Calcium und Plasma führt im Vergleich zur Kontrolle ohne Mauritanicain Zusatz in keiner der verwendeten Konzentrationen zu einer signifikanten Änderung (Abb. 29).

Auch bei diesen Versuchen könnte eine Erklärung für einen schnelleren Anstieg der Gerinnung bei einer Vorinkubation mit den Konzentrationen 16 µg/mL und 8 µg/mL, in einer Verstärkung der Thrombin Bindung an Fibrin liegen (s.o.). Dieser Effekt ist wie bei der reinen Fibrinogen-Lösung, bei einem Versuch ohne Vorinkubation, aus genannten Gründen nicht mehr vorhanden. Ein Unterschied der Versuche mit Plasma im Vergleich zu reinem Fibrinogen war anzunehmen, jedoch ist dieser unerwartet hoch. Vergleicht man die Verhältnisse von Mauritanicain zum Fibrinogen in beiden Versuchen, so steht im Versuch mit Plasma einer gleichen Mauritanicain Konzentration, Fibrinogen in einer Konzentration um etwa Faktor 10 weniger gegenüber, wenn man davon ausgeht, dass die Konzentration an Fibrinogen im Plasma zwischen 1,5 - 4,5 g/L beträgt [167]. Lediglich die höchste Mauritanicain Konzentration, bei einer Vorinkubation mit Plasma, führt zu einer Trübungsminderung, die direkte Inkubation hat keinen Einfluss auf die Gerinnung. Die Gründe hierfür mögen vielfältig sein. Mauritanicain könnte durch im Plasma enthaltene Protease-Inhibitoren, wie z.B. die zirkulierenden Inhibitoren des Plasmins, α2-Antiplasmin und α 2-Makroglobulin, gehemmt werden [72]. Gerade α 2-Makroglobulin ist ein allgemeiner unspezifischer Protease-Inhibitor, aber auch für a2-Antiplasmin ist eine Hemmung von Trypsin und Chymotrypsin beschrieben [73]. Eine weitere mögliche Ursache könnte im Falle einer sehr unspezifischen Spaltung von Proteinen durch Mauritanicain, der Angriff weiterer im Plasma vorhandener Proteine sein, so dass der Einfluss auf Fibrinogen und Fibrin vermindert ist.





Konzentration Mauritanicain: $A = 80 \ \mu g/mL$, $B = 16 \ \mu g/mL$, $C = 8 \ \mu g/mL$, $D = 1.6 \ \mu g/mL$, $E = 0.8 \ \mu g/mL$, $F = 0.16 \ \mu g/mL$, $G = 0.08 \ \mu g/mL$; $T = 37 \ ^{\circ}C$; *signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, $\alpha = 0.05$



Abb. 29: Direkte Inkubation von Plasma mit Ca²⁺ und verschiedenen Konzentrationen von Mauritanicain Konzentration Mauritanicain: $A = 80 \ \mu g/mL$, $B = 16 \ \mu g/mL$, $C = 8 \ \mu g/mL$, $D = 1.6 \ \mu g/mL$, $E = 0.8 \ \mu g/mL$, $F = 0.16 \ \mu g/mL$, $G = 0.08 \ \mu g/mL$; $T = 37 \ ^{\circ}$ C; keine signifikanten Änderungen, zweiseitiger t-Test, $n = 3 \ \alpha = 0.05$

Um zu sehen, wie sich eine größere Menge an Mauritanicain, als die maximal eingesetzte Konzentration von 80 µg/mL, auf eine direkte Inkubation mit Plasma und Calcium auswirkt, wurde die gleiche Konzentration an Mauritanicain, mit einer 1:1 Verdünnung an Plasma versetzt (Abb. 30). In diesem Fall bewirkt Mauritanicain eine deutlich verminderte Trübung der Lösung. Vermutlich reichen nun die Konzentrationen an Inhibitoren im verdünnten Plasma nicht aus, um Mauritanicain komplett zu hemmen. Ebenso könnte Mauritanicain neben einem möglichen Angriff weiterer Plasmaproteine nun ausreichend vorhanden zu sein, um auch entstandenes Fibrin abzubauen oder aber durch Abbau von Fibrinogen dieses so zu beeinflussen, dass eine Gerinnung zu Fibrin gemindert ist.



Abb. 30: Direkte Inkubation von Mauritanicain (80 µg/mL) mit Plasma (1:1 Verdünnung) und Calciumchlorid (25 mM)

T = 37 °C; *signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05

Eine Beeinflussung der Recalcifizierungszeit wurde in der Literatur auch für andere Latices, enthaltene proteolytisch aktive Fraktionen oder isolierte Proteasen untersucht. Dabei erfolgte die Messung häufig visuell. Die Serin-Protease LGP, aus dem Latex von *Synadenium grantii* HOOK. F. (Euphorbiaceae), führte konzentrationsabhängig zu einer schnelleren calciumabhängigen Gerinnung, im Vergleich zur Gerinnung ohne LGP Zusatz. Dabei erfolgte zwar eine Vorinkubation der Protease mit dem Plasma, jedoch nur für eine Minute [54]. Gleiches gilt auch für Pergularain e I. Diese Cystein-Protease zeigt daneben im Gegensatz zu LGP auch eine, durch Messung der Trübung bestimmte, thrombinartige Wirkung bei Inkubation mit einer Fibrinogen-Lösung, wie bereits unter 4.4.1.1 erwähnt [104]. Eine gerinnungsauslösende bzw. verstärkende Eigenschaft zeigt auch die aus dem Latex von *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) isolierte Serin-Protease Hirtin. Eine Inkubation mit humanem Plasma führte in Gegenwart von Calcium zu einer visuell detektierten Gerinnselbildung, wenn auch langsamer als durch Thrombin [53]. Ficin ist ein

Proteasegemisch, das in diversen Ficus Arten gefunden wurde und zeigte ebenfalls in Gegenwart von Calcium eine schnellere Gerinnung, in diesem Fall mit einem Koagulometer gemessen. Eine Inkubation der Proteasen mit dem Plasma erfolgte hier für insgesamt 4 min, bevor Calcium hinzugefügt wurde [134]. Das Proteasegemisch enthält Proteasen, die den humanen Gerinnungsfaktor X aktivieren und damit eine Gerinnung auslösen sollen [134]. Auch der Latex zweier Species der Familie Apocynaceae, Calotropis gigantea (L.) DRYAND. und Wrightia tinctoria R.BR., führte in vitro zu einer kürzeren Recalcifizierungszeit von humanem Plasma. Die Entstehung eines Gerinnsels aus reinem Fibrinogen wurde, wie unter 4.4.1.1 erwähnt, dagegen nur für Calotropis gigantea beobachtet. Die Autoren vermuten daher für diese eine thrombinartige Wirkung, für Wrightia tinctoria postulieren sie eine Aktivierung anderer Gerinnungsfaktoren [132, 163, 164]. Nach ähnlicher Methodik wie bei Ficin, ebenfalls mit einem Koagulometer, wurde auch der Latex von Cnidoscolus urens (L.) ARTHUR untersucht. Auch hier vermuten die Autoren u.a. eine Aktivierung anderer Gerinnungsfaktoren [135]. Eine proteolytisch aktive Fraktion des Latex zeigte mit zunehmender Konzentration eine Verminderung der Plasmagerinnungszeit in Gegenwart von Calcium, Ellagsäure und Phospholipiden, nicht jedoch bei Inkubation mit Calcium und Thromboplastin [135]. Die gleichen Beobachtungen machten auch Ramos et al. für die Cystein-Protease CpCP-1 aus Calotropis procera (AITON) DRYAND. Zwei weitere aus dem Latex isolierte Cystein-Proteasen (CpCP-2, CpCP-3) führten dagegen in beiden Fällen zu einer Verminderung der Gerinnungszeit [105]. Die Recalcifizierungszeit senkten auch die Latices von Asclepias curassavica L., Tabernaemontana divaricata (L.) R.BR. EX ROEM. & SCHULT. (Apocynaceae) und Artocarpus altilis (PARKINSON EX F.A.ZORN) FOSBERG (Moraceae), sowie eine proteolytisch aktive Fraktion aus Cryptostegia grandiflora ROXB. EX R.BR. [137, 165, 168]. In allen genannten Fällen kam es also zu einer Verstärkung der Gerinnung. Gemessen wurde in jedem der Verfahren in einem Endpunkt, also z.B. der Beginn des Auftretens von unlöslichem Fibrin in der Plasmaprobe, was häufig visuell detektiert wurde. Für Mauritanicain wurde die Entstehung von unlöslichen Produkten durch photometrische Messung der Trübung über einen Zeitraum von einer halben Stunde ermittelt. Wie bereits beschrieben, ist im Falle einer direkten Mischung von Plasma, Calcium und Mauritanicain keine Beeinflussung der Gerinnungszeit zu messen. Bei einer Vorinkubation von 30 min dagegen für die Protease Konzentrationen 80, 16 und 8 µg/mL schon. Bei einem Einsatz von 80 µg/mL Mauritanicain ist zum einen eine erst später auftretende Gerinnung zu sehen, zum anderen ist die Trübung insgesamt weniger ausgeprägt als bei einer Messung ohne Protease Zusatz. Bei den eingesetzten Konzentrationen von 16 µg/mL und 8 µg/mL tritt die Gerinnung dagegen schneller ein, nach 30 min ist aber kein Unterschied in der Trübung der Lösung im Vergleich zur Kontrolle zu finden. Diese Information bekommt man bei den in der Literatur durchgeführten Versuchen zu Milchsaft nicht. Das erwähnte LGP ist eine von wenigen aus Latex isolierten Proteasen, bei der eine Recalcifizierungszeit bestimmt wurde (s.o.). LGP wurde in Konzentrationen von 2 - 12 µg eingesetzt und führte dort mit steigender Konzentration zu einer schnelleren, visuell detektierten Gerinnung des Plasmas. Rechnet man die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen von Mauritanicain auf die gleiche Menge an Plasma hoch, dann wäre Mauritanicain in einem Bereich von 0,024 - 24 µg getestet worden. Für den Bereich 0,024 - 0,48 µg konnte demnach keine Beeinflussung der Gerinnung detektiert werden. Für 2,4 µg und 4,8 µg wäre eine schnellere und für 24 µg eine langsamere Gerinnung zu messen. Bezieht man die Molekülmassen der beiden Proteasen (34 kDa vs. 73 kDa) mit ein, dann ist die höchste eingesetzte molare Menge an Protease bei beiden Versuchen ausgeglichen. Möglicherweise würde LGP aber in einer höheren Konzentration auch zu einer verminderten Gerinnung führen. Dagegen sprechen allerdings Untersuchungen zur erwähnten Cystein-Protease CpCP-1 (26 kDa) aus Calotropis procera, bei der höhere Enzymmengen (5 - 80 µg) eingesetzt wurden. Es konnte auch dort in jeder eingesetzten Konzentration nur eine verkürzte und damit erhöhte Gerinnung (visuell) gemessen werden. Badgujar testete den Einfluss dreier Latices der Familie Euphorbiaceae: Euphorbia nivulia BUCH. - HAM., Pedilanthus tithymaloides (L.) POIT. und auch Synadenium grantii HOOK. F., aus dem LGP für die oben genannten Versuchen isoliert wurde. Alle drei Latices senkten mit steigender Konzentration die Blutgerinnungszeit [11]. Wie unter 4.4.1.1 beschrieben, zeigen einige der aus der Literatur zitierten Latices, aktive Fraktionen dieser oder Latex-Proteasen, auch gegenüber reinem Fibrinogen, in Abwesenheit von Thrombin, eine gerinnungsfördernde Wirkung, sowie eine calciumunabhängige Gerinnung von Plasma. Beides konnte für Mauritanicain nicht detektiert werden, so dass bei Mauritanicain gerinnungshemmende Eigenschaften überwiegen. Mit P1G10, einem Gemisch von Cystein-Proteasen aus dem Latex von Carica candamarcensis HOOK.F. (Synonym von Vasconcellea pubescens A. DC.) (Caricaceae) konnte eine Latex-Protease gefunden werden, die wie Mauritanicain zu einer Gerinnungshemmung führt, die vermutlich aufgrund fibrin(ogen)olytischer Eigenschaften erfolgt [169]. Der Latex von Jatropha curcas L. führte in hohen Konzentrationen zu einer Gerinnungsförderung, in niedrigeren Konzentrationen wurde dagegen eine Hemmung der Gerinnung beobachtet [10]. Ein aus dem Latex von Artocarpus heterophyllus LAM. (Moraceae) isoliertes, nicht proteolytisch aktives Glykoprotein (HSGPL1) bewirkt eine verlängerte Plasmagerinnungszeit, allerdings aufgrund inhibitorischer Eigenschaften gegenüber bestimmten Gerinnungsfaktoren [156]. Die meisten der in diesem Kapitel aus der Literatur zitierten Latices werden, wie auch schon unter 4.4.1.1 erwähnt, traditionell zur lokalen Blutstillung eingesetzt.

Inkubation verschiedener Latices mit Fibrinogen und Thrombin

Neben Mauritanicain wurden auch die aus dem Screening resultierenden Arten auf einen Einfluss des jeweiligen Latex auf die Gerinnung von Fibrinogen zu Fibrin untersucht. Eine Vorinkubation des Fibrinogens mit Latex und anschließender Thrombin Zugabe erbrachte die in Abb. 31 dargestellten Ergebnisse. Für die auf einen Proteingehalt von 200 μ g/mL eingestellten und zu je 15 μ L eingesetzten Latices von *E. mauritanica* und *C. aconitifolius* ist eine komplette Verhinderung der Trübung der Fibrinogen-Lösung (2,5 mg/mL) zu verzeichnen. Die drittstärkste Trübungsminderung wird durch den Latex von *E. gregaria* erzielt, gefolgt von *E. cylindrifolia, E. pedilanthoides, E. lophogona* und *E. viguieri*. Für die Latices von *E. globosa, E. schimperi, E. stenoclada* und *E. decaryi* konnte dagegen keine signifikante Trübungsminderung festgestellt werden.

Bei einer direkten Zugabe der Fibrinogen- und Thrombin-Lösung zum Latex, sind die Unterschiede zum Kontrollwert, im Vergleich zu den Ergebnissen mit Vorinkubation, weniger stark ausgeprägt. Lediglich bei *C. aconitifolius* findet ebenfalls eine vollständige Hemmung der Trübung statt. Herausstechend sind vor allem *E. mauritanica* und *E. gregaria*, deren Latices im Vergleich zur Vorinkubation deutlich zu einer geringeren Trübungsminderung führen.



Abb. 31: Vorinkubation von Fibrinogen mit verschiedenen Latices und anschließender Thrombin Zugabe Kontrolle = Puffer anstatt Latex (200 μ g/mL); Fibrinogen (2,5 mg/mL); T = 37 °C; *signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05



Abb. 32: Direkte Inkubation von Fibrinogen mit Thrombin und verschiedenen Latices Kontrolle = Puffer anstatt Latex (200 μ g/mL); Fibrinogen (2,5 mg/mL); T = 37 °C; *signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05

Inkubation verschiedener Latices mit Plasma und Calcium

Die zwölf ausgewählten Latices wurden zu gleichen Teilen mit Plasma sowie einer Calciumchlorid-Lösung versetzt. Dabei wurde, wie bei vorherigen Versuchen, zunächst der Latex und das Plasma für 30 min vorinkubiert. Die in Abb. 33 dargestellten Ergebnisse zeigen eine nahezu vollständige Hemmung der Gerinnung des Plasmas durch die Latices von *E. mauritanica, E. lophogona, E. stenoclada* und *C. aconitifolius*. Die entnommenen Latices von *E. gregaria, E. globosa* und *E. viguieri* zeigen ebenfalls eine deutliche Trübungsminderung im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz von Latex. Bei den Latices von *E. francoisii, E. cylindrifolia* und *E. pedilanthoides* ist eine mäßige Hemmung zu sehen, bei *E. schimperi* und *E. decaryi* ist keine Änderung zur Kontrolle detektierbar.



Abb. 33: Vorinkubation von Plasma mit verschiedenen Latices und anschließender Ca²⁺ Zugabe Kontrolle = Puffer anstatt Latex (200 μ g/mL); T = 37 °C; *signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05

Des Weiteren wurden Versuche durchgeführt, bei denen eine direkte Mischung aller drei Komponenten (Latex, Plasma, Ca^{2+}) mit anschließender Inkubation für 30 min bei 37 °C unter Messung der Absorption bei 560 nm erfolgte (Abb. 34). Dabei zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie bei der Vorinkubation von Latex und Plasma, teilweise ist die Minderung der Trübung weniger ausgeprägt. Dies gilt vor allem für *E. lophogona* und *E. globosa*.



Abb. 34: Direkte Inkubation von Plasma mit Calciumchlorid und verschiedenen Latices Kontrolle = Puffer anstatt Latex (200 μ g/mL); T = 37 °C; *signifikante Änderung, zweiseitiger t-Test, n = 3, $\alpha = 0.05$

Im Vergleich zu den Versuchen mit reinem Fibrinogen zeigen die Latices bei einer Inkubation mit Plasma einen stärkeren Einfluss auf die Gerinnung. Dies gilt vor allem für die direkte Inkubation aller drei Komponenten, bei der hier der Unterschied zur Vorinkubation geringer ist. Die Gründe könnten in der eingesetzten Menge liegen. Bei den Plasma Versuchen wurden jeweils $30 \,\mu$ L an Plasma, CaCl₂ (25 mM) und Latex ($200 \,\mu$ g/mL) eingesetzt, bei den Fibrinogen Versuchen 15 μ L Latex, 75 μ L Fibrinogen-Lösung ($2,5 \,m$ g/mL) und $20 \,\mu$ L Thrombin-Lösung ($6,4 \,$ U/mL). Für die Plasma Versuche steht also mehr Protein und damit enthaltene Proteasen pro Fibrinogen zur Verfügung. Die Menge an enthaltenen Proteasen scheint selbst bei einer direkten Inkubation ausreichend hoch zu sein, um durch einen Fibrinogen Abbau, einer Thrombin-induzierten Fibrin Bildung zuvor zu kommen bzw. um entstandenes Fibrin abzubauen.

Vor allem verwundert aber auf den ersten Blick das Ergebnis der direkten Inkubation mit Plasma im Vergleich zur isolierten Protease. Mauritanicain zeigte hier in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen Einfluss auf die Gerinnung nach Calcium Zusatz. Dagegen ist ein Einfluss des Latex von *E. mauritanica*, aus dem Mauritanicain isoliert wurde, gegeben. Ebenso zeigen wie erwähnt weitere Latices eine Aktivität an. Gründe hierfür können ebenfalls vielfältig sein. So enthalten die Latices sehr wahrscheinlich weitere Proteasen. Diese können ebenso einen Einfluss auf Fibrin(ogen) haben, aber auch auf andere Proteine. So sind einige enthaltenen Proteasen evtl. in der Lage, im Plasma vorkommendes Plasminogen zu Plasmin zu aktvieren (4.4.7) und dadurch einen fibrinolytischen Effekt zu verstärken. Ein Abbau von Thrombin durch enthaltene unspezifische Proteasen ist ebenso denkbar. Auch ist eine Erschöpfung der Inhibierung der Proteasen durch die im Plasma enthaltenen Plasmin-Inhibitoren α 2-Antiplasmin und α 2-Makroglobulin möglich. Die Zusammensetzung von Latex ist außerdem sehr heterogen (siehe 1.1), er könnte selber Protease-Inhibitoren enthalten, die z.B. Thrombin oder andere Gerinnungsfaktoren in ihrer Aktivität mindern könnten, so dass es nicht oder nur zu einer verminderten Entstehung von Fibrin kommen kann [2, 54, 156].

4.4.2 Fibrinogen-Platten-Test

Der Platten-Test mit Fibrinogen wurde angewandt, um eine gerinnungsfördernde Wirkung zu untersuchen. Hierzu wurde Fibrinogen in einem Agarose Gel copolymerisiert. Fibrinogen wird durch Thrombin zu Fibrin aktiviert, welches spontan polymerisiert. Dies sollte im sonst klaren Gel durch einen getrübten Hof angezeigt werden. Das Auftragen der Probelösungen erfolgte in kleine Ausstanzungen, gefolgt von einer Entwicklung über 24 h. Thrombin diente als Positivkontrolle.

Fibrinogen-Platte mit Mauritanicain

In Abb. 35 ist zu sehen, dass Thrombin um die Ausstanzung herum einen getrübten Hof bildet, der kontinuierlich an Größe zunimmt. Das im Gel befindliche Fibrinogen wird vermutlich zu Fibrin gespalten. Der Blindvergleich zeigt keine Bildung eines solchen Hofes. Mauritanicain zeigt zunächst ebenfalls eine Trübung, wenn auch in der eingesetzten Konzentration von 80 µg/mL in wesentlich schwächer ausgeprägter Form als bei Thrombin (128 U/mL). Der Hof breitet sich mit der Zeit aus, jedoch nimmt von innen heraus die Trübung wieder ab, wie deutlich bei dem Hof nach 17 h zu sehen ist. Nach 24 h ist bei Mauritanicain keine Trübung mehr sichtbar. Es entsteht vermutlich in kleinen Mengen zunächst Fibrin, welches anschließend wieder abgebaut wird.



Abb. 35: Fibrinogen-Agarose Gel mit Mauritanicain

Inkubation mit Probenpuffer, Thrombin (128 U/mL) oder Mauritanicain (80 µg/mL)

Fibrinogen-Platte mit verschiedenen Latices

Derselbe Assay wurde auch mit den Milchsäften (200 µg/mL) durchgeführt. Lediglich zwei der Latices zeigten hier eine Aktivität (Abb. 36). Wie zu erwarten, ist für *Euphorbia mauritanica* ein ähnliches Verhalten wie für das aus diesem Latex isolierte Mauritanicain (Abb. 35) zu sehen. *C. aconitifolius* führt zu einer starken Trübung des Gels, allerdings nimmt auch hier die Trübung von innen heraus wieder ab. Nach 24 h ist die Abnahme der Trübung nicht so weit fortgeschritten, wie es bei *Euphorbia mauritanica* der Fall ist. Dieses Phänomen deutet also daraufhin, dass beide Eigenschaften vorhanden sind. Einerseits wird vermutlich eine Polymerisation des Fibrins ausgelöst, andererseits wird das entstandene Produkt wieder aufgelöst. Dies wurde auch in der Literatur für andere Latices beschrieben. Sowohl bei dem Latex von *Calotropis gigantea* (L.) DRYAND. als auch bei der Untersuchung proteolytisch aktiver Fraktionen aus *Cryptostegia grandiflora* ROXB. EX R.BR. und *Calotropis procera* (AITON) DRYAND, zeigte sich zunächst eine Trübung, gefolgt von einer Wiederauflösung, in einem Fibrinogen-Platten-Test [132, 133, 137]. Ramos et al. isolierten jedoch ein Jahr später aus dem letztgenannten Latex drei Cystein-Proteasen, die auch nach 24 h noch eine

durchgehende Trübung im Gel zeigten [105]. Vielleicht sind dort also verschiedene Proteasen im Latex vorhanden, die gegenteilige Wirkungen in Bezug auf Fibrin(ogen) haben. Für den Latex von *Asclepias curassavica* L., *Tabernaemontana divaricata* (L.) R.BR. EX ROEM. & SCHULT. und *Artocarpus altilis* (PARKINSON EX F.A.ZORN) FOSBERG wurden ebenfalls durchgehende Trübungen beobachtet, jedoch verfolgten die Autoren die Entwicklung auch nur für 2 h [165, 168]. Würde man die Entwicklung der Trübung nach 2 h beenden, wäre auch bei Mauritanicain und *E. mauritanica* eine durchgehende Trübung zu beobachten, für *C. aconitifolius* dagegen nicht (vgl. Abb. 35 /Abb. 36).



Abb. 36: Fibrinogen-Agarose Gel mit verschiedenen Latices

Inkubation mit Probenpuffer, Thrombin (128 U/mL) oder Latex (200 µg/mL); weitere Latices zeigten keine Aktivität

4.4.3 Fibrin-Platten-Test

Beim Platten-Test zur Untersuchung der fibrinolytischen Aktivität wurde Fibrin aus Fibrinogen und Thrombin in einer Mischung mit Agarose *in situ* erzeugt und zu einem Gel copolymerisiert. Die vollständige Trübung des Gels zeigte ein Gelingen der Herstellung an. Nach Applikation der Proben wurde hier eine positive Reaktion durch entstehen von hellen Höfen angezeigt.

Fibrin-Platte mit Mauritanicain

Die Abb. 37 zeigt für den Blindwert zu allen Zeitpunkten ein identisches Bild an. Das Gel ist durch das vorhandene Fibrin getrübt. Für Plasmin ($150 \mu g/mL$) und Mauritanicain ($80 \mu g/mL$) ist bereits nach 1 h ein heller Hof zu sehen, was auf einen Abbau des Fibrins hindeutet. Die Durchmesser der Höfe erweitern sich mit fortschreitender Zeit, für Mauritanicain ist im Vergleich zu Plasmin nach 24 h in der eingesetzten Konzentration ein größerer Hof entstanden.

Blind



Abb. 37: Fibrin-Agarose Gel mit Mauritanicain

Inkubation mit Probenpuffer, Plasmin (150 µg/mL) oder Mauritanicain (80 µg/mL)

Fibrin-Platte mit verschiedenen Latices

Die Milchsäfte zeigten im mit Agarose copolymerisierten Fibrin-Gel ein unterschiedliches Verhalten (Abb. 38). Am stärksten ausgeprägt ist der helle Hof bei *E. mauritanica*, gefolgt von *C. aconitifolius*. Für *E. francoisii* und *E. stenoclada* ist ein weniger intensiver, aber eindeutiger heller Hof zu sehen. Während *E. gregaria* und *E. schimperi* keine Veränderung des Fibrin-Gels zeigen, kommt es bei den übrigen Latices zu in der Intensität schwach ausgeprägten hellen Höfen. Alle Latices wurden in einer Konzentration von 200 µg/mL eingesetzt.

Die Ursache für eine positive Reaktion im Fibrin-Platten-Test kann zwei Gründe haben. Zum einen können die enthaltenen Proteasen selbst direkt das Fibrin abbauen, was die gewünschte Reaktion dieser Analyse ist. Zum anderen könnte ein mit Plasminogen verunreinigtes Fibrinogen verwendet werden, so dass eine Plasminogen-Aktivator Aktivität denkbar wäre. In der vorliegenden Arbeit wurde daher darauf geachtet, ein Plasminogen freies Fibrinogen zu verwenden. Ein Fibrin-Platten-Test konnte, bis auf für die proteolytisch aktive Fraktion PlG10 aus dem Latex von *Carica candamarcensis* HOOK.F., für die Untersuchung von Latex Proteasen in der Literatur nicht gefunden werden [169]. Einsatz findet dieses Verfahren aber häufig in Kombination mit Plasminogen bei der Suche nach Plasminogen-Aktivatoren [170].



Abb. 38: Fibrin-Agarose Gel mit verschiedenen Latices Inkubation mit Probenpuffer, Plasmin (150 μg/mL) oder Latex (200 μg/mL)
4.4.4 Zymographie

Es wurden sowohl mit Fibrinogen als auch mit Fibrin copolymerisierte Gele hergestellt, um einen Einfluss auf die Gerinnung durch Abbau von Fibrinogen und einen Einfluss auf die Fibrinolyse durch den Abbau von Fibrin zu unterscheiden. Hierzu wurde bei der Herstellung eines Fibrin-Gels, zusätzlich zu Fibrinogen, Thrombin hinzugegeben und dieses für eine gewisse Zeit bei 37 °C inkubiert, um eine Fibrin-Bildung zu ermöglichen. Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass in keinem Fall ein Unterschied zwischen beiden Gelen bestand, daher werden nur die Ergebnisse der Fibrinogen-Zymographie gezeigt. Der nicht vorhandene Unterschied könnte zwei Gründe haben. Entweder ist es nach dieser Herstellungsmethode nicht möglich, eine Fibrin-Bildung zu initiieren, so dass nicht Fibrin, sondern Fibrinogen und Thrombin mit Acrylamid copolymerisiert werden. Ein zweiter Grund könnte darin bestehen, dass alle untersuchten Proteasen sowohl Fibrinogen als auch Fibrin abbauen. Es könnte eine Spaltung an Positionen in der Sequenz erfolgen, die sowohl im Fibrinogen als auch im Fibrin vorhanden sind. Dies wäre nicht weiter verwunderlich. Thrombin spaltet vom Fibrinogen nur kleine Aminosäureketten ab, der Großteil des Moleküls bleibt erhalten. Plasmin spaltet, wie auch bei diesem Versuch bestätigt werden konnte, ebenfalls Fibrinogen und nicht spezifisch nur Fibrin [75]. Eine Spezifität des Plasmins für Fibrin im Blut ist dadurch gegeben, dass es selber erst aus Plasminogen durch Bindung an Fibrin entsteht und frei zirkulierendes Plasmin durch Inhibitoren gehemmt werden würde [71, 72]. Neben den Zymogrammen wurden die Proben jeweils auch unter den gleichen Laufbedingungen in einem Gel ohne Fibrin(ogen)-Copolymerisation getrennt, anschließend fixiert und mit Silber gefärbt. Dadurch war es möglich, die Proteinbanden mit denen des Zymogramms zu vergleichen.

Ergebnisse der verschiedenen Latices

Für den Vergleich der Aktivität der in den Latices enthaltenen Proteasen wurde der Gesamtproteingehalt jeder Probe auf 200 μ g/mL eingestellt. Die Ergebnisse sind in Abb. 39 dargestellt. Dabei sind drei Blöcke voneinander getrennt, da es sich um verschiedene Gele handelt, die von der Laufhöhe her nicht exakt miteinander verglichen werden können. Als Positivkontrolle diente Plasmin (15 μ g/mL).

Für alle sich im Screening (4.1.2) als aktiv herausgestellten Latices konnte auch im Zymogramm eine Aktivität festgestellt werden. Die Ausprägung war dabei sehr unterschiedlich. Die Latices von *Cnidoscolus aconitifolius*, *E. gregaria*, *E. lophogona*,

E. mauritanica und E. stenoclada zeigten durch intensive weiße Banden eine besonders ausgeprägte Aktivität an. Dagegen waren bei E. cylindrifolia, E. schimperi und E. viguieri zwar eindeutige, aber im Vergleich nur schwach ausgeprägte Banden zu erkennen. Banden von mittlerer Intensität, dafür aber auch schärferer Abgrenzung, zeigen E. decarvi, E. globosa und E. pedilanthoides. Die Banden im Zymogramm von E. francoisii liegen ebenfalls im mittleren Intensitätsbereich. Bei einigen Zymogrammen sind mehrere weiße Banden vorhanden, bei anderen wiederrum nur eine. Dies muss aber nicht zwangsläufig heißen, dass es sich um mehrere aktive Proteasen handelt. Wie schon bei der Charakterisierung von Mauritanicain beschrieben (siehe 4.3.2), kann es sich zum einen um eine Protease aus mehreren Untereinheiten handeln, die selbst unter nicht reduzierenden und nicht hitzedenaturierenden Bedingungen voneinander getrennt werden. Zum anderen kann es sich um instabile Proteasen handeln, bei denen Teile z.B. durch einen Selbstverdau abgespalten werden, die Aktivität aber erhalten bleibt. Vergleicht man die unter gleichen Laufbedingungen entstandenen Vergleichsgele untereinander (Abb. 39 unten), fällt auf, dass die Zusammensetzung sehr heterogen ist, was auch schon beim Vergleich der Zusammensetzung in SDS-PAGE Gelen, unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen, zu sehen war (vgl. 4.1.3, Abb. 8, Seite 57). Auch die Zymogramme zeigen aktive Protein-Banden an jeweils unterschiedlichen Stellen im Gel an. Teilweise sind aber auch ähnliche Laufhöhen zu beobachten. Aufgrund dieser bereits in Vorversuchen ermittelten Ähnlichkeiten, wurden zum genaueren Vergleich die sich ähnelnden Latices bereits in benachbarte Positionen im Gel aufgetragen. Eine Ausbreitung der Banden auf benachbarte Bereiche durch Überladung konnte dabei für alle Banden bei den erstellten Zymogrammen ausgeschlossen werden. So zeigen die Latices von E. mauritanica und E. globosa zwei auf gleicher Höhe befindliche Banden, E. schimperi zeigt eine nur knapp unter, E. gregaria eine knapp über der oberen Bande der beiden genannten Latices. Auf einer nahezu gleichen Höhe befinden sich auch die Banden von E. lophogona, E. stenoclada und E. viguieri. Alle drei liegen im selben Bereich wie die obere Bande von E. mauritanica. Weitere Ähnlichkeiten zeigen die Zymogramme von E. cylindrifolia, E. decaryi und E. pedilanthoides. Vor allem die ersten beiden Latices zeigen identische Zymogramme ihrer zwei auf gleicher Höhe befindlichen fibrin(ogen)olytisch aktiven Proteasen. Die Bande von E. pedilanthoides liegt minimal über der oberen Bande der beiden vorher genannten Latices. Ein von den anderen Latices abweichendes Zymogramm zeigen C. aconitifolius und E. francoisii. Die proteolytisch aktiven Bereiche lassen sich in dem in Abb. 39 unten gezeigten SDS-PAGE Gel durch genaueres Hinsehen identifizieren. Dieses wurde unter gleichen Bedingungen (nicht hitzedenaturierend, nicht reduzierend)

hergestellt. Daher lässt sich keine Aussage über die genaue Molekülmasse der Banden machen, da das Laufverhalten von verschiedenen Faktoren abhängt. Die Latices, die im Zymogramm ähnliche Banden aufweisen, scheinen aber dennoch in der Gesamtheit ein unterschiedliches Proteinspektrum zu enthalten. Dies bestätigen auch die unter 4.1.3 gemachten Beobachtungen. Das dort in Abb. 8 (Seite 56) dargestellte Gel zeigt wie erwähnt eine SDS-PAGE unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Die Lage der Banden hängt also in diesem Fall nun allein von der Molekülmasse der Proteine ab. Latices mit Banden gleicher Molekülmasse zeigen auch dort jeweils noch andere Proteinbanden unterschiedlicher Masse. Vergleicht man die aus den Zymogrammen hervorgegangenen Latices mit ähnlicher Lage fibrin(ogen)olytisch aktiver Banden mit denen aus der Abb. 8 resultierenden ähnlichen Latices, ergibt sich teilweise eine Übereinstimmung. So zeigen auch hier die Latices von E. cylindrifolia, E. decarvi und E. pedilanthoides ein ähnliches Muster. Auch E. viguieri, E. stenoclada und E. lophogona zeigen in Abb. 8 teilweise Banden ähnlicher Molekülmasse. Dagegen sind in dem dort gezeigten Gel die Ähnlichkeiten der Zymogramme zwischen E. mauritanica, E. schimperi, E. globosa und E. gregaria nicht eindeutig wiederzuerkennen. Allerdings ist ein SDS-PAGE-Gel unter diesen Bedingungen bei einem so komplex zusammengesetzten Latex auch nur bedingt aussagekräftig. Allein das Erhitzen bei 95 °C kann, bevor es zur Denaturierung kommt, Selbstverdau und Verdau durch andere enthaltene Proteasen fördern.

Plasmin (+)	1000	
C. aconitifolius		
E. gregaria	+	
E. mauritanica	a- 8	1 111
E. schimperi		
E. globosa		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
Proteinmarker		
E. francoisii		
E. viguieri	1	
E. stenoclada		I THE IT
E. lophogona		
E. pedilanthoides		
E. decaryi		
E. cylindrifolia		
Proteinmarker		
	Zymogramm	SDS-PAGE (ohne Δ , ohne ME)

Abb. 39: Fibrinogen Zymogramm der verschieden Latices

(+) = Positivkontrolle, Δ = Erhitzung bei 95 °C, ME = Mercaptoethanol

Ergebnisse der isolierten Protease Mauritanicain

Mauritanicain zeigt eine Aktivität im Zymogramm an (Abb. 40 A). Selbst bei einer Verdünnung von 1:50 (Ausgangskonzentration: 80 µg/mL) ist diese Aktivität noch deutlich sichtbar. Es sind im Vergleichsgel mehrere Banden vorhanden, die auch im Zymogramm alle eine Aktivität zeigen. Die möglichen Gründe dafür sind bei der Charakterisierung und Reinheitsprüfung von Mauritanicain unter 4.3.2 genannt. Es wurde außerdem ein natives Zymogramm von Mauritanicain angefertigt. Das native Zymogramm zeigt wiederrum nur eine einzelne Bande (Abb. 40 B). Durch diese Ergebnisse wird die Vermutung, dass es sich um eine einzelne Protease handelt, nochmals gestärkt. Auch Plasmin zeigt in Abb. 39 und Abb. 40 mehrere Banden. Kim et al. machten dieselbe Beobachtung und vermuten dahinter Eigenverdau- und Aggregations-Produkte, die während der Probenaufbereitung entstehen. Gerade ein Eigenverdau ist definitiv denkbar, zumal Plasmin in mindestens zwei verschiedenen Formen im Plasma vorkommt. Darunter die Variante mit N-terminalem Glutamin (Glu-PLM: 88,4 kDa) und eine Variante mit N-terminalem Lysin (Lys-PLM: 79,5 kDa). Plasmin katalysiert selber die Entstehung von Lys-PLG bzw. Lys-PLM [68, 70]. Plasmin besteht aus zwei Aminosäureketten, die durch Disulfidbrücken verknüpft sind [68]. Da unter nicht reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde, sollte eine Spaltung dieser Disulfidbindungen nicht stattfinden, kann aber dennoch nicht ausgeschlossen werden. Bei einer Spaltung würden Fragmente mit einer Größe von 63,3 kDa (Kette A - Glu-PLM), 54,3 kDa (Kette A - Lys-PLM) und 25,2 kDa (Kette B) entstehen (berechnet aus der Sequenz für PLG nach Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/) letzter Aufruf: 04/2015).

Fibrin(ogen)-Zymographie fand bisher bei der Suche nach fibrin(ogen)olytisch aktiven pflanzlichen Latices lediglich bei der Untersuchung der proteolytisch aktiven Fraktion des Latex von *Cnidoscolus urens* (L.) ARTHUR Anwendung [135]. Daneben wurde sie z.B. bei der Suche nach fibrinolytisch aktiven Substanzen aus Mikroorganismen angewendet [143]. Mit diesem Versuch konnte definitiv gezeigt werden, ob ein Abbau von Fibrinogen stattfindet. Dass auch Fibrin abgebaut werden würde, ist demnach sehr wahrscheinlich (s.o.).



Abb. 40: Fibrinogen-Zymogramm mit Mauritanicain und Plasmin A: SDS-PAGE; B: Native-PAGE, Δ = Erhitzung bei 95 °C, ME = Mercaptoethanol

4.4.5 Spaltstellenanalyse durch Elektrophorese

Fibrinogen wurde mit der zu untersuchenden Probe für eine bestimmte Zeit inkubiert und dann der Abbau des Fibrinogens mit Hilfe der SDS-PAGE verfolgt. Dabei erfolgte eine Färbung mit Coomassie Brilliantblau R-250, statt mit der sensitiveren Silber-Färbung, um vor allem das im Überschuss vorhandene Fibrinogen und seine Abbauprodukte sichtbar zu machen und nicht die Banden der im Latex enthaltenen Proteine.

Inkubation mit verschiedenen Latices

Alle untersuchten Latices zeigten eine Aktivität gegenüber Fibrinogen (Abb. 41). Die Ergebnisse beziehen sich auf eine festgelegte Proteinkonzentration im Latex von 200 µg/mL.

Dabei erfolgte innerhalb von 60 min in allen Fällen ein Abbau der Aα-Kette des Fibrinogens. Die Bß-Kette wird lediglich bei E. schimperi nicht angegriffen, bei allen anderen findet ein teilweiser bis vollständiger Abbau der Bß-Kette statt. C. aconitifolius, E. gregaria, E. mauritanica und E. stenoclada sind bei der gewählten Konzentration in der Lage, die γ -Kette vollständig abzubauen, bei E. globosa und E. lophogona gelingt dies zu einem großen Teil. Bei den übrigen Latices ist nur ein schwacher Abbau der γ-Kette des Fibrinogens zu verzeichnen. Neben den Ergebnissen für den Abbau der Fibrinogen-Ketten, ist in Abb. 41 auch jeweils ein Kontrollgel dargestellt. Bei diesem wurde kein Fibrinogen verwendet, um zu sehen, ob möglicherweise Banden in den Gelen mit Fibrinogen, nicht seinen Abbauprodukten zuzuordnen seien, sondern Proteinen aus dem jeweiligen Latex. Beim Großteil der Latices sind jedoch aufgrund der geringen Konzentration und der eingesetzten Färbemethode keine oder nur schwach ausgeprägte störende Banden zu erkennen. Beim Vergleich der Lage der Bruchstücke des Fibrinogens im Gel ist eine deutliche Ähnlichkeit zwischen den Latices von E. francoisii, E. gregaria, E. mauritanica, E. stenoclada und Plasmin zu erkennen. Auch bei den anderen Latices sind diverse Übereinstimmungen zu finden. Da auch die Bruchstücke des Fibrinogens weiterverdaut werden können, ist eine identische Lage der Banden nicht zu erwarten gewesen. Bei C. aconitifolius sind keinerlei Bruchstücke zu erkennen, die enthaltenen Proteasen scheinen zu einem vollständigen Abbau zu führen.

Proteinmarker	MW [KDa] 200 116 97	66 45	31	52	MW [kDa] 200	116 97	66 45		31	22
C. aconitifolius				1						1
E. pedilanthoides		1								
E. decaryi										
E. cylindrifolia										
E. viguieri			1							
E. globosa			1							
Blind		A B	1							
	W Da] 00 7	a a	5	8	N Daj	9				
Proteinmarker	3 1 1 2 7 1 2 7	9 4	ļ	2	2 <u>F</u>	÷ 6	99	4	31	8
Plasmin				11						1
E. francoisii		11	1							
E. stenoclada				1				~		
E. lophogona		11								
E. gregaria		1		1				4 10		
E. schimperi		11								
E. mauritanica			1	1		15				
Blind		₽	1		-					
		SDS-PA	GE		SDS	S-PAG	E (ohne Fi	brinc	gen)

Abb. 41: Fibrinogen-Ketten-Abbau durch verschiedene Latices

Blind = Inkubation mit Puffer statt Latex; Plasmin = Positivkontrolle

Isolierte Protease Mauritanicain

Mauritanicain wurde in verschiedenen Konzentrationen mit Fibrinogen inkubiert und im Anschluss auf ein Gel aufgetragen. Die Abb. 42 zeigt, wie mit zunehmender Konzentration an Mauritanicain, der Abbau der Ketten fortschreitet. In allen Fällen ist die A α -Kette nicht mehr vorhanden, sie scheint also primär angegriffen zu werden. Anschließend folgt der Angriff der B β -Kette, die bei einer Konzentration von 4 µg/mL bereits deutlich abgenommen hat. Erst bei höheren Mauritanicain Konzentrationen ist auch ein Abbau der γ -Kette nachweisbar. Ein Kontrollgel zeigte lediglich in der höchsten Konzentration von Mauritanicain eine schwach ausgeprägte Bande bei 73 kDa, so dass auf die Darstellung verzichtet wurde.



Abb. 42: Fibrinogen-Ketten-Abbau durch Mauritanicain in verschiedenen Konzentrationen Blind = Inkubation mit Puffer statt Latex; Plasmin = Positivkontrolle

Der Versuch wurde außerdem in verschiedenen Zeitintervallen durchgeführt. Dabei kam Mauritanicain in einer Konzentration von 8 μ g/mL zum Einsatz. Hier wird nochmals deutlich, wie zunächst ein Abbau der Ketten in der Reihenfolge A α , B β , γ stattfindet (Abb. 43). Bereits nach 5 min Inkubation ist keine A α -Kette mehr zu erkennen. Nach 20 min hat die Intensität der B β -Kette deutlich abgenommen, während die γ -Kette erst nach 40 - 60 min bei der gewählten Konzentration sichtbar abgebaut zu werden scheint. Ein Kontrollgel wies keine Banden auf (Daten nicht gezeigt). Nicht nur die Abnahme der Fibrinogen-Ketten, sondern

auch eine Zunahme der Bruchstücke ist in Abb. 43 verfolgbar. Drei Bruchstücke im Bereich zwischen 29 - 35 kDa könnten von der A α -Kette stammen, da diese bereits nach kurzer Zeit auftreten. Sie scheinen allerdings weiter abgebaut zu werden, da die Intensität der Banden mit der Zeit weiter abnimmt. So ist das Bruchstück der Größe 35 kDa bereits nach 10 min nicht mehr sichtbar. Das Bruchstück mit einer Masse von 29 kDa hat nach 10 min dagegen an Intensität zugenommen, ein weiteres erscheint hier zum ersten Mal (28 kDa). Nach 20 min ist die Bande bei 31 kDa verschwunden, dagegen erscheint ein Bruchstück der Masse 25 kDa, das 28 kDa große Bruchstück nimmt an Intensität zu. Die beiden letztgenannten stammen vermutlich von der B β -Kette. Unterhalb der γ -Kette erscheinen nach einer Inkubationszeit von 40 min zwei Banden der Größe 42 kDa und 37 kDa, die mit der Zeit immer mehr an Intensität zunehmen. Ein Zusammenhang zur γ -Kette ist hier denkbar, da die B β -Kette zu diesem Zeitpunkt kaum noch vorhanden ist und die Intensität der γ-Kette im weiteren Verlauf umgekehrt proportional zu den beiden genannten Bruchstücken abnimmt. Die beiden letztgenannten Bruchstücke ähneln auch stark den Molekülmassen der Bruchstücke durch Inkubation mit Plasmin. Das 29 kDa große Bruchstück ist zum Zeitpunkt 40 min nicht mehr vorhanden, das der Größe 28 kDa hat nach 60 min an Intensität verloren. Beim Zeitpunkt 120 min kommt zum Bruchstück der Größe 25 kDa ein 26 kDa großes hinzu.



Abb. 43: Fibrinogen-Ketten-Abbau durch Mauritanicain nach verschiedenen Zeitintervallen Blind = Inkubation mit Puffer statt Latex, Plasmin = Positivkontrolle; Angegeben sind die gerundeten Werte der Molekülmassen in kDa

Die Spaltstellenanalyse von Mauritanicain bestätigt nochmals, dass Fibrinogen abgebaut wird. Dass auch Fibrin abgebaut werden würde ist sehr wahrscheinlich. Wie bereits bei der Zymographie beschrieben (4.4.4) und auch in diesem Versuch belegt, spaltet Plasmin auch Fibrinogen, die Spezifität für Fibrin ist durch die Aktivierung aus der Vorstufe direkt am Gerinnsel gegeben. Eine dem Thrombin ähnliche Spaltung ist unwahrscheinlich, da Thrombin nur Bruchstücke von geringer Molekülmasse vom Fibrinogen abspaltet [71, 72, 75]. Die Spaltstellenanalyse durch SDS-PAGE zeigt aber eindeutig, dass größere Bruchstücke entstehen, die eher dem Spaltverhalten des Plasmins ähneln.

Eine Spaltstellenanalyse durch SDS-PAGE wurde in der Literatur bei den meisten Latices bzw. enthaltenen aktiven Fraktionen oder daraus isolierten Proteasen, die eine fibrin(ogen)olytische Aktivität aufweisen, durchgeführt. Die Reihenfolge der Proteolyse der Ketten erfolgt dabei analog zu Mauritanicain, jedoch findet in einigen Fällen keine Hydrolyse der y-Kette statt. Bei der Serin-Protease LGP aus Synadenium grantii HOOK. F. wurden die Bruchstücke ebenfalls genauer untersucht. Die Ergebnisse ähneln denen von Mauritanicain. So entstehen laut Angabe der Autoren zunächst durch einen Abbau der Aa-Kette Bruchstücke von etwa 37 kDa und 29 kDa. Während die Intensität des 37 kDa Bruchstücks abnimmt, steigt die Intensität der 29 kDa Bande mit Beginn des Abbaus der Bß-Kette. Bei fortschreitendem Abbau der Bß-Kette nimmt die Intensität der 29 kDa Bande ab, dafür erscheinen eine Bande bei 27 kDa und zunehmend drei Banden bei 37 kDa, 39 kDa und 43 kDa, die mit einer Abnahme der γ -Kette einhergehen [54]. Auch bei AMP48 aus dem Latex von Artocarpus heterophyllus LAM. fand eine Analyse der Bruchstücke statt. Die Protease war in der Lage, die $A\alpha$ -Kette vollständig abzubauen. Eine Hydrolyse der weiteren Ketten erfolgte nur partiell, obwohl im Verhältnis zu Fibrinogen doppelt so viel Protease wie bei LGP und 25 mal mehr als bei Mauritanicain eingesetzt wurde. Bruchstücke entstehen hier bei 35 kDa, 33 kDa und 28 kDa, also im gleichen Bereich, wie auch bei LGP und Mauritanicain vermutlich bei der Hydrolyse der Aa-Kette entstehen. Durch EuP-82 aus Euphorbia lactea HAW. entstehen ähnliche Bruchstücke bei 36 kDa, 33 kDa, 31 kDa, sowie eines bei 50 kDa, welches von der Bβ-Kette stammen soll [40, 41]. Bei dem Abbau von Fibrinogen durch Hirtin aus Euphorbia hirta L., lassen sich im Gel bereits mit Beginn der Hydrolyse Bruchstücke bei etwa 45 kDa und 35 kDa erkennen (genaue Massen wurden nicht beschrieben). Das erstgenannte Bruchstück nimmt mit der Zeit an Intensität ab. Damit scheint das Spaltverhalten dieser Serin-Protease sich von Mauritanicain und LGP zu unterscheiden. Aufgrund des Fehlens eines Größenmarkers lassen sich bei allen weiteren untersuchten Latices keine Aussagen zur Masse der Bruchstücke treffen. Bei Eumiliin und Pergularain e I findet kein Abbau der y-Kette über den Inkubationszeitraum in den eingesetzten Konzentrationen statt [39, 104]. Die Latices von *Calotropis gigantea* (L.) DRYAND., *Synadenium grantii* HOOK. F. und *Wrighthia tinctoria* R.BR. wurden von Rajesh et al. verglichen und zeigten in der genannten Reihenfolge abnehmend eine Hydrolyse aller drei Ketten des Fibrinogens [164]. Der Latex von *Asclepias curassavica* L. wurde nur in einer Konzentration getestet, dabei kam es lediglich zu einem Angriff der Aa- und Bβ- Kette [165]. Im Latex von *Cnidoscolus urens* (L.) ARTHUR enthaltene Proteasen waren in der Lage alle drei Ketten anzugreifen [135]. In *Calotropis procera* (AITON) DRYAND enthaltene Proteasen spalten ebenfalls in der Reihenfolge A $\alpha > B\beta > \gamma$, die Autoren berichten von einer Zunahme von Bruchstücken kleiner Molekülmassen [133]. Der Latex von *Cryptostegia grandiflora* ROXB. EX R.BR. soll angeblich zur vollständigen Hydrolyse des Fibrinogens führen, allerdings waren keine Bruchstücke erkennbar [137].

4.4.6 Spaltstellenanalyse durch In-Gel Verdau

Fibrinogen wurde mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die A α -, B β - und γ -Kette aus dem Gel herausgeschnitten und jeweils ein In-Gel Verdau mit Thrombin (0,2 U), Plasmin (0,23 μ g) sowie Mauritanicain (0,16 μ g) bei 37 °C durchgeführt. Die Detektion der entstandenen Bruchstücke erfolgte mittels MALDI-TOF-MS.

Zur Methodenkontrolle wurde zunächst die Aα-Kette des Fibrinogens durch Thrombin verdaut. Thrombin soll von dieser das Fibrinopeptid A abspalten, bei dem es sich um ein Fragment der Größe 1536 Da handelt (nach Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/), letzter Aufruf: 04/2015). Das Versuchsergebnis bestätigt dieses (Abb. 44) und damit die Eignung der Methode.



Abb. 44: Massenspektrum der Bruchstücke des In-Gel Verdaus von Fibrinogen Aa durch Thrombin

Plasmin spaltet, wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben, das aus allen drei Ketten des Fibrinogens gebildete Fibrin an mehreren Stellen. In der A α -Kette des Fibrinogens (bzw. α -Kette des Fibrins) findet laut der oben angegebenen Datenbank vor allem eine Spaltung an zwei Stellen statt, hinter Lysin81(65) und Arginin104(88), wobei drei Hauptfragmente entstehen. Mit der Methode des In-Gel Verdaus lassen sich allerdings nur kleinere Peptide messen, große Peptide verbleiben vermutlich in den Gelstücken. Der Vergleich der Bruchstücke von Plasmin und Mauritanicain zeigt, dass beide Proteasen ein unterschiedliches Spaltverhalten aufweisen (Abb. 45).



Abb. 45: Massenspektren der Bruchstücke des In-Gel Verdaus von Fibrinogen Aα durch Plasmin und Mauritanicain

Ein Abgleich der Bruchstücke mit einem theoretischen Verdau der Sequenz von Fibrinogen A α ist in Abb. 46 dargestellt. Für Plasmin wurde eine Spaltung nach den Aminosäuren Arginin und Lysin erzeugt. Die Massen der theoretisch erzeugten Peptide decken sich zu 44 % mit den Massen der gemessenen Peptide. Bei einem Verdau durch Mauritanicain findet sich lediglich eine Sequenzabdeckung von 12 %. Das spricht dafür, dass sich, wie erwartet, die Spaltung nicht auf Lysin und Arginin beschränkt. Die beste Sequenzabdeckung (40,6 %) ist bei einem theoretischen Verdau nach den Aminosäuren Alanin, Arginin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Prolin und Valin zu finden (Abb. 46).

10	20	30	40	50	60	70	80
ADSGEGDFLA	EGGGVRGPRV	VERHQSACKD	SDWPFCSDED	WNYKCPSGCR	MKGLIDEVNQ	DFTNRINKLK	NSLFEYQKNN
		I			[
90	100	110	120	130	140	150	160
KDSHSLTTNI	MEILRGDFSS	ANNRDNTYNR	VSEDLRSRIE	VLKRKVIEKV	QHIQLLQKNV	RAQLVDMKRL	EVDIDIKIRS
170	180	190	200	210	220	230	240
CRGSCSRALA	REVDLKDYED	QQKQLEQVIA	KDLLPSRDRQ	HLPLIKMKPV	PDLVPGNFKS	QLQKVPPEWK	ALTDMPQMRM
			_				
250	260	270	280	290	300	310	320
ELERPGGNEI	TRGGSTSYGT	GSETESPRNP	SSAGSWNSGS	SGPGSTGNRN	PGSSGTGGTA	TWKPGSSGPG	STGSWNSGSS
330	340	350	360	370	380	390	400
GTGSTGNQNP	GSPRPGSTGT	WNPGSSERGS	AGHWTSESSV	SGSTGQWHSE	SGSFRPDSPG	SGNARPNNPD	WGTFEEVSGN
410	420	430	440	450	460	470	480
VSPGTRREYH	TEKLVTSKGD	KELRTGKEKV	TSGSTTTTRR	SCSKTVTKTV	IGPDGHKEVT	KEVVTSEDGS	DCPEAMDLGT
490	500	510	520	530	540	550	560
LSGIGTLDGF	RHRHPDEAAF	FDTASTGKTF	PGFFSPMLGE	FVSETESRGS	ESGIFTNTKE	SSSHHPGIAE	FPSRGKSSSY
570	580	590	600	610	620	630	
SKQFTSSTSY	NRGDSTFESK	SYKMADEAGS	EADHEGTHST	KRGHAKSRPV	RGIHTSPLGK	PSLSP	

Verdau Fibrinogen A α durch Plasmin (theoretischer Verdau an K und R) Sequenzübereinstimmung: 44,0 %

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm

Verdau **Fibrinogen** A α durch **Mauritanicain** (theoretischer Verdau an K und R) Sequenzübereinstimmung: 12,0 %

	•	,				
10	20	30	40	50	60	70
ADSGEGDFLA	EGGGVRGPRV	VERHQSACKD	SDWPFCSDED	WNYKCPSGCR	MKGLIDEVNQ	DFINRINKLK
80	90	100	110	120	130	140
NSLFEYQKNN	KDSHSLTTNI	MEILRGDFSS	ANNRDNTYNR	VSEDLRSRIE	VLKRKVIEKV	QHIQLLQKNV
150	160	170	180	190	200	210
RAQLVDMKRL	EVDIDIKIRS	CRGSCSRALA	REVDLKDYED	QQKQLEQVIA	KDLLPSRDRQ	HLPLIKMKPV
220	230	240	250	260	270	280
PDLVPGNFKS	QLQKVPPEWK	ALTDMPQMRM	ELERPGGNEI	TRGGSTSYGT	GSETESPRNP	SSAGSWNSGS
290	300	310	320	330	340	350
SGPGSTGNRN	PGSSGTGGTA	TWKPGSSGPG	STGSWNSGSS	GTGSTGNQNP	GSPRPGSTGT	WNPGSSERGS
360	370	380	390	400	410	420
AGHWTSESSV	SGSTGQWHSE	SGSFRPDSPG	SGNARPNNPD	WGTFEEVSGN	VSPGTRREYH	TEKLVTSKGD
430	440	450	460	470	480	490
KELRTGKEKV	TSGSTTTTRR	SCSKTVTKTV	IGPDGHKEVT	KEVVTSEDGS	DCPEAMDLGT	LSGIGTLDGF
500	510	520	530	540	550	560
RHRHPDEAAF	FDTASTGKTF	PGFFSPMLGE	FVSETESRGS	ESGIFTNTKE	SSSHHPGIAE	FPSRGKSSSY
570	580	590	600	610	620	630
SKQFTSSTSY	NRGDSTFESK	SYKMADEAGS	EADHEGTHST	KRGHAKSRPV	RGIHTSPLGK	PSLSP

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm

Verdau **Fibrinogen A** α durch **Mauritanicain** (theoretischer Verdau an K, L, A, V, I, P, R) Sequenzübereinstimmung: 40,6 %

•		-						
10	20	30	40	50	60	70	80	
ADSGEGDFLA	EGGGVRGPRV	VERHQSACKD	SDWPFCSDED	WNYKCPSGCR	MKGLIDEVNQ	DFTNR INK LK	NSLFEYQKNN	
90	100	110	120	130	140	150	160	
KDSHSLTTNI B	MEILRGDFSS	ANNRDNTYNR	VSEDLRSRIE		QHIQLLQKNV	RAQLVDMKRL	EVDIDIKIRS	
170	180	190	200	210	220	230	240	
CRGSCSRALA	REVDLKDYED	QQKQLEQVIA	KDLLPSRDRQ	HLPLIKMKPV	PDLVPGNFKS	QLQKVPPEWK	ALTDMPQMRM	
250	260	270	280	290	300	310	320	
ELERPGGNEI	TRGGSTSYGT	GSETESPRNP	SSAGSWNSGS	SGPGSTGNRN	PGSSGTGGTA	TWKPGSSGPG	STGSWNSGSS	
330	340	350	360	370	380	390	400	
GTGSTGNQNP	GSPRPGSTGT	WNPGSSERGS	AGHWTSESSV	SGSTGQWHSE	SGSFRPDSPG	SGNARPNNPD	WGTFEEVSGN	
410	420	430	440	450	460	470	480	
VSPGTRREYH	TEKLVTSKGD	KELRTGKEKV	TSGSTTTTRR	SCSKTVTKTV	IGPDGHKEVT	KEVVTSEDGS	DCPEAMDLGT	
490	500	510	520	530	540	550	560	
LSGIGTLDGF	RHRHPDEAAF	FDTASTGKTF	PGFFSPMLGE	FVSETESRGS	ESGIFTNTKE	SSSHHPGIAE	FPSRGKSSSY	
570	580	590	600	610	620	630		
SKQFTSSTSY	NRGDSTFESK	SYKMADEAGS	EADHEGTHST	KRGHAKSRPV	RGIHTSPLGK	PSLSP		

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm

Abb. 46: Vergleich des theoretischen Verdaus mit den Bruchstücken nach In-Gel Verdau von Fibrinogen Aα durch Plasmin und Mauritanicain

Erstellt mit Bruker Biotools (Vers. 3.2) und Sequence editor (Vers. 3.2)

In der der B β -Kette des Fibrinogens (bzw. β -Kette des Fibrins) soll eine bevorzugte Spaltung nach Lysin122(108) und Lysin133(119) durch Plasmin stattfinden. Auch hier lassen sich nur diverse kleine Peptide detektieren, die jedoch unterschiedlich bei Plasmin und Mauritanicain sind (Abb. 47).



Abb. 47: Massenspektren der Bruchstücke des In-Gel Verdaus von Fibrinogen Bβ durch Plasmin und Mauritanicain

Da für Plasmin die Spaltung nach Arginin und Lysin bekannt ist, wurde auch für die B β -Kette des Fibrinogens ein theoretischer Verdau nach diesen Aminosäuren durchgeführt. Die Messung ergibt eine Sequenzabdeckung von 37,3 %, bei Mauritanicain sind es 31,3 %. Ein ähnliches Spaltverhalten an der B β -Kette scheint also möglich zu sein. Eine optimale Abdeckung der gemessenen Peptidmassen, nach einem Verdau durch Mauritanicain, lässt sich durch Abgleich der Massen eines theoretischen Verdaus nach den Aminosäuren Alanin, Arginin, Isoleucin, Leucin, Lysin und Valin finden. Hier beträgt die Sequenzabdeckung 83,7 % (Abb. 48).

Verdau Fibrinogen Bß durch Plasmin	(theoretischer	Verdau a	n K und R)
Sequenzübereinstimmung: 37.3 %				

		J						
10	20	30	40	50	60	70	80	
QGVNDNEEGF	FSARGHRPLD	KKREEAPSLR	PAPPPISGGG	YRARPAKAAA	TQKKVER KAP	DAGGCLHADP	DLGVLCPTGC	
90	100	110	120	130	140	150	160	
QLQEALLQQE	RPIRNSVDEL	NNNVEAVSQT	SSSSFQYMYL	LKDLWQKRQK	QVKDNENVVN	EYSSELEKHQ	LYIDETVNSN	
170	180	190	200	210	220	230	240	
IPTNLRVLRS	ILENLRSKIQ	KLESDVSAQM	EYCRTPCTVS	CNIPVVSGKE	CEEIIRKGGE	TSEMYLIQPD	SSVKPYRVYC	
250	260	270	280	290	300	310	320	
DMNTENGGWT	VIQNRQDGSV	DFGRKWDPYK	QGFGNVATNT	DGKNYCGLPG	EYWLGNDKIS	QLTRMGPTEL	LIEMEDWKGD	
330	340	350	360	370	380	390	400	
KVKAHYGGFT	VQNEANKYQI	SVNKYRGTAG	NALMDGASQL	MGENRTMTIH	NGMFFSTYDR	DNDGWLTSDP	RKQCSKEDGG	
410	420	430	440	450	460	470		
GWWYNRCHAA	NPNGRYYWGG	QYTWDMAKHG	TDDGVVWMNW	KGSWYSMRKM	SMKIRPFFPQ	Q		

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm

Verdau Fibrinogen B β durch Mauritanicain (theoretischer Verdau an K und R) Sequenzübereinstimmung: 31,3 %

10	20	30	40	50	60	70	
QGVNDNEEGF	FSARGHRPLD	KKREEAPSLR	PAPPPISGGG	YRARPAKAAA	TQKKVERKAP	DAGGCLHADP	
80	90	100	110	120	130	140	
DLGVLCPTGC	QLQEALLQQE	RPIRNSVDEL	NNNVEAVSQT	SSSSFQYMYL	LKDLWQKRQK	QVKDNENVVN	
150	160	170	180	190	200	210	
EYSSELEKHQ	LYIDETVNSN	IPTNLRVLRS	ILENLRSKIQ	KLESDVSAQM	EYCRTPCTVS	CNIPVVSGKE	
220	230	240	250	260	270	280	
CEEIIRKGGE	TSEMYLIQPD	SSVKPYRVYC	DMNTENGGWT	VIQNRQDGSV	DFGRKWDPYK	QGFGNVATNT	
290	300	310	320	330	340	350	
DGKNYCGLPG	EYWLGNDKIS	QLTRMGPTEL	LIEMEDWKGD	KVKAHYGGFT	VQNEANKYQI	SVNKYRGTAG	
360	370	380	390	400	410	420	
NALMDGASQL	MGENRTMTIH	NGMFFSTYDR	DNDGWLTSDP	RKQCSKEDGG	GWWYNRCHAA	NPNGRYYWGG	
430	440	450	460	470			
QYTWDMAKHG	TDDGVVWMNW	KGSWYSMRKM	SMKIRPFFPQ	Q			

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm



10	20	30	40	50	60	70	
QGVNDNEEGF	FSARGHRPLD	KKREEAPSLR	PAPPPISGGG	YRARPAKAAA	TQKKVERKAP	DAGGCLHADP	
	(
80	90	100	110	120	130	140	
DLGVLCPTGC	OLOEALLOOE	RPIRNSVDEL	NNNVEAVSOT	SSSSFOYMYL	LKDLWOKROK	OVKDNENVVN	
	x-x <u>x</u> x-		<u>k</u> -	6			
150	160	170	180	190	200	210	
EYSSELEKHQ	LYIDETVNSN	IPTNLRVLRS	ILENLRSKIQ	KLESDVSAQM	EYCRTPCTVS	CNIPVVSGKE	
220	230	240	250	260	270	280	
CEEIIRKGGE	TSEMYLIQPD	SSVKPYRVYC	DMNTENGGWT	VIQNRQDGSV	DFGRKWDPYK	QGFGNVATNT	
		i					
290	300	310	320	330	340	350	
DGKNYCGLPG	EYWLGNDKIS	QLTRMGPTEL	LIEMEDWKGD	KVKAHYGGFT	VQNEANKYQI	SVNKYRGTAG	
— — —							
360	370	380	390	400	410	420	
NALMDGASQL	MGENRTMTIH	NGMFFSTYDR	DNDGWLTSDP	RKQCSKEDGG	GWWYNRCHAA	NPNGRYYWGG	
~							
430	440	450	460	470			
OX TWDMAKHG	TDDGWWWNW	KGSWYSMRKM	SMKIRPFFPO	0			
X1100HARDIO	1000 VWPINW	1000WIDHRRP		×			

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm

Abb. 48: Vergleich des theoretischen Verdaus mit den Bruchstücken nach In-Gel Verdau von Fibrinogen Bβ durch Plasmin und Mauritanicain

Erstellt mit Bruker Biotools (Vers. 3.2) und Sequence editor (Vers. 3.2)

Auch bei der Spaltung der γ -Kette des Fibrinogens sind die Bruchstücke nach Spaltung durch Plasmin und Mauritanicain unterschiedlich, wie das Massenspektrum in Abb. 49 zeigt. Plasmin soll nach Lysin58 und Lysin62 spalten. Auch hier wurden mehrere Peptidfragmente gemessen.



Abb. 49: Massenspektren der Bruchstücke des In-Gel Verdaus von Fibrinogen γ durch Plasmin und Mauritanicain

Eine theoretische Spaltung nach Arginin und Lysin ergibt nur eine Sequenzabdeckung der Peptidmassen mit den gemessenen Massen durch Verdau mit Mauritanicain von 8 %. Diese beiden Aminosäuren scheinen kein bevorzugter Angriffspunkt von Mauritanicain in der γ -Kette zu sein. Bei Plasmin ergibt sich ein Wert von 41,9 %. Die beste Sequenzabdeckung (60,2 %) ist bei einem theoretischen Verdau nach Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin und Valin zu finden (Abb. 50).

Verdau **Fibrinogen** γ durch **Plasmin** (theoretischer Verdau an K und R) Sequenzübereinstimmung: 41,9 %

•		-						
10	20	30	40	50	60	70	80	
YVATRDNCCI	LDERFGSYCP	TTCGIADFLS	TYQTKVDKDL	QSLEDILHQV	ENKTSEVKQL	IKAIQLTYNP	DESSKPNMID	
90	100	110	120	130	140	150	160	
AATLKSRKML	EEIMKYEASI	LTHDSSIRYL	QEIYNSNNQK	IVNLKEKVAQ	LEAQCQEPCK	DTVQIHDITG	KDCQDIANKG	
170	180	190	200	210	220	230	240	
AKQSGLYFIK	PLKANQQFLV	YCEIDGSGNG	WTVFQKRLDG	SVDFKKNWIQ	YKEGFGHLSP	TGTTEFWLGN	EKIHLISTQS	
250	260	270	280	290	300	310	320	
AIPYALRVEL	EDWNGRTSTA	DYAMFKVGPE	ADKYRLTYAY	FAGGDAGDAF	DGFDFGDDPS	DKFFTSHNGM	QFSTWDNDND	
330	340	350	360	370	380	390	400	
KFEGNCAEQD	GSGWWMNKCH	AGHLNGVYYQ	GGTYSKASTP	NGYDNGIIWA	TWKTRWYSMK	KTTMKIIPFN	RLTIGEGQQH	
410	420	430						
HLGGAKQVRP	EHPAETEYDS	LYPEDDL						

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm

Verdau **Fibrinogen** γ durch **Mauritanicain** (theoretischer Verdau an K und R) Sequenzübereinstimmung: 8,0 %

•		0						
10	20	30	40	50	60	70	80	
YVATRDNCCI	LDERFGSYCP	TTCGIADFLS	TYQTKVDKDL	QSLEDILHQV	ENKTSEVKQL	IKAIQLTYNP	DESSKPNMID	
90	100	110	120	130	140	150	160	
AATLKSRKML	EEIMKYEASI	LTHDSSIRYL	QEIYNSNNQK	IVNLKEKVAQ	LEAQCQEPCK	DTVQIHDITG	KDCQDIANKG	
170	180	190	200	210	220	230	240	
AKQSGLYFIK	PLKANQQFLV	YCEIDGSGNG	WTVFQKRLDG	SVDFKKNWIQ	YKEGFGHLSP	TGTTEFWLGN	EKIHLISTQS	
250	260	270	280	290	300	310	320	
AIPYALRVEL	EDWNGRTSTA	DYAMFKVGPE	ADKYRLTYAY	FAGGDAGDAF	DGFDFGDDPS	DKFFTSHNGM	QFSTWDNDND	
330	340	350	360	370	380	390	400	
KFEGNCAEQD	GSGWWMNKCH	AGHLNGVYYQ	GGTYSKASTP	NGYDNGIIWA	TWKTRWYSMK	KTTMKIIPFN	RLTIGEGQQH	
410	420	430						
HLGGAKQVRP	EHPAETEYDS	LYPEDDL						

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm

Verdau Fibrinogen γ durch Mauritanicain	(theoretischer	Verdau a	an K, I	_, A,	V, I	, G)
Sequenzübereinstimmung: 60,2 %						

10	20	30	40	50	60	70	
YVATRDNCCI	LDERFGSYCP	TTCGIADFLS	TYQTKVDKDL	QSLEDILHQV	ENKTSEVKQL	IKAIQLTYNP	
80	90	100	110	120	130	140	
DESSKPNMID	AATLKSRKML	EEIMKYEASI	LTHDSSIRYL	QEIYNSNNQK	IVNLKEKVAQ	LEAQCQEPCK	
150	160	170	180	190	200	210	
DTVQIHDITG	KDCQDIANKG	AKQSGLYFIK	PLKANQQFLV	YCEIDGSGNG	WIVFQKRLDG	SVDFKKNWIQ	
220	230	240	250	260	270	280	
YKEGFGHLSP	TGTTEFWLGN	EKIHLISTQS	AIPYALRVEL	EDWNGRTSTA	DYAMFKVGPE	ADKYRLTYAY	
290	300	310	320	330	340	350	
FAGGDAGDAF	DGFDFGDDPS	DKFFTSHNGM	QFSTWDNDND	KFEGNCAEQD	GSGWWMNKCH	AGHLNGVYYQ	
360	370	380	390	400	410	420	
GGTYSKASTP	NGYDNGIIWA	TWKTRWYSMK	KTTMKIIPFN	RLTIGEGQQH	HLGGAKQVRP	EHPAETEYDS	
430							
LYPEDDL							

Massenbereich: 0 - 4000 Da, mgl. verpasste Spaltungen = 6, Massentoleranz 1000 ppm

Abb. 50: Vergleich des theoretischen Verdaus mit den Bruchstücken nach In-Gel Verdau von Fibrinogen γ durch Plasmin und Mauritanicain

Erstellt mit Bruker Biotools (Vers. 3.2) und Sequence editor (Vers. 3.2)

Die Ergebnisse des In-Gel Verdaus der drei Ketten des Fibrinogens zeigen, dass Mauritanicain zu anderen Spaltprodukten führt als Plasmin. Die Spezifität zur Spaltung hinter bestimmten Aminosäuren ist zwischen den Ketten unterschiedlich und insgesamt sehr unspezifisch (Tab. 20).

		Sequenz-							
	L	A	K	V	Ι	R	G	Р	Abdeckung [%]
Αα	12,6	7,8	25,2	13,6	9,7	11,7	n.B.	19,4	40,6
Ββ	17,3	13,5	21,1	12,0	12,8	23,3	n.B.	n.B.	83,7
γ	29,0	11,3	14,5	12,9	14,5	6,3	17,7	n.B.	60,2

Tab. 20: Substratspezifität nach In-Gel Verdau von Fibrinogen durch Mauritanicain

n.B. = für den theoretischen Verdau nicht berücksichtigt

Ein vermehrtes Spalten nach Alanin, Isoleucin, Leucin, Lysin und Valin, wie bei einem Verdau von β -Lactoglobulin beobachtet wurde (4.3.3.1), lässt sich aber auch hier wiederfinden. Die Methode des In-Gel Verdaus eignet sich allerdings nur bedingt um eine Aussage zur Spaltung des Fibrinogens zu treffen. Bei der A α -, B β - und γ -Kette handelt es sich um relativ große Proteine, die laut Literatur durch Plasmin bevorzugt an wenigen Stellen zu großen Fragmenten gespalten werden (vgl. 1.4.2), was auch in den Versuchen zur Spaltstellenanalyse durch Elektrophorese (4.4.5) bestätigt wurde. Auch Mauritanicain zeigte dort einen Abbau der Ketten des Fibrinogens zu größeren Fragmenten, die teils weiter abgebaut wurden (vgl. Abb. 43 Seite 110). Wie bereits erwähnt, lassen sich beim In-Gel Verdau nur kleine Peptide detektieren. Die größeren Fragmente ließen sich folglich mit der Methode nicht nachweisen. Die Spezifität der Spaltung von Mauritanicain für bestimmte Aminosäuren bei der Spaltung zu wenigen, größeren Fragmenten, könnte von den Ergebnissen der Analyse der kleinen Peptide abweichen.

Eine Analyse von Bruchstücken durch Massenspektrometrie wurde bei Latex-Proteasen nur für Pergularain e I und EuP-82 durchgeführt. Bei Pergularain e I verglichen die Autoren das Spaltverhalten gegenüber Fibrinogen mit dem von Thrombin, da eine thrombinähnliche Wirkung angenommen wurde. Es zeigte sich, dass Pergularain e I ebenfalls die Fibrinopeptide A und B abspaltet, daneben aber auch noch weitere Peptide [104]. In dem Fall wurde allerdings ein Verdau in Lösung durchgeführt. Dadurch lassen sich zwar die bekannten Massen der Fibrinopeptide zuordnen, weitere Fragmente einer der drei Ketten zuzuordnen, ist dagegen problematischer. Der In-Gel Verdau, bei dem zuvor die Ketten voneinander getrennt werden, hat hier Vorteile. Der Nachteil ist aber wie erwähnt, dass sich nur kleine Peptide detektieren lassen. Daher wäre auch ein In-Lösung Verdau von Fibrinogen durch Mauritanicain sinnvoll. Dieser sollte wie bei der Spaltanalyse durch Elektrophorese in verschiedenen Zeitintervallen erfolgen, um den Verlauf der Spaltung zu verfolgen. Im Falle von EuP-82 erfolgte ein tryptischer Verdau eines Bruchstücks, welches wie bei der Spaltstellenanalyse durch Elektrophorese (4.4.5) erhalten wurde und konnte so einer der drei Ketten zugeordnet werden [40].

4.4.7 Plasminogen-Aktivator Aktivität

Zur Untersuchung der Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, wurden die Proben mit Plasminogen inkubiert und die proteolytische Aktivität gegenüber dem Plasmin spezifischen Substrat Boc-Val-Leu-Lys-AMC gemessen. Dieses Substrat wurde beim Screening auf Plasmin Aktivität verwendet, demzufolge setzen alle Latices das Substrat auch direkt um. Daher wurde die Aktivitätsdifferenz zwischen einer Analyse mit Plasminogen Zusatz und einer Analyse ohne Plasminogen gemessen. Das Ergebnis zeigt in Abb. 51 B, dass bis auf *E. francoisii* und *C. aconitifolius* alle Latices in der Lage sind, auch Plasminogen zu Plasmin zu aktvieren. Die Ausprägung ist dabei sehr unterschiedlich. Obwohl Werte von bis zu ca. 40 % bei einigen Latices erreicht werden, scheint dies dennoch nur ein Nebeneffekt bei der Fibrinolyse zu sein. Plasmin verstärkt in diesem Versuch durch Eigenaktivierung seine Aktivität um ca. 170 % (Abb. 51 A). Der natürliche Plasminogen-Aktivator t-PA diente als Positivkontrolle. Mauritanicain zeigte keine PA-Aktivator-Aktivität.





A: Kontrolle mit t-PA (0,25 µg/mL) B: Latices (200 µg/mL) und Plasmin (75 µg/mL)

*signifikante Änderung gegenüber Abwesenheit von Plasminogen, zweiseitiger t-Test, n = 3, α = 0,05

4.4.8 Auflösung von Plasma-Gerinnseln

Die Ergebnisse der Inkubation der Proben mit einem aus Plasma erzeugten und gewaschenen Gerinnsel, über einen Zeitraum von 24 h bei 37 °C, sind in Abb. 52 dargestellt. Mauritanicain (40 μ g/mL), sowie die Latices (200 μ g/mL) von *Cnidoscolus aconitifolius*, *E. cylindrifolia*, *E. francoisii*, *E. lophogona*, *E. mauritanica*, *E. pedilanthoides* und *E. stenoclada* führen zu einer fast vollständigen Auflösung der Gerinnsel. Plasmin (150 μ g/mL) führte ebenso wie die Latices von *E. decaryi*, *E. viguieri* zu einer deutlich sichtbaren Verringerung der Größe der Gerinnsel. Bei den Latices von *E. globosa*, *E. gregaria* und *E. schimperi* sind dagegen in den eingesetzten Konzentrationen keine eindeutigen Veränderungen gegenüber dem Blindwert zu erkennen.





Das Ergebnis bestätigt, dass nicht nur wie durch Elektrophorese gezeigt, Fibrinogen abgebaut wird, sondern auch aus Plasma erzeugtes Fibrin. *E. schimperi* zeigte bereits beim Abbau von Fibrinogen (4.4.5) nur einen Angriff der A α -Kette. *E. globosa* konnte die γ -Kette nur partiell abbauen. Beide zeigten auch bei den Trübungsmessungen (4.4.1.2) nur geringe Aktivität. Jedoch überrascht vor allem das Ergebnis für *E. gregaria*, da dessen Latex in der Lage war alle drei Ketten des Fibrinogens effektiv abzubauen und auch bei der Trübungsmessung einen großen Einfluss auf die Entstehung eines Gerinnsels zeigte. In der Literatur sind nur wenige Methoden mit einer Auflösung von Plasma-Gerinnseln bei der Suche nach fibrinolytisch aktiven Milchsäften beschrieben. Rajesh et al. erzeugten ein Gerinnsel aus Blut und Plasma und inkubierten es mit dem Latex von *Calotropis gigantea* (L.) DRYAND., *Synadenium grantii* HOOK.F. und *Wrightia tinctoria* R.BR.. In allen Fällen war eine Aktivität vorhanden, detektiert durch Proteingehaltsbestimmung der Hydrolyseprodukte des Überstandes nach Zentrifugation [132, 163, 164]. Singh et al. erzeugten ein Blutgerinnsel und ermittelten die Effektivität einer fibrinolytischen Aktivität durch Bestimmung des Gewichtes des Gerinnsels vor und nach Inkubation mit dem Latex von *Tabernaemontana divaricata* (L.) R.BR. EX ROEM. & SCHULT. und *Artocarpus altilis* (PARKINSON EX F.A.ZORN) FOSBERG [168]. Crinumin aus dem Latex von *Crinum asiaticum* L. wurde mit einem aus Blut erzeugtem Gerinnsel in Petrischalen gegeben und die Auflösung visuell detektiert. Daneben wurde eine Auflösung eines Fibrin-Gerinnsels mikroskopisch untersucht [106]. Meistens wird allerdings zunächst aus Fibrinogen und Thrombin ein Gerinnsel erzeugt und anschließend, ähnlich wie bei der Methode der Spaltstellenanalyse von Fibrinogen (3.9.4), dieses für bestimmte Zeitintervalle mit der Probe inkubiert und eine SDS-PAGE durchgeführt [36, 53, 54, 105, 131, 135, 137].

5. Schlussfolgerungen

Mauritanicain besitzt eine Molekülmasse von 73 kDa. Im Massenspektrum und in der SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen, sowohl in Ab- und Anwesenheit eines Reduktionsmittels, wird diese Masse bestätigt. Daneben sind in der SDS-PAGE weitere Banden zu sehen, die vermutlich Abbauprodukte sind, da ein tryptischer Verdau dieser Banden diverse identische Massen der Fragmente hervorbrachte. Verzichtet man auf eine Denaturierung durch Hitze, sind lediglich zwei intensive Banden im Gel vorhanden. Die Protease liegt evtl. nativ als ein größeres, nicht kovalent verbundenes Dimer vor. Die Recherche der Literatur ergibt, dass auch viele der aus der Familie Euphorbiaceae isolierten Proteasen entweder aus mehreren Untereinheiten bestehen oder aber unter den Bedingungen der SDS-PAGE eine Instabilität aufweisen (siehe 4.3.2). Am ähnlichsten scheint Mauritanicain in dieser Eigenschaft den aus Euphorbia lactea HAW. isolierten Proteasen Euphorbain la₁, lc und y₃ zu sein. Weitere Eigenschaften wie der IEP und das pH Optimum weichen dagegen ab. Domsalla hat Mauritanicain erstmals isoliert [150]. Mauritanicain scheint nach seinen und nach den Recherchen und Ergebnissen dieser Arbeit eine bisher unbekannte Protease zu sein. Ein von ihm durchgeführter tryptischer Verdau und anschließender Abgleich mit Datenbanken führte zu keiner Übereinstimmung mit anderen aus Latex isolierten Proteasen. Auch ein im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter Peptidmassenfingerprint (Daten nicht gezeigt) der Hauptbande bei 73 kDa und der kleineren Bruchstücke ergab in der Hinsicht keine Übereinstimmungen. Allerdings sind zum jetzigen Zeitpunkt von den bisher aus der Familie Euphorbiaceae isolierten Proteasen auch keine Sequenzen aufgeklärt und demzufolge auch nicht in Datenbanken zu finden. Vereinzelt sind lediglich N-terminale Aminosäuren ermittelt worden, lediglich für Nivulian-II ist hier mehr bekannt [60]. Eine Sequenzaufklärung von Mauritanicain wäre ein nächster Schritt, eine Analyse der zweiten ohne Hitzedenaturierung entstehenden Bande sollte ebenfalls erfolgen.

Bevor Untersuchungen zum Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse durchgeführt wurden, konnten in einem Screening 122 Arten der Familie Euphorbiaceae auf eine Aktivität gegenüber dem Substrat Boc-Val-Leu-Lys-AMC getestet werden. Das natürliche Fibrin abbauende Enzym Plasmin, soll eine hohe Spezifität für dieses fluorogene Substrat haben [129]. Von den zwölf für weitere Untersuchungen ausgewählten Arten, wurde eine gerinnungsauslösende Wirkung für *E. mauritanica* und *C. aconitifolius*, sowie für Mauritanicain im Fibrinogen-Platten-Test gezeigt. Alle drei führten zu einem getrübten Hof, so dass zunächst eine thrombinähnliche Wirkung angenommen wurde. Bei der photo-

metrischen Trübungsmessung sollte ebenfalls zunächst eine thrombinähnliche Wirkung untersucht werden. Allerdings zeigte hier keine der drei Proben, weder bei der Untersuchung mit Fibrinogen noch bei Plasma in Abwesenheit von Calcium, eine Aktivität an. Für Mauritanicain wurden sogar verschiedene Konzentrationen des Fibrinogens eingesetzt, um eine konzentrationsabhängige Wirkung zu untersuchen. Wie beschrieben, war dies nicht der Fall. In allen drei Fällen wurde allerdings im Fibrinogen-Platten-Test, im Gegensatz zur Kontrolle mit Thrombin, der entstandene Hof auch wieder aufgelöst, so dass ebenfalls eine fibrinolytische Wirkung vorhanden sein musste. Bei der photometrischen Untersuchung auf eine fibrin(ogen)olytische Aktivität fiel bei Mauritanicain auf, dass im Vergleich zur Kontrolle ohne Mauritanicain Zusatz zwar am Endpunkt eine verminderte Trübung vorhanden war, jedoch kam es hier z.T. zu einem schnelleren Anstieg der Trübung. Die Wirkung des Thrombin scheint also zunächst verstärkt zu werden, was sich aber nur bei bestimmten Konzentrationen und einer Vorinkubation von Mauritanicain mit Fibrinogen auswirkt. Möglicherweise geschieht dies aufgrund einer Freilegung von Thrombin Bindungsregionen im Fibrinogen. Bei einer direkten Inkubation von Mauritanicain mit Fibrinogen und Thrombin ist hingegen kein Anstieg der Trübung, sondern ausschließlich eine konzentrationsabhängige Minderung der Trübung zu beobachten. Während die Latices teilweise in der Lage sind, bei Inkubation mit Plasma die Calcium-induzierte Trübung zu mindern, ist bei Mauritanicain erst bei einer durch Verdünnung des Plasmas simulierten höheren Enzymmenge eine Aktivität zu verzeichnen. Dies spricht für eine Interaktion von Mauritanicain mit im Plasma vorhandenen Inhibitoren. Von den Latices zeigen hier vor allem C. aconitifolius, E. stenoclada, E. gregaria, E. mauritanica, E. lophogona und E. viguieri eine starke Verminderung der Trübung an. Insgesamt sind für Mauritanicain sowie die untersuchten Latices, in den untersuchten Konzentrationen, eher gerinnungshemmende Eigenschaften festzustellen. Diese Eigenschaft geht vermutlich auf eine Hydrolyse von Fibrinogen, sowie auch von Fibrin zurück. Ob weitere Mechanismen, wie die Aktivierung von gerinnungshemmenden Substanzen oder die direkte Inhibition von Gerinnungsfaktoren, zusätzlich stattfinden, kann aber für die Untersuchungen mit Plasma nicht ausgeschlossen werden. Eine Aktivierung von Plasminogen durch die verschiedenen Latices konnte bis auf für E. francoisii und C. aconitifolius gezeigt werden, auch wenn diese Plasminogen-Aktivator Aktivität vermutlich neben der direkten plasminartigen Aktivität eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Die bevorzugte Fibrin(ogen)olyse wird neben der erwähnten photometrisch ermittelten verminderten Gerinnung, vor allem durch die Ergebnisse der Spaltstellenanalyse, der Zymographie, des Fibrin-Platten-Tests und der Auflösung von Plasma-Gerinnseln gezeigt. So führte

Mauritanicain in der Reihenfolge $A\alpha > B\beta > \gamma$ zu einer kompletten Spaltung des Fibrinogens. Auch *Cnidoscolus aconitifolius, E. globosa, E. gregaria, E. lophogona, E. mauritanica und E. stenoclada* sind bei der gewählten Konzentration in der Lage, alle Ketten größtenteils zu spalten, die übrigen Latices waren in unterschiedlichem Ausmaß dazu befähigt. In den Fibrinogen-Zymogrammen zeigten alle Latices einen Abbau des Substrates an, am intensivsten war auch hier die Aktivität bei den zuvor genannten Arten. Im Fibrin-Platten-Test waren die entstandenen hellen Höfe bei einer Inkubation mit Mauritanicain, *E. mauritanica* und *C. aconitifolius* am stärksten ausgeprägt. Zur Auflösung eines aus Plasma erzeugten Gerinnsels waren bis auf den bei anderen Versuchen sehr aktiven Latex von *E. gregaria*, sowie die Latices von *E. globosa* und *E. schimperi*, sowohl alle übrigen Latices als auch Mauritanicain in unterschiedlichen Ausmaß in der Lage. Für die zwölf Latices sind alle Versuche in Tab. 21 vereinfacht zusammengefasst dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Latices eine Quelle für proteolytische Enzyme sind, die in der Lage sind Fibrinogen und Fibrin abzubauen, sowie Plasminogen zu Plasmin zu aktivieren. Die Zusammensetzung der Latices ist komplex, daher wäre ein nächster Schritt eine weitere Aufreinigung vorzunehmen und die für die Reaktionen verantwortlichen Proteasen zu isolieren und charakterisieren. Dabei sind von besonderem Interesse die Latices, die befähigt waren, eine Calcium-induzierte Plasmagerinnung effektiv zu mindern und gleichzeitig ein Plasma-Gerinnsel aufzulösen. Für den Latex von Euphorbia mauritanica ist dies bereits geschehen. Das aus ihm isolierte Mauritanicain zeigte eindeutig einen Abbau von Fibrin(ogen). Bei den entstehenden Bruchstücken vom Fibrin(ogen) handelt es sich, wie auch bei der Hydrolyse des Fibrinogens durch Plasmin, um wenige größere Fragmente, die mit der Zeit weiter abgebaut werden. Eine Interaktion mit im Plasma vorhandenen Inhibitoren ist aufgrund der Ergebnisse wahrscheinlich und wichtig, damit bei einem möglichen therapeutischen Einsatz eine unkontrollierte Fibrin(ogen)olyse nicht zu schweren Blutungen führen würde. Neben Mauritanicain konnte in dieser Arbeit eine weitere fibrin(ogen)olytische Fraktion aus dem Latex von Euphorbia mauritanica L. identifiziert werden, deren Aktivität in Vorversuchen ermittelt wurde (Daten nicht gezeigt). Eine Isolation der enthaltenen verantwortlichen Protease sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Bevor Mauritanicain in einem Tiermodell auf fibrinolytische Eigenschaften getestet werden kann, sollten zunächst eine Strukturaufklärung, sowie weitere Versuche an Plasma-Gerinnseln und Untersuchungen zur möglichen Toxizität der Protease folgen. Milchsäfte werden traditionell u.a. zur Wundheilung angewendet [11, 13, 14, 168]. Fibrinolyse und das Plasminogen-Aktivator-System sind wichtige Bestandteile der Wundheilung, eine Analyse in diese Richtung wäre ebenfalls denkbar [171, 172]. Neben einer pharmazeutischen Anwendung sind außerdem auch andere Einsatzgebiete von Mauritanicain und den anderen Milchsäften z.B. in der Lebensmittel- und Waschmittelindustrie denkbar (vgl. 1.3.2).

	C. aconitifolius	E. cylindrifolia	E. decaryi	E. francoisii	E. globosa	E. gregaria	E. lophogona	E. mauritanica	E. pedilanthoides	E. schimperi	E. stenoclada	E. viguieri
Thrombinartige Gerinnung von Fibrinogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca ²⁺ -unabhängige Plasmagerinnung	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minderung der Thrombin- induzierten Gerinnung von Fibrinogen mit Vorinkubation	+++	+	-	++	-	+++	+	+++	+	(+)	-	+
Minderung der Thrombin- induzierten Gerinnung von Fibrinogen ohne Vorinkubation	+++	+	-	++	(+)	++	++	(+)	-	-	-	-
Minderung der Ca ²⁺ - induzierten Gerinnung von Plasma mit Vorinkubation	+++	(+)	-	+	++	(++)	+++	+++	+	-	+++	++
Minderung der Ca ²⁺ - induzierten Gerinnung von Plasma ohne Vorinkubation	+++	+	-	+	(+)	+++	++	++	+	(+)	+++	++
Fibrinogen-Platten-Test	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
Fibrin-Platten-Test	+++	+	+	++	+	-	++	+++	+	-	++	+
Fibrin(ogen)-Zymographie	+++	+	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	+++	+
Kettenabbau Fibrinogen	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	++
Abbau von Plasma- Gerinnseln	+++	+++	++	+++	-	-	+++	+++	+++	-	+++	++

Tab. 21: Zusammenfassung der Ergebnisse des Einflusses der Latices auf Fibrin(ogen) und Plasma

- = keine Aktivität, + = Aktivität vorhanden +++ > ++ > +, () = nicht signifikante Änderung

6. Zusammenfassung / Summary

Milchsaft (Latex) ist ein komplexes Gemisch verschiedener Inhaltsstoffe, deren Funktion ungeklärt ist, aber vor allem in einem Abwehrmechanismus der Pflanze begründet wird. Proteolytische Aktivität wurde bisher in vielen Latices beschrieben, aus einigen wurden Proteasen isoliert, wobei es sich hauptsächlich um Cystein- und Serin-Proteasen handelt. Mauritanicain ist eine Serin-Protease aus dem Milchsaft von Euphorbia mauritanica L. (Euphorbiaceae), die erstmals von Dr. André Domsalla isoliert und charakterisiert wurde. In dieser Arbeit konnte Mauritanicain als Protease mit einer Molekülmasse von 73 kDa durch MALDI-TOF-MS und SDS-PAGE identifiziert werden. Möglicherweise liegt die Protease nativ als nicht kovalent verbundenes Dimer von höherer Molekülmasse vor. Der isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei etwa 6,5. Eine optimale Umsetzung des Substrats Casein findet bei einer Temperatur von 55 - 65 °C und einem pH-Wert von 5,5 - 6,5 statt. Mauritanicain spaltet je nach Substrat bevorzugt hinter den Aminosäuren Alanin, Leucin und Lysin. Dabei scheint zunächst bevorzugt Leucin angegriffen zu werden, gefolgt von Lysin und Alanin. Dies konnte durch einen In-Gel Verdau von ß-Lactoglobulin in verschiedenen Zeitintervallen festgestellt werden. Daneben findet aber auch nach weiteren Aminosäuren wie z.B. Isoleucin und Valin eine Spaltung statt. Ein mögliches pharmakologisches Einsatzgebiet von Proteasen ist die Fibrinolyse. Daher sollte Mauritanicain sowie diverse Milchsäfte auf einen Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse hin untersucht werden. Plasmin ist das natürliche Enzym, welches einen Abbau von Fibrin bewirkt. Durch Screening von 122 Arten der Familie Euphorbiaceae JUSS. auf proteolytische Aktivität gegenüber dem für Plasmin spezifischen fluorogenen Substrat Boc-Val-Leu-Lys-AMC, konnte für 19 Arten eine starke Aktivität ermittelt werden, von denen 12 Arten für weitere Untersuchungen ausgewählt SDS-PAGE Analyse der Latices deutet auf eine wurden. Eine heterogene Proteinzusammensetzung mit teils partiellen Übereinstimmungen hin. Weder für diese Arten, noch für Mauritanicain war bisher ein Einfluss auf die Hämostase und Fibrinolyse beschrieben. Es wurde das Verhalten der 12 Latices und Mauritanicain in verschiedenen Methoden getestet. Thrombin führt natürlicherweise zur Gerinnung von Fibrinogen zu Fibrin. Mauritanicain sowie die Latices von Euphorbia mauritanica L. und Cnidoscolus aconitifolius (MILL.) I. M. JOHNST. führten im Fibrinogen-Platten-Test zu einer Trübung, jedoch verschwand darauffolgend, im Gegensatz zur Kontrolle, die Trübung wieder. Die fibrin(ogen)olytische Aktivität scheint bei allen zu überwiegen. So führten weder Mauritanicain noch einer der 12 Latices in einer photometrischen Untersuchung zu einer

thrombinartigen und calciumunabhängigen Gerinnung. Alle Milchsäfte waren in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, eine Calcium-induzierte Gerinnung von Schweineplasma zu hemmen. Für Mauritanicain konnte dies bei hohen Konzentrationen oder bei einer 30 minütigen Vorinkubation ebenfalls gezeigt werden. Neben einer gewissen Fähigkeit der Latices Plasmin aus Plasminogen zu aktivieren, scheint bei ihnen und Mauritanicain der gerinnungshemmende Effekt vor allem auf eine Hydrolyse von Fibrinogen und Fibrin zurückzuführen zu sein. Neben einer fibrinolytischen Aktivität in einem Fibrin-Platten-Test konnte der Abbau von Fibrinogen und den auch damit wahrscheinlichen Abbau von Fibrin in weiteren Methoden bewiesen werden. Dies geschah durch Minderung einer Thrombin-induzierten Trübung einer Fibrinogen-Lösung, durch Fibrinogen-Zymographie und durch eine Analyse der Hydrolyse der Aa-, Bβ- und γ-Kette des Fibrinogens durch SDS-PAGE. Für Mauritanicain konnte in letzterem Verfahren ein zeitlicher Verlauf der Hydrolyse in der Reihenfolge A $\alpha > B\beta > \gamma$, sowie eine mögliche Herkunft der Spaltprodukte ermittelt werden. Hinter welchen Aminosäuren eine Spaltung in den drei Ketten durch Mauritanicain bevorzugt stattfindet, wurde in einem In-Gel Verdau von Fibrinogen untersucht. Letztlich konnte, bis auf für Euphorbia globosa (HAW.) SIMS, Euphorbia gregaria MARLOTH und Euphorbia schimperi C. PRESL, bei einer festgelegten Konzentration, der Abbau eines Plasma-Gerinnsels für Mauritanicain und die übrigen Latices nachgewiesen werden. Damit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die untersuchten Latices eine Quelle für proteolytische Enzyme sind, die durch einen Abbau Fibrinogens die Hämostase negativ und u.a. durch einen Abbau eines daraus entstehenden Gerinnsels die Fibrinolyse positiv beeinflussen können und daher für weitere Untersuchungen interessant sind.

Latex is a complex mixture of various ingredients, whose function is unknown, but is mainly caused by a defense mechanism of the plant. Proteolytic activity has been described in many latices and several proteases were isolated, which are mainly cysteine and serine proteases. Mauritanicain is a serine protease from the latex of Euphorbia mauritanica L. (Euphorbiaceae), which was first isolated and characterized by Dr. André Domsalla. In this work Mauritanicain was identified as a protease with a molecular weight of 73 kDa by MALDI-TOF-MS and SDS-PAGE. It is possible that the protease is natively present as a not covalently linked dimer of a higher molecular mass. The isoelectric point of the protein is about 6.5. An optimal degradation of the substrate casein takes place at a temperature of 55 -65 °C and pH 5.5 - 6.5. Depending on the substrate, Mauritanicain prefers cleaving behind the amino acids alanine, leucine and lysine. Initially, leucine appears to be preferentially attacked, followed by lysine and alanine, but also other amino acids such as isoleucine and valine. This could be determined by an in-gel digestion of β -lactoglobulin at different time intervals. One potential pharmacological application of proteases is fibrinolysis. Therefore Mauritanicain as well as various latices should be tested for an effect on hemostasis and fibrinolysis. Plasmin is the natural enzyme which causes degradation of fibrin. The screening of 122 species of the Euphorbiaceae JUSS. family for proteolytic activity against the specific fluorogenic substrate for plasmin Boc-Val-Leu-Lys-AMC, shows strong activity for 19 species, of which 12 species were selected for further studies. An SDS-PAGE analysis of the latices indicates a heterogeneous protein composition with partial matches. Neither for these species, nor for Mauritanicain an influence on hemostasis and fibrinolysis previously was described. The behavior of the 12 latices and Mauritanicain has been tested using different methods. Thrombin naturally induces the coagulation of fibrinogen to fibrin. In a fibrinogenplate-assay Mauritanicain and the latices of Euphorbia mauritanica L. and Cnidoscolus aconitifolius (MILL.) I. M. JOHNST. caused clouding of the fibrinogen-agarose gel, but in contrast to the control subsequently the clouding disappeared. The fibrin(ogen)olytic activity appears to predominate for all of the latices, because in a spectrophotometric assay neither Mauritanicain nor one of the latices led to thrombin-like and calcium independent coagulation. To a variable extent all latices were able to inhibit calcium-induced coagulation of porcine plasma. For Mauritanicain this could also be shown at high concentrations or at a 30 minute pre-incubation. Apart from a certain ability of latices to activate plasmin from plasminogen, their anticoagulant effect as well as of Mauritanicain seems to be mainly the result of hydrolysis of fibrinogen and fibrin. In addition to a fibrinolytic activity in a fibrinplate-assay, the degradation of fibringen and therefore also probable degradation of fibrin was proved by a reduction of thrombin-induced turbidity of a fibrinogen solution, by fibrinogen zymography and by analyzing the hydrolysis of A α -, B β - and γ -chain of fibrinogen by SDS-PAGE. For Mauritanicain a time course hydrolysis in the order A $\alpha > B\beta > \gamma$, as well as a possible origin of the cleavage products was determined in the latter method. Behind which amino acids a cleavage in the three chains by Mauritanicain preferably takes place, has been investigated in an in-gel digestion of fibrinogen. Finally the reduction of a plasma clot could be detected at a fixed concentration for Mauritanicain and the other latices except for *E. globosa* (HAW.) SIMS, *E. gregaria* MARLOTH and *E. schimperi* C. PRESL. Thus the results of this work are, that the studied latices are a source of proteolytic enzymes, which can negatively affect the hemostasis due to a degradation of fibrinogen and positively affect fibrinolysis by a reduction of a resulting clot and are therefore interesting for further studies.

Literaturverzeichnis

- 1. Konno K., Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. Phytochemistry, 2011. 72(13): p. 1510-30.
- 2. Agrawal A.A. and Konno K., *Latex: A Model for Understanding Mechanisms, Ecology, and Evolution of Plant Defense Against Herbivory.* Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2009. 40(1): p. 311-331.
- 3. Goel G., Makkar H.P., Francis G., Becker K., *Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals.* Int J Toxicol, 2007. 26(4): p. 279-88.
- 4. Martin M.N., *The Latex of Hevea brasiliensis Contains High Levels of Both Chitinases and Chitinases/Lysozymes.* Plant Physiol, 1991. 95(2): p. 469-76.
- 5. Ujwala K. and Karpagam N., *Potential therapeutical values of plant latices*. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2013. 3(2): p. 317-325.
- 6. Appendino G. and Szallasi A., *Euphorbium: modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancient medicine.* Life Sci, 1997. 60(10): p. 681-96.
- 7. Glatthaar-Saalmuller B. and Fallier-Becker P., *Antiviral action of Euphorbium compositum and its components*. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd, 2001. 8(4): p. 207-12.
- 8. Nambudiri N.S. and Nambudiri V.E., *Euphorbia peplus: 18th-century insights on a 21st-century therapy.* JAMA Dermatol, 2013. 149(9): p. 1081.
- 9. Lebwohl M., Swanson N., Anderson L.L., Melgaard A., Xu Z., Berman B., *Ingenol mebutate gel for actinic keratosis*. N Engl J Med, 2012. 366(11): p. 1010-9.
- 10. Osoniyi O. and Onajobi F., *Coagulant and anticoagulant activities in Jatropha curcas latex.* J Ethnopharmacol, 2003. 89(1): p. 101-5.
- 11. Badgujar S.B., *Evaluation of hemostatic activity of latex from three Euphorbiaceae species.* J Ethnopharmacol, 2014. 151(1): p. 733-9.
- 12. Felix-Silva J., Giordani R.B., da Silva-Jr A.A., Zucolotto S.M., Fernandes-Pedrosa Mde F., *Jatropha gossypiifolia L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant.* Evid Based Complement Alternat Med, 2014. 2014: p. 369204.
- 13. Goyal M., Nagori B.P., Sasmal D., *Wound healing activity of latex of Euphorbia caducifolia*. J Ethnopharmacol, 2012. 144(3): p. 786-90.
- 14. Kumar B., Vijayakumar M., Govindarajan R., Pushpangadan P., *Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India*. J Ethnopharmacol, 2007. 114(2): p. 103-13.

- 15. *The Plant List (2013). Version 1.1.*, Zuletzt aufgerufen am 24.03.2015: http://www.theplantlist.org/.
- 16. Wurdack K.J., Hoffmann P., Chase M.W., Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid RBCL and TRNL-F DNA sequences. Am J Bot, 2005. 92(8): p. 1397-420.
- 17. Jussieu A.L.d., *Euphorbiae Classis XV, Ordo I.* Genera Plantarum, 1789: p. 384-385.
- 18. Rowley G.D., A History of Succulent Plants1997: Strawberry Press.
- 19. Turner R., Euphorbias A Gardener's Guide. Timber Press, 1995: p. 16-18.
- 20. Watson L. and Dallwitz M.J., *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval, http://delta-intkey.com,* 1992 onwards Version: 9th March 2015.
- 21. Horn J.W., van Ee B.W., Morawetz J.J., Riina R., Steinmann V.W., Berry P.E., Wurdack K.J., *Phylogenetics and the evolution of major structural characters in the giant genus Euphorbia L. (Euphorbiaceae).* Mol Phylogenet Evol, 2012. 63(2): p. 305-26.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. 62(3): p. 597-635.
- 23. Rawlings N.D., Waller M., Barrett A.J., Bateman A., *MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors.* Nucleic Acids Res, 2014. 42(Database issue): p. D503-9.
- 24. Craik C.S., Page M.J., Madison E.L., *Proteases as therapeutics*. Biochem J, 2011. 435(1): p. 1-16.
- 25. Fruton J.S., *A history of pepsin and related enzymes*. Q Rev Biol, 2002. 77(2): p. 127-47.
- 26. Flemmig M. and Melzig M.F., *Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis.* J Pharm Pharmacol, 2012. 64(8): p. 1025-39.
- 27. Maurer H.R., *Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use.* Cell Mol Life Sci, 2001. 58(9): p. 1234-45.
- 28. Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C., *Industrial enzyme applications*. Curr Opin Biotechnol, 2002. 13(4): p. 345-51.
- 29. Cherry J.R. and Fidantsef A.L., *Directed evolution of industrial enzymes: an update.* Curr Opin Biotechnol, 2003. 14(4): p. 438-43.
- 30. Shah M., Mir S., Paray M., *Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review.* Dairy Science & Technology, 2014. 94(1): p. 5-16.

- 31. Bekhit A.A., Hopkins D.L., Geesink G., Bekhit A.A., Franks P., *Exogenous Proteases for Meat Tenderization*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013. 54(8): p. 1012-1031.
- 32. Pande M., Dubey V.K., Yadav S.C., Jagannadham M.V., *A novel serine protease cryptolepain from Cryptolepis buchanani: purification and biochemical characterization*. J Agric Food Chem, 2006. 54(26): p. 10141-50.
- 33. Antao C.M. and Malcata F.X., *Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features.* Plant Physiol Biochem, 2005. 43(7): p. 637-50.
- 34. Domsalla A. and Melzig M.F., *Occurrence and properties of proteases in plant latices*. Planta Medica, 2008. 74(7): p. 699-711.
- 35. van der Hoorn R.A. and Jones J.D., *The plant proteolytic machinery and its role in defence*. Curr Opin Plant Biol, 2004. 7(4): p. 400-7.
- 36. Siritapetawee J., Thammasirirak S., Samosornsuk W., *Antimicrobial activity of a 48kDa protease (AMP48) from Artocarpus heterophyllus latex.* Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012. 16(1): p. 132-7.
- 37. Kumar R., Singh K.A., Tomar R., Jagannadham M.V., *Biochemical and spectroscopic characterization of a novel metalloprotease, cotinifolin from an antiviral plant shrub: Euphorbia cotinifolia.* Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale, 2011. 49(7): p. 721-8.
- 38. Nath L.K. and Dutta S.K., *Extraction and purification of curcain, a protease from the latex of Jatropha curcas Linn*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1991. 43(2): p. 111-4.
- 39. Fonseca K.C., Morais N.C., Queiroz M.R., Silva M.C., Gomes M.S., Costa J.O., Mamede C.C., Torres F.S., Penha-Silva N., Beletti M.E., Canabrava H.A., Oliveira F., *Purification and biochemical characterization of Eumiliin from Euphorbia milii var*. *hislopii latex.* Phytochemistry, 2010. 71(7): p. 708-15.
- 40. Siritapetawee J., Sojikul P., Klaynongsruang S., *Biochemical characterization of a new glycosylated protease from Euphorbia cf. lactea latex.* Plant Physiol Biochem, 2015. 92: p. 30-38.
- 41. Siritapetawee J., Limphirat W., Kantachot C., Kongmark C., *The effects of metal ions in Euphorbia cf. lactea latex on the fibrinogenolytic activity of a plant protease.* Appl Biochem Biotechnol, 2015. 175(1): p. 232-42.
- 42. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Two proteases from the latex of Elaeophorbia drupifera*. Phytochemistry, 1985. 24(12): p. 2843-2845.
- 43. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Isolation and characterization of euphorbain l, a proteinase from the latex of Euphorbia lathyris.* Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology, 1983. 746(3): p. 154-159.

- 44. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Isolation and characterization of proteases from Euphorbia lactea and Euphorbia lactea cristata*. Phytochemistry, 1986. 25(4): p. 807-810.
- 45. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Euphorbain p, a serine protease from euphorbia pulcherrima*. Phytochemistry, 1984. 23(3): p. 682-683.
- 46. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Four serine proteases from the latex of Euphorbia tirucalli*. Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology, 1985. 63(10): p. 1093-1096.
- 47. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Proteases of euphorbiaceae*. Phytochemistry, 1988. 27(1): p. 45-50.
- 48. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Three serine proteases from the latex of Euphorbia cyparissias*. Phytochemistry, 1985. 24(5): p. 925-928.
- 49. 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, Molecular Biology and Biophysics, 2000. 4: p. 223-231.
- 50. Arima K., Uchikoba T., Yonezawa H., Shimada M., Kaneda M., *Cucumisin-like* protease from the latex of Euphorbia supina. Phytochemistry, 2000. 53(6): p. 639-44.
- 51. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Purification and characterization of hevain, a serine protease from Hevea brasiliensis.* Phytochemistry, 1984. 23: p. 963-964.
- 52. Lynn K.R. and Clevette-Radford N.A., *Hevains: Serine-centred proteases from the latex of Hevea brasiliensis.* Phytochemistry, 1986. 25(10): p. 2279-2282.
- 53. Patel G.K., Kawale A.A., Sharma A.K., *Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb Euphorbia hirta*. Plant Physiology and Biochemistry (Issy-les-Moulineaux, France), 2012. 52: p. 104-11.
- 54. Rajesh R., Nataraju A., Gowda C.D., Frey B.M., Frey F.J., Vishwanath B.S., *Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from Synadenium grantii latex: action on human fibrinogen and fibrin clot.* Biochimie, 2006. 88(10): p. 1313-22.
- 55. Moro L.P., Murakami M.T., Cabral H., Vidotto A., Tajara E.H., Arni R.K., Juliano L., Bonilla-Rodriguez G.O., *Purification, biochemical and functional characterization of miliin, a new thiol-dependent serine protease isolated from the latex of Euphorbia milii.* Protein & Peptide Letters, 2008. 15(7): p. 724-30.
- 56. Yadav S.C., Pande M., Jagannadham M.V., *Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant Euphorbia milii*. Phytochemistry, 2006. 67(14): p. 1414-26.

- 57. Yadav R.P., Patel A.K., Jagannadham M.V., *Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin-like serine protease from Euphorbia neriifolia Linn.* Process Biochemistry (Amsterdam, Neth.), 2011. 46(8): p. 1654-1662.
- 58. Yadav R.P., Patel A.K., Jagannadham M.V., *Neriifolin S, a dimeric serine protease from Euphorbia neriifolia Linn.: Purification and biochemical characterisation.* Food Chemistry, 2012. 132(3): p. 1296-1304.
- 59. Badgujar S.B. and Mahajan R.T., *Comparison of cysteine proteases of four laticiferous* plants and characterization of Euphorbia nivulia Buch.-Ham. latex glycosylated cysteine peptidase. Indian Journal of Natural Products and Resources, 2012. 3: p. 152-160.
- 60. Badgujar S.B. and Mahajan R.T., *Peptide Mass Fingerprinting and N-Terminal Amino Acid Sequencing of Glycosylated Cysteine Protease of Euphorbia nivulia Buch.-Ham.* Journal of Amino Acids, 2013. 2013: p. 569527.
- 61. 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(4): p. 291-9.
- 62. Mahajan R.T. and Adsul Y.D., *Isolation, purification and characterization of serine protease from medicinal plant Euphorbia prunifolia Jacq.* Int. J. of Adv. Res. , 2015. 3(1): p. 388-395.
- 63. Menon M., Vithayathil P.J., Raju S.M., Ramadoss C.S., *Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of Synadenium grantii Hook, 'f'*. Plant Science (Shannon, Ireland), 2002. 163(1): p. 131-139.
- 64. Collen D. and Lijnen H.R., *Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis*. Blood, 1991. 78(12): p. 3114-24.
- 65. Chapin J.C. and Hajjar K.A., *Fibrinolysis and the control of blood coagulation*. Blood Rev, 2015. 29(1): p. 17-24.
- 66. Doolittle R.F., *Structural basis of the fibrinogen-fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography.* Blood Rev, 2003. 17(1): p. 33-41.
- 67. Nieuwenhuizen W., *Fibrin-mediated plasminogen activation*. Ann N Y Acad Sci, 2001. 936: p. 237-46.
- 68. Castellino F.J. and Ploplis V.A., *Structure and function of the plasminogen/plasmin system*. Thromb Haemost, 2005. 93(4): p. 647-54.
- 69. Holvoet P., Lijnen H.R., Collen D., *A monoclonal antibody specific for Lysplasminogen. Application to the study of the activation pathways of plasminogen in vivo.* J Biol Chem, 1985. 260(22): p. 12106-11.
- 70. Fredenburgh J.C. and Nesheim M.E., *Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro*. J Biol Chem, 1992. 267(36): p. 26150-6.
- 71. Trexler M., Vali Z., Patthy L., *Structure of the omega-aminocarboxylic acid-binding sites of human plasminogen. Arginine 70 and aspartic acid 56 are essential for binding of ligand by kringle 4.* J Biol Chem, 1982. 257(13): p. 7401-6.
- 72. Cesarman-Maus G. and Hajjar K.A., *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. 129(3): p. 307-21.
- 73. Schaller J. and Gerber S.S., *The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects*. Cell Mol Life Sci, 2011. 68(5): p. 785-801.
- 74. Walker J.B. and Nesheim M.E., *The molecular weights, mass distribution, chain composition, and structure of soluble fibrin degradation products released from a fibrin clot perfused with plasmin.* J Biol Chem, 1999. 274(8): p. 5201-12.
- 75. Kunamneni A., Abdelghani T.T., Ellaiah P., *Streptokinase--the drug of choice for thrombolytic therapy*. J Thromb Thrombolysis, 2007. 23(1): p. 9-23.
- 76. Nicholl S.M., Roztocil E., Davies M.G., *Plasminogen activator system and vascular disease*. Curr Vasc Pharmacol, 2006. 4(2): p. 101-16.
- 77. Emeis J.J., Regulation of the acute release of tissue-type plasminogen activator from the endothelium by coagulation activation products. Ann N Y Acad Sci, 1992. 667: p. 249-58.
- 78. Oliver J.J., Webb D.J., Newby D.E., *Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(12): p. 2470-9.
- 79. Barrett A.J., Rawlings N.D., Woessner J.F., *Handbook of Proteolytic Enzymes*1998: Academic Press.
- 80. Pennica D., Holmes W.E., Kohr W.J., Harkins R.N., Vehar G.A., Ward C.A., Bennett W.F., Yelverton E., Seeburg P.H., Heyneker H.L., Goeddel D.V., Collen D., *Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. coli*. Nature, 1983. 301(5897): p. 214-21.
- 81. Wiman B. and Collen D., *Molecular mechanism of physiological fibrinolysis*. Nature, 1978. 272(5653): p. 549-50.
- 82. Hoylaerts M., Rijken D.C., Lijnen H.R., Collen D., *Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin.* J Biol Chem, 1982. 257(6): p. 2912-9.
- 83. Matsuo O., Rijken D.C., Collen D., *Thrombolysis by human tissue plasminogen activator and urokinase in rabbits with experimental pulmonary embolus*. Nature, 1981. 291(5816): p. 590-1.
- 84. van Zonneveld A.J., Veerman H., Pannekoek H., On the interaction of the finger and the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. Inhibition of kringle-2 binding to fibrin by epsilon-amino caproic acid. J Biol Chem, 1986. 261(30): p. 14214-8.

- 85. Verheijen J.H., Caspers M.P., Chang G.T., de Munk G.A., Pouwels P.H., Enger-Valk B.E., *Involvement of finger domain and kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator in fibrin binding and stimulation of activity by fibrin*. EMBO J, 1986. 5(13): p. 3525-30.
- 86. Longstaff C., Thelwell C., Williams S.C., Silva M.M., Szabo L., Kolev K., *The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: kinetic and microscopic studies.* Blood, 2011. 117(2): p. 661-8.
- 87. de Munk G.A., Caspers M.P., Chang G.T., Pouwels P.H., Enger-Valk B.E., Verheijen J.H., *Binding of tissue-type plasminogen activator to lysine, lysine analogues, and fibrin fragments.* Biochemistry, 1989. 28(18): p. 7318-25.
- 88. Weening-Verhoeff E.J., Quax P.H., van Leeuwen R.T., Rehberg E.F., Marotti K.R., Verheijen J.H., *Involvement of aspartic and glutamic residues in kringle-2 of tissue-type plasminogen activator in lysine binding, fibrin binding and stimulation of activity as revealed by chemical modification and oligonucleotide-directed mutagenesis.* Protein Eng, 1990. 4(2): p. 191-8.
- 89. Verstraete M., Bounameaux H., de Cock F., Van de Werf F., Collen D., *Pharmacokinetics and systemic fibrinogenolytic effects of recombinant human tissuetype plasminogen activator (rt-PA) in humans.* J Pharmacol Exp Ther, 1985. 235(2): p. 506-12.
- 90. Hotchkiss A., Refino C.J., Leonard C.K., O'Connor J.V., Crowley C., McCabe J., Tate K., Nakamura G., Powers D., Levinson A., et al., *The influence of carbohydrate structure on the clearance of recombinant tissue-type plasminogen activator*. Thromb Haemost, 1988. 60(2): p. 255-61.
- 91. Browne M.J., Carey J.E., Chapman C.G., Tyrrell A.W., Entwisle C., Lawrence G.M., Reavy B., Dodd I., Esmail A., Robinson J.H., *A tissue-type plasminogen activator mutant with prolonged clearance in vivo. Effect of removal of the growth factor domain.* J Biol Chem, 1988. 263(4): p. 1599-602.
- 92. Ahern T.J., Morris G.E., Barone K.M., Horgan P.G., Timony G.A., Angus L.B., Henson K.S., Stoudemire J.B., Langer-Safer P.R., Larsen G.R., *Site-directed mutagenesis in human tissue-plasminogen activator. Distinguishing sites in the aminoterminal region required for full fibrinolytic activity and rapid clearance from the circulation.* J Biol Chem, 1990. 265(10): p. 5540-5.
- 93. Lijnen H.R. and Collen D., *Strategies for the improvement of thrombolytic agents*. Thromb Haemost, 1991. 66(1): p. 88-110.
- 94. Kuiper J., Van't Hof A., Otter M., Biessen E.A., Rijken D.C., van Berkel T.J., *Interaction of mutants of tissue-type plasminogen activator with liver cells: effect of domain deletions.* Biochem J, 1996. 313 (Pt 3): p. 775-80.
- 95. Weitz J.I., *Limited fibrin specificity of tissue-type plasminogen activator and its potential link to bleeding.* J Vasc Interv Radiol, 1995. 6(6 Pt 2 Suppl): p. 19S-23S.

- 96. Martin U., von Mollendorff E., Akpan W., Kientsch-Engel R., Kaufmann B., Neugebauer G., *Pharmacokinetic and hemostatic properties of the recombinant plasminogen activator bm 06.022 in healthy volunteers*. Thromb Haemost, 1991. 66(5): p. 569-74.
- 97. Martin U., von Mollendorff E., Akpan W., Kientsch-Engel R., Kaufmann B., Neugebauer G., *Dose-ranging study of the novel recombinant plasminogen activator BM 06.022 in healthy volunteers.* Clin Pharmacol Ther, 1991. 50(4): p. 429-36.
- 98. Smalling R.W., Bode C., Kalbfleisch J., Sen S., Limbourg P., Forycki F., Habib G., Feldman R., Hohnloser S., Seals A., *More rapid, complete, and stable coronary thrombolysis with bolus administration of reteplase compared with alteplase infusion in acute myocardial infarction. RAPID Investigators.* Circulation, 1995. 91(11): p. 2725-32.
- 99. Bode C., Smalling R.W., Berg G., Burnett C., Lorch G., Kalbfleisch J.M., Chernoff R., Christie L.G., Feldman R.L., Seals A.A., Weaver W.D., *Randomized comparison of* coronary thrombolysis achieved with double-bolus reteplase (recombinant plasminogen activator) and front-loaded, accelerated alteplase (recombinant tissue plasminogen activator) in patients with acute myocardial infarction. The RAPID II Investigators. Circulation, 1996. 94(5): p. 891-8.
- 100. Keyt B.A., Paoni N.F., Refino C.J., Berleau L., Nguyen H., Chow A., Lai J., Pena L., Pater C., Ogez J., et al., *A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(9): p. 3670-4.
- Cannon C.P., McCabe C.H., Gibson C.M., Ghali M., Sequeira R.F., McKendall G.R., Breed J., Modi N.B., Fox N.L., Tracy R.P., Love T.W., Braunwald E., *TNK-tissue* plasminogen activator in acute myocardial infarction. Results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10A dose-ranging trial. Circulation, 1997. 95(2): p. 351-6.
- 102. Avorn J., Knight E., Ganz D.A., Schneeweiss S., *Therapeutic delay and reduced functional status six months after thrombolysis for acute myocardial infarction*. Am J Cardiol, 2004. 94(4): p. 415-20.
- 103. Wallentin L., Goldstein P., Armstrong P.W., Granger C.B., Adgey A.A., Arntz H.R., Bogaerts K., Danays T., Lindahl B., Makijarvi M., Verheugt F., Van de Werf F., Efficacy and safety of tenecteplase in combination with the low-molecular-weight heparin enoxaparin or unfractionated heparin in the prehospital setting: the Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic Regimen (ASSENT)-3 PLUS randomized trial in acute myocardial infarction. Circulation, 2003. 108(2): p. 135-42.
- 104. Shivaprasad H.V., Rajaiah R., Frey B.M., Frey F.J., Vishwanath B.S., '*Pergularain e I'--a plant cysteine protease with thrombin-like activity from Pergularia extensa latex.* Thromb Res, 2010. 125(3): p. e100-5.
- 105. Ramos M.V., Araujo E.S., Juca T.L., Monteiro-Moreira A.C., Vasconcelos I.M., Moreira R.A., Viana C.A., Beltramini L.M., Pereira D.A., Moreno F.B., *New insights*

into the complex mixture of latex cysteine peptidases in Calotropis procera. Int J Biol Macromol, 2013. 58: p. 211-9.

- 106. Singh K.A., Nayak M.K., Jagannadham M.V., Dash D., *Thrombolytic along with antiplatelet activity of crinumin, a protein constituent of Crinum asiaticum.* Blood Cells Mol Dis, 2011. 47(2): p. 129-32.
- 107. Choi J.H., Kim D.W., Park S.E., Choi B.S., Sapkota K., Kim S., Kim S.J., Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant Aster yomena (Kitam.) Honda with anticoagulant activity: purification and partial characterization. J Biosci Bioeng, 2014. 118(4): p. 372-7.
- 108. Kim D.W., Choi J.H., Park S.E., Kim S., Sapkota K., Kim S.J., *Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from Petasites japonicus*. Int J Biol Macromol, 2015. 72: p. 1159-67.
- 109. Chung D.M., Choi N.S., Chun H.K., Maeng P.J., Park S.B., Kim S.H., A new fibrinolytic enzyme (55 kDa) from Allium tuberosum: purification, characterization, and comparison. J Med Food, 2010. 13(6): p. 1532-6.
- 110. Choi H.S. and Sa Y.S., *Fibrinolytic and antithrombotic protease from Spirodela polyrhiza*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. 65(4): p. 781-6.
- 111. Siigur J., Samel M., Tonismagi K., Subbi J., Siigur E., Tu A.T., *Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from Vipera lebetina snake venom.* Thromb Res, 1998. 90(1): p. 39-49.
- 112. Guan A.L., Retzios A.D., Henderson G.N., Markland F.S., Jr., *Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake (Agkistrodon contortrix contortrix)*. Arch Biochem Biophys, 1991. 289(2): p. 197-207.
- 113. Novokhatny V., *Structure and activity of plasmin and other direct thrombolytic agents*. Thromb Res, 2008. 122 Suppl 3: p. S3-8.
- 114. Swenson S. and Markland F.S., Jr., *Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes*. Toxicon, 2005. 45(8): p. 1021-39.
- 115. Tjandrawinata R.R., Trisina J., Rahayu P., Prasetya L.A., Hanafiah A., Rachmawati H., Bioactive protein fraction DLBS1033 containing lumbrokinase isolated from Lumbricus rubellus: ex vivo, in vivo, and pharmaceutic studies. Drug Des Devel Ther, 2014. 8: p. 1585-93.
- 116. Hahn B.S., Cho S.Y., Ahn M.Y., Kim Y.S., *Purification and characterization of a plasmin-like protease from Tenodera sinensis (Chinese mantis)*. Insect Biochem Mol Biol, 2001. 31(6-7): p. 573-81.
- Wu B., Wu L., Chen D., Yang Z., Luo M., Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from Fusarium sp. CPCC 480097. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009. 36(3): p. 451-9.

- 118. Pais E., Alexy T., Holsworth R.E., Jr., Meiselman H.J., *Effects of nattokinase, a pro-fibrinolytic enzyme, on red blood cell aggregation and whole blood viscosity.* Clin Hemorheol Microcirc, 2006. 35(1-2): p. 139-42.
- 119. Dabbagh F., Negahdaripour M., Berenjian A., Behfar A., Mohammadi F., Zamani M., Irajie C., Ghasemi Y., *Nattokinase: production and application*. Appl Microbiol Biotechnol, 2014. 98(22): p. 9199-206.
- 120. Balaraman K. and Prabakaran G., *Production & purification of a fibrinolytic enzyme (thrombinase) from Bacillus sphaericus.* Indian J Med Res, 2007. 126(5): p. 459-64.
- 121. Peng Y., Yang X., Zhang Y., *Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo.* Appl Microbiol Biotechnol, 2005. 69(2): p. 126-32.
- 122. Sapan C.V., Lundblad R.L., Price N.C., *Colorimetric protein assay techniques*. Biotechnol Appl Biochem, 1999. 29 (Pt 2): p. 99-108.
- 123. Wiechelman K.J., Braun R.D., Fitzpatrick J.D., *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation*. Anal Biochem, 1988. 175(1): p. 231-7.
- 124. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. 150(1): p. 76-85.
- 125. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
- 126. Jones L.J., Upson R.H., Haugland R.P., Panchuk-Voloshina N., Zhou M., Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement. Anal Biochem, 1997. 251(2): p. 144-52.
- 127. Rosén S., *Chromogenic methods in coagulation diagnostics*. Hämostaseologie, 2005. 25(3): p. 259-266.
- 128. Witt I., *Test systems with synthetic peptide substrates in haemostaseology*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1991. 29(6): p. 355-74.
- 129. Kato H., Adachi N., Ohno Y., Iwanaga S., Takada K., Sakakibara S., *New fluorogenic peptide substrates for plasmin.* J Biochem, 1980. 88(1): p. 183-90.
- 130. Longstaff C. and Whitton C.M., *A proposed reference method for plasminogen activators that enables calculation of enzyme activities in SI units.* J Thromb Haemost, 2004. 2(8): p. 1416-21.
- 131. Shivaprasad H.V., Riyaz M., Venkatesh Kumar R., Dharmappa K.K., Tarannum S., Siddesha J.M., Rajesh R., Vishwanath B.S., *Cysteine proteases from the Asclepiadaceae plants latex exhibited thrombin and plasmin like activities.* J Thromb Thrombolysis, 2009. 28(3): p. 304-8.

- 132. Bindhu O.S. and Singh M.K., *Hemostatic, milk clotting and blood stain removal potential of cysteine proteases from Calotropis gigantea (L.) R. Br. Latex.* Pharmacogn Mag, 2014. 10(Suppl 2): p. S350-6.
- 133. Ramos M.V., Viana C.A., Silva A.F., Freitas C.D., Figueiredo I.S., Oliveira R.S., Alencar N.M., Lima-Filho J.V., Kumar V.L., *Proteins derived from latex of C. procera maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2012. 385(5): p. 455-63.
- Richter G., Schwarz H.P., Dorner F., Turecek P.L., Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from Ficus carica. Br J Haematol, 2002. 119(4): p. 1042-51.
- 135. de Menezes Y.A., Felix-Silva J., da Silva-Junior A.A., Rebecchi I.M., de Oliveira A.S., Uchoa A.F., Fernandes-Pedrosa Mde F., *Protein-rich fraction of Cnidoscolus urens* (L.) Arthur leaves: enzymatic characterization and procoagulant and fibrinogenolytic activities. Molecules, 2014. 19(3): p. 3552-69.
- 136. Astrup T. and Müllertz S., *The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity*. Arch Biochem Biophys, 1952. 40(2): p. 346-51.
- 137. Viana C.A., Oliveira J.S., Freitas C.D., Alencar N.M., Carvalho C.P., Nishi B.C., Ramos M.V., *Thrombin and plasmin-like activities in the latices of Cryptostegia grandiflora and Plumeria rubra*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2013. 24(4): p. 386-92.
- 138. Löffler G., Petrides P.E., Heinrich P.C., *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 8. 2007: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- 139. Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
- 140. Bio-Rad L.S.G., *Ready Gel System RESOURCE GUIDE*. BULLETIN 2144 US/EG REV A, 96-0474 1297.
- 141. Ouyang C. and Teng C.M., *Fibrinogenolytic enzymes of Trimeresurus mucrosquamatus venom*. Biochim Biophys Acta, 1976. 420(2): p. 298-308.
- 142. Wilkesman J. and Kurz L., *Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents*. Recent Pat Biotechnol, 2009. 3(3): p. 175-84.
- 143. Kim S.H., Choi N.S., Lee W.Y., *Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels.* Anal Biochem, 1998. 263(1): p. 115-6.
- 144. Zehr B.D., Savin T.J., Hall R.E., *A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels.* Anal Biochem, 1989. 182(1): p. 157-9.
- 145. Switzer Iii R.C., Merril C.R., Shifrin S., *A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels*. Anal Biochem, 1979. 98(1): p. 231-237.

- 146. Merril C.R., Goldman D., Van Keuren M.L., Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. ELECTROPHORESIS, 1982. 3(1): p. 17-23.
- 147. Merril C.R., Goldman D., Sedman S.A., Ebert M.H., Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science, 1981. 211(4489): p. 1437-8.
- 148. Lottspeich F. and Engels J., *Bioanalytik.* 2. Auflage, 2006: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- 149. Rehm H., *Der Experimentator, Proteinbiochemie/Proteomics.* 4. Auflage, 2002: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- 150. Domsalla A., Untersuchungen von pflanzlichen Latices hinsichtlich ihrer Proteaseaktivität und deren Einfluss auf die Interleukin-6 Sekretion monozytischer Zellen. FU Berlin, 2012. FUDISS_thesis_000000037368.
- 151. Domsalla A., Gorick C., Melzig M.F., *Proteolytic activity in latex of the genus Euphorbia--a chemotaxonomic marker?* Pharmazie, 2010. 65(3): p. 227-30.
- 152. Jaffé W.G., *Hurain, a new plant protease from Hura crepitans.* Journal of Biological Chemistry, 1943. 149: p. 1-7.
- 153. ChiÑAs F.A.I. and Canales A.L.-M., *Proteolytic Enzymes from Cnidoscolus chayamansa* "*Chaya*". Journal of Food Science, 1986. 51(1): p. 243-244.
- 154. Chary M. and Reddy S., *Protease activity of some latex bearing plants*. NATIONAL ACADEMY SCIENCE LETTERS-INDIA, 1983. 6(6): p. 183-184.
- 155. Nath L. and Dutta S., *Extraction and study of certain physico-chemical properties of a new proteolytic enzyme from the latex of jatropha curcas linn*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 1988. 50(2): p. 125-127.
- 156. Siritapetawee J. and Thammasirirak S., *Purification and characterization of a heteromultimeric glycoprotein from Artocarpus heterophyllus latex with an inhibitory effect on human blood coagulation.* Acta Biochim Pol, 2011. 58(4): p. 521-8.
- 157. Kim J.S., Kim Y.O., Ryu H.J., Kwak Y.S., Lee J.Y., Kang H., *Isolation of stress*related genes of rubber particles and latex in fig tree (Ficus carica) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. Plant Cell Physiol, 2003. 44(4): p. 412-4.
- 158. Broekaert I., Lee H.I., Kush A., Chua N.H., Raikhel N., *Wound-induced accumulation* of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (Hevea brasiliensis). Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(19): p. 7633-7.
- 159. Kubasch M., Biochemische Untersuchungen von Latices aus Euphorbiaceen hinsichtlich proteolytischer Aktivität und der Umsetzung eines Plasmin-spezifischen Substrates. Diplomarbeit Greifswald/Berlin 2013.

- 160. Badgujar S.B. and Mahajan R.T., *Identification and characterization of Euphorbia nivulia latex proteins*. Int J Biol Macromol, 2014. 64: p. 193-201.
- 161. Simoes I. and Faro C., *Structure and function of plant aspartic proteinases*. Eur J Biochem, 2004. 271(11): p. 2067-75.
- 162. Devaraj K.B., Gowda L.R., Prakash V., An unusual thermostable aspartic protease from the latex of Ficus racemosa (L.). Phytochemistry, 2008. 69(3): p. 647-55.
- 163. Rajesh R., Raghavendra Gowda C.D., Nataraju A., Dhananjaya B.L., Kemparaju K., Vishwanath B.S., *Procoagulant activity of Calotropis gigantea latex associated with fibrin(ogen)olytic activity*. Toxicon, 2005. 46(1): p. 84-92.
- 164. Rajesh R., Shivaprasad H.V., Gowda C.D., Nataraju A., Dhananjaya B.L., Vishwanath B.S., *Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: a special emphasis on clot inducing and dissolving properties.* Planta Med, 2007. 73(10): p. 1061-7.
- 165. Shivaprasad H.V., Rajesh R., Nanda B.L., Dharmappa K.K., Vishwanath B.S., *Thrombin like activity of Asclepias curassavica L. latex: action of cysteine proteases.* J Ethnopharmacol, 2009. 123(1): p. 106-9.
- 166. Meh D.A., Siebenlist K.R., Mosesson M.W., *Identification and characterization of the thrombin binding sites on fibrin.* J Biol Chem, 1996. 271(38): p. 23121-5.
- 167. Lowe G.D., Rumley A., Mackie I.J., *Plasma fibrinogen*. Ann Clin Biochem, 2004. 41(Pt 6): p. 430-40.
- 168. Singh M.K., Usha R., Hithayshree K.R., Bindhu O.S., *Hemostatic potential of latex proteases from Tabernaemontana divaricata (L.) R. Br. ex. Roem. and Schult. and Artocarpus altilis (Parkinson ex. F.A. Zorn) Forsberg.* J Thromb Thrombolysis, 2015. 39(1): p. 43-9.
- 169. Bilheiro R.P., Braga A.D., Filho M.L., Carvalho-Tavares J., Agero U., Carvalho M., Sanchez E.F., Salas C.E., Lopes M.T., *The thrombolytic action of a proteolytic fraction* (*P1G10*) from Carica candamarcensis. Thromb Res, 2013. 131(4): p. e175-82.
- 170. Chen H., Mo W., Su H., Zhang Y., Song H., *Characterization of a novel bifunctional mutant of staphylokinase with platelet-targeted thrombolysis and antiplatelet aggregation activities.* BMC Mol Biol, 2007. 8: p. 88.
- 171. Laurens N., Koolwijk P., de Maat M.P., *Fibrin structure and wound healing*. J Thromb Haemost, 2006. 4(5): p. 932-9.
- 172. Li W.Y., Chong S.S., Huang E.Y., Tuan T.L., *Plasminogen activator/plasmin system: a major player in wound healing?* Wound Repair Regen, 2003. 11(4): p. 239-47.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Fibrinbildung und Fibrinolyse (stark vereinfachte schemachtische Darstellung)
Abb. 2: Fibrin(ogen)olyse durch Plasmin 10
Abb. 3: Humane und tierische Plasminogen-Aktivatoren mit ihren funktionellen Domänen und Mutationen
Abb. 4: Anritzen einer Pflanze zur Gewinnung von Latex
Abb. 5: Schematische Darstellung der Aktivitätsmessung von Milchsaft mit einem spezifischen Peptidsubstrat
Abb. 6: Schematische Darstellung des In-Gel Verdaus
Abb. 7: Bilder der 12 für weitere Untersuchungen ausgewählten Arten
Abb. 8: SDS-PAGE der durch das Screening für weitere Untersuchungen ausgewählten Latices
Abb. 9: Proteingehalt und proteolytische Aktivität nach Ionenaustausch-Chromatographie des LatexF von <i>Euphorbia mauritanica</i> L
Abb. 10: SDS-PAGE bestimmter Fraktionen nach Auftrennung des LatexF durch Ionenaustausch-Chromatographie
Abb. 11: Größenausschluss-Chromatographie zur Isolation von Mauritanicain
Abb. 12: SDS-PAGE zur Molekülmassenbestimmung von Mauritanicain
Abb. 13: Massenspektrum (MALDI-TOF) von Mauritanicain
Abb. 14: SDS-PAGE und Massenspektren nach In-Gel Verdau zur Reinheitsprüfung 64
Abb. 15: Vergleich der Massenspektren des In-Gel Verdaus der drei intensivsten Banden der SDS-PAGE von Mauritanicain
Abb. 16: Reinheitsprüfung von Mauritanicain durch Elektrophorese

Abb. 17: In-Gel Verdau von β -Lactoglobulin durch Mauritanicain in verschiedenen
Zeiträumen (L, A, K)
Abb. 18: In-Gel Verdau von β-Lactoglobulin in verschiedenen Zeiträumen (div. Aminosäuren)
Abb. 19: Temperaturabhängigkeit von Mauritanicain gegenüber BODIPY-FL Casein
Abb. 20: pH-Abhängigkeit von Mauritanicain gegenüber BODIPY-FL Casein bei 37 °C 73
Abb. 21: Isoelektrische Fokussierung von Mauritanicain und Standardproteinen
Abb. 22: Restaktivität von Mauritanicain nach Inkubation mit Inhibitoren
Abb. 23: Vergleich des Einflusses von Mauritanicain und Thrombin auf Fibrinogen (5 mg/mL)
Abb. 24: Einfluss von Mauritanicain auf Citratplasma78
Abb. 25: Einfluss von Mauritanicain (80 µg/mL) auf die Thrombin-induzierte Gerinnung nach Vorabinkubation mit unterschiedlichen Fibrinogen Konzentrationen
Abb. 26: Vorinkubation von Fibrinogen 2,5 mg/mL mit verschiedenen Konzentrationen von Mauritanicain und anschließender Thrombin Zugabe
Abb. 27: Direkte Inkubation von Fibrinogen 2,5 mg/mL mit Thrombin und verschiedenen Konzentrationen von Mauritanicain
Abb. 28: Vorinkubation von Plasma mit verschiedenen Konzentrationen von Mauritanicain und anschließender Ca ²⁺ Zugabe
Abb. 29: Direkte Inkubation von Plasma mit Ca ²⁺ und verschiedenen Konzentrationen von Mauritanicain
Abb. 30: Direkte Inkubation von Mauritanicain (80 μg/mL) mit Plasma (1:1 Verdünnung) und Calciumchlorid (25 mM)
Abb. 31: Vorinkubation von Fibrinogen mit verschiedenen Latices und anschließender Thrombin Zugabe

Abb. 32: Direkte Inkubation von Fibrinogen mit Thrombin und verschiedenen Latices 92
Abb. 33: Vorinkubation von Plasma mit verschiedenen Latices und anschließender Ca ²⁺ Zugabe
Abb. 34: Direkte Inkubation von Plasma mit Calciumchlorid und verschiedenen Latices 94
Abb. 35: Fibrinogen-Agarose Gel mit Mauritanicain
Abb. 36: Fibrinogen-Agarose Gel mit verschiedenen Latices
Abb. 37: Fibrin-Agarose Gel mit Mauritanicain
Abb. 38: Fibrin-Agarose Gel mit verschiedenen Latices
Abb. 39: Fibrinogen Zymogramm der verschieden Latices
Abb. 40: Fibrinogen-Zymogramm mit Mauritanicain und Plasmin 106
Abb. 41: Fibrinogen-Ketten-Abbau durch verschiedene Latices
Abb. 42: Fibrinogen-Ketten-Abbau durch Mauritanicain in verschiedenen Konzentrationen
Abb. 43: Fibrinogen-Ketten-Abbau durch Mauritanicain nach verschiedenen Zeitintervallen
Abb. 44: Massenspektrum der Bruchstücke des In-Gel Verdaus von Fibrinogen Aα durch Thrombin
Abb. 45: Massenspektren der Bruchstücke des In-Gel Verdaus von Fibrinogen Aα durch Plasmin und Mauritanicain
Abb. 46: Vergleich des theoretischen Verdaus mit den Bruchstücken nach In-Gel Verdau von Fibrinogen Aα durch Plasmin und Mauritanicain
Abb. 47: Massenspektren der Bruchstücke des In-Gel Verdaus von Fibrinogen Bβ durch Plasmin und Mauritanicain

Abb. 48: Vergleich des theoretischen Verdaus mit den Bruchstücken nach In-Gel Verdau von
Fibrinogen Bβ durch Plasmin und Mauritanicain
Abb. 49: Massenspektren der Bruchstücke des In-Gel Verdaus von Fibrinogen γ durch
Plasmin und Mauritanicain
Abb. 50: Vergleich des theoretischen Verdaus mit den Bruchstücken nach In-Gel Verdau von
Fibrinogen γ durch Plasmin und Mauritanicain
Abb. 51: Prozentuale Zunahme der proteolytischen Aktivität der Latices gegenüber Boc-Val-
Leu-Lys-AMC in Anwesenheit von Plasminogen
Abb. 52: Einfluss auf Plasma-Gerinnsel durch Mauritanicain und verschiedene Latices 122

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Charakterisierte Proteasen in der Familie Euphorbiaceae
Tab. 2: Zusammensetzung Fibrinogens nach Swiss-Prot (http://www.uniprot.org/; letzterAufruf: 04/2015)
Tab. 3: Einteilung der Plasminogen-Aktivatoren 11
Tab. 4: Zusammensetzung eines Gels (1 mm) f ür die SDS-PAGE
Tab. 5: Proteinstandard f ür die SDS-PAGE (Zusammensetzung kann je nach Charge variieren)
Tab. 6: Zusammensetzung des Standards zur Isoelektrischen Fokussierung
Tab. 7: Zusammensetzung eines Gels (1 mm) f ür die Zymographie
Tab. 8: Standard A für die MALDI-TOF-MS
Tab. 9: Zusammensetzung der Lösungen für den In-Gel Verdau
Tab. 10: Standard B für die MALDI-TOF-MS (In-Gel Verdau (Bruker Peptide Calibration Standard II)) 42
Tab. 11: Pufferkonzentrationen f ür die Ionenaustausch-Chromatographie
Tab. 12: Inhibitoren zur Bestimmung der Protease-Klasse
Tab. 13: Puffersysteme f Ger pH Abh 46
Tab. 14: Allgemeine proteolytische Aktivität gegenüber BODIPY-FL-Casein
Tab. 15: Ergebnisse des Screenings auf proteolytische Aktivität gegenüber dem Plasmin-spezifischen Substrat Boc-Val-Leu-Lys-AMC
Tab. 16: Übersicht über die 12 für weitere Untersuchungen ausgewählten Arten
Tab. 17: In-Gel Verdau von β-Lactoglobulin (L, A, K) durch Mauritanicain

Tab. 18:	In-Gel	Verdau	von	β-Lactoglobulin	durch	Mauritanicain	in	verschiedenen
Zeiträume	en (L, A,	K)	•••••				•••••	69
Tab. 19: I	n-Gel Ve	erdau vor	nβ-Lac	ctoglobulin in ver	schieder	nen Zeiträumen	(div.	Aminosäuren) 69
Tab. 20: S	Substrats	pezifität 1	nach Ir	n-Gel Verdau von	Fibrino	gen durch Mauri	itanic	ain 120
Tab. 21: Z	Zusamm	enfassung	g der I	Ergebnisse des E	influsses	s der Latices au	ıf Fib	orin(ogen) und
Plasma			•••••		•••••			

Publikationsverzeichnis

Artikel in Fachzeitschriften

Flemmig M, Melzig MF - Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis, Journal of Pharmacy and Pharmacology, Volume 64, Issue 8, pages 1025–1039, August 2012

Poster

Flemmig M, Melzig MF - Research of plant latices of the genus *Euphorbia* in terms of fibrinolytic activity - Joint Meeting of the Austrian and German Pharmaceutical Societies. Innsbruck, Österreich, 20. - 23. September 2011

Flemmig M, Domsalla A, Rawel H, Melzig MF - Mauritanicain - A new serine protease from the latex of *Euphorbia mauritanica* L. - ICNPR - International Congress on Natural Products Research. New York City, USA, 28. Juli - 01. August 2012

Flemmig M, Melzig MF - Plant latex proteases with potential influence on blood coagulation and fibrinolysis - 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Münster, 01. - 04. September 2013

Flemmig M, Kubasch M, Melzig MF - Detecting of fibrino(geno)lytic activity of plant latex proteases by a specific fluorogenic substrate and fibrin(ogen)-zymography - 62nd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Guimarães, Portugal, 31. August - 04. September 2014

<u>Vorträge</u>

Investigation of proteases in plant latices - 6st Dahlem Centre of Plant Sciences (DCPS) ,OpenHouse' day - Institut für Pharmazie, 29. Januar 2014

Aktuelle Forschung in der Pharmazeutischen Biologie: Forschung an Milchsäften aus den Euphorbiaceen - Winterseminare Botanischer Garten Berlin, 05. März 2014

Research about latices from Euphorbiaceae / Fibrinolytic enzymes in plant latices -1st Minisymposium "New developments in Pharmacognosy - Berlin and Warsaw" - Institut für Pharmazie 07. März 2015

Danksagung

Der erste Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias F. Melzig, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit anzufertigen und mir stets bei der Planung und Durchführung von Versuchen sein vollstes Vertrauen geschenkt hat. Seine ständige Ansprechbarkeit ist keine Selbstverständlichkeit. Besonders möchte ich mich auch für die Ermöglichung des Besuchs zahlreicher internationaler Kongresse bedanken. Nie vergessen werde ich die Tagung in New York City. Vermissen werde ich auch die zahlreichen Gespräche abseits der Doktorarbeit.

Bei Prof. apl. Dr. Harshadrai Rawel möchte ich mich nicht nur für die Möglichkeit bedanken, dass ich die MALDI-TOF-MS Versuche bei ihm an der Universität Potsdam durchführen konnte, sondern auch für die Hilfe bei der Durchführung und diversen Fragestellungen.

Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe danke ich für viele schöne Stunden im und außerhalb des Labors. Ein besonderer Dank für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft gilt Stefan Böttger, Tina Buchholz und Stefanie Quosdorf. Michael Kubasch, den ich während seiner Diplomarbeit betreuen durfte, danke ich für die Datengenerierung beim Pflanzen-Screening.

Eine Universität ist neben der Forschung vor allem der Lehre verpflichtet. Die Durchführung der Lehrtätigkeit in der Arzneimittelanalytik lag mir stets besonders am Herzen. Ich danke Dr. Barbara Grimm für die mir gegebene Freiheit bei der Lehre und ihr immer offenes Ohr, sowie den Kollegen Aurica, Franziska und Robert für viele schöne gemeinsame Stunden bei der Betreuung der Studenten.

Der Familie Dr. Grauert und dem gesamten Team ihrer drei Kreuzberger Apotheken, insbesondere Ulrike Franck, danke ich für die sehr schöne Zeit und die flexible Arbeitszeitgestaltung neben meiner Haupttätigkeit in der Forschung.

Ich danke allen meinen Freunden, vor allem aber Sophie und Pati. Einen großen Teil meiner Freizeit die letzten Jahre mit ihnen zu verbringen, war wunderbar.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern möchte ich ganz herzlich für ihr Vertrauen, ihr Verständnis und ihren liebevollen Rückhalt bei allen Entscheidungen auf meinem bisherigen Lebensweg danken.

Der letzte und wichtigste Dank gilt meiner Verlobten Nicole. Ohne sie wäre nichts möglich gewesen! Zeit mit ihr und unserem Sohn Johannes zu verbringen, ist für mich das schönste Glück auf Erden! Danke!!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version

aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der

angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 12.05.2015

Martin Flemmig