

**Charakterisierung der Aktivität von Proteasen aus dem
Maden-Exkretions-Produkt von *Lucilia sericata* in der
humanen Blutgerinnung als Teilprozess der Wundheilung**



DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fachbereiche
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

M. Sc. Mareike Kahl

aus Geseke

Gießen, im Juni 2014

1. Gutachter:

Professor Dr. Thomas Wilke

Spezielle Zoologie und Biodiversitätsforschung
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter:

Professor Dr. Klaus T. Preissner

Institut für Biochemie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Disputation: 21.07.2014

*Leicht ist das Leben für keinen von uns. Doch was nützt das,
man muß Ausdauer haben und vor allem Zutrauen zu sich selbst.
Man muß daran glauben, für eine bestimmte Sache begabt zu sein,
und diese Sache muß man erreichen, koste es, was es wolle.*

Marie Curie (1867-1934)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	IV
ZUSAMMENFASSUNG.....	1
SUMMARY.....	3
1 EINLEITUNG.....	5
1.1 Rationale	5
1.2 Humane Wundheilung.....	5
1.2.1 Hämostase und Inflammation.....	6
1.2.2 Proliferative Phase.....	8
1.2.3 Phase des Gewebeumbaus	8
1.2.4 Störungen der Wundheilung.....	8
1.3 Madentherapie.....	11
1.3.1 Historisches.....	11
1.3.2 Madentherapie heute	12
1.3.3 Die Goldfliege <i>Lucilia sericata</i>	14
1.3.3.1 Lebenszyklus	15
1.3.3.2 Ernährung und Verdauung.....	15
1.3.3.3 Immunsystem.....	16
1.3.4 Wundheilungsfördernde Mechanismen	17
1.3.4.1 Débridement.....	17
1.3.4.2 Antimikrobielle Effekte.....	19
1.3.4.3 Stimulation der Wundheilung.....	21
1.4 Das Hämostasesystem	24
1.4.1 Serinproteasen	24
1.4.2 Thrombozytäre Blutstillung (Primäre Hämostase)	26
1.4.3 Plasmatische Blutstillung (Sekundäre Hämostase)	26
1.4.4 Die Kontaktphasen-Aktivierung.....	29
1.4.5 Fibrinolyse.....	32
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	35
3 MATERIAL UND METHODEN	37
3.1 Proteinbiochemische Methoden.....	37
3.1.1 Proteinbestimmung.....	37

3.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
3.1.3	Färbungen der Proteine im Polyacrylamid-Gel.....	38
3.1.4	Western Blot Analyse	39
3.1.5	Gewinnung des Maden-Exkretions-Produktes von <i>Lucilia sericata</i>	40
3.1.6	Ultrafiltration	40
3.1.7	Ionenaustausch-Chromatographie.....	41
3.1.8	Massenspektrometrie und Datenbankrecherchen	42
3.1.9	Renaturierung und Aktivierung rekombinanter Proteine	43
3.2	Bestimmung der Gerinnungs-Aktivität.....	44
3.2.1	Herstellung von Citratplasma	44
3.2.2	Turbidimetrie.....	44
3.2.3	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit	46
3.2.4	Thromboelastometrie	47
3.2.5	Bestimmung der Serinprotease-Aktivität.....	48
3.2.6	Nachweis aktiver Serinproteasen mit fluoreszenter Sonde.....	48
3.2.7	Analyse der Kallikrein-Aktivität	49
3.2.8	Untersuchung der FXIIa-Aktivität	49
3.2.9	Thrombin-Aktivität.....	49
3.2.10	Plättchenaggregometrie	50
3.2.11	Enzymatische Aktivierung und Inaktivierung gerinnungsrelevanter Proteine	50
3.3	Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität	51
3.3.1	Messung der Plasmin-Aktivität.....	51
3.3.2	Untersuchung fibrinogenolytischer und fibrinolytischer Eigenschaften.....	51
3.4	Zellkulturtechnische Methoden	52
3.4.1	Einführung in die verwendeten Zelltypen	52
3.4.1.1	Murine Fibroblasten (L929).....	52
3.4.1.2	Humane umbilikale venöse Endothelzellen.....	52
3.4.2	Isolierung und Kultivierung primärer Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	52
3.4.3	Erhaltung der Zellkultur.....	53
3.4.4	Kryokonservierung von Zellen	53
3.4.5	Auftauen von Zellen.....	53
3.4.6	Zellzählung	54
3.4.7	Zytotoxizitätstest	54
3.4.8	Viabilitätsbestimmung	55
3.5	Statistische Analyse.....	55

4	ERGEBNISSE	56
4.1	Charakterisierung gerinnungsrelevanter Aktivitäten in MEP	56
4.1.1	Protease-Aktivität von MEP	56
4.1.2	Inhibitorprofil von MEP	57
4.1.2.1	Inhibierung von MEP durch verschiedene SERPINE.....	57
4.1.2.2	Inhibierung von MEP durch das natürliche SERPIN Antithrombin	57
4.1.3	MEP vermittelt prokoagulatorische Aktivität in humanem Plasma und Vollblut	59
4.1.4	Kontaktphasen-Aktivierung durch MEP	61
4.1.4.1	MEP-vermittelte Kallikrein-ähnliche Aktivität	61
4.1.4.2	Proteolytische Aktivierung von Kontaktphasen-Proteinen durch MEP	62
4.1.4.3	Kontaktphasen-Bypassing Aktivität von MEP.	64
4.1.5	Inaktivierung von C1-Esterase-Inhibitor durch MEP	66
4.1.6	Charakterisierung der aktiven Komponenten in MEP	67
4.1.7	Vergleich prokoagulatorischer Aktivitäten von MEP-Präparationen aus proteinfrei und auf Blut-Agar gezüchteten Maden	70
4.1.8	Fibrinolytisches und fibrinogenolytisches Potenzial von MEP.....	72
4.1.8.1	MEP-vermittelte Proteolyse von Plasminogen	72
4.1.8.2	Einfluss von MEP auf die intravasale Fibrinolyse.....	73
4.1.9	Thrombin-ähnliche Aktivität von MEP und sein Einfluss auf die Aktivierung von Thrombozyten	75
4.2	Identifizierung prokoagulatorischer Komponenten in MEP	76
4.2.1	Fraktionierung von MEP mittels Ionenaustausch-Chromatographie	76
4.2.2	Untersuchung der MEP-Fraktionen in gerinnungsrelevanten Tests.....	78
4.2.3	Identifikation aktiver Proteine in MEP.	81
4.3	Einfluss von MEP auf die Viabilität verschiedener Zelltypen	85
4.3.1	Zytotoxizität	85
4.3.2	Einfluss auf die Zellproliferation	85
5	DISKUSSION.....	86
5.1	Interaktionen von MEP mit der humanen Blutgerinnung	86
5.2	Einfluss von MEP auf die Fibrinolyse.....	92
5.3	Einfluss von MEP auf die Zellviabilität	93
5.4	Identifizierung der aktiver Proteasen in MEP	94
5.5	Schlussfolgerung.....	96
	LITERATURVERZEICHNIS.....	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	118
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	122
TABELLENVERZEICHNIS.....	124
A ANHANG: MATERIALIEN	125
A.1 Chemikalien und Reagenzien.....	125
A.2 Geräte und sonstige Materialien	126
A.3 Verwendete Kits.....	128
A.4 Antikörper	128
A.5 Inhibitoren, Enzyme und sonstige Proteine.....	129
A.6 Puffer und Lösungen	129
A.7 Verwendete Färbelösungen und Protokolle	131
B ANHANG: ERGEBNISSE.....	133
B.1 Kationenaustausch-Chromatographie und Aktivitäten der gesammelten MEP-Fraktionen.....	133
B.2 Einfluss von MEP auf die Viabilität verschiedener Zelltypen	134
DANKSAGUNG.....	136
ERKLÄRUNG.....	138

ZUSAMMENFASSUNG

Schon vor Jahrhunderten wurden Fliegenlarven, auch als Maden bezeichnet, als Teil der traditionellen Medizin von verschiedenen Kulturen eingesetzt. Mit vermehrtem Auftreten von Antibiotikaresistenzen und einer gleichzeitigen Zunahme chronischer Wunden wie z.B. solchen assoziiert mit diabetischen oder venösen Ulzera, rückte die Madentherapie in den 1980er Jahren wieder in den Fokus. In umfassende Untersuchungen konnten seit dem drei Hauptmechanismen identifiziert werden, über welche die Maden der Goldfliege *Lucilia sericata* ihre wundheilungsfördernden Eigenschaften vermitteln: (1) Das Wunddébridement, (2) antimikrobielle Wirkungen sowie (3) eine Stimulation des Heilungsprozesses. Der Einfluss von Maden-Exkretions-Produkten (MEP) auf das humane Gerinnungssystem als Teilreaktion der Wundheilung ist bislang weitgehend unerforscht. Die Aufdeckung gerinnungsfördernder Aktivitäten des MEP und eine Identifikation der aktiven Moleküle sowie deren weitere Charakterisierung könnte eine neue Perspektive der modernen biochirurgischen Behandlung chronischer Wunden eröffnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels verschiedener optischer und mechanischer Methoden der Einfluss von MEP auf die Gerinnungszeit in humanem Plasma und Vollblut untersucht. Zur Charakterisierung der in MEP enthaltenen Protease-Aktivitäten wurden zudem unterschiedliche chromogene Substrate, Serinprotease-Inhibitoren und Mangelplasmen eingesetzt. Des Weiteren wurde der MEP-Gesamtextrakt fraktioniert und die generierten Pools auf ihre Protease-Aktivität und ihr prokoagulatorisches Potenzial untersucht mit dem Ziel einer Identifizierung der aktiven Moleküle und der Charakterisierung von deren Einfluss auf die humane Gerinnung.

Diese Arbeit zeigt, dass Serinproteasen im MEP von *Lucilia sericata* eine Kallikrein-*Bypassing*-Aktivität besitzen, so die Kontaktphasen-Proteine hochmolekulares Kininogen (HMWK) und Faktor XII (FXII) spalten, prokoagulatorische Effekte in humanem Plasma und Vollblut vermitteln und zudem die Gerinnungszeit in Mangelplasmen der Kontaktphasen-Proteine wieder herstellen. Die beobachtete Kallikrein-ähnliche Aktivität wurde dabei von Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen vermittelt und in Inhibitor-Studien zudem durch Kontaktphasen-Inhibitoren wie dem C1-Esterase-Inhibitor oder anderen FXIIa-spezifischen Inhibitoren vollständig gehemmt. Weiterhin konnte die Hauptaktivität drei Fraktionen zugeordnet werden. Massenspektrometrische Analysen und anschließende Datenbankabgleiche der in diesen Fraktionen enthaltenen Proteine erlaubten die Identifizierung eines möglicherweise an der Vermittlung der prokoagulatorischen MEP-Aktivität beteiligten Enzyms. Das Protein wurde in *E.coli* kloniert und mittels Dialyse renaturiert bevor Versuche zu seiner Aktivierung mit Trypsin-Agarose folgten. Tatsächlich zeigte das als "Jonah" bezeichnete Protein Serinprotease-Aktivität,

diese war jedoch im Vergleich zum MEP-Gesamtextrakt gering. Aufgrund der ineffektiven Aktivierung des Proteins, konnte bislang im Clot-Lyse-Test kein Einfluss des Proteins auf die Gerinnungszeit von humanem Plasma festgestellt werden.

Neben der Charakterisierung von MEP Kallikrein-ähnlichen Protease-Cocktail mit prokoagulatorischer Aktivität wurde zudem weiterer Forschungsbedarf im Hinblick auf die multifunktionalen Aktivitäten von MEP aufgedeckt. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte spaltet MEP, wie auch Kallikrein, HMWK und eine mögliche Entstehung von Bradykinin und aktiviertem HMWK, sowie die Analyse von dessen Einfluss auf das Wundheilungsgeschehen ist ein interessanter neuer Ansatz in der Untersuchung der Mechanismen der Madentherapie.

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Ergebnisse eine Beeinflussung der Blutgerinnung und tragen so zur Aufklärung der wundheilungsfördernden Wirkungen des MEP bei. Zudem konnte ein maßgeblich an der prokoagulatorischen Aktivität des MEP beteiligtes Enzym identifiziert werden, was einen ersten Schritt zum gezielten Einsatz dieses isolierten Moleküls im Rahmen einer modernen biochirurgischen Anwendung darstellt.

SUMMARY

For centuries maggots have been used for the treatment of wounds by a variety of cultures, as part of their traditional medicine. With increasing appearance of antimicrobial resistance and in association with diabetic ulcers, maggot therapy was revisited in the 1980s. Broad investigations have highlighted three mechanisms by which sterile maggots of the greenbottle fly *Lucilia sericata* improve healing of chronic wounds: (1) The biosurgical debridement, (2) disinfecting properties and (3) the stimulation of the wound healing process. However, the influence of maggot excretion products (MEP) on blood coagulation as part of the wound healing process has not been studied in detail. Thus, uncovering of procoagulant activities in MEP, as well as an identification of the active molecules and further characterization might offer a new perspective in modern biosurgical treatment of chronic wounds.

Therefore, in this work, the impact of MEP on coagulation of human plasma and blood was investigated by several optical and mechanical methods. The activity of contained proteases in MEP was further characterized using different chromogenic substrates, serine protease inhibitors and deficient plasmas. Furthermore total MEP content was fractionated and generated pools were analyzed for protease activity and procoagulant potential with the aim to identify active molecules in MEP and further characterize their impact on blood coagulation.

Here, we demonstrate that specific MEP-derived serine proteases from *Lucilia sericata* induce clotting of human plasma and whole blood, particularly by activating contact phase proteins factor XII and kininogen, providing a strong kallikrein-bypassing activity, both in plasma and isolated systems. In plasmas deficient in contact phase proteins, MEP was able to restore clotting times to normal levels. The observed kallikrein-like activity was mediated by trypsin- and chymotrypsin-like proteases in total MEP and inhibitor-studies indicated that kallikrein-like protease activity was significantly blocked by C1-esterase-inhibitor or other specific factor XIIa inhibitors. Furthermore, three major active fractions of MEP were identified. Mass spectrometry analysis of the proteins contained in these fractions and subsequent data base comparisons led to the identification of a putative candidate for MEP-mediated actions. The protein was recombinantly produced in *E.coli* and refolded by dialysis, before activation experiments were started with trypsin-agarose. Indeed, the Jonah protein exerts serine protease activity, which however was low when compared to total MEP. Due to the ineffective activation of the protein, in the clot-lysis assay no impact of the Jonah protein on the clotting time of human plasma was observed so far. As we showed that MEP, like kallikrein cleaved HMWK, the putative release of bradykinin and the investigation of its impact in wound healing, could offer another direction of research into the mechanisms underlying maggot therapy.

Together, MEP provides a prominent contact phase bypassing activity and thereby strongly induces blood clotting in the context of wound healing. Furthermore, an enzyme significantly involved in the procoagulant activity of MEP was identified, constituting a first step in the targeted modern biosurgical therapy of chronic wounds with isolated molecules from maggots.

1 EINLEITUNG

1.1 Rationale

Die wundheilungsfördernden Eigenschaften von Fliegenmaden sind bereits seit Jahrhunderten bekannt. Bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die Madentherapie zur Behandlung von chronischen Wunden genutzt, geriet dann jedoch durch die Einführung moderner Antibiotika in Vergessenheit¹. Ein Anstieg in der Zahl chronischer Wunden, assoziiert mit venösen oder diabetischen Ulzera und Druckgeschwüren, bei gleichzeitiger Zunahme antibiotikaresistenter Keime in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen weltweit verhalf der Madentherapie zu neuem Interesse^{2,3}. Eine Vielzahl von Berichten beschreibt den positiven Einfluss der Fliegenmaden in der Heilung chronischer Wunden (siehe 1.3.2) und es wurde lange Zeit angenommen, dass die Maden nur nekrotisches Gewebe aus dem Wundareal entfernen, während gesundes Granulationsgewebe unangetastet bleibt^{3,4}.

Heute ist bekannt, dass Maden durch sezernierte Proteasen und andere Enzyme umliegendes Wundgewebe schädigen und zudem durch mechanische Reizung von freiliegenden Nerven Schmerzen verursachen können⁵. Der größte Nachteil der Madentherapie gegenüber konventionellen Behandlungsmethoden ist jedoch die negative Wahrnehmung durch Patienten und Behandelnde⁶. Das bedeutet, eine Weiterentwicklung der Madentherapie zur modernen Biochirurgie, d.h. die Applikation von essentiellen, isolierten Wirkstoffen des Maden-Exkretions-Produktes (MEP), ist ein herausforderndes translationales Konzept für die zukünftige Wundbehandlung. Für eine solche Weiterentwicklung, müssen zunächst aktive Moleküle aus den MEP identifiziert, charakterisiert und synthetisch hergestellt werden, damit sie zur praktischen Wundbehandlung z.B. in ein Hydrogel inkorporiert, eingesetzt werden können⁷. Diesem Ziel haben sich bereits mehrere Arbeitsgruppen weltweit gewidmet, sodass bisher einige antibakterielle Moleküle sowie für das Wunddébridement verantwortliche Enzyme in dem MEP von *Lucilia sericata* identifiziert werden konnten (siehe 1.3.4). Das volle Potenzial an wundheilungsfördernden Komponenten scheint jedoch bislang weder bekannt, noch annähernd ausreichend untersucht zu sein.

1.2 Humane Wundheilung

Die Wundheilung ist ein in verschiedene, sich überlappende Phasen gegliederter Vorgang, der ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren und Zelltypen erfordert⁸. Der Wundheilungsprozess wird in die Phase der Hämostase und Inflammation, die proliferative Phase und zuletzt die Phase des Gewebeumbaus gegliedert (Abbildung 1). Abhängig von dem Stadium des Heilungsvorgangs

werden verschiedene Zelltypen an den Ort des Wundgeschehens rekrutiert. Mit dem Ziel größere Blutverluste zu stoppen, kommt es direkt nach einer Gefäßverletzung zur Vasokonstriktion und Aktivierung der Hämostase. Diese stellt sowohl den initialen Schritt als auch die Grundlage für weitere Vorgänge im Wundheilungsgeschehen dar^{9,10}. Die inflammatorische Phase ist durch den Einstrom von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten gekennzeichnet. Diese bereinigen das Wundareal von Bakterien und nekrotischem Gewebe und locken weitere Zelltypen wie Fibroblasten und Keratinozyten an¹¹. Während der so eingeleiteten proliferativen Phase vermitteln Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten durch Reepithelisierung und Neovaskularisation der entstehenden provisorischen Gewebematrix den Verschluss der Wunde. Die provisorische Matrix wird durch verstärkte Kollageneinlagerungen sowie Umbauprozesse in der letzten Phase des Wundheilungsvorgangs zu Narbengewebe⁹.

1.2.1 Hämostase und Inflammation

Das bei der Gerinnung entstehende Fibringerinnsel zusammen mit assoziierten Thrombozyten, Kollagenfasern, Thrombin und Fibronektin dient als Oberfläche für einwandernde Zellen und zur lokalen Konzentration von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Aggregierte Thrombozyten sezernieren Wachstumsfaktoren wie den transformierenden Wachstumsfaktor (*Transforming growth factor*, TGF), den Blutplättchen-Wachstumsfaktor (*Platelet-derived growth factor*, PDGF), Zytokine wie den Plättchenfaktor 4 (*Platelet factor 4*, PF4), Interleukin (IL) -1 und den Tumornekrosefaktor α (*Tumor necrosis factor- α* , TNF- α) sowie weitere inflammatorische Mediatoren wie Thromboxan A2 (TXA2), Leukotrien B4 (LTB4), den plättchenaktivierenden Faktor (*Platelet activating factor*, PAF) und das chemotaktische Komplementanaphylatoxin C5a. Die beschriebenen Faktoren verstärken die Vasokonstriktion und führen zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten, deren Aktivierung und Aggregation (siehe 1.4.2). Zudem werden durch die genannten Faktoren für die folgenden Wundheilungsphasen wichtige Zelltypen wie Neutrophile, Monozyten und Fibroblasten angelockt^{9,10,12}.

Eine durch Prostaglandine und Leukotriene hervorgerufene Vasodilatation der Blutgefäße erleichtert die Infiltration von Neutrophilen und Monozyten an den Ort des Wundgeschehens⁹. Dort angelangte Neutrophile phagozytieren infiltrierte Bakterien sowie zelluläre Rückstände oder verdauen diese durch die Sekretion von Serinproteasen (z.B. Elastase) und Matrix-Metalloproteasen (MMPs)^{9,13,14}. Erhöhte Spiegel an IL-1 und TNF- α führen zudem zur Aktivierung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) auf Makrophagen. Die hierdurch gebildeten Mengen an reaktiven Sauerstoffradikalen (*Reactive oxygen species*, ROS) töten Wundbakterien wie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)⁹. Ein wesentlicher Bestandteil der antimikrobiellen Wirkung neutrophiler Granulozyten ist zudem die Bildung neutrophiler

extrazellulärer Netze (*Neutrophil extracellular traps*, NETs). Hierbei werden sowohl das gesamte Chromatin als auch granuläre Proteine von aktivierten Neutrophilen ausgeworfen und bilden ein faseriges Netzwerk, das Pathogene abfängt und abtötet^{15,16}. In das Gewebe eingewanderte Monozyten differenzieren zu Makrophagen und unterstützen die Neutrophilen bei der Beseitigung von Mikroorganismen. Von Neutrophilen und Makrophagen sezernierte und gebundene Proteasen wie die Kollagenasen MMP-8 und MMP-9 sowie der Urokinase-Typ Plasmin Aktivator (*Urokinase-type plasminogen activator*, u-PA) vermitteln ein Débridement der Wunde. Die Bedeutung von u-PA liegt neben der Aktivierung des Plasmins und der resultierenden Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix (*Extracellular matrix*, ECM) wie Fibrin oder Fibronectin zudem in der Aktivierung weiterer Kollagenasen^{12,14}. Durch den Umbau der ECM wird der Einstrom weiterer Makrophagen und Fibroblasten erleichtert^{9,14}. Letztere werden von den durch Makrophagen gebildeten Zytokinen PDGF, TNF- α , IL-6, dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF) und dem Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) angezogen^{9,11,12}.

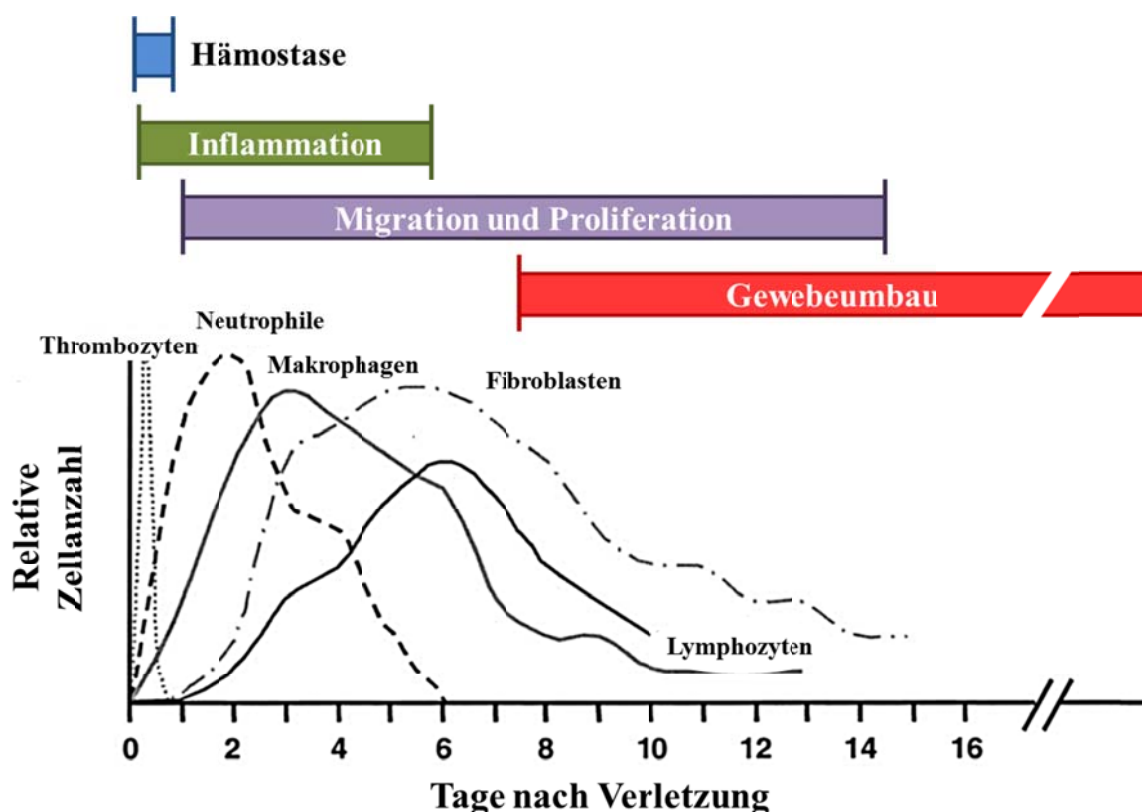


Abbildung 1: Phasen der Wundheilung.

Der Wundheilungsvorgang wird in die Phase der Hämostase und Inflammation, die proliferative Phase und die Phase des Gewebeumbaus eingeteilt. Je nach Stadium des Heilungsvorgangs werden verschiedene Zelltypen an den Ort des Wundgeschehens rekrutiert (modifiziert nach^{9,17}).

1.2.2 Proliferative Phase

Die proliferative Phase der Wundheilung ist durch Reepithelisierung, Angiogenese und die Bildung einer provisorischen Gewebematrix gekennzeichnet. Von Makrophagen stammendes IL-1 stimuliert Fibroblasten zur Expression des Keratinozyten-Wachstumsfaktors (*Keratinocyte growth factor*, KGF, auch FGF7), welcher die Migration und Proliferation von Keratinozyten fördert. PDGF veranlasst Fibroblasten zur Synthese einer vorläufigen Matrix aus Kollagen III, Glykosaminoglykanen und Fibronectin, welche durch die zusätzliche Sekretion von Gewebeinhibitoren der Metalloproteasen (*Tissue inhibitors of metalloproteases*, TIMPs) vor proteolytischer Degradation geschützt wird⁹. Thrombozyten, Makrophagen, Fibroblasten, geschädigte Endothelzellen und Keratinozyten vermitteln durch Abgabe des vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktor (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) die Rekapillarisation und somit die Nährstoffversorgung des regenerierenden Gewebes^{8,9}. Unterstützt wird dieser Prozess durch Matrix-abbauende Proteasen, die den notwendigen Raum für Zellmigration und -proliferation schaffen^{9,14}. Eine besondere Rolle bei der Angiogenese spielt zudem von Makrophagen in die Wunde abgegebenes Stickstoffmonoxid (*Nitric oxide*, NO). Es fördert über eine Erhöhung der VEGF-Expression zusätzlich die Bildung von Kapillaren. Fibroblasten differenzieren durch TGF- β vermittelt zu Myofibroblasten, die im Weiteren eine Wundkontraktion bewirken. Angeregt durch Thrombozyten und Makrophagen versuchen Epithelzellen des äußeren Wundbereiches durch eigenes Wachstum einen weiteren Wundverschluss zu erreichen^{8,9}.

1.2.3 Phase des Gewebeumbaus

Während der letzten Phase des Wundheilungsvorgangs, dem Gewebeumbau, sind ein Großteil der Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten aus der Matrix ausgewandert oder durch apoptotischen Zelltod untergegangen¹⁸. Die besonderen Merkmale dieser Phase sind die verstärkte Ablagerung von Kollagen durch Fibroblasten sowie eine von Wundproteasen verübte Remodellierung der Matrix, wobei Kollagen III als Hauptbestandteil durch Kollagen vom Typ I ersetzt wird^{9,18}. Die resultierende, als Granulationsgewebe bezeichnete Matrix wird durch weitere Umbauprozesse zu Narbengewebe.

1.2.4 Störungen der Wundheilung

Ist der physiologische Ablauf der Wundheilung gestört, kommt es zur Entstehung einer chronischen Wunde mit pathologisch veränderten Reparaturmechanismen¹⁹. In diesem Zusammenhang ist eine Wunde als chronisch oder therapierefraktär definiert, wenn trotz kausaler und sachgerechter Behandlung innerhalb von 3 Monaten keine Tendenz zur Heilung sichtbar wird.

oder es nach 12 Monaten nicht zum Abheilen der Wund kommt²⁰. Die Ätiologie nicht-heilender Wunden kann vielfältig sein, jedoch sind sie meist Symptom chronischer Grunderkrankungen wie der venösen Insuffizienz, von Mikro- und Makroangiopathien im Rahmen diabetischer Stoffwechselstörungen oder von arterieller Verschlusskrankheit bzw. Resultat einer schlechten Durchblutung bei immobilisierten Patienten (Druckulzeration, Dekubitus)^{21,22}. Die Zahl der Patienten mit chronischen Wunden wird in Deutschland auf 2-3 Millionen geschätzt²³, wobei aufgrund der demografischen Entwicklung von einer steigenden Tendenz ausgegangen wird¹⁹. Neben der Beeinträchtigung der Lebensqualität betroffener Patienten sind chronische Wunden auch von enormer sozioökonomischer Bedeutung, da jährlich etwa 2% des Gesundheitsbudgets zur Behandlung von schlecht heilenden Wunden aufgebracht werden²².

Trotz der häufig unterschiedlichen Ursachen sind chronische Wunden durch eine funktionelle Gemeinsamkeit gekennzeichnet: Ihre Persistenz in der inflammatorischen Phase des Wundheilungsprozesses^{19,22}. Zudem scheint eine lokal auftretende Gewebshypoxie mit einer tiefgreifenden Verschlechterung des Wundheilungsgeschehens einher zu gehen²⁴. Während der Sauerstoffpartialdruck in einer normalen Wunde bei 20-50 mmHg (Millimeter Quecksilbersäule) liegt, herrschen in chronischen Wunden nur 5-20 mmHg vor²⁴. Es zeigte sich, dass es unter Hypoxie zu einer erhöhten Expression von Endothelzelladhäsionsmolekülen wie dem Interzellulären Zelladhäsionsmolekül-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1), dem Vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1), dem Lymphozytenfunktion-Antigen-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1*, LFA-1) und dem „*Very late antigen-4*“ (VLA-4) kommt, was in einem verstärkten Influx inflammatorischer Zellen an den Ort des Wundgeschehens führt²⁵. Einwandernde Neutrophile und Makrophagen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und TNF sowie gewebeabbauende Enzyme wie MMPs (vor allem MMP-8 und Neutrophile Elastase) oder gewebeschädigende ROS²⁶. Während letztere in physiologisch heilenden Wunden durch Proteinaseinhibitoren wie α 2-Makroglobulin oder TIMPs gehemmt werden, kommt es in chronischen Wunden zu einem relativen Überschuss an aktiven Proteasen im Vergleich zur Konzentration an Inhibitoren und somit zu einem exzessiven Abbau an ECM Komponenten wie Kollagen, Fibronectin oder Vitronectin^{27,28}. Aufgrund der essentiellen Bedeutung der ECM als Grundgerüst für einwandernde Zellen führt dies im weiteren zu einer Verminderung der Migration und Proliferation von Fibroblasten, Keratinozyten und Epithelzellen mit dem Resultat einer ineffizienten Wundreepithelisierung²⁹. Neben einer verminderten Fibroblastenproliferation, welche möglicherweise durch einen zu geringen Sauerstoffpartialdruck im Gewebe hervorgerufen wird oder das Ergebnis einer möglichen Zellalterung ist, ist auch die Kollagensynthese in chronischen Wunden vermindert^{30,31,32}. Außerdem werden veränderte Zytokinprofile und

Wachstumsfaktor-Muster beschrieben. Während einige Studien Erhöhungen reparaturrelevanter Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- β oder VEGF beschreiben^{33,34,35}, konnten andere Studien diese Ergebnisse nicht bestätigen^{36,37} oder zeigten einen gegenteiligen Effekt³⁸, was möglicherweise auf die große Vielfalt in der Ätiologie und dem Verlauf chronischer Wunden zurückzuführen ist.

Ein weiteres Spezifikum chronischer Wunden ist die Kolonisierung mit Bakterien²¹, wobei erst von einer kritischen bakteriellen Besiedlung bei mehr als 10^5 Organismen/g Gewebe gesprochen wird³⁹. Zu den in chronischen Wunden identifizierten Bakterienspezies gehören neben *S. aureus* weitere Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) oder *Enterobacter* sp.⁴⁰. Hohe Spiegel an Bakterien tragen nicht nur zur Aufrechterhaltung des pro-inflammatorischen Status bei⁴¹, sondern verstärken zudem die vorzeitige Lyse der ECM mit der Konsequenz einer verminderten Zellmigration⁴². Zudem prädisponieren häufige Krankenhausaufenthalte, Operationen und ausgedehnte Antibiotika-Therapien Patienten zu bakterieller Kolonisation oder Infektion mit resistenten Organismen wie dem Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA)³⁹, welcher typischerweise Biofilme ausbildet und durch diese zusätzlich geschützt ist³⁹. *S. aureus* erlangte kurz nach der Einführung von Methicillin als Penicillin-Ersatz seine Resistenz gegen dieses Antibiotikum sodass Infektionen mit MRSA bis heute zu einer weltweiten Epidemie wurden⁴³. Neben *S. aureus* bilden aber auch andere Bakterien wie *P. aeruginosa* Biofilme mittels einer Exopolysaccharid Matrix aus und sind somit vor Immunmechanismen und Antibiotika geschützt⁴⁴.

Das allgemeine Behandlungskonzept einer chronischen Wunde umfasst neben der Behebung der Grunderkrankung die Lokaltherapie zur symptomatischen Wundbehandlung²¹. Die lokale Behandlung ist abhängig vom Stadium der Wundheilung und muss diesem angepasst werden¹⁹. Prinzipiell basiert die Lokaltherapie auf der Reinigung der Wunde, der Desinfektion sowie einer Förderung von Granulation und Epithelisierung im Wundgebiet^{19,21}. Von besonderer Bedeutung für die Therapie von chronischen Wunden ist das Débridement der Wunde^{6,45}. Dieses ist definiert als die Entfernung nicht-vitalen Gewebes aus einer Wunde und meint speziell bei chronischen Wunden die Eliminierung von nekrotischem Gewebe sowie die Entfernung von Verbandsresten, Fremdkörpern und anderen avitalen Bestandteilen⁴⁵. Da nekrotisches Gewebe und fibrinöse Beläge die Wundheilung verzögern und Bakterien den Eintritt erleichtern und somit das Infektionsrisiko erhöhen¹⁹, stellt das Débridement die grundlegende Voraussetzung für eine physiologisch ablaufende Wundheilung dar⁴⁵. Unter den Therapieoptionen stellt hier das chirurgische Débridement, also eine operative Entfernung von Belägen, die Methode der ersten Wahl dar. Weitere verbreitete Methoden sind die Hydrotherapie, der Einsatz von Ultraschallwellen sowie von proteolytischen Enzymen wie Kollagenasen verschiedenen

Ursprungs, bovinem Fibrolysin oder bakterieller Streptokinase. Eine der wahrscheinlich ältesten Methoden in der Behandlung von Wunden stellt die Biochirurgie oder Madentherapie, d.h. die Behandlung von Wunden mit Fliegenmaden dar⁴⁵. Diese Behandlungsmethode soll in den folgenden Kapiteln ausführlich beschrieben werden.

1.3 Madentherapie

Die Madentherapie oder Biochirurgie ist definiert als die gezielte Applikation lebender steriler Fliegenlarven, mit dem Ziel des Débridements, der Desinfektion sowie der Granulationsförderung einer Wunde^{3,7,46,47}. Anwendung findet die Madentherapie vor allem in der Behandlung chronischer therapierefraktärer Wunden, die mit diabetischen und vaskulären Ulzera (=Geschwüre) assoziiert sind⁷.

1.3.1 Historisches

Die wundheilungsfördernden Eigenschaften von Fliegenmaden sind bereits seit Jahrhunderten bekannt¹. So waren Fliegenmaden bereits Teil der traditionellen Medizin australischer Aborigines, burmesischer Hügelvölker und zentralamerikanischer Maya-Indianer^{1,48}. Spätere Berichte erfolgten dann durch Militärärzte wie den französischen Chirurgen Ambrose Paré oder Baron Dominique-Jean Larrey¹. Erste dokumentierte Aufzeichnungen über eine gezielte Anwendung der Fliegenmaden zur Wundreinigung lieferte John Forney Zacharias während des amerikanischen Bürgerkrieges¹. Auch der amerikanische Chirurg William S. Baer griff auf Erfahrungen aus seiner Zeit als Militärarzt zurück, als er 1929 als Professor an der Johns Hopkins Universität Kinder, die an chronischer Osteomyelitis erkrankt waren, erfolgreich mit Fliegenmaden behandelte^{48,49}. Aufgrund der bahnbrechenden Erfolge wurde die Madentherapie zwischen 1930 und 1940 zu einer gängigen Methode in der Behandlung von Wunden. Die Entdeckung von Penicillin und die kommerzielle Herstellung von Antibiotika ab 1944 jedoch ließen die Madentherapie in Vergessenheit geraten¹. Erst die Zunahme intractabler chronischer Wunden assoziiert mit venösen oder diabetischen Ulzera und Druckgeschwüren in Zusammenhang mit dem Anstieg antibiotikaresistenter Keime in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen weltweit verhalfen der Madentherapie zu neuem Interesse^{2,3}, sodass sie bis heute in mehr als 30 Ländern zur modernen Wundtherapie bei mehr als 60.000 Patienten angewandt wurde⁵⁰. Im Jahre 2004 wurde die Madentherapie von der *US Food and Drug Administration* (FDA) für das Débridement nicht-heilender nekrotischer Haut- und Weichgewebewunden wie Druckulzera, neuropathische und venöse Ulzera und nicht-heilende traumatische und postoperative Wunden zugelassen².

1.3.2 Madentherapie heute

Die Aufzucht der Fliegenmaden geschieht heute kommerziell durch Firmen wie Biomonde® nach Desinfektion der Eier auf sterilem Nährboden⁴⁵. Die Applikation der Maden erfolgt entweder frei in direktem Wundkontakt oder in Form eines Gazebeutels (Biobag)¹. Dabei werden ca. 5-10 Maden/cm² Wundoberfläche aufgebracht und für 2-5 Tage bis zum folgendem Verbandswechsel in der Wunde belassen⁴⁵. In dieser Zeit nimmt die Madengröße etwa um das zehnfache zu¹⁹. Man geht davon aus, dass die Maden in der Lage sind, bis zu 0,3 g Gewebe/Tag aus einer Wunde zu entfernen⁵⁰, wobei lange angenommen wurde, dass nur nekrotisches Gewebe entfernt und gesundes unangetastet bleibt¹.



Abbildung 2: Behandlung eines diabetischen Fußes mit Fliegenmaden.

Vor der Behandlung mit Fliegenmaden ist die Wunde mit nekrotischem Wundschorf belegt (links). 4 Tage später während der Behandlung mit freilaufenden Maden (Mitte). Nach Abschluss der Behandlung ist die Wunde von nekrotischem Gewebe gesäubert (rechts)⁴⁷.

Eine Vielzahl an Fallbeispielen und Studien postulieren positive Effekte der Madentherapie auf die Heilung venöser^{51,52,53,54}, diabetischer^{55,56} und Druck-Ulzera^{57,58}. So beschreiben Dumville *et al.* (2009) und Waymann *et al.* (2002) beispielsweise ein schnelleres Débridement durch den Einsatz von Fliegenmaden im Vergleich zur mit Hydrogelen behandelten Gruppe^{51,52}. Im Vergleich zur konventionellen Therapie konnte dabei eine Verkleinerung des nekrotischen Wundareals und ein erhöhtes Wachstum von Granulationsgewebe mit schnellerem Wundverschluss beobachtet werden⁵⁵. Ein großes Problem bei der Behandlung chronischer Wunden stellt deren Besiedlung mit MRSA dar (siehe 1.2.4). Neuere Studien zeigten, dass die biochirurgische Behandlung zu einer Verminderung oder sogar vollständigen Eliminierung einer MRSA-Kolonisierung in chronischen Wunden führt und somit zur Verbesserung der Wundheilung beiträgt^{59,60}.

Trotz der vielen Berichte über die heilungsfördernden Wirkungen der Madentherapie gibt es bislang nur wenige vergleichbare klinische Studien zu ihrer Effizienz. Zarchi & Jemec (2012)

fassten die wenigen verfügbaren Studien mit dem Ziel einer evidenzbasierten Bewertung der Biochirurgie zusammen. Dabei wurden die Parameter Débridement und Heilungsrate zwischen den Studien im Vergleich zur konventionellen oder Hydrogel-Therapie evaluiert. Die Autoren konnten aufgrund schlechter Studiendesigns und minderer Qualität der Untersuchungen, was sich z.B. durch kurze Follow-up Zeiträume, geringe Patientenzahlen oder unklare Ein- bzw. Ausschlusskriterien zeigte, kein positives Gesamtfazit in Bezug auf die heilungsfördernde Wirkung der Fliegenmaden geben⁶¹. Anzumerken ist jedoch, dass letztendlich nur sieben Studien ausgewertet wurden und, wie die Autoren selbst erklärten, nur der Einfluss der Madentherapie auf das Débridement der Wunde untersucht wurde, während andere, ebenfalls über den Heilungszustand aufschlussgebende Faktoren wie Infektionsraten oder post-operative Komplikationen nicht berücksichtigt wurden⁶¹. Letztendlich konnte somit lediglich der Bedarf an hochwertig organisierten Studien für eine klare Bewertung der Effektivität der Madentherapie aufgedeckt werden.

Eine häufig auftretende Nebenwirkung der Madentherapie sind Schmerzen^{3,5}. Grund für die Schmerzen ist eine durch sezernierte Proteasen verübte Schädigung des umliegenden Gewebes und eine mechanische Reizung freiliegender Nerven durch das Mundwerkzeug der Maden. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Maden nur nekrotisches Gewebe entfernen, während sie sauberes Granulationsgewebe unangetastet lassen. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung widerlegt, dass Maden in zu hohen Mengen appliziert gewebeschädigende Effekte vermitteln und die Schmerzen direkt nach der Entfernung aufhören⁵. Die Einführung von Biobags sollte die mechanische Reizung vermindert und eine genaue Konzentration der Maden und damit der proteolytischen Enzyme gewährleistet. Zudem kann das Ausmaß der Schmerzen mit Analgetika kontrolliert werden^{5,6} und die gezielte Applikation der Maden in der Wunde wurde durch die Biobags sehr erleichtert, da das Bauen von Gaze-Käfigen, die die Maden am Entkommen hindern, damit unnötig wurde^{1,6,46}. Weitere technische Komplikationen ergeben sich bei zu starker Produktion von Wundflüssigkeit oder Austrocknung, da die Maden eine gewisse Menge an Flüssigkeit sowie Sauerstoff benötigen⁶⁰. Während der frühen Madentherapie auftretende Infektionen durch Verwendung unsteriler Maden werden heute durch standardisierte Verfahren zur Herstellung steriler Maden weitestgehend verhindert^{1,6}. Weitere Nebenwirkungen oder Komplikationen wie Blutungen oder auftretende Angstgefühle während der Therapie scheinen eher selten zu sein⁶². Der immer noch größte Nachteil der Madentherapie gegenüber konventionellen Behandlungsmethoden ist ihre negative Wahrnehmung durch Patienten und Behandelnde⁶. So kann es im Zuge proteolytischer Reaktionen zu Geruchsbildungen kommen oder Patienten fühlen sich abgestoßen von der Vorstellung lebender Organismen in einer Wunde^{60,62}.

1.3.3 Die Goldfliege *Lucilia sericata*

Heute werden die Larven der Goldfliege *Lucilia sericata* am häufigsten in der Madentherapie angewendet⁷. Es gibt über 100.000 Fliegenarten mit unterschiedlichen morphologischen Charakteristiken, Lebensräumen und Verhaltensweisen¹. Fliegen können obligat oder fakultativ parasitierend sein, wobei obligate Parasiten in ihrer Ernährung zwingend auf einen Wirt angewiesen sind, zu starken Gewebeerkrankungen beim Wirt führen und somit nicht zur Madentherapie geeignet sind. Fakultativ parasitierende Fliegenarten hingegen können sich problemlos auf totem oder nekrotischem Gewebe entwickeln und eignen sich deshalb zum therapeutischen Einsatz beim Menschen^{46,53}. *Lucilia sericata*, ein fakultativer Parasit, gehört zur Gruppe der Schmeißfliegen (Calliphoridae) und wird aufgrund ihrer gold-grünen Färbung (Abbildung 3) auch allgemein als *greenbottle fly* bezeichnet^{1,7}.

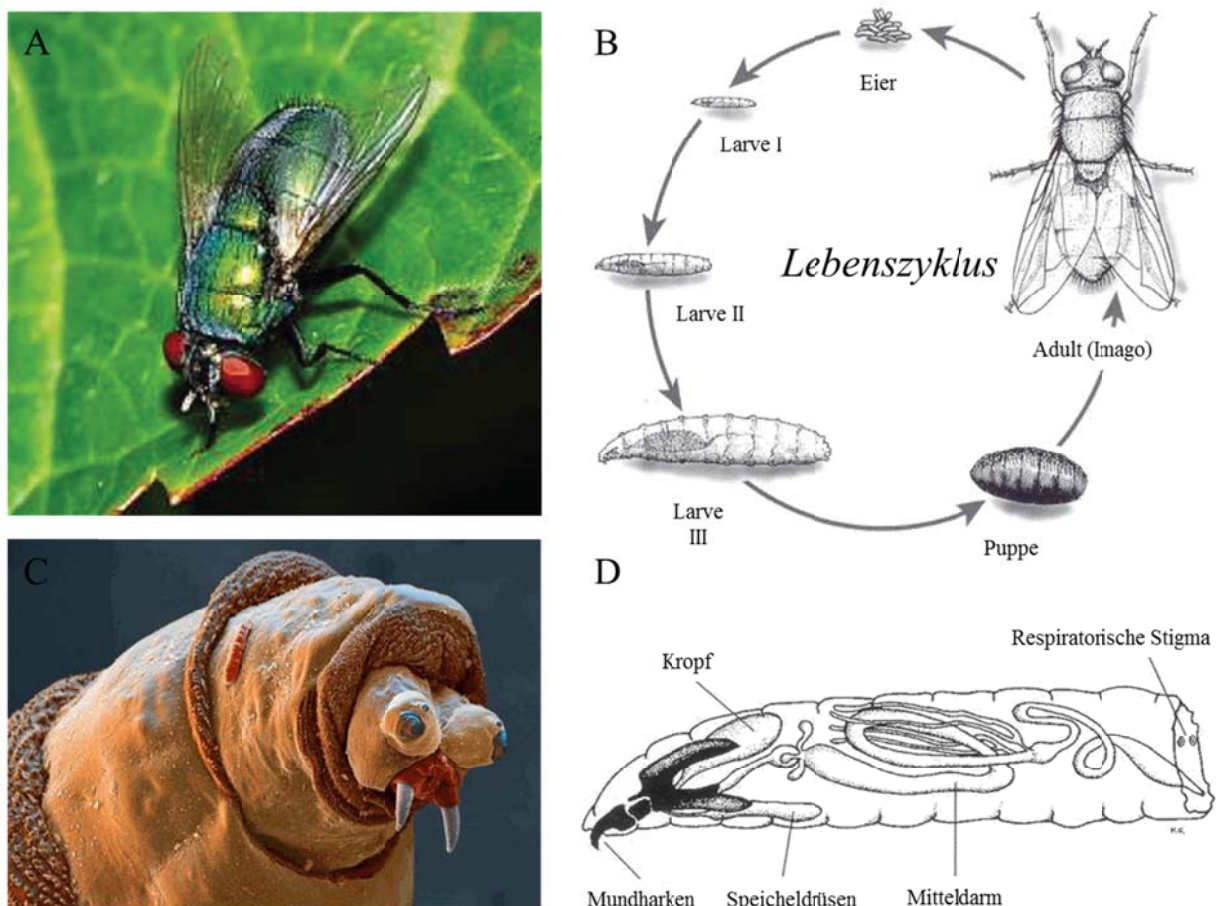


Abbildung 3: Biologie der Goldfliege *Lucilia sericata*.

(A) Die Goldfliege *Lucilia sericata* entwickelt sich in einer vierstufigen Metamorphose (B) aus dem Ei über verschiedene Larven- und einem Puppenstadien; (C) Vorderende einer Larve von ventral; (D) Schematische Darstellung der Larvenanatomie (modifiziert nach^{1,63}).

1.3.3.1 Lebenszyklus

Fliegen haben spezialisierte sensorische Organe, die ihnen die Erkennung von Tierkadavern, verfaulem Fleisch oder offenen Wunden als Lebensraum und zur Reproduktion ermöglichen¹. Weibliche Fliegen legen hier bis zu 200 Eier ab, wobei die Anzahl der abgelegten Eier sowohl von der Größe des Fliegenweibchens als auch vom vorhandenen Nahrungsangebot abhängt. Ungeachtet der Spezies verläuft die Entwicklung von Fliegen in einer 4-stufigen Metamorphose (Abbildung 3), in der sie sich vom Ei zum adulten Tier (Imago) differenzieren⁵³. Jedes Entwicklungsstadium wird dabei von einer Häutung abgeschlossen, während der die nicht mitwachsende Kutikula abgestreift wird⁶⁴. Die Zeit die dabei zur vollständigen Entwicklung eines adulten Tieres aus dem Ei notwendig ist, hängt wiederum von ökologischen Faktoren, wie Umgebungstemperatur und Feuchtigkeit ab. Für gewöhnlich dauert die Entwicklung zur Larve ca. 12-24 Stunden und die Reifung zur Puppe eine weitere Woche. Diese entwickeln sich dann in bis zu drei Wochen zu adulten Tieren. Die Lebensspanne von Schmeißfliegen beträgt ca. 2 Monate¹.

1.3.3.2 Ernährung und Verdauung

Der Körper der Fliegenlarven besteht aus 12 Segmenten ohne klare Unterscheidung von Kopf und übrigen Segmenten¹. Wegen des Fehlens von Abdominalbeinen werden die Larven der Schmeißfliegen als Maden bezeichnet⁶⁴. Anteile des Kopfes sind in den vorderen Brustbereich verlagert und bilden dort mit starken Muskeln ein Schlundgerüst (cephalopharyngeales Skelett), von dem nur die nach außen ragenden Mundhaken zu sehen sind (Abbildung 3)⁶⁵. Das muskulöse Schlundgerüst dient der Fortbewegung wobei eine Rückwärtsbewegung der Maden durch Haarkränze an den einzelnen Segmenten verhindert wird^{1,65}. Fliegenmaden atmen über ein stark reduziertes Tracheensystem, das sich zum vorderen und hinteren Körperende in Form von Stigmen öffnet. Die ebenfalls stark vereinfachten Sinnesorgane erlauben nur eine Unterscheidung von hell und dunkel⁵³.

Die Verdauungsvorgänge von Schmeißfliegenmaden finden außerhalb des Körpers statt (extrakorporale Verdauung). In den Speicheldrüsen des Vorderdarms und im Mitteldarm (Abbildung 3) sezernierte Verdauungsenzyme werden durch Regurgitation auf die potentielle Nahrung abgegeben und dienen der Verflüssigung dieser, sodass sie anschließend über die sich im Vorderdarm befindliche Pharynxpumpe aufgesaugt werden kann. Aufgenommene Nahrung kann dann im Kropf gespeichert werden oder gelangt direkt in den Mitteldarm, welcher für die Resorption der Nährstoffe zuständig ist^{1,66}. Der Darm der Maden entspricht in seiner Länge dem fünffachen der Körperlänge und ermöglicht die effiziente Ausnutzung der Nährstoffe. Die Regurgitation von Verdauungsenzymen, der starke Saugapparat und der extrem dehnbare Kropf

sind evolutionäre Anpassungen, die den Hauptzweck des Madenstadiums widerspiegeln: Die schnellstmögliche Aufnahme möglichst großer Nahrungsmengen. Unter optimalen Bedingungen sind die Maden so in der Lage, ihr Körpergewicht innerhalb weniger Tage um das Hundertfache zu steigern¹.

1.3.3.3 Immunsystem

Die natürlichen Lebensräume der Maden von *Lucilia sericata* – Kadaver, Exkremente und Wunden – sind mikrobiell stark kontaminiert. Zum Schutz gegen schädliche äußere Einflüsse besitzen Insekten eine Kutikula. Diese besteht aus einem Chitingrundgerüst mit eingelagerten Komponenten wie Proteinen und Lipiden und stellt eine erste physikalische Barriere dar^{66,67}. Ist diese erste Barriere jedoch verletzt, wird die Erkennung und Abtötung von vorhandenen Keimen für die Maden lebensnotwendig^{1,67,68}. Insekten besitzen kein adaptives Immunsystem, verfügen aber über eine starke angeborene Immunabwehr, welche es ihnen erlaubt, in Umgebungen mit starker mikrobieller Besiedlung zu überleben⁶⁹. Das Immunsystem setzt sich dabei, ähnlich dem des Menschen, aus zellulären und löslichen Komponenten zusammen⁷⁰.

Den zellulären Anteil stellen die Immunozyten, eine Gruppe der Hämozyten dar. Hämozyten sind die „Blutzellen“ der Insekten, die in einem offenen Kreislauf mit der Hämolymphe zirkulieren⁷⁰. Die immunologisch aktiven Hämozyten besitzen Eigenschaften von phagozytierenden Zellen wie Plasmatozyten, Granulozyten und Makrophagen⁷⁰. Diese sind an Abwehrprozessen wie Phagozytose, Einkapselung und Gerinnung beteiligt⁶⁹. Die Phagozytose wird von oberflächengebundenen Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRRs), die an konservierte Pathogenstrukturen (*Pathogen-associated microbial patterns*, PAMPs) binden, erleichtert. Zu diesen zählen Lektine sowie Homologe von humanen Toll-like Rezeptoren oder Peptidoglykan-erkennende Proteine (*Peptidoglycan recognition proteins*, PGRPs)^{69,70}. Sind die Pathogene zu groß um phagozytiert zu werden, werden sie von den Hämozyten eingekapselt und im Rahmen einer respiratorischen Entladung der Zellen durch toxische Substanzen wie ROS oder NO getötet^{69,70,71}. In die von den Hämozyten gebildete Zellschicht lagert sich außerdem das durch die Phenoloxidase aus Chinonsubstraten gebildete antimikrobiell wirksame und zytotoxische Pigment Melanin ein^{69,71}.

Die Gerinnung der Hämolymphe als Antwort auf eine äußerliche Verletzung dient der schnellen Abdichtung der Wunde, stellt das Hydroskelett wieder her und führt zur Ausbildung eines Netzwerks, indem Bakterien zurückgehalten werden^{69,70}. Von aktivierten Plasmatozyten abgegebene Gerinnungsfaktoren interagieren dabei mit Faktoren aus dem Hämolympheplasma zu einem weichen Gerinnsel. Dieses wird durch das von der Phenoloxidase gebildete Melanin und durch eine Transglutaminase-vermittelte Vernetzung zu einem stabilen Gerinnsel, das durch

angelagerte Plasmatozyten weiter stabilisiert und von einer neu wachsenden Epidermis überlagert wird^{71,72}, sodass ein weiteres Eindringen von Keimen verhindert wird.

Neben der bereits genannten Phenoloxidase spielen weitere humorale Faktoren wie Zytokine, Neuropeptide, Komplement-ähnliche Peptide und antimikrobielle Peptide (*Antimicrobial peptides*, AMPs) eine Rolle in der Immunantwort von Insekten⁷⁰. Die direkte Tötung von Pathogenen durch AMPs stellt neben den zellulär vermittelten Mechanismen die wichtigste Komponente der Insektenimmunität dar⁶⁹. AMPs sind kleine basische Peptide mit einem Molekulargewicht von <5 kilo Dalton (kDa), meist aus 12-15 Aminosäureresten bestehend und einer positiven Nettoladung bei physiologischem pH⁶⁷. Ihrer Struktur nach können sie in Proteine mit α -Helizes wie z.B. Cecropine, disulfidstabilisierte Cystein-reiche Proteine wie Defensine sowie Prolin- und Glyzin-reiche Proteine eingeteilt werden. AMPs werden sowohl vom Fettkörper als auch von einigen Hämocyten synthetisiert und nach Infektion in hohen Mengen in die Hämolymphe abgegeben, um Eindringlinge wie Viren, Pilze und Bakterien zu töten^{67,69}. AMPs binden aufgrund ihrer positiven Ladung leicht an negativ geladene Moleküle wie Phosphatidylglycerol oder polyanionische Lipopolysaccharide auf Zellmembranen von Bakterien. Die folgende Integration der AMPs in die Membran führt zur Ausbildung von Poren, welche zum Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten, dem Verlust von Metaboliten und gegebenenfalls sogar zur Lyse mikrobieller Zellen führt. Zudem können AMPs, ohne eine Zerstörung der Zellmembran, ins Cytoplasma translozieren und dort mit intrazellulären Molekülen wie Proteinen, die an DNA-, RNA- oder Proteinbiosynthese beteiligt sind, interferieren oder die Apoptose einleiten⁶⁹.

1.3.4 Wundheilungsfördernde Mechanismen

Eine Vielzahl an Studien beschreibt die wundheilungsfördernden Wirkungen von *Lucilia sericata* Maden in der Behandlung chronischer Wunden (siehe 1.3.2). Nach Jahren der Erforschung dieser Beobachtungen wurde immer deutlicher, dass die Effekte nicht von einer einzigen Substanz oder Substanzklasse, sondern vielmehr ein Zusammenspiel verschiedener, synergistisch agierender Faktoren verübt werden. Bis heute konnten drei Hauptwirkmechanismen der Madentherapie identifiziert werden: 1. das biochirurgische Débridement, 2. die Desinfektion der Wunde, sowie 3. die Stimulation von neu wachsendem Granulationsgewebe.

1.3.4.1 Débridement

Die von den Fliegenmaden im Rahmen ihrer extrakorporalen Verdauung abgegebenen Sekrete führen zur Andauung nekrotischer und fibrinöser Beläge, die im Weiteren durch Aufsaugen und Abkratzen von den Maden aus der Wunde entfernt werden und somit im Sinne eines

biochirurgischen Débridements zur Wundheilung beitragen⁶⁸. Genauere Untersuchungen der zu Grunde liegenden Prozesse führten zur Identifizierung von Kollagenasen^{73,74} Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen, sowie einer Metallo- und einer Aspartylprotease^{75,76}. Chambers *et al.* (2003) zeigten weiterhin, dass ein Chymotrypsin-ähnliches Enzym ECM-Komponenten wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen Typ I und III degradiert und somit erheblich zum Abbau von fibrinösem Wundschorf beitragen kann⁷⁶. Dieselbe Arbeitsgruppe veröffentlichte 2010 die Klonierung und Charakterisierung eines Chymotrypsin-ähnlichen Enzymes aus *Lucilia sericata* in Insektenzellen⁷⁷. Die Analyse der Proteinsequenz ergab das Vorhandensein von drei, das katalytische Zentrum und die Zymogen-Spaltstelle beinhaltenden, konservierten Chymotrypsindomänen. Im Vergleich zu bovinem und humanem Chymotrypsin war das Chymotrypsin aus *Lucilia* wesentlich effektiver in der Degradation von Wundbelägen *ex vivo*⁷⁷ und wird zudem nicht von endogenen Inhibitoren wie α -Antichymotrypsin, α -Antitrypsin oder α 2-Makroglobulin gehemmt⁷⁸. Das Enzym unterscheidet sich biochemisch von humanem Chymotrypsin, da es in einer physiologischen Wundsituation vor endogenen Inhibitoren geschützt ist⁷⁸. Mit dem Ziel der Umgehung der Nachteile der modernen Madentherapie (siehe 1.3.2) konzipierte die Arbeitsgruppe ein Hydrogel, welches das gefriergetrocknete *Lucilia* Chymotrypsin enthält und leitete zudem die Herstellung des Enzyms nach den Anforderungen der Guten Herstellungspraxis für Arzneimittel in *E.coli* ein^{79,80}.

Erst kürzlich veröffentlichte eine niederländische Arbeitsgruppe die rekombinante Herstellung einer weiteren Serinprotease aus *Lucilia sericata*. Das als Sericase bezeichnete Enzym setzt die aktive Protease Plasmin aus Plasminogen frei und ist so *in vitro* profibrinolytisch wirksam⁸¹.

Neben den bereits beschriebenen Serinproteasen identifizierten Altincicek & Vilcinskas (2009)⁸² sowie Andersen *et al.* (2010)⁸³ mögliche glycosidische Enzyme in *Lucilia*. Glycosidasen sind dafür bekannt, Zuckerreste von Proteinen abzuspalten, was zu einer erhöhten Sensitivität der Zwischenprodukte gegenüber Proteasen führt⁸⁴. Telford *et al.* (2012) untersuchten Wundbeläge auf das Vorhandensein von Zuckerresten und deren Schicksal unter Einwirkung von MEP⁸⁵. Es zeigte sich, dass MEP in der Lage war, Zuckerreste von mit Wundbelag assoziierten Proteinen abzuspalten. Weiterhin konnte die Anwesenheit einer α -D-Glucosidase-, einer α -D-Mannosidase- und einer *N*-Azetyl- β -D-Glucosaminidase-Aktivität in MEP nachgewiesen werden. Somit scheinen in MEP enthaltene Glycosidasen Zuckerreste abzuspalten und dadurch die Sensitivität gegenüber Proteasen zu erhöhen, was letztendlich in einer gesteigerten Effektivität des biochirurgischen Débridements resultiert⁸⁵.

1.3.4.2 Antimikrobielle Effekte

Chronische Wunden sind häufig mit Bakterien kolonisiert oder infiziert, was vor allem bei Infektion mit antibiotikaresistenten Keimen zu einer dramatischen Verschlechterung der Wundheilung führen kann. Die Desinfektion der Wunde ist somit ein integraler Bestandteil in ihrer Behandlung (siehe 1.2.4).

Das natürliche Habitat von Fliegenlarven sind Tierkadaver, Exkremente oder Wunden, welche große Mengen pathogener Mikroorganismen beherbergen. Um in dieser Umgebung überleben zu können, haben die Maden verschiedene Mechanismen zur Eliminierung von Bakterien entwickelt^{6,68}. Es konnte gezeigt werden, dass Maden während des Fressens in einer Wunde nicht nur nekrotisches Gewebe, sondern auch Bakterien aufnehmen und verdauen oder sie im Darm zurückhalten und so eine Rekontamination der Wunde verhindern⁸⁶. Zudem kommt es durch die mechanische Stimulation, die die Maden in der Wunde ausüben, zu einer verstärkten Produktion seröser Wundflüssigkeit mit Ausspülung von Bakterien aus der Wunde^{6,68}. Neben der mechanischen Zerstörung von Bakterien sezernieren Fliegenmaden alkalische Komponenten wie Ammoniumbikarbonat, Calcium, Allantoin oder Harnstoff in die Wunde. Dies trägt zur Wunddesinfektion bei, indem zum einem das Wachstum von Bakterien gehemmt wird und zum anderen das für ebenfalls sezernierte proteolytische Enzyme optimale Aktivitätsmilieu geschaffen wird⁶.

Seit den ersten Beschreibungen antibakterieller Wirkungen durch Fliegenmaden in den 1930er Jahren, untersuchten viele Arbeitsgruppen den Einfluss von Maden oder deren Exkretionsprodukten auf das Wachstum von Bakterien, teilweise mit voneinander abweichenden Ergebnissen². Während Bexfield *et al.* (2004)¹⁶ und Hubermann *et al.* (2007)¹⁴¹ eine Verringerung der Zahl von grampositiven Bakterien wie *S. aureus* (Methicillin-sensitive und -resistente Formen) und gramnegativen Bakterien wie *P. aeruginosa* oder *Escherichia coli* (*E. coli*) beschrieben, was Jarkliê *et al.* (2008)⁸⁷ für *S. aureus* zudem *in vivo* bestätigten, konnten andere Gruppen keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität dieser Bakterien feststellen^{88,89}. Laut Cazander *et al.* (2013) könnte die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise an unterschiedlichen Präparationen und eingesetzten Konzentrationen des MEP oder in der Verwendung verschiedener Methoden zur Messung des bakteriellen Wachstums liegen².

Bakterielle Biofilme, vor allem von antibiotikaresistenten Stämmen wie MRSA gebildet, stellen ein zusätzliches Problem bei der Behandlung chronischer Wunden dar (siehe 1.2.4). Das MEP von *Lucilia sericata* war in verschiedenen Untersuchungen in der Lage, sowohl die Bildung bakterieller Biofilme durch *S. aureus*, *P. aeruginosa* und *S. epidermis* zu hemmen, als auch etablierte Biofilme abzubauen^{88,89,90,91}. Weiterhin zeigte das MEP synergistische Effekte mit

verschiedenen Antibiotika wie Gentamycin oder Daptomycin bei dem Abbau von *S. aureus*-Biofilmen^{92,93} und verstärkte deren Aktivität.

In den letzten Jahren widmeten sich immer mehr Arbeitsgruppen der Identifizierung und Charakterisierung der für die antibakterielle Wirkung verantwortlichen Moleküle. Kerridge *et al.* (2005) untersuchten die antibakterielle Wirkung von aus MEP hergestellten und nach Molekulargewicht separierten Fraktionen. Die stärkste Aktivität gegen Methicillin-sensitiven und resistenten *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* und in geringerem Maß auch *P. aeruginosa* fand sich dabei in der Fraktion mit niedermolekularen Komponenten (<1 kDa)⁹⁴. Hubermann *et al.* (2007) identifizierten die drei niedermolekularen Verbindungen P-Hydroxybenzoesäure (138 Da), P-Hydroxyphenyllessigsäure (152 Da) und Prolin-Diketopiperazin (194 Da)⁹⁵, die alle drei antibakterielle Aktivität gegen *Micrococcus luteus* (*M. luteus*) und *P. aeruginosa* zeigten. Auch Bexfield *et al.* testeten verschiedene aus dem MEP hergestellte Fraktionen und isolierten zwei antibakterielle Verbindungen, von denen ein Faktor mit einer Größe <500 Da starke Aktivität gegen verschiedene Bakterien, unter anderem zwölf MRSA-Stämme, zeigte^{96,97}. Die Strukturformel dieser aktiven Komponente lautet C₁₀H₁₆N₆O₉ und das Molekül ist unter dem Namen Seraticin® als neuartiges Antibiotikum patentiert und registriert².

Čeřovský *et al.* (2010) beschrieben die Isolation und strukturelle Aufklärung des Defensins Lucifensin aus Gewebeextrakten (Darm, Speichel, Hämolymphe) von *Lucilia sericata*⁹⁸. Kurz darauf konnte das erstmals synthetisch hergestellte Peptid auf seine antimikrobielle Wirkung untersucht werden und erwies sich als stark inhibitorisch gegen grampositive Bakterien wie *M. luteus*, *Bacillus subtilis* und in etwas geringerem Maß gegen *S. aureus*, während keine Wirkung auf gramnegative Bakterien beobachtet wurden⁹⁹.

Chinesische Forscher isolierten dann 2013 das antimikrobielle Peptid „anti bacterial protein from maggots“ (MAMP) aus Madenhomogenat¹⁰⁰. *In vitro* zeigte MAMP inhibitorische Aktivität sowohl gegen das Methicillin-sensitive als auch gegen das resistente *S. aureus*. *In vivo* senkte die äußere Anwendung nicht nur die Viabilität von *S. aureus*, sondern stimulierte zudem die Wundheilung in einem murinen Hautinfektionsmodell. Eine russische Arbeitsgruppe ermittelte diverse antimikrobielle Moleküle aus der Hämolymphe und dem Exkretionsprodukt der Maden¹⁰¹. Hierbei handelt es sich laut der Autoren um bekannte Peptide wie das Lucifensin oder MAMP, aber auch um bislang unbekannte Komponenten.

Antimikrobielle Peptide in Insekten werden als Antwort auf mikrobielle Reize exprimiert und abgegeben¹⁰². Eine Induktion der antimikrobiellen Wirkung in Maden durch die aseptischen

Wundbedingungen scheint auch im Rahmen der Madentherapie vorzuliegen. So ist die antibakterielle Aktivität von Maden aus chronischen Wunden 3-5x höher als die von sterilen Maden¹⁰³. Ähnliche Ergebnisse beobachteten auch Kawabata *et al.* (2010) nach Untersuchung der antibakteriellen Aktivität gegen *S.aureus* bei sterilen oder zuvor mit Bakterien infizierten Maden¹⁰⁴. Altincicek & Vilcinskas (2009) suchten nach Immun-induzierten Genen in *Lucilia sericata* und fanden neben einigen an der Signaltransduktion- und der Stressantwort beteiligten Genen auch Verdauungsenzyme wie Lipasen, Trypsin-ähnliche Serinproteasen, Cysteinyl- und Aspartylproteasen und Metalloproteasen. Weiterhin war die Expression von mit der Immunantwort assoziierten Genen wie Lysozym, Ferritin, Transferrin sowie antimikrobielle Peptide mit Ähnlichkeit zu Insekten-Diptericinen, Defensinen und Prolin-reichen Peptiden nach Infektion der Maden verändert⁸².

Neben antimikrobiellen Peptiden scheinen jedoch noch weitere Proteine an der antibakteriellen Aktivität von *Lucilia sericata* beteiligt zu sein. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl ein aus *Lucilia* isoliertes Chymotrypsin sowie ein Protein mit DNase-Funktion in der Lage waren, bakterielle Biofilme zu zerstören^{90,105}. Extrazelluläre DNA ist eine grundlegende Strukturkomponente bakterieller Biofilme und es zeigte sich, dass die Einwirkung von DNasen zum effektiven Abbau von Biofilmen führt und zudem die Wirkung von Antibiotika unterstützt^{106,107}.

Pöppel *et al.* (2014) identifizierten kürzlich das antifungales Peptid Lucimycin aus *Lucilia sericata*. Dieses zeigte Aktivität gegen Stämme wie *Ascomycota* (Schlauchpilze), *Basidiomycota* (Ständerpilze) und *Zygomycota* (Jochpilze) sowie den Scheinpilz *Phytophthora parasitica*, war jedoch unwirksam gegen Bakterien¹⁰⁸.

1.3.4.3 Stimulation der Wundheilung

Nachdem lange Zeit angenommen wurde, dass Fliegenmaden in der Wundheilung vorwiegend durch den Abbau nekrotischer Wundbeläge, eine durch im Wundbett krabbelnde Maden hervorgerufene mechanische Stimulation sowie der Sekretion wundheilungsfördernder Substanzen wie Allantoin und Harnstoff zur Förderung der Heilung beitragen, ist 80 Jahre nach den ersten Untersuchungen klar, dass zudem biochemische, mit dem Heilungsprozess assoziierte Signalwege beeinflusst werden müssen¹⁰⁹. Eine neuere klinische Untersuchung von Dumville *et al.* (2009) zeigte, dass die Wirkung von freilaufenden Maden sich nicht signifikant von den in Biobags applizierten Maden unterscheidet, sodass die mechanische Stimulation des Wundgewebes eher von nachrangiger Bedeutung zu sein scheint⁵¹.

Viele Studien untersuchten den Einfluss von MEP auf die Proliferation und Migration verschiedener am Wundheilungsprozess beteiligter Zelltypen, teilweise mit widersprüchlichen Ergebnissen. Tatsächlich beschreibt Prete einen wachstumsfördernden Effekt von sowohl isolierter Hämolymphe als auch dem MEP auf humane Fibroblasten in einer Konzentration von 0,09 µg/ml Gesamtprotein¹¹⁰. Ähnliche Effekte konnte für Endothelzellen^{109,111}, Monozyten¹¹² und Nervengewebe¹¹³ beobachtet werden. Bexfield *et al.* (2010) identifizierten die Aminosäuren L-Histidin, 3-Guanidinopropansäure und L-Valinol in MEP und zeigten deren mitogene Effekte auf humanen umbilikale venöse Endothelzellen, während kein Einfluss auf die Proliferation von humanen Fibroblasten erkennbar war¹¹⁴. Auch Smith *et al.* (2006) konnten nach 12 h Einwirkung keinen signifikanten Effekt von MEP (50 µg/ml) auf die Proliferation von Fibroblasten feststellen¹¹⁵.

Neben dem Zellwachstum scheint auch die Zellmigration von Fibroblasten und Endothelzellen durch das MEP beeinflusst zu werden. In einem 3D-Migrationsmodell wurde der Einfluss von MEP auf Fibroblasten in einer Kollagen-Fibronektin-Matrix untersucht¹¹⁶. Hierbei zeigte sich nach 24 h eine Stimulation der Zellmigration durch Konzentrationen von 1 und 5 µg/ml. Anzumerken ist jedoch, dass höhere Konzentrationen zu einer Senkung der Migration mit veränderter Morphologie der Zellen führten. In einem *in vitro* Fibroblasten-Wundheilungs-Assay hatte MEP eine offenbar Protease-vermittelte Migrations-fördernde Aktivität¹¹⁵. Zur weiteren Untersuchung wurden Hydrogele mit MEP präpariert und ihr Effekt auf die Migration von Fibroblasten und Keratinozyten ebenfalls in einem *in vitro* Wundheilungs-Assay untersucht. Auch hier kam es zu einer Erhöhung der Zellmigration durch MEP. Einen Einfluss auf die Migration von Endothelzellen untersuchten Wang *et al.* (2010)¹¹¹. Hier konnte eine gesteigerte Migration humaner mikrovaskulärer Endothelzellen nach Stimulation in einem Transwell-System beobachtet werden. Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass dieser Effekt über den Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B-Signalweg vermittelt wird.

Chinesische Forscher analysierten Fettsäure-Extrakte aus getrockneten Maden in einem murinen Wundheilungsmodell und beobachteten einen signifikanten pro-angiogenen Effekt durch einen Anstieg der VEGF-Expression in Gewebeproben¹¹⁷. *In vitro* Untersuchungen an Monozyten und daraus generierten Makrophagen bestätigen diese Ergebnisse¹¹⁸. Hier führte MEP zu einer Verschiebung vom pro-inflammatorischen zum anti-inflammatorischen und pro-angiogenen Phänotyp von Makrophagen mit gesteigerter Produktion von VEGF und *Basic fibroblast growth factor* (bFGF). Außerdem senkte MEP cAMP-abhängig die Lipopolysacharrid (LPS)- und Lipoteichonsäure (LTA)- induzierte Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-12p40 und des Makrophagenmigration inhibierenden Faktors in einer Konzentration von 3,5 µg/ml bei gleichzeitiger Erhöhung des anti-inflammatorischen IL-10¹¹². Des Weiteren

inhibierte MEP die chemotaktische Antwort LPS-simulierter Monozyten. Übereinstimmend wurde eine reduzierte Migration Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin-stimulierter Neutrophiler beobachtet¹¹⁹. MEP führte zu einer verringerten Expression der Zelladhäsionsmoleküle CD11b und CD18 auf Neutrophilen, was laut Autoren die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen und eine anschließende Transmigration vermindert und somit den Einstrom inflammatorischer Zellen in das Wundgebiet senkt. Außerdem verringert MEP die Produktion von H₂O₂ sowie die Ausschüttung von Elastase aus Neutrophilen, sodass sowohl ECM-Komponenten als auch umliegendes Gewebe vor Degradation geschützt werden¹¹⁹. Pecivova *et al.* (2008) beobachteten in Übereinstimmung hiermit keinen Einfluss auf die Myeloperoxidase-Aktivität und die Superoxidbildung unstimulierter Neutrophiler, jedoch kam es nach Vorbehandlung der Neutrophilen mit opsonisiertem Zymosan zu einer Senkung beider Parameter¹²⁰. Neben ihrer Rolle in der Aufrechterhaltung pathologischer inflammatorischer Prozesse in chronischen Wunden, sind Leukozyten jedoch maßgeblich für die Desinfektion des Wundgebiets verantwortlich. Anzumerken ist deshalb, dass weder die Phagozytose noch das intrazelluläre Abtöten von Mikroben wie *S. aureus* oder dem Pilz *Candida albicans* in Monozyten und Neutrophilen durch MEP beeinflusst wurde^{112,119,120}.

Ein weiterer wichtiger Aktivator der inflammatorischen Antwort im Wundheilungsgeschehen ist das Komplement-System¹²¹. Hier führt die Aktivierung eines der drei bekannten Signalwege (Klassischer Signalweg, alternativer Signalweg und Lectin-Weg) final zur Proteolyse der zentralen Faktoren C3 und C5, welche in aktiver Form sowohl durch Markierung schadhafter Zellen und Bakterien für Phagozyten, als auch durch Chemoattraktion weiterer inflammatorischer Zelltypen zur Aufrechterhaltung von Entzündungsprozessen im Rahmen der physiologischen Wundheilung beitragen. In chronischen Wunden jedoch sind häufig erhöhte Spiegel an Komplementaktivatoren nachweisbar und es zeigte sich, dass die Inhibierung der Komplementkaskade vor den Symptomen chronisch inflammatorischer Prozesse schützt¹²¹. Dies führte zu der Hypothese, dass MEP das Komplement-System und damit letztendlich die Heilung chronischer Wunden beeinflussen kann². Eine *in vitro* Studie untersuchte den Effekt von MEP in Seren von gesunden und post-operativen Patienten, mit dem Ergebnis einer konzentrationsabhängigen Inhibierung der Komplement-Aktivierung. MEP-Komponenten spalten C3 und C4 im Serum, was zum Verbrauch der Faktoren führt, sodass sie für eine Komplement-Aktivierung nicht mehr zur Verfügung stehen¹²².

1.4 Das Hämostasesystem

Unter physiologischen Bedingungen wird die Fließfähigkeit des Blutes durch den nicht-thrombogenen Charakter des ruhenden Endothels mit seinen vasodilatorischen, entzündungs- und wachstumshemmenden Eigenschaften gewährleistet¹²³. Wie bereits unter 1.2 beschrieben, kommt es nach einer Gefäßverletzung zur Aktivierung des Hämostasesystems. Diese hat zum einen das Ziel größere Blutverluste durch die Ausbildung eines Wundverschlusses zu verhindern und liefert zum anderen durch die Produktion eines Fibrinnetzwerkes das notwendige Fundament für Zellmigrationsvorgänge im Wundheilungsprozess. Erreicht wird dies durch ein dynamisches reguliertes Zusammenspiel löslicher und zellständiger Faktoren von Gerinnung und Fibrinolyse mit zellulären Komponenten (v.a. Thrombozyten) sowie der stationären Gefäßwand unter Bedingungen des strömenden Blutes^{123,124}.

Die Rolle der Hämostase im Wundheilungsprozess wird deutlich bei Erkrankungen wie Hämophilie B oder Faktor (F) XIII-Mangel, welche neben einer unzureichenden Gerinnung auch zu einer Störung der Wundheilung führen können^{9,11,125}. Aufgrund dieser Schlüsselfunktion werden die der Blutgerinnung zu Grunde liegenden Prozesse in diesem Kapitel ausführlich beschrieben.

Zur modellhaften Beschreibung der Vorgänge der Blutgerinnung wurde das 1964 sowohl von Macfarlane, als auch von Davie & Ratnoff^{126,127} etablierte Kaskaden- oder Wasserfallmodell der Gerinnung durch ein „Zellbasiertes Gerinnungsmodell“ (Abbildung 4) mit *Tissue factor* (TF) als Hauptaktivator erweitert^{128,129}. Dieses trägt der Notwendigkeit einer negativ geladenen Thrombozytenoberfläche für die effektive Auslösung und Propagierung der Blutgerinnung sowie deren Konzentration auf den Wundbereich Rechnung¹³⁰. In diesem Modell führt eine Gefäßläsion durch die Aktivierung von Thrombozyten zur Ausbildung eines primären Wundverschlusses und liefert die Grundlage für die gleichzeitige Fibrinbildung durch die Initiierung plasmatischer Gerinnungsprozesse. Hauptakteure in Gerinnung und Fibrinolyse sind die Serinproteasen, welche durch ihre speziellen Eigenschaften maßgeblich an der Initiierung der kaskadenartigen Aktivierung aber auch durch ihre Expression in Zymogenform an der Regulation dieser Prozesse beteiligt sind^{131,132}.

1.4.1 Serinproteasen

Serinproteasen machen in der Natur 1/3 aller bekannten Proteasen aus und sind an physiologischen Prozessen wie Verdauung, Gerinnung oder Immunität beteiligt¹³². Bei den Enzymen handelt es sich um Endopeptidasen, welche ihr Substrat in der Mitte der Polypeptidkette hydrolysieren. Der Name der Proteasen stammt von einem reaktiven Seryl-Rest im reaktiven

Zentrum des Enzyms, welcher zusammen mit den Aminosäuren Histidin und Aspartat die katalytische Triade bildet. Bei der Hydrolysereaktion kommt es zum nukleophilen Angriff des Hydroxy-Sauerstoffatoms im Seryl¹⁹⁵-Rest des Enzyms auf die Carbonylgruppe der Peptidbindung eines Substrates. Die Aminosäurereste His⁷⁵ und Asp¹⁰² stabilisieren dabei die Komplexbildung zwischen Protease und Substrat¹³². Zu den Serinproteasen gehören neben den intrazellulären Glutamyl-Proteasen mit Beteiligung am Zell-Turnover die extrazellulären Proteasen der Trypsin-Superfamilie¹³³. Letztere kann nach Art der vertretenen katalytischen Aktivitäten weiter in 1. Trypsin-ähnlich, 2. Chymotrypsin-ähnlich und 3. Elastase-ähnlich untergliedert werden. Trypsin-ähnliche Proteasen spalten vorwiegend positive geladene Seitenketten (Arginin, Lysin, Histidin), während Chymotrypsine bevorzugt große hydrophobe Reste hydrolysieren und Elastase-ähnliche Proteasen hinter Alanin spalten^{133,134}. Zu den wichtigsten Vertretern aus der Trypsin-Superfamilie gehören neben den Verdauungsenzymen Trypsin und Chymotrypsin auch Komplementfaktoren wie C1r und C1s oder die Gerinnungsfaktoren VII, IXa, Xa, XIa, XIIa, und Thrombin. Des Weiteren werden die Kallikreine (aus Gewebe und Plasma) und die Kallikrein-related peptides, sowie die an der Fibrinolyse beteiligten Enzyme gewebspezifischer Plasminogenaktivator (*Tissue-type plasminogen activator*, t-PA), u-PA und Plasmin zu den Mitgliedern dieser Superfamilie gezählt^{132,133}. Gemeinsam ist den Serinproteasen der Trypsin-Superfamilie ihre Expression in Zymogen-Form, was eine proteolytische Aktivierung erforderlich macht und somit der Regulation ihrer Aktivität dient¹³². Die Organisation von Serinproteasen in Kaskadensystemen, in welchen eine Protease die nachfolgende proteolytisch aktiviert, ist dabei ein phylogenetisch konserviertes Prinzip, das sich sowohl in der Gerinnungskaskade und dem Komplementsystem des Menschen, als auch im Rahmen des Hämolyph-Clottings oder der Embryonalentwicklung bei Insekten wiederfindet^{72,135}.

Die Protease-Inhibierung durch Serinprotease-Inhibitoren (SERPINE), wie den C1-Esterase-Inhibitor oder Antithrombin ist ein zweischrittiger Mechanismus^{136,137}. Im ersten Schritt kommt es zur Ausbildung eines Komplexes beider Reaktionspartnern, infolge dessen das reaktive Zentrum des SERPINs (*Reactive site loop*, RSL) durch die zu inhibierende Protease als Substrat erkannt wird. In diesem kovalenten Komplex wird die Protease vorerst sterisch inhibiert. In einem weiteren Schritt wird das SERPIN durch die Protease gespalten und es entsteht ein Acyl-Intermediat-Komplexe in dem die katalytische Struktur der Protease zerstört wird. Da auch der Inhibitor während dieser Reaktion deaktiviert wird, werden SERPINE als „Selbstmord-Inhibitoren“ bezeichnet^{136,137}. Eine Gemeinsamkeit von Proteasen der Trypsin-Superfamilie ist ihre Inhibierung durch Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), indem das reaktive Serin der katalytischen Triade in einem Komplex mit dem Inhibitor blockiert wird¹³³.

1.4.2 Thrombozytäre Blutstillung (Primäre Hämostase)

Hervorgerufen durch den Wegfall der Endothelbarriere gelangen zirkulierende Thrombozyten in Kontakt mit subendothelialen Kollagenfasern. Die initiale Thrombozytenadhäsion wird dabei durch die Interaktion zwischen dem Glykoprotein (GP) GPIb/FV/FIX-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche mit dem Von-Willebrandt Faktor (vWF) auf Kollagenfasern vermittelt^{123,138}. Der multimer vWF wird ausschließlich von Endothelzellen und Megakaryozyten produziert. Während Endothelzellen vWF luminal wie basolateral konstitutiv sezernieren oder in den Weibel-Palade-Körperchen speichern, erfolgt die lokale vWF-Freisetzung aus den α -Granula der Thrombozyten nach deren Stimulation¹³⁹. Gelangt der zirkulierende vWF in Kontakt mit Kollagenfibrillen der verletzten Gefäße kommt es unter dem Einfluss von starken Scherkräften des Blutflusses zu einer Konformationsänderung des kollagengebunden vWF, sodass die Bindung von vorbei strömenden Thrombozyten über deren GPIb ermöglicht wird¹³⁹. Stabilisiert wird diese initiale Bindung der Thrombozyten an die Kollagenmatrix durch thrombozytären GPIa, GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ ^{123,138}. Die Aktivierung des Integrin $\alpha II\beta_3$ führt zuletzt zur Aggregation der Thrombozyten über Fibrinogenbrücken¹²³.

Die durch den Kontakt mit der ECM hervorgerufene Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer Adenosintriphosphat (ATP) -getriebenen Umverteilung (Flip-Flop-Mechanismus) von negativ geladenen, calciumbindenden Phospholipiden wie Phosphatidylserin und -inositol auf die Außenseite der Thrombozytenmembran^{123,130,140,141}. Hier wirken die Phospholipide prokoagulatorisch, indem sie die spezifische Bindung und lokale Konzentrierung der Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren VII, IX, X und Prothrombin über deren calcium-bindende γ -Carboxyglutaminsäure (Gla)-Reste ermöglichen^{123,131,142}. Des Weiteren werden sowohl FV als auch vWF aus den α -Granula der Thrombozyten freigesetzt^{139,143}. Das während der parallel ablaufenden plasmatischen Blutstillung auf TF-tragenden Zellen gebildete Thrombin (siehe 1.4.3) führt zu einer Verstärkung der Thrombozytenaggregation und -Aktivierung über die Spaltung der Protease-aktivierten Rezeptoren (*Protease-activated-receptor*, PAR) 1 und 4^{144,145}. Darüber hinaus sezernieren aktivierte Thrombozyten wie unter 1.2 beschrieben weitere, den Wundheilungsprozess antreibende Faktoren.

1.4.3 Plasmatische Blutstillung (Sekundäre Hämostase)

Die plasmatische Blutstillung dient der Stabilisierung des durch Thrombozytenaggregate gebildeten primären Wundverschlusses durch die Bildung eines Fibrinnetzwerkes an der Verletzungsstelle. Die Aktivierung des Schlüsselenzyms Thrombin kann in drei überlappende Phasen eingeteilt werden: Die Initiierungs-, Amplifikations- und Propagationsphase¹²⁸.

Das plasmatische Gerinnungssystem (Abbildung 4) wird durch den extrinsischen Weg (Initiierungsphase) ausgelöst. Nach einer Gefäßverletzung kommt der auf subendothelialen Zellen der Gefäßwand wie glatten Muskelzellen und Fibroblasten exponierte TF in Kontakt mit dem plasmatischem Faktor VII/VIIa (a für „aktiviert“) und aktiviert im extrinsischen Tenase-Komplex mit diesem FX, was in der Bildung einer für die Fibrinsynthese noch nicht ausreichenden Menge an Thrombin resultiert^{123,128,146,147}. Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass verschiedene inflammatorische Stimuli die TF-Aktivität in Zellen mit niedriger basaler Expression wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten, Neutrophilen oder Thrombozyten erhöhen. Die von diesen aktivierten Zellen, an Mikropartikel gebunden in das Plasma abgegebene und als „intravasaler“ TF bezeichnete Form kann in Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen zur Initiierung der Blutgerinnung beitragen^{123,148}.

Wie unter 1.4.2 beschrieben, ist für eine weitere Amplifikation und Propagation der Gerinnung die negativ geladene Oberfläche aktivierter Thrombozyten essentiell^{130,149}. Das während der Initiationsphase gebildete Thrombin führt zur Aktivierung der Gerinnungsfaktoren VIII¹⁵⁰, XI¹⁵¹ und V¹⁵². Aktivierter dimerer FXI vermittelt die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von FIX^{153,154}. Dieser bildet im Komplex mit FVIIIa auf der Thrombozytenoberfläche den intrinsischen Tenase-Komplex, welcher die Umwandlung von FX zu FXa katalysiert^{131,144}. Der Prothrombinasekomplex, bestehend aus FXa/FVa produziert genügend Thrombin für die Fibrinbildung. Die kovalente Stabilisierung des Fibrinnetzwerkes wird über die Transglutaminase FXIII vermittelt und gewährleistet eine Stabilisierung des primären, durch aggregierte Thrombozyten gebildeten Wundverschlusses¹⁵⁵. Das in der Leber gebildete Akut-Phase Protein Fibrinogen besteht aus drei über Disulfidbrücken miteinander verknüpfte Polypeptidketten, die als $\text{A}\alpha$ -, $\text{B}\beta$ - und γ -Kette bezeichnet werden¹⁵⁶. Im Zuge der Fibrinbildung kommt es zur Abspaltung der Fibrinopeptide A und B durch Thrombin¹⁵⁷. Die gebildeten Fibrinmonomere polymerisieren und bilden ein Fibrinnetzwerk, dass im Rahmen der ebenfalls Thrombin-aktivierten Transglutaminasereaktion durch die kovalente Verknüpfung der α - und γ -Ketten mechanisch stabilisiert wird^{156,158}.

Während für die Fibrinbildung nur ein minimaler Teil (ca. 5%) des gebildeten Thrombins herangezogen wird, diffundiert der Großteil von der Verletzungsstelle weg und assoziiert mit dem endothelständigen Rezeptor Thrombomodulin (TM). Gebunden an TM verliert Thrombin seine gerinnungsfördernde Wirkung, ist jedoch, in Kooperation mit dem endothelialen Protein C Rezeptor (*Endothelial Protein C receptor*, EPCR) in der Lage das antikoagulatorische Protein C zu aktivieren. Aktiviertes Protein C (APC) inaktiviert durch proteolytische Spaltung im Komplex mit Protein S an der Wundstelle die Kofaktoren FVa und FVIIIa, so dass die weitere Thrombinbildung unterbleibt^{159,160}. Ein weiterer Teil des aktiven Thrombins verbleibt im

Fibrinthrombus und trägt über die Aktivierung von Thrombozyten und FXIII zur Thrombusstabilität bei¹²³.

Der Hauptinhibitor der TF-abhängigen Gerinnungsaktivierung ist der mit Lipoproteinen assoziierte *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI), welcher den TF/FVIIa-Komplex in FXa-abhängiger Weise bindet und inaktiviert¹⁶¹. Folglich muss die gebildete Menge an FXa das inhibitorische Potential des TFPI überschreiten um eine TF/FVIIa-initiierte Aktivierung der Thrombinbildung zu erreichen. Zudem wird TFPI von Protein S gebunden und somit die Inhibitorwirkung in der initialen TF-abhängigen Gerinnungsaktivierung verstärkt¹⁶².

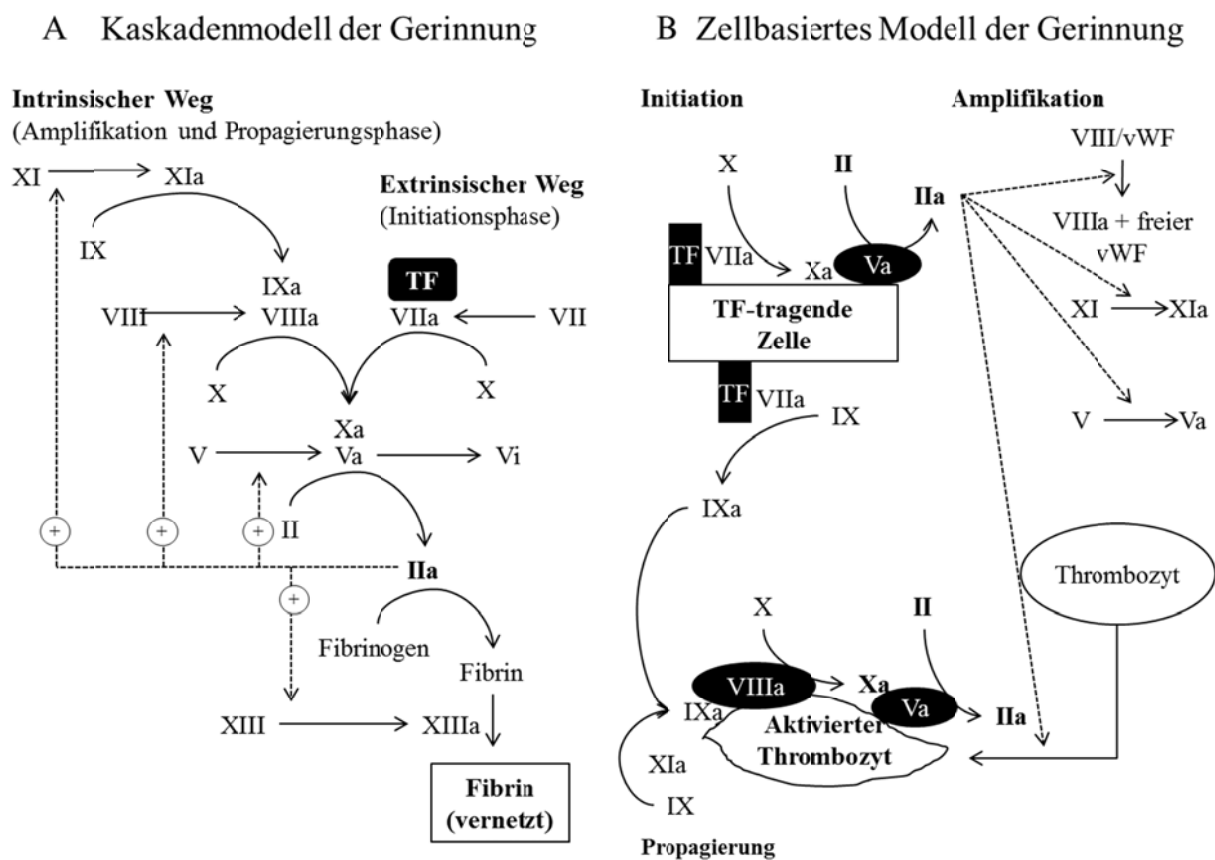


Abbildung 4: Modelle der Gerinnungsaktivierung.

Der Ablauf der Gerinnung kann in die drei Phasen Initiation, Amplifikation und Propagation eingeteilt werden. Die Aktivierung der Gerinnung im Kaskadenmodell (A) repräsentiert den grundlegenden Ablauf der Gerinnungsinitiierung über den intrinsischen und den extrinsischen Weg als eine Aneinanderreihung proteolytischer Reaktionen, die zur Aktivierung der jeweils nachfolgenden Gerinnungsproteasen führt¹²⁸. Der *tissue factor* (TF)/Faktor VIIa-Signalweg initiiert im zellbasierten Modell der Gerinnung (B) die Faktor Xa-Bildung auf einer TF-tragenden Zelle. Die zunächst nur geringen Mengen an gebildetem Thrombin (Faktor IIa) amplifizieren im Weiteren das prokoagulatorische Signal durch die Aktivierung der Faktoren V, VIII und FXI und der Steigerung der Thrombozytenaktivierung. In der Propagationsphase kommt es zur Aktivierung von Faktor X auf der Thrombozytenoberfläche durch den Faktor VIIIa/Faktor XIa-Komplex. Faktor Xa initiiert im Folgenden im Komplex mit seinem Kofaktor Faktor Va die Massenproduktion von Thrombin mit resultierender Fibrinbildung (a=aktiviert; modifiziert nach^{163,164}).

Eine weitere Regulation von Thrombin und anderen Gerinnungsproteinen erfolgt über das SERPIN Antithrombin¹³⁶, welches vor allem Thrombin und FXa inhibiert, wobei die antikoagulatorische Aktivität des Enzyms durch endothelzellständige Heparansulfate oder durch exogen appliziertes Heparin verstärkt wird. Gebunden an Heparansulfate auf Endothel und Subendothel ist die Aktivität von Antithrombin auf die Gefäßwand lokalisiert¹³⁶. Am Gerinnsel gebundenes Thrombin und FXa sind vor der Inaktivierung durch Antithrombin geschützt. Antithrombin ist somit maßgeblich an der lokalen Beschränkung der Thrombusbildung beteiligt, indem es sich von der Verletzungsstelle entfernende prokoagulatorische Proteasen inaktiviert¹³⁷.

1.4.4 Die Kontaktphasen-Aktivierung

Neben der zuvor beschriebenen TF-abhängigen Initiierung der Blutgerinnung kann diese auch über die Aktivierung der sogenannten Kontaktphase eingeleitet werden. Das Kontaktphasen-System beinhaltet vier Komponenten: Die Serinprotease-Zymogene FXI, FXII und Präkallikrein (PK), sowie den nicht-enzymatischen Kofaktor hochmolekulares Kininogen (*High molecular weight kininogen*, HMWK)^{165,166}. Der Begriff „Kontaktphasen-Aktivierung“ beschreibt dabei die Fähigkeit des FXII zur Autoaktivierung nach Kontakt mit biologischen oder künstlichen/fremden negativ geladenen Oberflächen (Abbildung 5)^{167,168}. FXII kann *in vitro* durch künstliche Substanzen wie Glass, Kaolin oder Dextransulfate^{169,170,171} und durch polyanionische Substanzen wie Glykosaminoglykane, Kollagene, Sulfatide und Heparin^{171,172,173} aktiviert werden.

Als endogene Aktivatoren wurden 2006 erstmals Thrombozyten sezernierte Polyphosphate beschrieben¹⁷⁴. Unsere Arbeitsgruppe konnte 2007 nachweisen, dass im Zuge einer Endothelverletzung von geschädigten Zellen abgegebene extrazelluläre Ribonukleinsäuren (RNAs) an FXII und FXI binden und prokoagulatorische Wirkung über die Aktivierung der Kontaktphase ausüben¹⁷⁵. Des Weiteren wurden falsch gefaltete Proteine¹⁷⁶ sowie von Neutrophilen sezernierte NETs¹⁷⁷ als endogene Initiatoren der Kontaktphasen-Aktivierung identifiziert.

Nach Bindung von FXII an eine negativ geladene Oberfläche kommt es zu Konformationsänderungen und einer proteolytischen Spaltung des Zymogens¹⁶⁹. Diese kann zudem durch Einwirkung von Proteasen wie Kallikrein¹⁷⁸ oder Plasmin¹⁷⁹ erfolgen und resultiert in der Entstehung von FXIIa. Für die Aktivierung des FXII sind außerdem Zinkionen notwendig, die durch Histidine in der N-terminalen Region gebunden werden und die aktive Protease stabilisieren¹⁸⁰. Das über eine Disulfidbrücke vernetzte Aktivierungsprodukt besteht aus einer leichten Kette (30 kDa) und einer schweren Kette (50 kDa)^{166,181}. Während letztere die Oberflächenbindungsdomänen beinhaltet^{182,183}, enthält die leichte Kette das aktive Zentrum mit

der für Serinproteasen typischen katalytische Triade aus Aspartat, Histidin und Serin^{181,184}. Aktivierter FXII kann in seiner Nachbarschaft FXI und PK aktivieren^{165,166,185}. Diese Faktoren sind über HMWK an Proteoglykane von Endothelzellen oder GPIb auf Thrombozyten gebunden^{186,187,188,189,190}. Das multifunktionale Glykoprotein HMWK setzt sich aus einer leichten und einer schweren Kette (Abbildung 5) zusammen, wobei die schwere Kette aus den Domänen (D) D1-D3 besteht und über das Kininsegment (D4) mit der leichten Kette in Verbindung steht^{166,191}. Die leichte Kette beinhaltet die Domänen D5 und D6. Während D5 durch eine Vielzahl positiv geladener Lysyl-, Glycyl- und vor allem Histidylreste zusammen mit D3 für die Bindung des HMWK an negativ geladene Zelloberflächen verantwortlich ist^{166,192,193,194}, enthält D6 die Bindungsstellen für PK und FXI^{195,196}. Eine der Funktionen des HMWK als Kofaktors besteht somit in der Konzentrierung der Kontaktphasen-Proteine PK und FXI auf der Zelloberfläche um eine effektive Proteaseaktivierung zu erreichen^{166,197}.

Des Weiteren dient HMWK als Vorstufe des pro-inflammatorischen und vasoaktiven Peptides Bradykinin, das aus der Domäne D4 durch aktiviertes Kallikrein abgespalten wird^{166,198}. Die inaktive Kallikrein-Vorstufe Präkallikrein liegt im Plasma zu 75% an HMWK gebunden vor^{166,189} und die Aktivierung des Zymogens führt zur Bildung des zweikettigen PKa, wobei die leichte Kette die Serinprotease-typische katalytische Triade enthält. Beide Ketten sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden^{199,200,201}. Die Bindung von PK an HMWK wird über die sogenannten *Apple (A)*-Domänen A1 und A4 vermittelt^{202,203}. Diese entstehen durch Disulfidbrücken zwischen vier homologen Domänen aus ca. 90-91 Aminosäuren in der leichten Kette des Proteins und resultieren in vier strukturell ähnlichen Proteindomänen^{201,204}, welche neben der Bindungsstelle für HMWK auch die Bindung an FXII über A3 und A4 vermitteln²⁰². Kallikrein unterstützt durch die Umsetzung weiterer FXII-Zymogene die Amplifikation der Kontaktphasen-Aktivierung^{167,178}, welche letztendlich in der Aktivierung des Faktor XI resultiert^{205,206}. Dieser zeigt in seiner Aminosäuresequenz eine 58% Homologie zu Präkallikrein²⁰⁷ und zirkuliert im Blut als Zymogen ebenfalls an HMWK gebunden²⁰⁸. FXIa kann im Weiteren über den intrinsischen Aktivierungsweg die Thrombinbildung über FIX amplifizieren^{154,209}.

Reguliert wird die Kontaktphase vor allem durch den C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH.), der die Inaktivierung von FXIIa, Kallikrein und FXIa bewirkt^{210,211,212}. Zudem beteiligen sich Antithrombin^{213,214,215}, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1)²¹⁶, Protein C-Inhibitor²¹⁷ und TFPI²¹⁸ an der Inhibierung der Kontaktphasen-Proteasen.

Die physiologische Relevanz des intrinsischen Gerinnungsweges war lange Zeit umstritten, da Patienten mit einer Defizienz an PK, HMWK oder FXII keine verstärkte Blutungsneigung aufweisen²¹⁹ und auch kongenitaler FXI-Mangel, häufig als Hämophilie C bezeichnet, nur zu

einem milden, meist durch Operationen hervorgerufenen, Blutungsphänotyp führt²²⁰. Unterstützt wurden diese Beobachtungen durch die Entdeckung, dass FXI nicht vorwiegend durch FXIIa sondern durch Thrombin aktiviert wird²²¹. Dies wurde jedoch relativiert, da gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von FXI durch Thrombin in Plasma keine Rolle spielt, durch Fibrinogen inhibiert wird und FXII als Kofaktor notwendig ist^{222,223,224}. In verschiedenen Schlaganfall- und Thrombosemodellen hatte ein Fehlen von FXI^{225,226,227} und FXII^{228,229} protektive Effekte auf eine pathologische Thrombusbildung. Die FXIIa-getriebene intrinsische Gerinnungskaskade scheint für die Ausbildung gefäßokklusiver Thromben essentiell zu sein, während ihre Bedeutung für die Fibrinbildung *in vivo* als gering angesehen wird²³⁰. Somit stellt die Inhibierung des FXII einen interessanten Ansatz zur Prävention von Thromboembolien dar, ohne die Blutstillung zu beeinflussen²³⁰. Wie unsere Arbeitsgruppe zudem zeigen konnte, führte eine Aktivierung der Kontaktphase durch RNA zu einer verstärkten Thrombusbildung in Mäusen¹⁷⁵.

Die Proteine des Kontaktphasensystems sind des Weiteren in vaskulären Prozessen wie Komplementaktivierung²³¹, Fibrinolyse und Angiogenese involviert²³². Die Aktivierung der Kontaktphase induziert über die klassische Komplementaktivierung eine Reihe inflammatorischer Reaktionen, die letztendlich in der Produktion von Anaphylatoxinen, der Kontraktion glatter Muskelzellen, der Rekrutierung verschiedener Immunzellen sowie einer Bradykinin-vermittelten Erhöhung der Gefäßpermeabilität resultieren²³². Bradykinin sowie auch FXII/FXIIa sind in der Lage an Endothelzellen zu binden und deren Migration und Proliferation zu fördern, was z.B. in einer gesteigerten Angiogenese resultiert. Aktiviertes HMWK hingegen verhindert die Endothelzellmigration und inhibiert somit die Neovaskularisierung^{232,233}. Zudem wurde von es von unserer Arbeitsgruppe als anti-inflammatorisches Protein beschrieben²³⁴ und zeigt in verschiedenen Untersuchungen antibakterielle Aktivität^{235,236}. Die Interaktionen des Kontaktphasensystems mit der plasmatischen Fibrinolyse sind vielfältig. Zum einen stabilisiert FXIa Gerinnsel und verhindert eine Fibrinolyse²³⁷. Weiterhin ist schon seit mehr als 50 Jahren bekannt, dass die Aktivierung der Kontaktphase zu einer Erhöhung der Plasminbildung führt¹⁶⁶. Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl FXIa, FXIIa als auch Kallikrein in der Lage sind Plasminogen zu aktivieren, wenn auch in weit aus geringerem Ausmaß als u-PA oder t-PA²³⁸. FXIIa kann außerdem über eine Komplexbildung des PAI-1 indirekt zu einer Förderung der Fibrinolyse beitragen²³². Kallikrein kann über die Freisetzung des Peptids Bradykinin die Abgabe von t-PA aus Endothelzellen fördern²³⁹.

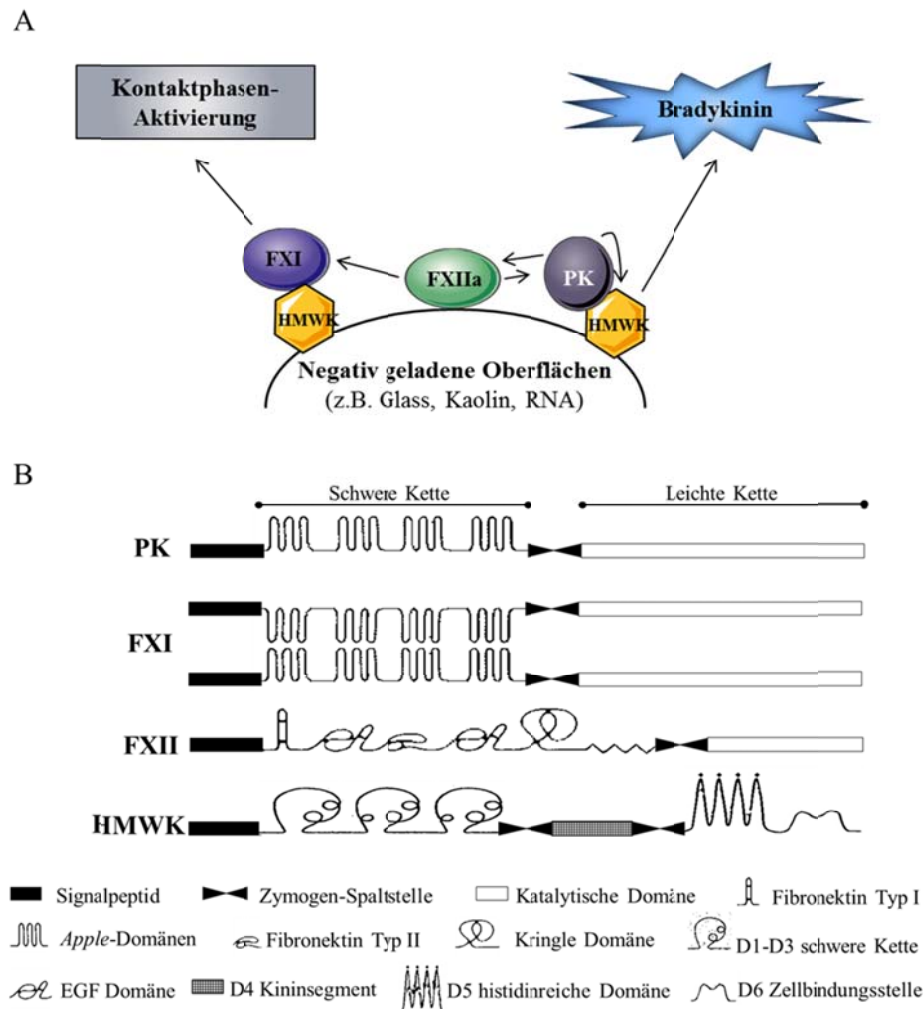


Abbildung 5: Die Kontaktphasen-Aktivierung.

(A) Das Zusammentreffen der Kontaktphasen-Proteine auf einer negativ geladenen Oberfläche führt zur Aktivierung von Faktor XII. Dieser aktiviert im Weiteren die Gerinnungskaskade über Faktor XI. Zusätzlich führt die Aktivierung von Präkallikrein (PK) zu Kallikrein zu einer Amplifikation der Faktor XII-Aktivierung einerseits und zur Freisetzung des pro-inflammatorischen Peptids Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen (HMWK) andererseits. (B) Domänenstrukturen der Kontaktphasen-Proteine (modifiziert nach^{131,165,240}).

1.4.5 Fibrinolyse

Die Aufgabe des fibrinolytischen Systems besteht in der gezielten Auflösung von fibrinreichen Blutgerinnseln¹²³. Vermittelt wird dies durch das Schlüsselenzym Plasmin, das als Hauptakteur der Fibrinolyse Fibrin spaltet^{241,242}. Plasmin wird durch limitierte Proteolyse aus dem Proenzym Plasminogen generiert²⁴². Zu den Plasminaktivatoren gehören die Serinproteasen t-PA und u-PA²⁴².

Während u-PA über die Bindung an seinen zellulären Rezeptor Urokinase-Rezeptor (*Urokinase receptor*, uPAR) vor allem eine extravasale Proteolyse im Zuge von Migrations- und Gewebeumbauprozessen, wie z.B. im Rahmen des Wundheilungsgeschehens (siehe 1.2)

vermittelt und auch bei der Tumorprogression und -metastasierung beteiligt ist, induziert t-PA vorwiegend die Auflösung intravasaler Blutgerinnsel (Abbildung 6)^{123,241}.

t-PA wird von Endothelzellen konstitutiv gebildet, in Weibel-Palade-Körperchen gespeichert und durch vasoaktive Substanzen wie Adrenalin, PAF oder Thrombin freigesetzt^{123,243}. Mit seinem Substrat Plasminogen bindet t-PA über Lysinbindungsstellen in Kringle-Domänen an das als Kofaktor dienende Fibrin^{241,244,245}. Die aktive Serinprotease Plasmin gehört zur Gruppe der Endopeptidasen und spaltet Fibrin an Lysyl- oder Arginyl-Resten²⁴⁶. Dies führt zur Amplifikation der Fibrinolyse durch die Freisetzung neuer Lysinbindungsstellen für Enzym und Substrat^{123,247}. Zudem verstärkt Plasmin über einen positiven Feedback-Mechanismus seine eigene Bildung, indem es das ebenfalls aktive einkettige t-PA in weitaus effektiveres zweikettiges t-PA spaltet^{123,242}.

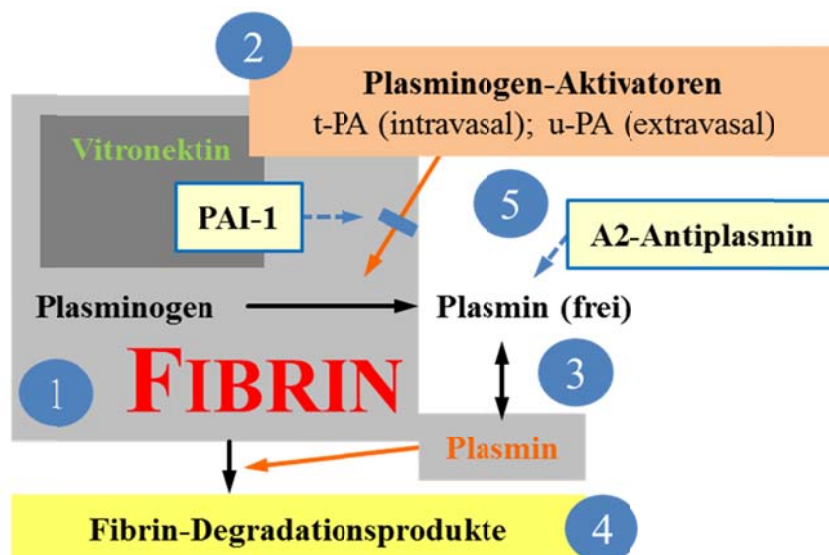


Abbildung 6: Reaktionen des Fibrinolyse-Systems.

Auf dem mit Vitronektin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) aus Thrombozyten angereicherten Fibringerinnsel (1), bilden der gewebspezifische Plasminogenaktivator (t-PA) (2) und Plasminogen mit ihrem Kofaktor Fibrin den zentralen Multikomponenten-Enzymkomplex. Das dabei entstehende Plasmin (3) kann nur in Fibrin-gebundener Weise dieses Substrat effektiv proteolysieren (4), während es in der freien Form sofort durch α 2-Antiplasmin inaktiviert wird (5). Die Kontrolle der Plasminogen-Aktivierung übernimmt PAI-1 (5). Dieser ist an Vitronektin und Fibrin gebunden. Urokinase-Typ Plasmin Aktivator (u-PA) spielt keine Rolle bei der fibrinspezifischen Plasminogen-Aktivierung in der Zirkulation, sondern findet sich extravasal als potenter Plasminbildner, notwendig für Zellmigration und -invasion (modifiziert nach¹²³).

Reguliert wird die Fibrinolyse zum einen durch Fibrin selbst, indem es durch seine Kofaktor-Funktion seinen eigenen Abbau initiiert und durch Auflösung des Gerinnsels eliminiert wurde²⁴². Zudem gewährleistet die Fibrin-abhängige proteolytische Aktivierung des Plasmin durch t-PA eine lokal limitierte, regulierbare Fibrinolyse^{123,248}. Einen wichtigen physiologischen Inhibitor stellt PAI-1 dar. Das von Thrombozyten im Gerinnsel sezernierte SERPIN wird von

Vitronektin stabilisiert und inhibiert t-PA bei fortschreitender Fibrinolyse, sodass die Plasmin-Bildung unterbleibt^{123,249,250}. α 2-Antiplasmin inhibiert Plasmin direkt über Blockierung der Lysinbindungsstellen und verhindert somit kompetitiv die Interaktion von Plasmin mit Fibrin²⁴². α 2-Antiplasmin ist zunächst über FXIII und Fibrin gebunden und verhindert so in der frühen Phase der Fibrinolyse die Spaltung von Fibrin durch Plasmin¹²³. Eine regulatorische Verbindung zwischen Gerinnung und Fibrinolyse stellt die Zink-abhängige Metalloprotease Thrombin-aktivierbarer Inhibitor der Fibrinolyse (*Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*, TAFI) dar²⁴². TAFI wird durch Thrombin zwar aktiviert, die Bindung von Thrombin an TM erhöht die Aktivität jedoch um mehr als das 1000fache²⁵¹. TAFI entfernt die durch Plasmin gebildeten Carboxy-terminalen Lysyl-Reste am Fibrinmolekül und hemmt somit die Plasmin-Bildung²⁴⁶. Durch seine inhibitorische Wirkung auf die Plasmin-Bildung verhindert der Thrombin/TM-Komplex eine zu frühe Fibrinolyse und stabilisiert das Blutgerinnsel²⁴⁶.

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Seit Entdeckung der wundheilungsfördernden Eigenschaften von Fliegenmadensekreten widmeten sich verschiedene Arbeitsgruppen der Charakterisierung der zu Grunde liegenden Reaktionen und der Identifizierung der verantwortlichen aktiven Enzyme, unter diesen v.a. Serinproteasen vom Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlichen Typ. Obwohl Serinproteasen neben ihrer Beteiligung an extravasaler und intravasaler Fibrinolyse im Menschen zudem die Hauptakteure der Gerinnungsaktivierung sind, ist der Einfluss von Exkretionsprodukten der Fliegenmaden auf das humane Gerinnungssystem weitgehend unerforscht und die aktuelle Datenlage zu diesem Thema unklar: Weil *et al.* beschrieben 1933 eine hämostatische Wirkung von MEP *in vivo*²⁵², während van der Plas *et al.* in einer aktuellen Studie keinen Einfluss auf die humane Gerinnung *in vitro* feststellen konnten⁸¹. Dabei gehören die Verdauungsenzyme der Insekten, genau wie die humanen Gerinnungsfaktoren zu der stark konservierten Trypsin-Superfamilie der Peptidasen und unterliegen zudem dem gleichen regulatorischen Prinzip der Zymogen-Aktivierung^{131,132,134}, was eine funktionale Redundanz der Enzyme wahrscheinlich macht.

Weiterhin zeigen neuere Untersuchungen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten der Gerinnungssysteme in Vertebraten und Invertebraten, die eine umfangreiche Analyse der Interaktion von MEP mit der humanen Gerinnung im Rahmen der Wundheilung interessant erscheinen lassen. Es deutet alles darauf hin, dass die Aktivierung des Gerinnungssystems ein phylogenetisch altes, adaptives Prinzip der Infektabwehr ist, dessen Rolle auch in der angeborenen Immunantwort des Menschen immer deutlicher hervortritt⁷². So wurde z.B. eine Aktivierung des humanen intrinsischen Gerinnungsweges durch den Kontakt mit Pathogenen wie *S. aureus* und *E. coli* beobachtet²⁵³ und gezeigt, dass von Neutrophilen abgegebene NETs zur Aktivierung der Kontaktphase führen¹⁷⁷. Eine weitere funktionelle Gemeinsamkeit beider Gerinnungssysteme ist zudem ihre Aktivierung durch Kontakt mit extrazellulären RNAs^{175,254}. Weiterhin zeigen die Gerinnungssysteme von Invertebraten und Vertebraten strukturell ähnliche Komponenten wie die Transglutaminase oder das Insektenprotein Hemolectin mit seiner Von-Willebrand-Faktor-ähnlichen Domäne^{72,255}.

Auf der Grundlage der beschriebenen Beobachtungen wurde für diese Arbeit folgende Arbeitshypothese formuliert:

Das zur Verdauung von Maden in die Wunde sezernierte MEP fördert durch die enthaltenen Enzyme und deren struktureller Ähnlichkeit zu humanen Faktoren die Gerinnung im Wundgeschehen und vermittelt überdies wundheilungsfördernde Eigenschaften.

Basierend auf dieser Arbeitshypothese sollten in dieser Arbeit folgende Zielstellungen im Detail bearbeitet werden:

1. Analyse der Interaktion von MEP mit dem humanen Hämostasesystem
2. Identifizierung aktiver Proteine/Enzyme in MEP

Eine Förderung der Blutgerinnung durch MEP würde einen weiteren, bisher unbeschriebenen Mechanismus der beobachteten wundheilungsfördernden Wirkungen der Madentherapie liefern. Zudem würde die Identifizierung der aktiven Komponenten einen ersten Schritt zu deren isoliertem therapeutischen Einsatz in der modernen Biochirurgie darstellen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Proteinbiochemische Methoden

3.1.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Proben wurde mit dem auf der Biuret-Reaktion beruhenden *Thermo Scientific Pierce BCA-Proteinassay* durchgeführt. In alkalischer Lösung bildet Protein mit zweiwertigen Kupferionen einen Komplex. Die Kupferionen werden im Weiteren zu einwertigen Kupferionen reduziert, diese bilden mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der bei 562 nm photometrisch bestimmt werden kann^{256,257}.

Es wurden 5 µl der zu analysierenden Probe, sowie 5 µl einer Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA, Eichkurve 0, 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000 µg/ml) für die Proteinbestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Pro Well wurden anschließend 100 µl der Reaktionslösung des BCA-Proteinassays zugegeben. Nach 30 Minuten (min) Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm photometrisch detektiert und der Proteingehalt der Proben anhand der Standardkurve bestimmt.

3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird das zu untersuchende proteinhaltige Gemisch mit dem anionischen Detergenz SDS (*Sodiumdodecylsulfat*, Natriumlaurylsulfat) versetzt. SDS bindet in einem konstanten Verhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösung) an Proteine. Die stark negative Ladung des SDS überlagert die Eigenladung der Proteine, sodass eine Trennung nach Masse der Proteine möglich ist, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molmasse ist. Zugabe von 10%igem 2-Mercaptoethanol im Probenansatz führt zur Reduktion von Disulfidbrücken.

Das zu untersuchende Proteingemisch wurde mit der entsprechenden Menge vierfach konzentriertem Probenpuffer (Tabelle 19) versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die vorbereitete Probe und 6 µl eines Proteinmarkers (*Prestained Protein Ladder*; Thermo Fisher) auf das Gel aufgetragen. Zur Auftrennung der Proben wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet²⁵⁸. Bei dieser Methode ist die Polyacrylamidmatrix in ein Sammel- und ein Trenngel unterteilt. Diese unterscheiden sich sowohl in Porengröße als auch in ihrem pH-Wert (Tabelle 21). Die Proteine wurden im grobporigen Sammelgel zu einer distinkten Bande aufkonzentriert. Die Auftrennung nach Molmasse erfolgt anschließend im

engermaschigen Trenngel. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V unter Verwendung von SDS-Laufpuffer (Tabelle 15) als Elektrolyt durchgeführt. Die fertigen SDS-Gele wurden anschließend mit verschiedenen Ansätzen gefärbt oder zur Western Blot-Analyse verwendet.

3.1.3 Färbungen der Proteine im Polyacrylamid-Gel

Zur Darstellung der Proteine im Polyacrylamid-Gel wurde je nach vorhandener Proteinmenge im Gel und dem weiteren Verwendungszweck eine Coomassie-, Silber- oder Flamingo-Färbung durchgeführt.

Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Brilliant Blue-Färbung ist eine einfache, jedoch auch die am wenigsten sensitive Färbemethode²⁵⁹. Die Färbung des Gels mit der Coomassie-Färbelösung (Tabelle 22) erfolgt über Nacht. Anschließend wurde das Gel so lange mit Entfärbelösung (Tabelle 23) behandelt, bis der Hintergrund entfärbt und die Banden gut sichtbar waren.

Silberfärbung

Für Gele mit geringerem Proteingehalt, wurde die ca. 100-mal sensitivere Silberfärbung angewandt. Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Bindung von Silberionen an negativ geladene Gruppen der Proteine, welche in einem weiteren Schritt durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert werden. Für die Färbung wurde das Bio-Rad *Silver Staining Kit* benutzt. Dieses beruht auf dem ursprünglichen Protokoll für Silberfärbungen nach Merrill *et al.* (1981)²⁶⁰ und wurde nach beiliegender Anleitung wie in Tabelle 24 beschrieben verwendet.

Flamingo-Färbung

Waren Gele mit geringem Proteingehalt im Weiteren für massenspektrometrische Analysen vorgesehen, wurde anstelle der Silberfärbung eine Flamingo-Färbung durchgeführt. Hierzu wurde die *FlamingoTM Fluorescent Gel Stain*-Lösung von Bio-Rad verwendet. Die Flamingo-Färbelösung enthält einen in Lösung nicht-fluoreszierenden Farbstoff, der nach Bindung an Proteine mit einem Exzitationsmaximum von 512 nm und einem Emmissionsmaximum von 535 nm mit einem Fluoreszenz-Scanner detektiert werden kann. Zuerst wurden die Gele 2 Stunden (h) in Fixierlösung (Tabelle 25) inkubiert und anschließend über Nacht in einem abgedunkelten Gefäß in der Flamingo-Färbelösung (Bio-Rad) belassen, bevor die Detektion der Banden im Gel mit dem *VersaDocTM Imaging System 4000 MP* (Bio-Rad) durchgeführt wurde.

3.1.4 Western Blot Analyse

Bei der Western Blot-Analyse werden die zuvor im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteinen mit Hilfe einer senkrecht zum Gel angeordneten elektrischen Spannung auf eine Trägermembran übertragen und mittels Immundetektion nachgewiesen²⁶¹. Hierbei bleibt das Muster der vorherigen Auftrennung der Proteine im Gel erhalten, die mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Nachdem Towbin *et al.* (1979)²⁶¹ die Methode ursprünglich unter Verwendung einer Nitrocellulose-Membran beschrieb, führten Gültekin & Heermann 1988²⁶² die Polyvinyliden-Membran ein, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Der Transfer fand für 90 min bei einer Spannung von 100 V statt. Als Elektrolyt diente Blot-Puffer (Tabelle 9).

Zur Kontrolle gleicher Auftragsmengen an Protein wurden die Membranen vor dem Blockieren mit Ponceau S gefärbt. Ponceau S ist ein negativ geladenes Färbemittel, welches reversibel an positiv geladene Aminogruppen von Proteinen bindet. Zur Färbung wurde die Membran nach dem Blotting-Vorgang für 2-3 min mit 1 ml Ponceau S Färbelösung auf einem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz mit ddH₂O gewaschen und gescannt. Im Anschluss wurde die Membran zur Entfernung der Färbelösung zuerst mit 0,1 M (Molar) NaOH und anschließend mehrmals mit TBS-T-Puffer (Tabelle 17) gewaschen.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen wurde diese für 1 h mit 5% Milchpulver oder 5% BSA in TBS-T inkubiert. Der Protein-spezifische Erstantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in Milchpulver oder BSA in TBS-T eingesetzt und verblieb über Nacht und bei 4°C auf der Membran. Die Membran wurde dreimal mit TBS-T gewaschen und der Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP)-gekoppelte Zweitantikörper (1:5000 in Milchpulver/BSA) bei RT 60 min inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare) nach den Vorgaben des Herstellers entwickelt. Bei der ECL-Reaktion wird das im Reagenz enthaltene Luminol von der HRP oxidiert. Hierbei wird ein Chemilumineszenzsignal abgegeben, dass proportional zu Menge an HRP und damit dem vorhandenen Protein ist und auf einem Röntgenfilm detektiert wird.

Sollte die Membran zur erneuten Behandlung mit weiteren Antikörpern benutzt werden, mussten die aufgetragenen Erst- und Zweitantikörper entfernt werden. Dies wurde durch Inkubation der Membran mit einem mit einem Glycin-HCL-haltigen Puffer (pH 2,5) erreicht. Der Blot wurde dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen, um die ECL-Lösung zu entfernen, und dann 90 min mit dem Stripping-Puffer (Tabelle 16) inkubiert. Nach dem Strippen wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und konnte anschließend erneut blockiert und mit dem nächsten Erstantikörper behandelt werden.

3.1.5 Gewinnung des Maden-Exkretions-Produktes von *Lucilia sericata*

Zur Gewinnung des Maden-Exkretions-Produktes (MEP) von *Lucilia sericata* wurden sterile Maden im 2. Larvenstadium von der Firma Biomonde GmbH aus Barsbüttel (Hamburg) verwendet. Nach der Lieferung wurden die Maden für 3 Tage auf proteinfreiem Agar oder Schafblut-Agar bei 28°C kultiviert. Steriles Insektenzellmedium wurde hierzu mit 4%iger Agarose in bidestilliertem Wasser (ddH₂O) auf 1% Agarose-Endkonzentration eingestellt, mit Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) versetzt und in 50 ml *Tube Spin*[®] Bioreaktoren aliquotiert. Der bereits fertig gelieferte Schafblut-Agar wurde auf den Platten zerkleinert und portionsweise in Bioreaktoren aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C bis zur Verwendung. Die Insektenlarven wurden mit einer Federstahlpinzette unter sterilen Bedingungen in die mit Medium gefüllten Bioreaktoren umgesetzt. Zur Gewinnung von MEP wurden die Maden in ein neues Bioreaktorröhrchen ohne Medium überführt und mit 6 ml ddH₂O für 1h bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden das MEP über ein Teesieb in ein leeres 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen abgegossen, die Maden etwas getrocknet und für die nächste Sammlung erneut mit Wasser inkubiert. Insgesamt erfolgten vier Sammlungen, wobei der letzte Inkubationsschritt über Nacht stattfand. Die von den proteinfrei und auf Blut-Agar gezüchteten Maden gesammelten Sekrete wurden in einem 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen vereinigt und wie im Anschluss beschrieben fraktioniert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die weiteren Untersuchungen wurden mit proteinfrei hergestelltem MEP durchgeführt. Wurde MEP von Blut-Agar gezüchteten Maden untersucht, wird dies ausdrücklich benannt.

3.1.6 Ultrafiltration

Um die in einem Probengemisch enthaltenen Proteine zu konzentrieren und zu fraktionieren, wurde die Probe im Ultrafiltrations-Röhrchen (Millipore, USA) durch Membranen unterschiedlicher Ausschluss-Größe (10 kDa, 30 kDa) zentrifugiert. Beim Filtrationsvorgang werden Proteine, die größer als der entsprechende *cut-off* der Membran sind, zurückgehalten und konzentriert, während kleinere Proteine durch die Membran filtriert werden und sich im Dialysat wiederfinden. MEP wurde zuerst in Ultrafiltrations-Röhrchen mit einem *cut-off* von 30 kDa überführt, bei 4000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert und die zurückgehaltene Fraktion gesammelt. Das Dialysat wurde im nächsten Schritt in Ultrafiltrations-Röhrchen mit einer Ausschluss-Größe von 10 kDa wie beschrieben zentrifugiert. Die so erhaltenen Fraktionen (<10 kDa, 10-30 kDa und >30 kDa) wurden für die Analyse und verschiedene gerinnungsbezogene Versuche verwendet.

3.1.7 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie (*Ion-exchange chromatography*) ist eine Trennmethode zur Separation von Gemischen und von ionisierten Molekülen. Wie bei allen Chromatographieverfahren erfolgt die Auftrennung der Probe durch deren Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase. Im Falle der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (*High performance liquid chromatography*, HPLC) dient eine Flüssigkeit als mobile Phase, während die stationäre Phase eine unlösliche polymere Matrix mit chemisch gebundenen ionischen Gruppen ist. Entsprechend dieser ionischen Gruppen lassen sich die Anionenaustausch-Chromatographie (positiv geladene Gruppen) und die Kationenaustausch-Chromatographie (negativ geladene Gruppen) unterscheiden. Während der Ionenaustausch-Chromatographie binden die im Substanzgemisch enthaltenen geladenen Proteine unterschiedlich stark an die stationäre Phase. Je stärker geladen ein Protein ist, umso stärker wird auch die Bindung an das entgegengesetzt geladene Säulenmaterial erfolgen. Anschließend wird die Säule mit dem Elutionspuffer gespült. Durch kontinuierliche Änderung von pH-Wert und/oder Salzkonzentration des Elutionspuffers erfolgt die Eluierung der gebundenen Proteine in der Reihenfolge ihrer Bindungsstärke (die schwach gebundenen Proteine eluieren zuerst).

Die hier beschriebene Fraktionierung wurde im Fraunhofer Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (IME) in der Projektgruppe „Bioressourcen“ durchgeführt. Den ersten Schritt zur Fraktionierung des Probenmischungs stellte die Auftrennung der Proteine mit einem Anionenaustauscher (*YMC-BioPro QA*, YMC Co., Japan) dar. Die in einem Verhältnis von 1:1 mit 0,2% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat (CHAPS) verdünnte Probe wurde in Puffer A (5 mM Tris, pH 8; 0,1% CHAPS) aufgenommen, mit dem die Säule äquilibriert war. Die Elution der Probe von der Säule erfolgte mit Puffer B (5 mM Tris, pH 8; 0,0% CHAPS; 1 M NaCl) bei einer Flussrate von 0,5 ml pro Minute. Der Gradient stieg innerhalb von 28 min auf 50%igen Puffer B und in weiteren 2 min auf 100%igen Puffer B, wo er für weitere 10 min aufrechterhalten wurde. Die Detektion der Proteine fand bei 280 nm statt. Zudem wurden Konduktivität und relative Fluoreszenzemission im Verlauf der Auftrennung aufgezeichnet. Während der Elution der Probe wurden die Proteine in Fraktionen gesammelt.

Der während der Elution der Probe vom Anionenaustauscher gesammelte Durchfluss wurde in einem weiteren Schritt auf einen Kationenaustauscher (*YMC-BioPro SP*, YMC Co., Japan) geladen, um alle nicht am Anionenaustauscher gebundenen Proteine zu trennen. Das für die Fraktionierung gewählte Programm wurde analog zu dem der Anionenaustausch-Chromatographie gewählt und der pH des Puffer C (5 mM Tris; 1 M NaCl) auf pH 7 eingestellt.

Die gesammelten Fraktionen wurden im Weiteren in gerinnungsrelevanten Experimenten untersucht.

3.1.8 Massenspektrometrie und Datenbankrecherchen

Zur Auftrennung und Identifikation von Proteinen wurde eine massenspektrometrische Analyse im Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena durchgeführt. Das verwendete System *Synapt HDMS Tandem Mass Spectrometer* (Waters, UK) vereint Flüssigchromatographie (*Liquid chromatophraphie*, LC) mit Ionenmobilitäts-Spektrometrie (IMS) und Massenspektrometrie (MS).

Als erster Schritt der Analyse wurden 20 µl des zu untersuchenden Proteingemisches mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Flamingo-Färbung sichtbar gemacht (Abbildung 7). Anschließend wurden die Banden mittels *ExQuest Spot-Cutter* (Bio-Rad) ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und die trypsinisierten Peptide extrahiert. Im Weiteren wurde das Probengemisch mittels LC aufgetrennt. Prinzipiell verläuft die LC analog zu der unter 3.1.7 beschriebenen HPLC, wobei der Druck, mit dem das Probengemisch injiziert wird, im Falle der LC geringer ist.

Bevor die mittels LC separierte Probe in das IMS gespeist wurden, mussten mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) zunächst Ionen erzeugt werden. Die gebildeten Ionen drifteten im IMS im elektrischen Feld gegen ein Gas und erreichen abhängig von Masse und Struktur unterschiedliche Driftgeschwindigkeiten, mit denen sie zeitlich nacheinander auf einen Detektor treffen. Im Anschluss an die Trennung mittels IMS erfolgte die weitere Separation der Ionen im MS.

Das Prinzip der Massenspektrometrie besteht in der Auftrennung von Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z). Abhängig von Molekulargewicht und Ladung werden Substanzen in einem Substanzgemisch unterschiedlich stark in einem elektrischen Feld abgelenkt und treffen so voneinander getrennt auf ein Detektionssystem, wo sie qualitativ und quantitativ erfasst werden.

Die gesammelten MS-Spektren wurden im Anschluss mit einer dem Max-Planck-Institut hauseigenen Transkriptom-Datenbank von *Lucilia sericata* und zum anderen mit bekannten Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)²⁶³ verglichen.

Des Weiteren wurde ein Vergleich identifizierter Proteine mit bekannten Aminosäuresequenzen aus der UniProtKB-Datenbank²⁶⁴ mittels *Constraint-based Multiple Alignment Tool* (COBALT) durchgeführt²⁶⁵.

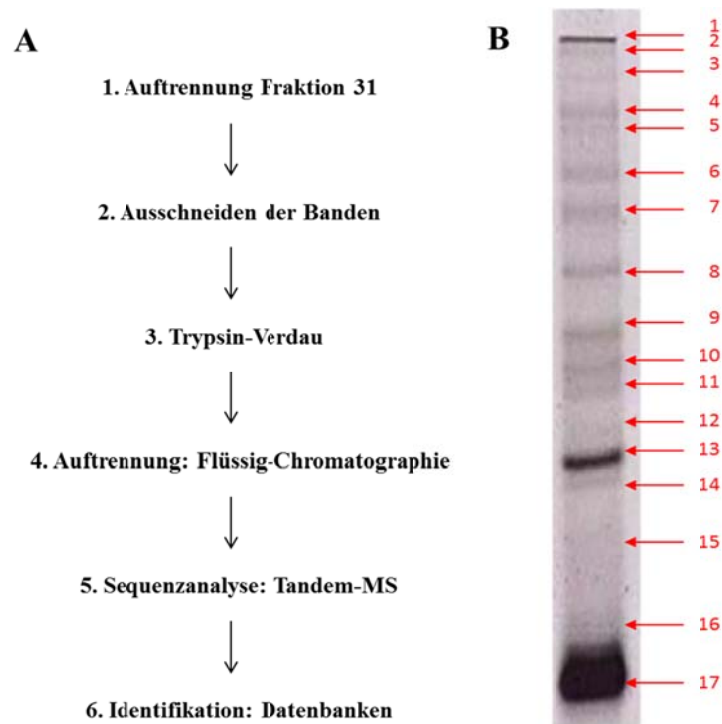


Abbildung 7: Identifikation aktiver Komponenten in Fraktion 31.

(A) Schematischer Ablauf der einzelnen Teilschritte im Rahmen der Identifizierung der in Fraktion 31 enthaltenen Proteine und Peptide. (B) Zur Analyse ausgeschnittene Banden aus Fraktion 31.

3.1.9 Renaturierung und Aktivierung rekombinanter Proteine

Ein gängiges Verfahren zur Renaturierung von Proteinen ist die Dialyse, d.h. der Austausch niedermolekularer Substanzen über eine Dialysemembran²⁶⁶. Diese ermöglicht z.B. einen Austausch von stark denaturierendem Harnstoff, welcher häufig als Pufferzusatz zur Aufreinigung rekombinanter Proteine eingesetzt wird, gegen nicht denaturierende Pufferzusätze. Während kleine Substanzen wie Salze die Membran passieren können, werden größere Substanzen, wie Proteine von ihr zurückgehalten. Somit kann der Puffer, indem das Protein gelöst ist, ausgetauscht und eine Renaturierung des Proteins herbeigeführt werden. Hierzu wurden 500 µl der Probe mit 2-Mercaptoethanol (3% v/v) versetzt und 24 h in dem System Float-A-Lyzer G2 (*Molecular weight cut off* 0,5-1 kDa, Spectrum Labs) bei 4°C gegen 1l Dialysepuffer (Tabelle 10) dialysiert. Dabei wurde nach 3 und 6 h ein neuer Dialysepuffer eingesetzt.

Das so erhaltene Dialysat wurde mit Trypsin-Agarose (10% v/v) für verschiedene Zeitintervalle auf einem Roller-Mixer RT inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Probe 5 min bei 13 000 x g zentrifugiert und ein Teil des Überstandes für eine Analyse mittels SDS-PAGE, chromogenem Serinprotease-Aktivitätstest und Clot-Lyse-Test verwendet. Nach der Zentrifugation sollte der Überstand frei von Trypsin-Agarose sein. Trotzdem wurden alle mit dem

Dialysat durchgeführten Schritte zudem mit Dialysepuffer durchgeführt, um Effekte durch Puffersubstanzen oder Trypsin-Verunreinigungen in den Proben auszuschließen.

3.2 Bestimmung der Gerinnungs-Aktivität

Um die Gerinnungs-Aktivität einer Probe zu bestimmen wurden unterschiedliche isolierte Testsysteme verwendet. Die Gerinnungszeit von Plasma wurde dabei sowohl photometrisch (Clot-Lyse-Test) als auch mechanisch (Kugelkoagulometer) bestimmt. Vollblut wurde mittels Thromboelastographie im ROTEM®-System analysiert. Außerdem wurden für verschiedene Gerinnungsproteasen spezifische chromogene Substrate eingesetzt, um die in der Probe enthaltenen Proteasen zu charakterisieren.

3.2.1 Herstellung von Citratplasma

Mit Citrat (Endkonzentration 10 mM) versetzte Blutproben von zehn gesunden Spendern wurden vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin (Fachbereich Medizin, Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung von Thrombozyten-reichem Plasma (*Platelet rich plasma*, PRP) wurden die Proben für 20 min bei 150 x g bei RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Thrombozytenzahl auf 300 000 Zellen pro µl Plasma eingestellt. Das Plasma wurde innerhalb der nächsten 2 h für Experimente verwendet. Die im Röhrchen verbliebene Blutprobe wurde für die Herstellung von Thrombozyten-armem Plasma (*Platelet poor plasma*, PPP) bei 2.800 x g und RT für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, gemischt und die aliquotierten Thrombozyten-armen Plasmaproben sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Plasma bei -80°C bis zu seiner Benutzung gelagert.

3.2.2 Turbidimetrie

Mit Hilfe der Turbidimetrie lässt sich der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Gerinnungszeit von Citratplasma photometrisch untersuchen. Hierzu wird die Trübung des Plasmas nach Rekalifizierung und anschließender Lyse durch Zugabe t-PA bei 405 nm detektiert (Clot-Lyse-Test). Im Zuge der Gerinnung steigt die Absorption nach Rekalifizierung bis auf ein Maximum an. Dieses stellt den Zeitpunkt der vollständigen Gerinnung des Plasmas dar und wurde als Gerinnungszeit in mOD detektiert. Die anschließende durch t-PA vermittelte Lyse des Fibrinogens geht mit einer Abnahme der Absorption bei 405 nm einher (Abbildung 8).

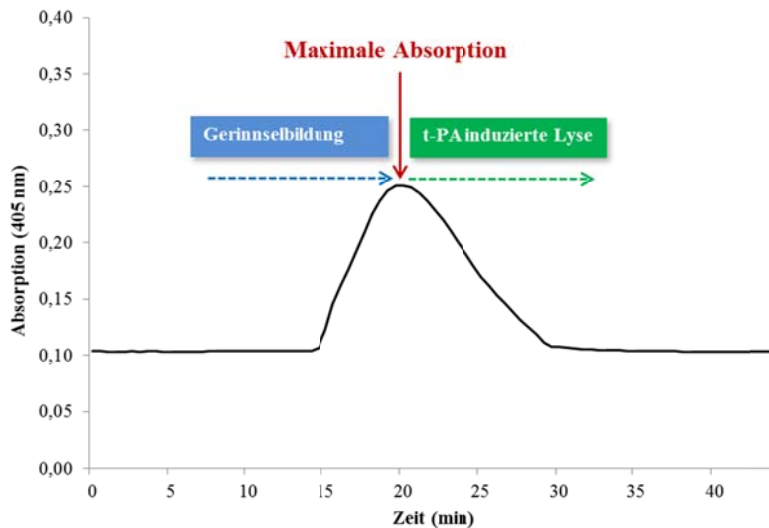


Abbildung 8: Turbidimetrische Bestimmung der Gerinnungszeit von Citratplasma

Die Gerinnungszeit von Citratplasma wird anhand der Trübung des Plasmas nach Rekalifizierung und anschließender Lyse durch Zugabe des gewebspezifischen Plasminogenaktivators (t-PA) im Clot-Lyse-Test bestimmt.

Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde 1 h bei 37°C mit 3% BSA (w/v) in TBS blockiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche zu maskieren. Alle eingesetzten Substanzen wurden mit 0,1 M Imidazol-Puffer verdünnt. In einem Gesamtvolumen von 100 µl wurden steigende Konzentrationen der zu untersuchenden Proben mit t-PA (0,1 µg/ml) und humanem Thrombozyten-armen Citratplasma (1:3) für 5 min bei 37°C inkubiert. Von den mittels Ionenaustausch-Chromatographie erzeugten Proben wurden jeweils 10 µl eingesetzt, wobei die Proben 27-40 wegen des zu erwartenden NaCl-Gehaltes zuvor 1:3 verdünnt werden mussten. Anschließend wurde die Gerinnungsbildung durch Zugabe von Calciumchlorid (Endkonzentration 6 mM) gestartet. Zur Untersuchung der in MEP enthaltenen Protease-Typen wurden die Proben 30 min bei 37°C mit verschiedenen Serinprotease-Inhibitoren von unterschiedlicher Spezifität, wie Phenylmethylsulfonylfluorid, Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen, Chymostatin, Antithrombin, C1-Esterase-Inhibitor, Corn-Trypsin-Inhibitor, H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketon oder rHA-Infestin-4 vorbehandelt (Tabelle 1). Das verwendete Antithrombin war zuvor in der Arbeitsgruppe nach dem Protokoll von Miller-Andersson *et al.* (1974)²⁶⁷ mittels Affinitäts-Chromatographie aus humanem Plasma isoliert worden. Die Absorption wurde dabei für 45 min bei 405 nm mit der *Gene5 Software* (BIO-TEK) gemessen.

Zudem sollte der Einfluss von MEP auf Thrombozyten im Zuge der plasmatischen Gerinnung untersucht werden. Hierzu wurde die Gerinnungszeit von Thrombozyten-reichem Plasma mit der von Thrombozyten-armen Plasma nach Zugabe der zu untersuchenden Proben im beschriebenen experimentellen Ansatz verglichen.

Tabelle 1: Spezifitäten und Molekulargewichte der eingesetzten Serinprotease-Inhibitoren.

Inhibitor	MW (Da)	Spezifität
C1-Esterase-Inhibitor	105 000	C1s/C1r (Komplement), FXIIa, FXIa, Plasma Kallikrein ²⁶⁸
Chymostatin	600	Chymotrypsin und Chymotrypsin-like Proteasen, Chymase, lysosomale Cysteinproteasen ^{269,270}
Corn-Trypsin-Inhibitor (CTI)	12 028	FXIIa, Trypsin ^{271,272}
H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethyketon (PPACK)	Ca. 600	FXIIa, Plasma Kallikrein ^{229,273}
Hirudin	Ca. 7 000	Thrombin ^{164,274}
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	174,2	Chymotrypsin, Trypsin, Thrombin, Cysteinproteasen ²⁷⁵
rHA-Infestin-4 (Infestin)	73 000	FXIIa ^{276,277,278}
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (SBTI)	20 100	Plasma Kallikrein, FXIa ^{279,280,281}
Antithrombin	58 200	Thrombin, FXa, FXIa, Plasma Kallikrein, Trypsin ^{213,214,215,282,283}

(MW=Molekulargewicht, Da=Dalton, F=Faktor, a=aktiviert)

Um die Beteiligung der Kontakthasenaktivierung beim Gerinnungsvorgang genauer zu untersuchen, wurden außerdem Mangelplasmen von Kontaktphasen-Proteinen Faktor XII, Faktor XI, Präkallikrein und hochmolekularem Kininogen (Haemochrom diagnostica) eingesetzt. Als Kontrollen wurden die jeweils fehlenden Proteine in physiologischen Plasmakonzentrationen zugesetzt, jedoch wegen der versuchsbedingten Verdünnung des Plasmas ebenfalls 1:3 verdünnt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Plasmakonzentrationen und eingesetzte Mengen der Kontaktphasen-Proteine.

Kontrolle	Plasmakonzentration (mg/L)	Eingesetzte Konzentration (µg/ml)
Präkallikrein	35-50	30
Faktor XII	15-47	15
Faktor XI	3-7	2
Hochmolekulares Kininogen	74-84	20

Plasmakonzentrationen nach^{240,284}

3.2.3 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (*Activated Partial Thromboplastin Time*, APTT) dient der Untersuchung des intrinsischen Gerinnungsweges und erfasst zudem die Menge an gerinnbarem Fibrinogen. Das Prinzip beruht dabei auf der Kontaktphasen-Aktivierung durch Oberflächenaktivatoren wie Kaolin oder Kephalin. FXIIa aktiviert dann nach Rekalifizierung FXI, was letztendlich zur Bildung von Fibrin führt. Die Messung der Gerinnungszeit im APTT-Test erfolgte dabei mechanisch mittels Kugelkoagulometer. In dem rotierenden Reaktionsgefäß wird eine Stahlkugel in der Lösung durch ein Magnetfeld in der untersten Position gehalten. Kommt es im Zuge der Gerinnung zur Fibringelbildung in der Lösung, wird die Stahlkugel im

Fibrinclot eingeschlossen und verändert ihre Position im Magnetfeld, was durch eine Stoppuhr registriert wird.

MEP wurde in 0,1 M Imidazol verdünnt und 20 µl dieser Lösung mit 50 µl Thrombozyten-armem Citratplasma für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde weitere 3 min mit 50 µl *Actin FS*[®] (Sojaphosphatide in Ellagsäure) bei 37°C inkubiert bevor die Gerinnung durch Rekalifizierung (40 mM CaCl₂) initiiert wurde. Anstelle des Normalplasmas wurden in diesem Test die Gerinnungszeiten von FXI- und FXII-defizienten Plasmen untersucht.

3.2.4 Thromboelastometrie

Das „klassische Gerinnungssystem“ wurde 1994 durch Monroe *et al.* (1994)²⁸⁵ von einem „Zellbasierten Modell der Hämostase“ erweitert. Gerinnungstests, die die Gerinnungszeit in Plasma untersuchen, können den Einfluss zellulärer Elemente wie Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten nicht ausreichend darstellen. Um Gerinnungstests in einem möglichst physiologischen Kontext durchzuführen, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bernd Engelmann (Institut für Laboratoriumsmedizin der Universität München) eine Thromboelastometrie (TEM) in Vollblut durchgeführt.

Bei der Rotations-Thromboelastometrie (ROTEM[®]) wird ein an einem dünnen Draht frei hängender Stempel in ein kleines Cup mit Vollblut eingetaucht und bewegt (Abbildung 9). Solange das Blut flüssig ist, bewegt der Stempel sich ungehindert. Kommt es zur Blutgerinnung und Fibrinbildung, werden die Bewegungen des Stempels umso stärker gehemmt, je stabiler das Gerinnsel wird. Die Drehung des Stempels wird dabei optisch detektiert, aufgezeichnet und analysiert^{286,287}.

Um eine Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges während der Probennahme zu verhindern, wurden 10% Trinatriumcitrat und 0,5 µg/ml CTI in einer Spritze vorgelegt. Von dem frisch entnommenen Blut wurden 270 µl zusammen mit 30 µl der zu untersuchenden Proben in einer Küvette gemischt. Die Gerinnung des Blutes wurde durch Rekalifizierung mit 30 µl CaCl₂ in HEPES-Puffer (Tabelle 12) gestartet und die Gerinnungszeiten für 60 min mit einem ROTEM[®]-Analyzer (Pentapharm) aufgezeichnet.

Für die Untersuchung wurde die Gerinnungszeit (*Clotting time*, CT) als Parameter festgelegt. Der CT-Wert gibt die Zeit von der Zugabe des Aktivators bis zur Gerinnselbildung an und ist somit ein Maß für die Gerinnungsaktivierung einer Probe (Abbildung 9).

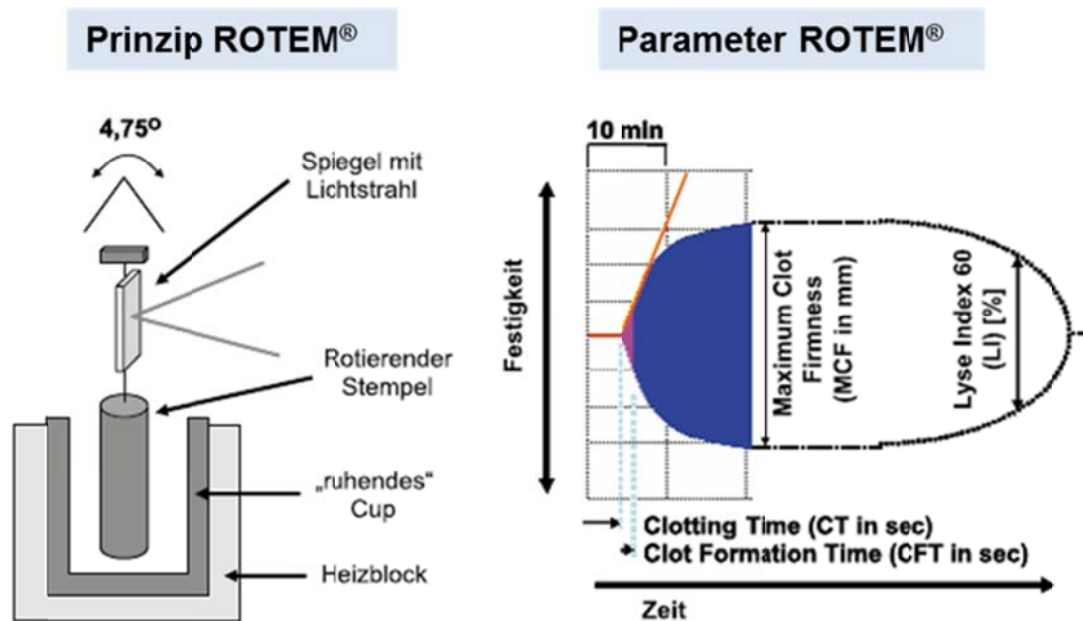


Abbildung 9: Prinzip und Parameter der ROTEM®-Analyse^{286,287}.

3.2.5 Bestimmung der Serinprotease-Aktivität

Die Gruppe der Serinproteasen stellt die wichtigste Enzymklasse im Prozess der plasmatischen Gerinnung dar. Die globale Serinprotease-Aktivität wurde in einem isolierten System mit Hilfe eines zunächst chromogenen Substrats untersucht, dass durch die enzymatische Spaltung in ein farbiges Produkt umgewandelt wird, dessen Absorption bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann.

Unspezifische Bindungsstellen einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden durch eine einstündige Inkubation mit 3% BSA (w/v) in TBS bei 37°C blockiert. Die Aktivität der enthaltenen Serinproteasen wurde in HBS-Puffer (Tabelle 11) mit 0,4 mM chromogenen Substrat S-2288 (Gesamtvolumen 100 µl) gemessen. Steigende Konzentrationen an unbehandeltem sowie zuvor 5 min bei 95°C gekochtem MEP wurden so getestet. Zur Hemmung spezifischer Serinproteasen wurden die zu untersuchenden Proben für 30 min bei 37°C mit den in Tabelle 1 genannten Inhibitoren vorbehandelt. Die Absorption wurde für 60 min bei 405 nm mit Hilfe der *Gene5 Software* (BIO-TEK) gemessen und analysiert.

3.2.6 Nachweis aktiver Serinproteasen mit fluoreszenter Sonde

Serine im katalytischen Zentrum aktiver Serinproteasen wurden durch den Einsatz einer spezifischen Fluorophosphonat-Sonde (*ActivX TAMRA FP Serine Hydrolase Probe*, Thermo Scientific) markiert. Hierzu wurden 25 µg Protein in PBS für 30 min bei RT mit 1 µl Sonde im Dunkeln inkubiert, 5 min mit vierfach konzentriertem Probenpuffer gekocht und anschließend

mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Serinproteasen erfolgte mit dem *VersaDocTM Imaging System 4000 MP* (Bio-Rad) bei 532 nm. Die Proteinbanden im Gel wurden anschließend zur Überprüfung der geladenen Proteinmenge in den einzelnen Proben mit Silberfärbung dargestellt.

3.2.7 Analyse der Kallikrein-Aktivität

Kallikrein als Hauptakteur des Kontaktphase-Systems spielt eine besondere Rolle bei der Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges. Um die Aktivierung des intrinsischen Gerinnungswegs zu untersuchen, wurde zunächst die Kallikrein-Aktivität im isolierten System mit dem für Kallikrein spezifischen chromogenen Substrat S-2302 bestimmt. In einem ersten Schritt wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte für 1 h mit 3% BSA (w/v) in TBS bei 37°C blockiert. Die Aktivität der Proben wurde in HBS-Puffer (Gesamtvolumen 100 µl) mit dem chromogenen Substrat S-2302 bei 37°C für 1 h gemessen. Im Weiteren wurde der Substratumsatz nach zusätzlicher Supplementation des Systems mit hochmolekularem Kininogen (55 nM) und Zinkchlorid (50 µM) allein oder in Kombination mit Präkallikrein (20 nM) untersucht. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Proben mit den in Tabelle 1 beschriebenen Serinprotease-Inhibitoren behandelt. Die Absorption bei 405 nm wurde für 60 min mit Hilfe der *Gene5 Software* (BIO-TEK) detektiert und analysiert.

3.2.8 Untersuchung der FXIIa-Aktivität

Neben Kallikrein ist der aktivierte Faktor XII (FXIIa) die zentrale Protease des intrinsischen Gerinnungsweges. Faktor XIIa wird physiologisch durch den C1-Esterase-Inhibitor gehemmt¹⁸⁴. Neben der Aktivierung von Proteasen kann auch die Inaktivierung ihrer Inhibitoren zu einer gesteigerten Gerinnungs-Aktivität führen.

Die der C1-Esterase-Inhibitor Aktivität wurde indirekt über dessen Hemmung der FXIIa-Aktivität bestimmt. Zur Bestimmung der FXIIa-Aktivität wurde 20 nM FXIIa wurden mit 150 nM unbehandeltem oder vorbehandeltem C1-Esterase-Inhibitor in einem Gesamtvolumen von 100 µl und in HBS-Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Vorbehandlung des Inhibitors wurde dieser für 30 min bei 37°C mit den zu untersuchenden Proben inkubiert. Nach Zugabe des chromogenen Substrates S-2302 (2 mM), wurde die Absorption bei 405 nm mit Hilfe der *Gene5 Software* (BIO-TEK) über 1 h und bei 37°C gemessen.

3.2.9 Thrombin-Aktivität

Die Thrombin-Aktivität wurde in 50 nM Tris/0,2% BSA mit 2 mM chromogenen Substrat S-2238 (Gesamtvolumen 100 µl) für 15 min bei 37°C und 405 nm gemessen. Als Positivkontrolle diente

Thrombin²⁸⁸. Die Detektion und Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der *Gene5 Software* (BIO-TEK). Zur Hemmung der Thrombinaktivität in den zu untersuchenden Proben wurden die Reaktionsansätze vor der Aktivitäts-Bestimmung 30 min bei 37°C mit steigenden Hirudin-Konzentrationen vorbehandelt.

3.2.10 Plättchenaggregometrie

Plättchenaggregometrie ist die Standardmethode zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion²⁸⁹. Hierzu wird die Zunahme der Lichttransmission in Thrombozyten-reichem Plasma (*Platelet rich plasma*, PRP) nach Zugabe verschiedener Agonisten wie Thrombin oder Kollagen bestimmt. Eine Aktivierung der Thrombozyten geht mit einer Aggregation der Zellen einher, was sich in einem Anstieg der Lichttransmission ausdrückt.

PRP (225 µl) wurde für 2 min bei 37°C inkubiert, bevor die Aggregation nach Zugabe von 25 µl MEP, sowie Thrombin oder Kollagen als Positivkontrollen, gestartet. Die Aggregation wurde gegen Thrombozyten-armes Plasma über 11 min bei 37°C im *Platelet aggregation profiler PAP 8E* (Bio/Data) gemessen und die finale Aggregation (%) mit der entsprechenden Software analysiert.

3.2.11 Enzymatische Aktivierung und Inaktivierung gerinnungsrelevanter Proteine

Aktivierung und Inaktivierung isolierter Faktoren

Gerinnungsfaktoren und deren Kofaktoren sind Zymogene, die erst durch limitierte proteolytische Spaltung aktiviert werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob MEP die Kontaktphasen-Proteine FXII, Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen spalten und somit aktivieren können. Hierzu wurden Faktor XII, Präkallikrein und hochmolekulares Kininogen mit MEP für 60 min bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrollen dienten hier die physiologischen Aktivatoren der Proteine (Faktor XIIa und Präkallikrein).

Bei Inhibitoren kann deren proteolytische Spaltung zum Funktionsverlust führen. C1-Esterase-Inhibitor, der wichtigste Inhibitor der Kontaktphasen-Proteine, wurde mit MEP konzentrations- und zeitabhängig bei 37°C inkubiert. Mit dem gleichen Vorgehen wurde der Einfluss der Proben auf Antithrombin untersucht. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit vierfach konzentriertem Probenpuffer versetzt und eine wie unter 3.1.2 beschriebene SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt.

Aktivierung und Inaktivierung in Plasma

Der Einfluss von MEP auf die Kontaktphasen-Proteine Faktor XII und hochmolekulares Kininogen wurde im Plasma mittels Western Blot-Analyse untersucht. Hierzu wurden 0,2 µl Plasma für verschiedene Zeitintervalle mit MEP bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Reaktionsansätze mit vierfach konzentriertem Probenpuffer versetzt, gekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Immundetektion von Faktor XII und hochmolekularem Kininogen wie unter 3.1.4 beschrieben.

3.3 Bestimmung der fibrinolytischen Aktivität

3.3.1 Messung der Plasmin-Aktivität

Plasminogen wurde nach dem Protokoll von Deutsch *et al.* (1970)²⁹⁰ aus humanem Plasma isoliert und mit den zu untersuchenden Proben für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit SDS-Probenpuffer gestoppt und mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Plasmin-Aktivität von Plasminogen nach 15 min Inkubation mit den entsprechenden Proben wurde mit dem chromogenen Substrat S-2251 (0,3 mM) bei 37°C und 405 nm für 15 min mit der *Gene5 Software* (BIO-TEK) detektiert. Als Positivkontrolle wurde Plasminogen unter den beschriebenen Bedingungen mit t-PA behandelt.

3.3.2 Untersuchung fibrinogenolytischer und fibrinolytischer Eigenschaften

Humanes Thrombozyten-armes Citratplasma wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl 1:3 verdünnt und durch Rekalifizierung (Endkonzentration 27 mM) bei 37°C geronnen, wobei die Absorption für 45 min bei 405 nm detektiert wurde. Die Zeit bis zur Fibrinolyse wurde nach Zugabe von 0,1 M Imidazolpuffer und t-PA (Positivkontrolle) oder MEP bei 37°C und 405 nm über 36 h mit der *Gene5 Software* (BIO-TEK) bestimmt und berechnet als Zeit bei halbmaximaler Lyse des Gerinnsels. Fibrinogen, Plasminogen und Thrombin, alleine oder in Kombination, wurden für verschiedene Zeitintervalle mit MEP oder t-PA bei 37°C inkubiert. Als Puffer wurde hier TBS verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt und die Proben mittels SDS-PAGE analysiert.

3.4 Zellkulturtechnische Methoden

3.4.1 Einführung in die verwendeten Zelltypen

3.4.1.1 Murine Fibroblasten (L929)

Die L929 Zellen wurden 1948 aus murinem Binde- und Fettgewebe isoliert und waren eine der ersten Zelllinien, deren kontinuierliche Kultur im Labor etabliert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Zelllinie stellvertretend zur Untersuchung von Fibroblastenfunktionen genutzt.

3.4.1.2 Humane umbilikale venöse Endothelzellen

Humane umbilikale venöse Endothelzellen (*Human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) sind makrovaskuläre Endothelzellen, die wie unter 3.2.3 beschrieben aus der humanen Nabelschnurvene isoliert wurden. Seit Jaffe *et al.* (1973)²⁹¹ geeignete Kulturbedingungen für diese Primärzelllinie beschrieb, werden sie standardmäßig als Zellmodell zur Untersuchung von unter anderem Endothelfunktionen, Inflammation und Immunität verwendet. Die im Weiteren beschriebenen Versuche wurden mit HUVEC bis Passage 4 durchgeführt.

3.4.2 Isolierung und Kultivierung primärer Endothelzellen aus der Nabelschnurvene

Die Isolierung primärer Endothelzellen aus der Nabelschnurvene erfolgte wie bei Jaffe *et al.* (1973)²⁹¹ beschrieben und wurde 24 h nach der Entnahme durchgeführt. Die Nabelschnüre wurden mit einer sterilen Kompresse gesäubert und auf Verletzungen untersucht. Ein Ende der Nabelschnur wurde mit einem sterilen Einmalskalpell um ca. 1 cm gekürzt, eine Knopfkanüle in die Vene eingeführt und diese mit einem Kabelbinder fixiert. Die Kanüle wurde mit einem Dreiwegehahn verbunden und die Vene mit 50 ml *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, PromoCell) gespült. Das andere Ende der Nabelschnur wurde ebenfalls gekürzt und anschließend ein mit einem Stück Schlauch verbundener Nadeladapter in die Vene eingeführt und fixiert. Nach Verschließen des Schlauchstücks mit einer Klemme wurde über den Dreiwegehahn Kollagenaselösung (0,05% w/v in HBSS) in die Vene eingespritzt. Die Nabelschnur wurde mit Kollagenaselösung für 20 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die abgelösten Zellen mit 50 ml HBSS aus der Vene in ein 50 ml Röhrchen mit 1 ml FCS ausgespült und durch fünfminütige Zentrifugation bei 250 x g pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml Wachstumsmedium mit 20% FCS resuspendiert und die Zellen anschließend auf eine zuvor mit Rattenschwanzkollagen (50 µg/ml) beschichtete Schale überführt. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 ml frisches Wachstumsmedium in die Kulturschale gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert bis erneut 80-90% Konfluenz erreicht wurde.

3.4.3 Erhaltung der Zellkultur

Zur Erhaltung der Zellkultur wurden die Zellen bei 80-90% Konfluenz auf neue Kulturschalen mit frischem Wachstumsmedien (Tabelle 20) ausgesät.

Vor der Ablösung der Zellen wurden diese zweimal mit sterilem Phosphatpuffer (*Phosphate-buffered saline*, PBS, Tabelle 13) gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml *TrypLETM Express* wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ von der Kulturschale gelöst. Die Reaktion wurde mit 10 ml Wachstumsmedium abgestoppt und die Zellsuspension 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Wachstumsmedium resuspendiert und portioniert auf neue kollagenbeschichtete Kulturschalen verteilt.

3.4.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden diese bei -80°C eingefroren. Einen Tag vor Beginn der Konservierung wurde das Medium erneuert. Für das Einfrieren der Zellen wurden zwei steril filtrierte Lösungen mit folgender Zusammensetzung eingesetzt:

Lösung A: Wachstumsmedium mit 20% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Lösung B: Wachstumsmedium mit 40% Fetales Kälberserum (FCS)

Lösung A (500 µl) wurde in sterilen Kryoröhrchen vorgelegt und bis zur Verwendung auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und zur Ablösung von der Kulturschale mit 1 ml *TrypLETM Express* im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 10 ml Wachstumsmedium wurden die Zellen 5 min bei 250 x g zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet in 1 ml kalter Lösung B resuspendiert. Die Zellsuspension (500 µl) wurden in die vorbereiteten Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wies somit eine Endkonzentration von 10% DMSO (v/v) und 20% FCS (v/v) auf. Die Kryoröhrchen wurden im Anschluss zur langsamen Konservierung für mind. 2 h in einen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter bei -80°C aufbewahrt, wodurch sie mit einer Geschwindigkeit von -1°C/min auf -80°C herunterkühlen. Für eine dauerhafte Konservierung wurden die Zellen anschließend in einen Stickstofftank (-180°C) überführt.

3.4.5 Auftauen von Zellen

Das aus dem Stickstofftank entnommene Kryoröhrchen wurde im Wasserbad bei 37°C unter Schütteln aufgetaut und der Inhalt des Röhrchens zügig in 10 ml Wachstumsmedium überführt. Die Zellen wurden dann 5 min bei 250 x g zentrifugiert, das entstandene Zellpellet in 10 ml frischem Wachstumsmedium resuspendiert und in eine zuvor mit Rattenschwanzkollagen (50 µg/ml) beschichtete Kulturschale ausgesät. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und

5% CO₂ inkubiert bis 80-90% Konfluenz erreicht war und eine wie unter 3.2.2 beschriebene Passagierung notwendig wurde.

3.4.6 Zellzählung

Um für die im Folgenden dargestellten Experimente eine definierte Zellzahl aussähen zu können, wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS und der Ablösung mit *TrypLETM Express* mit Hilfe des Zellzählers TC10 (Bio-Rad) gezählt. Hierzu wurden 10 µl einer Zellsuspension auf die zum Zählgerät passenden Objektträger gegeben und in die entsprechende Öffnung des Gerätes eingeführt. Der angezeigte Messwert beschrieb die Anzahl an Zellen in einem ml Originallösung.

3.4.7 Zytotoxizitätstest

Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität (LDH) im Zellüberstand ist eine gängige Methode um zytotoxische Effekte von Stimulanzen auf Zellen zu untersuchen. Eine erhöhte Enzymaktivität korreliert hierbei mit einem Anstieg an Zell- oder Gewebeschädigungen²⁹². Das Prinzip beruht dabei auf der Oxidation von Lactat zu Pyruvat in einem ersten LDH katalysierten Schritt und der in einem zweiten Schritt folgenden Reduktion des Tetrazoliumsalzes Iodonitrotetrazoliumchlorid zu Formazan bei gleichzeitiger Oxidation von NADH/H⁺ durch den enthaltenen Katalysator Diaphorase. Die Menge an gebildeten Formazan korreliert hierbei direkt mit der Aktivität der LDH im Zellüberstand und ist somit proportional zur Zytotoxizität eines Stimulus²⁹³.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von MEP auf HUVEC und L929-Zellen wurden 10 000 Zellen auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und bis zur Konfluenz bei im Brutschrank inkubiert. Zur Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in Phenolrot-freiem Medium mit 0,5% FCS für 48 h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ stimuliert. Als Positivkontrolle wurde 0,1% Triton-X-100 (v/v) und als Negativkontrolle serumfreies Medium verwendet. Nach Beendigung der Stimulationszeit wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte 10 min bei 250 x g zentrifugiert und 50 µl der zellfreien Überstände auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Nach Zugabe von 50 µl LDH-Substratmix (Roche) wurde die Bildung des Formazans bei 500 nm detektiert. Der Anteil an Zytotoxizität wurde dann aus den gemessenen Absorptionswerten der Kontrollen und der Stimulationen nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = ((\text{Stimulanzen} - \text{Negativkontrolle}) / (\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle})) \times 100$$

3.4.8 Viabilitätsbestimmung

Um die Zahl der lebensfähigen Zellen zu ermitteln, wurde im Zellproliferations-Testkit XTT (AppliChem) das 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid-Salz (XTT) verwendet. Dieses wird durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase in Anwesenheit des Elektronentransporters Phenazinmethosulfat zu einem wasserlöslichen, orangenen Formazan-Farbstoff reduziert. Ausschließlich mitochondriale Enzyme lebender Zellen können das XTT in Formazan umwandeln, sodass die bei 450 nm gemessene Absorption der Zahl der metabolisch-aktiven Zellen direkt proportional ist²⁹⁴.

Zur Bestimmung der Proliferation wurden 3 000 Zellen pro Vertiefung auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und 16 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Vier Stunden vor Beginn der Stimulation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium inkubiert um alle Zellen in die G₀-Phase des Zellzyklus zu überführen. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in Phenolrot-freiem Medium mit 0,1% FCS im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ stimuliert. Als Positivkontrolle diente Medium mit 2% FCS. Medium ohne FCS wurde als Negativkontrolle verwendet. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde 50 µl XTT-Reagenz (AppliChem) zugegeben und nach weiteren 4 h bei 37°C die Bildung des Formazans bei 450 nm detektiert.

3.5 Statistische Analyse

Die statistischen Auswertungen der vorliegenden Ergebnisse wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 (Version 5.02) durchgeführt.

Die statistische Signifikanz von zwei Gruppen wurde durch mit Hilfe des Einstichproben-t-Test geprüft. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse (*Analysis of variance*, ANOVA) verwendet und die Signifikanz durch den Bonferroni-*Post hoc* Test geprüft. Ein Wert von $P < 0,05$ wurde als signifikantes Ergebnis definiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung gerinnungsrelevanter Aktivitäten in MEP

4.1.1 Protease-Aktivität von MEP

Bereits 2003 beschrieben Chambers *et al.* und Schmidtchen *et al.* das Vorhandensein von Serinproteasen des Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Typs in MEP^{75,76}. Die von den Autoren verwendeten Exkrete/Sekrete stammten von auf Fleisch gezüchteten Maden. Bislang wurden noch keine Funktions-Studien mit MEP-Präparationen von proteinfrei kultivierten Maden durchgeführt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Serinprotease-Aktivität von MEP aus proteinfrei gezüchteten Maden analysiert und charakterisiert.

Eine gelelektrophoretische Analyse von MEP ergab, dass sich das MEP-assoziierte Proteom aus einer Vielzahl an Proteinen mit unterschiedlicher Größe zusammensetzt (Abbildung 10), wobei zwei prominente Banden mit 15 und 25 kDa herausstachen. In einem chromogenen Test zeigte MEP eine konzentrationsabhängige Serinprotease-Aktivität, die ab einer Konzentration von 30 µg/ml signifikant im Vergleich zur Kontrolle war und durch Hitze-Inaktivierung aufgehoben wurde. Die Markierung aktiver Serinproteasen in MEP mit einem fluoreszierenden Substrat zeigte eine deutliche Aktivität der 25 kDa Bande. Diese Aktivität war nach zu voriger Hitze-Inaktivierung des MEP nicht mehr detektierbar.

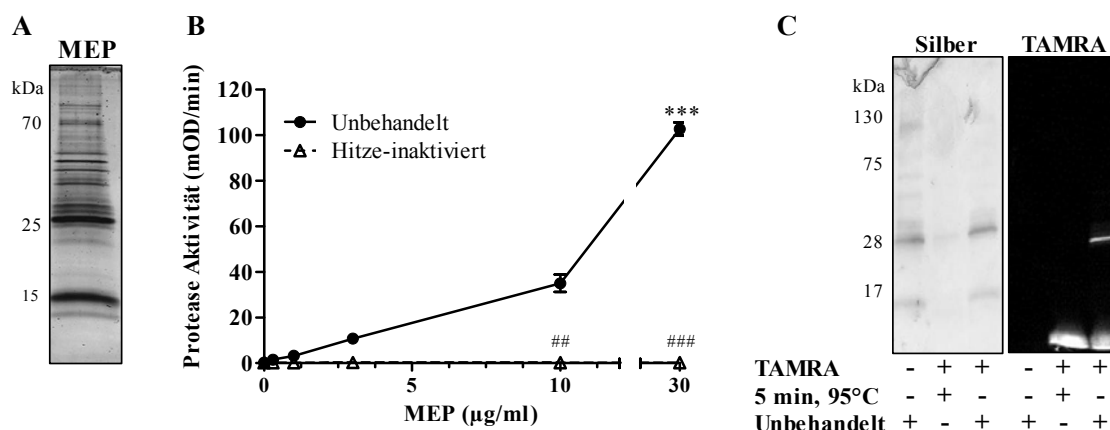


Abbildung 10: Serinprotease-Aktivität von MEP.

(A) Die in MEP enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Flamingo-Färbung im Gel dargestellt. (B) Die Serinprotease-Aktivität von unbehandeltem und Hitze-inaktiviertem (5 min, 95°C) MEP wurde anhand der Spaltung des chromogenen Substrates S-2288 detektiert (n=3). (C) Aktive Serinproteasen in unbehandeltem und Hitze-inaktiviertem MEP wurden mit einer fluoreszierenden Serinhydrolase-Sonde (TAMRA) inkubiert und durch SDS-PAGE separiert (n=3). Alle Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SD (** $P < 0,001$, MEP vs. Kontrolle; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ unbehandelt vs. Hitze-inaktiviert).

Aus diesen Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass ebenso wie auf Fleisch gezüchtete Maden, auch proteinfrei kultivierte Larven aktive Serinproteasen sezernieren und die Hauptfraktionen nach SDS-PAGE ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa besitzen.

4.1.2 Inhibitorprofil von MEP

4.1.2.1 Inhibierung von MEP durch verschiedene SERPINE

Zur weiteren Charakterisierung der enthaltenen Serinproteasen wurde MEP mit verschiedenen SERPINen (Tabelle 1) inkubiert, bevor die Serinprotease-Aktivität erneut im chromogenen Test gemessen wurde. Die Hemmung erfolgte mittels des Breitband- Inhibitors PMSF, den Trypsin- bzw. Chymotrypsin-spezifischen Inhibitoren SBTI und Chymostatin sowie des FXIIa- und Kallikrein-Inhibitors PPACK. Zudem wurde MEP mit den FXIIa-Inhibitoren rHA-Infestin-4 und CTI behandelt. Die Inhibitoren PMSF, PPACK, Chymostatin, SBTI, und rHA-Infestin-4 hoben die MEP-vermittelte Serinprotease-Aktivität auf (Abbildung 11). Während PMSF MEP schon in sehr geringen Konzentrationen (0-1 mM) vollständig inaktivierte, führte eine Behandlung von MEP mit 50 µg/ml Chymostatin zu einer 70%igen Reduktion der Serinprotease-Aktivität. CTI war nicht in der Lage die Serinprotease-Aktivität von MEP signifikant zu vermindern. Die Funktionalität der Inhibitoren wurde anhand ihrer positiven Inhibierung von Trypsin, α -Chymotrypsin und FXIIa überprüft.

4.1.2.2 Inhibierung von MEP durch das natürliche SERPIN Antithrombin

Das in hoher Konzentration zirkulierende (150 µg/ml) natürliche SERPIN Antithrombin, inaktiviert Thrombin und andere Serinproteasen und wird in seiner Aktivität durch Heparin verstärkt. Die Interaktion von Antithrombin und MEP wurde in An- und Abwesenheit von Heparin im chromogenen Test sowie nach Inkubation der Faktoren mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 12). Während Antithrombin in einer Konzentration von 1 µg/ml die Protease-Aktivität um 75% reduzierte, hatte Heparin allein keinen Einfluss auf die MEP-vermittelte Serinprotease-Aktivität. Zudem war die Inhibierung von MEP durch Antithrombin ebenfalls unabhängig von Heparin.

Während der Inhibierung von Thrombin durch Antithrombin kommt es zur Ausbildung eines kovalenten stöchiometrischen Komplexes mit anschließender Spaltung des Inhibitors. Eine ähnliche Reaktion konnte jedoch nach Inkubation des Inhibitors mit MEP nicht beobachtet werden. Im SDS-Gel war weder die Ausbildung eines Komplexes, noch die Spaltung des Inhibitors sichtbar.

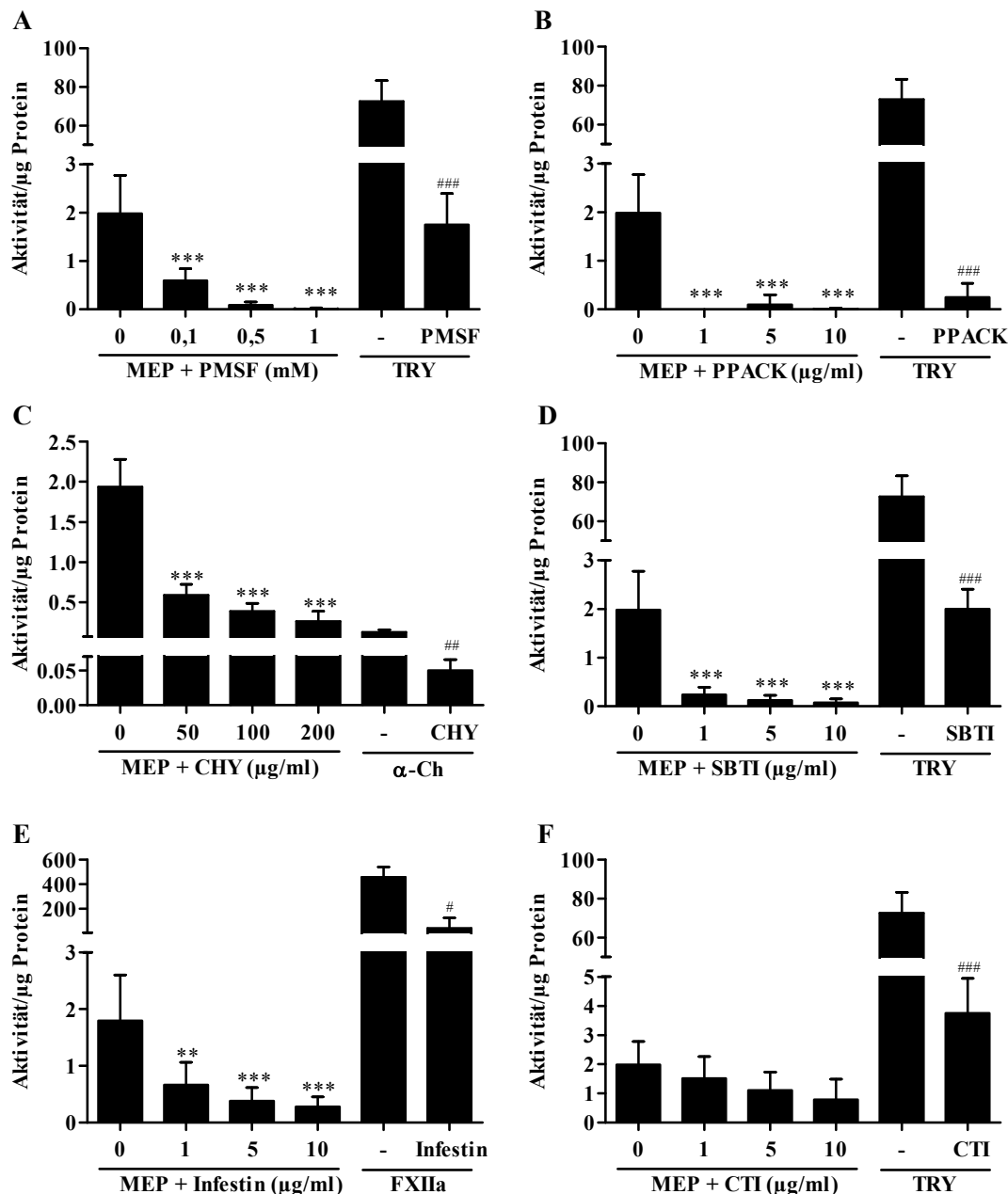


Abbildung 11: Charakterisierung aktiver Serinproteasen in MEP nach Inaktivierung durch verschiedene Inhibitoren.

Die globale Serinprotease-Aktivität von MEP (10 µg/ml) wurde nach 30 min Inkubation mit (A) Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), (B) H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketon (PPACK), (C) Chymostatin (CHY), (D) Sojabohnen-Trypsin Inhibitor (SBTI), (E) rHA-Infestin-4 (Infestin) und (F) Corn-Trypsin-Inhibitor (CTI) bei 37°C durch proteolytische Spaltung des chromogenen Substrates S-2288 bei 405 nm gemessen. Die Daten wurden gegen die jeweiligen Inhibitoren in den genutzten Konzentrationen normalisiert und angegeben als spezifische Aktivität/µg Gesamtprotein. α-Chymotrypsin (α-Ch), Trypsin (TRY) und aktivierter Faktor XII (FXIIa) dienten als Positivkontrollen für die Inhibitorwirkung. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (n≥3; **P<0,01, ***P<0,001, MEP vs. Kontrolle; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 unbehandelt vs. Hitze-inaktiviert).

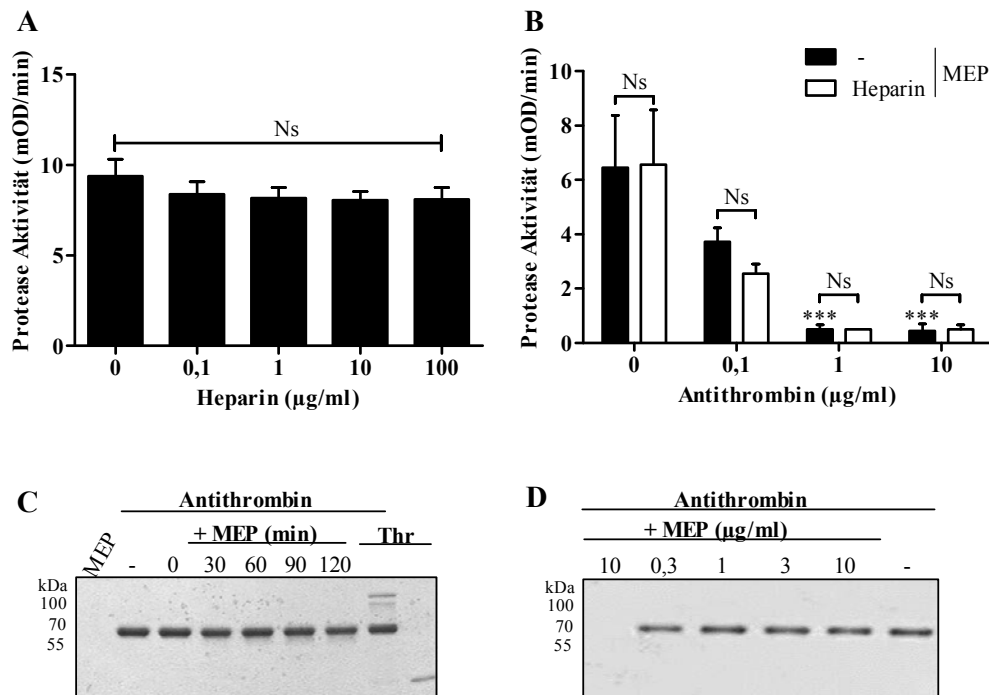


Abbildung 12: Inaktivierung von MEP durch Antithrombin.

Die Serinprotease-Aktivität von MEP (10 µg/ml) wurde nach Inkubation mit (A) steigenden Heparin-Konzentrationen und (B) steigenden Antithrombin-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von Heparin (1 µg/ml) anhand der Proteolyse des chromogenen Substrates S-2288 gemessen. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SD ($n=3$; $***P<0,001$, Antithrombin vs. Kontrolle; Ns=nicht signifikant). Antithrombin (3,75 µg) wurde (C) für die angegebenen Zeitintervalle mit 3 µg/ml MEP inkubiert und (D) mit steigenden MEP-Konzentrationen für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Kontrolle für die Antithrombin-Wirkung wurde Antithrombin für 120 min mit Thrombin (Thr, 750 ng) inkubiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Serinprotease-Aktivität in MEP durch Trypsin- und Chymotrypsin-spezifische Inhibitoren, Thrombin-Inhibitoren wie PPACK oder das endogene SERPIN Antithrombin, sowie den bekannten Kontaktphasen-Inhibitor rHA-Infestin-4 signifikant reduziert werden konnte.

4.1.3 MEP vermittelt prokoagulatorische Aktivität in humanem Plasma und Vollblut

Die Madentherapie ist eine gängige Methode zum Abbau fibrinöser und bakterieller Wundbeläge. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige in MEP enthaltene Serinproteasen fibrinogenolytische und fibrinolytische Eigenschaften besitzen. Da Serinproteasen neben ihrer Beteiligung an der Fibrinolyse zudem die Hauptakteure der Gerinnung sind, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob MEP einen Einfluss auf die humane Blutgerinnung hat und somit über diese Funktion zur Progression der Wundheilung beitragen kann.

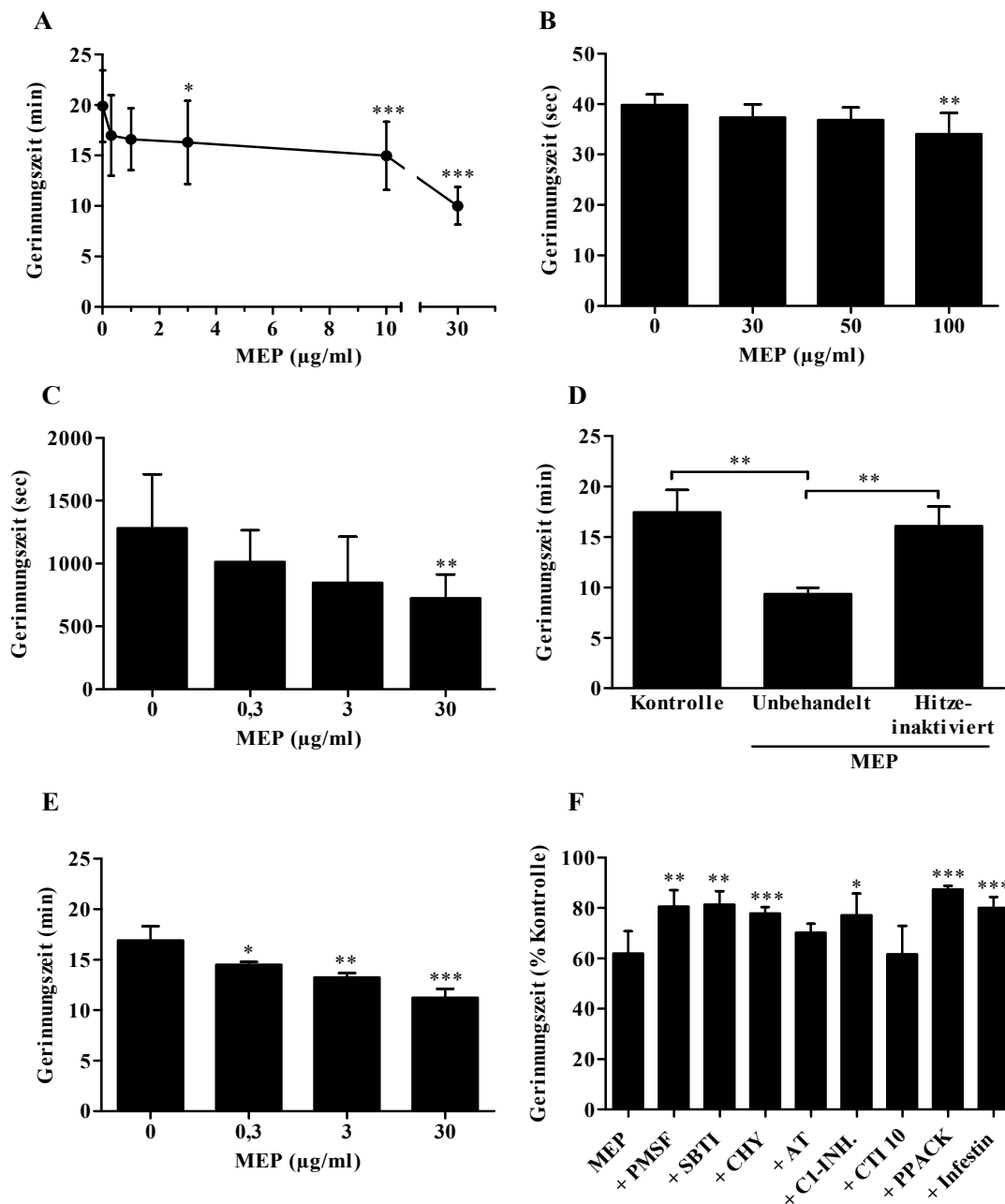


Abbildung 13: Prokoagulatorische Aktivität von MEP

Die prokoagulatorische Aktivität steigender MEP-Konzentrationen in humanem Plasma wurde (A) im turbidimetrischen Clot-Lyse Experiment und (B) im APTT-Test analysiert, wobei die Gerinnung durch Rekalifizierung initiiert wurde ($n \geq 3$). (C) Die Gerinnungszeit von humanem Vollblut, gemessen mittels Thromboelastometrie nach Zugabe steigender MEP Konzentrationen ($n \geq 4$). (D) Die prokoagulatorische Wirkung von unbehandelten und Hitze-inaktiviertem MEP im turbidimetrischen Test ($n = 3$). (E) Gerinnungszeit von humanem Plasma in Anwesenheit steigender MEP-Konzentrationen und nach 5 min Vorinkubation mit Kaolin (2 ng/ml) ($n = 3$). (F) Prokoagulatorische Aktivität von MEP in humanem Plasma nach 30 min Vorbehandlung mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sojabohnen-Trypsin Inhibitor (SBTI), Chymostatin (CHY), Antithrombin (AT), C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH.), Corn-Trypsin-Inhibitor (CTI), H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketon (PPACK) und rHA-Infestin-4 (Infestin) bei 37°C ($n \geq 4$). Alle Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SD (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

In einem Plasma Clot-Lyse-Test, einem APTT-Test sowie einer Thromboelastographie-Analyse verkürzte MEP signifikant die Gerinnungszeit verglichen mit einer Pufferkontrolle (Abbildung 13). Im turbidimetrischen Test verringerte MEP in einer Konzentration von 30 µg/ml die Zeit bis zur Gerinnung um durchschnittlich 9 Min, was einer 50%igen Reduktion der Gerinnungszeit entsprach. Dieser Effekt auf die Gerinnungszeit war nach Hitze-Inaktivierung von MEP nicht mehr vorhanden. Zudem war die Verkürzung der Gerinnungszeit unabhängig von zusätzlicher Kontaktphasen-Aktivierung durch Kaolin. Um herauszufinden, welche der verschiedenen Serinproteasen in MEP für den Gerinnungszeit-verkürzenden Effekt verantwortlich sind, wurde MEP mit den zuvor bereits beschriebenen Inhibitoren vorbehandelt. Zudem wurde MEP vor dem Einsatz mit dem Kontaktphase-spezifischen C1-Esterase-Inhibitor inkubiert. PMSF, SBTI, Chymostatin, PPACK, rHA-Infestin-4 und der C1-Esterase-Inhibitor waren in der Lage, die gerinnungsfördernden Effekte von MEP im Plasma zu hemmen, während Antithrombin und CTI keinen Einfluss auf die MEP-vermittelten Effekte hatten.

Die Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass MEP prokoagulatorische Aktivität in humanem Plasma und Vollblut hat und sich diese Funktion vorwiegend auf Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Proteasen mit Ähnlichkeit zu Kontaktphasen-Proteinen zurückführen lässt.

4.1.4 Kontaktphasen-Aktivierung durch MEP

Da sowohl die Serinprotease-Aktivität von MEP, als auch seine prokoagulatorischen Effekte durch die Kontaktphasen-Inhibitoren Infestin und C1-Esterase-Inhibitor aufgehoben wurden, sollte der Einfluss von MEP auf die Aktivierung von Proteasen des intrinsischen Gerinnungswegs überprüft werden.

4.1.4.1 MEP-vermittelte Kallikrein-ähnliche Aktivität

Um einen ersten Hinweis auf die Interaktionen von MEP mit der Kontaktphase der Gerinnung zu erhalten, wurden die Proteasen in MEP auf eine intrinsische Kallikrein-Aktivität überprüft (Abbildung 14). Im isolierten chromogenen Testsystem konnte eine dosisabhängige Kallikrein-Aktivität von MEP (schraffierte Balken), die unabhängig von den Kofaktoren HMWK und Zinkchlorid (schwarze Balken) war, beobachtet werden. Nach zusätzlicher Anreicherung mit Präkallikrein kam es zu einer Erhöhung der Gesamtkallikrein-Aktivität (weiße Balken) von 50% in der höchsten MEP-Konzentration im Vergleich zu MEP allein. Eine Vorbehandlung von MEP mit den beschriebenen Inhibitoren, führte für alle SERPINE zu einer signifikanten Verminderung der Kallikrein-Aktivität, wobei PMSF, SBTI, Antithrombin und PPACK in den angegebenen Konzentrationen zu einer nahezu vollständigen Inaktivierung von MEP führten, während

Chymostatin die Aktivität um 85% und CTI um 80% senkte. Die Kontaktphase-spezifischen SERPINE C1-Esterase-Inhibitor und rHA-Infestin-4 reduzierten die Kallikrein-Aktivität um 90 bzw. 95%.

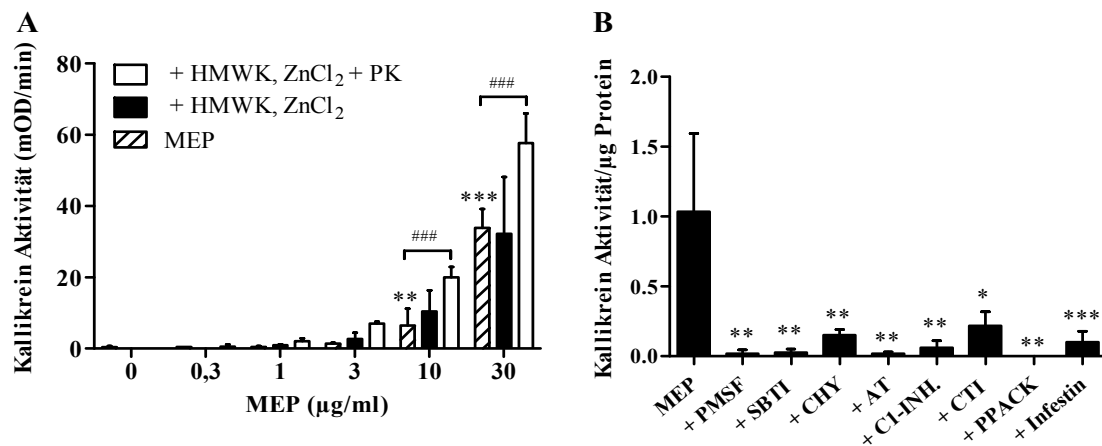


Abbildung 14: Kallikrein-ähnliche Aktivität von MEP

(A) MEP-vermittelte Spaltung des Kallikrein-spezifischen chromogenen Substrates S-2302 in Anwesenheit von 50 µM Zinkchlorid (ZnCl₂), 55 nM hochmolekularem Kininogen (HMWK) und 20 nM Präkallikrein (PK) (n≥4). (B) Kallikrein-Aktivität von MEP nach 30 min Vorbehandlung mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sojabohnen-Trypsin Inhibitor (SBTI), Chymostatin (CHY), Antithrombin (AT), C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH.), Corn-Trypsin-Inhibitor (CTI), H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketon (PPACK) und rHA-Infestin-4 (Infestin) bei 37°C, gemessen durch Proteolyse des chromogenen Substrates S-2302 (n≥3). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

4.1.4.2 Proteolytische Aktivierung von Kontaktphasen-Proteinen durch MEP

Nach Faktor XIIa-vermittelter Kontaktphasen-Induktion aktiviert Kallikrein die Proteine HMWK und FXII und trägt so zur Amplifikation der Gerinnungsinitiierung über die Kontaktphase bei. Da die in MEP enthaltene Proteasen im chromogenen Test das Kallikrein-spezifische Substrat S-2302 spalteten, wurde untersucht, ob eine Behandlung von HMWK und FXII im isolierten System und im Plasma zur proteolytischen Aktivierung dieser Faktoren führt.

MEP spaltete die Faktoren HMWK und FXII im isolierten System und im Plasma (Abbildung 15). Nach Behandlung von FXII mit MEP und anschließender Auftrennung im SDS-Gel wurden zusätzliche Proteinbanden bei ca. 55, 50, 40, 30 und 26 kDa sichtbar. Diese waren auch nach Western Blot-Analyse im Plasma sichtbar und konnten anhand ihrer Größe den aktiven Spaltprodukten αFXIIa (80 kDa) und βFXIIa (28-30 kDa) zugeordnet werden¹⁶⁶, wobei die über Disulfidbrücken verknüpften Polypeptidketten von αFXIIa im SDS-Gel bei 40 kDa zu finden sind. Dass die Proteolyse von FXII durch MEP zu dessen Aktivierung führt, zeigte sich im

chromogenen Test, wo eine Inkubation von MEP mit inaktiven FXII zu einer Zunahme der Protease-Aktivität im Vergleich zu der von MEP selbst vermittelten Aktivität führte.

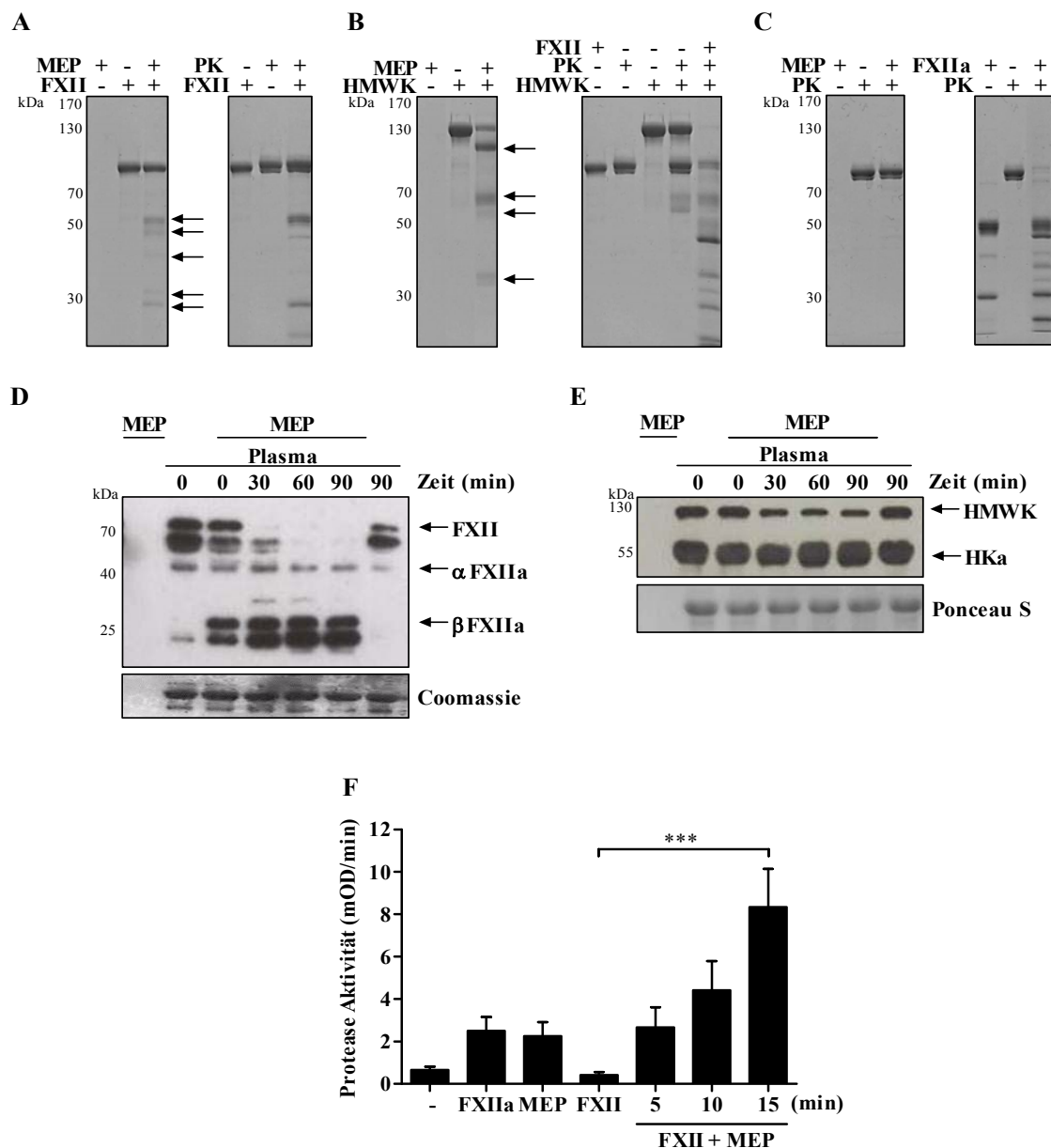


Abbildung 15: Proteolyse von Kontaktphasen-Proteinen durch MEP.

Die Kontaktphasen-Proteine (A) Faktor XII (FXII, 1 μ M), (B) hochmolekulares Kininogen (HMWK, 2,75 mM) und (C) Präkallikrein (PK, 1 μ M) wurden 60 Min bei 37°C mit MEP (3 μ g/ml) inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (n=3). PK, HMWK, FXII und aktivierter FXII (FXIIa) dienen dabei als jeweilige Kontrollen. Humanes Plasma (0,2 μ l) wurde für verschiedene Zeitintervalle mit MEP (10 μ g/ml) bei 37°C inkubiert und anschließend die Integrität von (D) FXII und (E) HMWK mittels Western Blot analysiert (n≥3). Abbildungen sind repräsentativ für mehrere unabhängige Experimente. (F) Die spezifische Protease-Aktivität von FXII (1 μ M) nach Inkubation mit MEP (3 μ g/ml) für verschiedene Zeitintervalle, gemessen durch Spaltung des chromogenen Substrates S-2302. Die Aktivität von FXIIa (3 nM) dient als Kontrolle für die Spezifität des Substrates (n=3). Dargestellte Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD (***)P<0,001).

Die Behandlung von HMWK mit MEP führte im isolierten System zur Entstehung zusätzlicher Spaltprodukte des HMWK mit ca. 95, 60, 55 und 40 kDa. Während das 95 kDa Fragment möglicherweise ein Intermediär-Spaltprodukt darstellt, können die Fragmente mit den Größen 60, 55 und 46 kDa der durch Kallikrein-Einwirkung im ersten Schritt aus HMWK entstehenden schweren (64 kDa) und leichten Kette (56 kDa) sowie, der in einem zweiten Spaltschritt prozessierten leichten Kette (46 kDa) zugeordnet werden¹⁶⁶. Im Plasma bewirkte MEP die Spaltung des HMWK (ca. 120 kDa) in das bradykininfreie Kininogen (HKa), was sich in der Zunahme der 55 kDa Bande bei gleichzeitiger Abnahme der 120 kDa Bande zeigt. HKa besteht aus der über Disulfidbrücken verknüpften schweren und leichten Kette und zeigt sich nach SDS-PAGE bei 56-64 kDa¹⁶⁶.

Da bekannt ist, dass Kallikrein selbst seine Vorstufe Präkallikrein aktivieren kann, wurde zudem eine mögliche Spaltung von Präkallikrein durch MEP untersucht. Nach einer einstündigen Inkubation von Präkallikrein mit 3 µg/ml MEP hingegen, waren keine zusätzlichen Proteinbanden im SDS-Gel sichtbar. Zusammenfassend beschreiben die Ergebnisse, dass MEP eine Kallikrein-ähnliche Aktivität besitzt und in der Lage ist, die Kontaktphasen-Proteine HMWK und FXII zu spalten/aktivieren.

4.1.4.3 Kontaktphasen-Bypassing Aktivität von MEP

In Anlehnung an die bereits beschriebene Kallikrein-ähnliche Aktivität und den prokoagulatorischen Einfluss von MEP in humanem Plasma, wurde der Einfluss von MEP auf die Gerinnungszeit von Mangelplasmen, die defizient in den Kontaktphasen-Proteinen HMWK, PK, FXII und FXI sind, untersucht. Die Mangelplasmen zeigten sowohl im turbidimetrischen als auch im APTT-Test, eine signifikant verlängerte Gerinnungszeit im Vergleich zu Normalplasma (Abbildung 16). Deshalb wurden analysiert, in wie weit MEP, vermittelt über seine Ähnlichkeit zu den Kontaktphase-Proteasen, das Gerinnungsgeschehen beeinflussen und eine normale Gerinnungszeit in den Mangelplasmen wieder herzustellen vermag.

Die Substitution von MEP führte im turbidimetrischen Test zu einer signifikanten Verkürzung der Gerinnungszeit in HMWK-, PK-, FXI-, und FXII-Mangelplasma (Abbildung 16). Zur Kontrolle wurde das HMWK-, FXI- und FXII- defiziente Plasma mit den fehlenden Faktoren in physiologischen Mengen versetzt, was ebenfalls zu einer signifikanten Verkürzung der Gerinnungszeit im Vergleich zur Kontrolle führte. Allein für das PK-defiziente Plasma konnte nach Zugabe unphysiologisch hoher PK-Mengen keine signifikante prokoagulatorische Aktivität beobachtet werden.

Die Ergebnisse der turbidimetrischen Experimente konnten mittels APTT-Test in FXII- und FXI-Mangelplasma bestätigt werden. Hier verkürzte MEP die Gerinnungszeit in FXII-Mangelplasma um 52% und in FXI-Mangelplasma um 17% verglichen zur Kontrolle; diese Effekte waren nach Hitze-Inaktivierung von MEP nicht mehr ersichtlich.

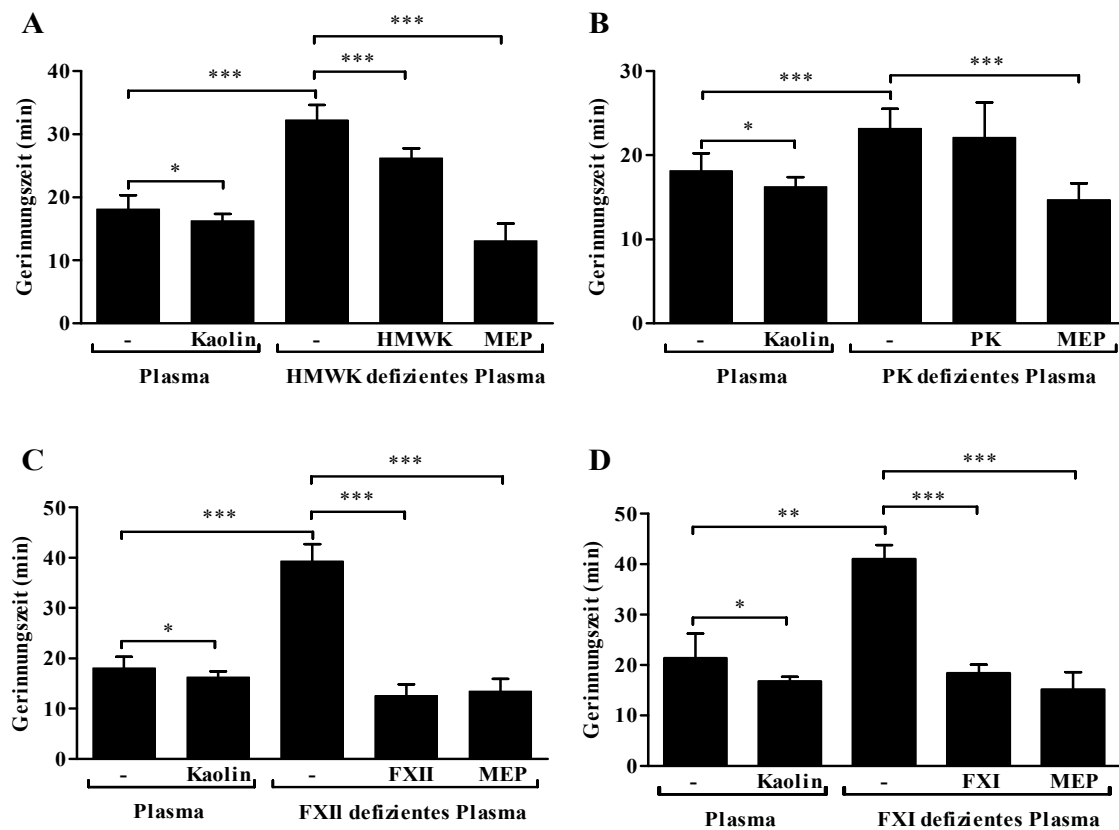


Abbildung 16: Prokoagulatorische Aktivität von MEP in defizienten Plasmen.

Die prokoagulatorische Aktivität von MEP (30 µg/ml) wurde in Plasmen defizient an (A) hochmolekularem Kininogen (HMWK), (B) Präkallikrein (PK), (C) Faktor XII (FXII) und (D) Faktor XI (FXI) im turbidimetrischen Clot-Lyse Experiment nach Rekalifizierung analysiert. Zur Kontrolle wurden die Plasmen mit den jeweils fehlenden Komponenten HMWK (20 µg/ml), PK (30 µg/ml), FXI (2 µg/ml) und FXII (15 µg/ml) substituiert. Humanes Normalplasma mit 0,1 M Imidazol oder Kaolin (10 ng/ml) diente als Testkontrolle (n≥3). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Insgesamt zeigte MEP in den beschriebenen Untersuchungen eine Kallikrein-ähnliche Aktivität, welche zur proteolytischen Aktivierung der Kontaktphasen-Proteine FXII und HMWK führte. Zudem stellte MEP die Gerinnungszeit von Mangelplasmen der Kontaktphase-Proteine wieder her und zeigte eine Kontaktphasen-*Bypassing* Aktivität.

4.1.5 Inaktivierung von C1-Esterase-Inhibitor durch MEP

Neben der direkten Aktivierung von Gerinnungsproteasen kann zudem die Inaktivierung von spezifischen Inhibitoren zu einer Netto-Gerinnungsaktivierung führen. Basierend auf der bereits in Abbildung 13 und Abbildung 14 gezeigten Inhibierung der in MEP enthaltenen Proteasen durch C1-Esterase-Inhibitor, wurde die Interaktion von MEP mit dem Inhibitor weiter untersucht und mögliche funktionelle Konsequenzen analysiert.

MEP spaltet den C1-Esterase-Inhibitor (ca. 100 kDa, Tabelle 1) Zeit- und Dosisabhängig, was durch die Entstehung von zusätzlichen Banden mit kleinerem Molekulargewicht von ca. 80 kDa sichtbar war (Abbildung 18). Eine vollständige Proteolyse der 100 kDa-Bande wurde nach einstündiger Inkubation mit 10 µg/ml MEP detektiert. Mit der Proteolyse des Inhibitors ging eine dosisabhängige Inhibierung der MEP-vermittelten Protease-Aktivität im chromogenen Test einher. Hier führte eine 30 min Vorinkubation von MEP mit C1-Esterase-Inhibitor in einer Konzentration von 5 µg/ml zu einer 70%igen Reduktion der Serinprotease-Aktivität von MEP. Dabei wurde die Funktionalität des Inhibitors anhand seines Vermögens die Protease-Aktivität von FXIIa zu hemmen kontrolliert. Basierend auf diesen Daten stellte sich die Frage nach den funktionellen Konsequenzen der MEP-C1-Esterase-Inhibitor-Interaktion für die Aktivität des Inhibitors. Um dies zu analysieren, wurde wieder die Fähigkeit des Inhibitors FXIIa zu hemmen genutzt. Während mit Puffer inkubierter C1-Esterase-Inhibitor FXIIa in seiner Aktivität hemmte, war mit MEP behandelter C1-Esterase-Inhibitor nicht mehr in der Lage FXIIa, zu inaktivieren.

Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass MEP durch den Kontaktphasen-Inhibitor C1-Esterase-Inhibitor gehemmt wird, was zur Inaktivierung des Inhibitors führt.

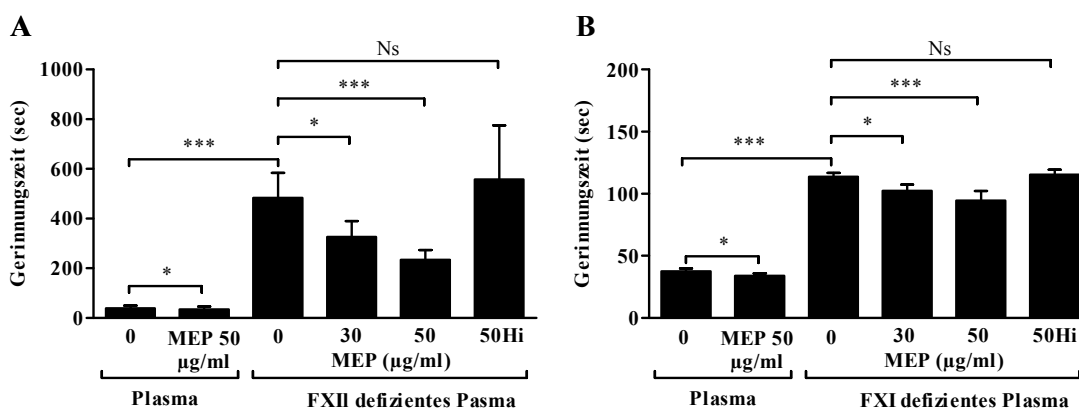


Abbildung 17: Prokoagulatorische Aktivität von MEP in defizienten Plasmen im APTT-Test.

Die prokoagulatorische Aktivität von unbehandeltem MEP (30 und 50 µg/ml) und Hitze-inaktiviertem (Hi) MEP (50 µg/ml) wurde in Plasmen defizient an (A) Faktor XII (FXII) und (B) Faktor XI (FXI) im APTT-Test analysiert. Die Reaktion wurde dabei durch Rekalifizierung gestartet. Normalplasma diente als Kontrolle (n≥3). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (*P<0,05, ***P<0,001, Ns=Nicht signifikant).

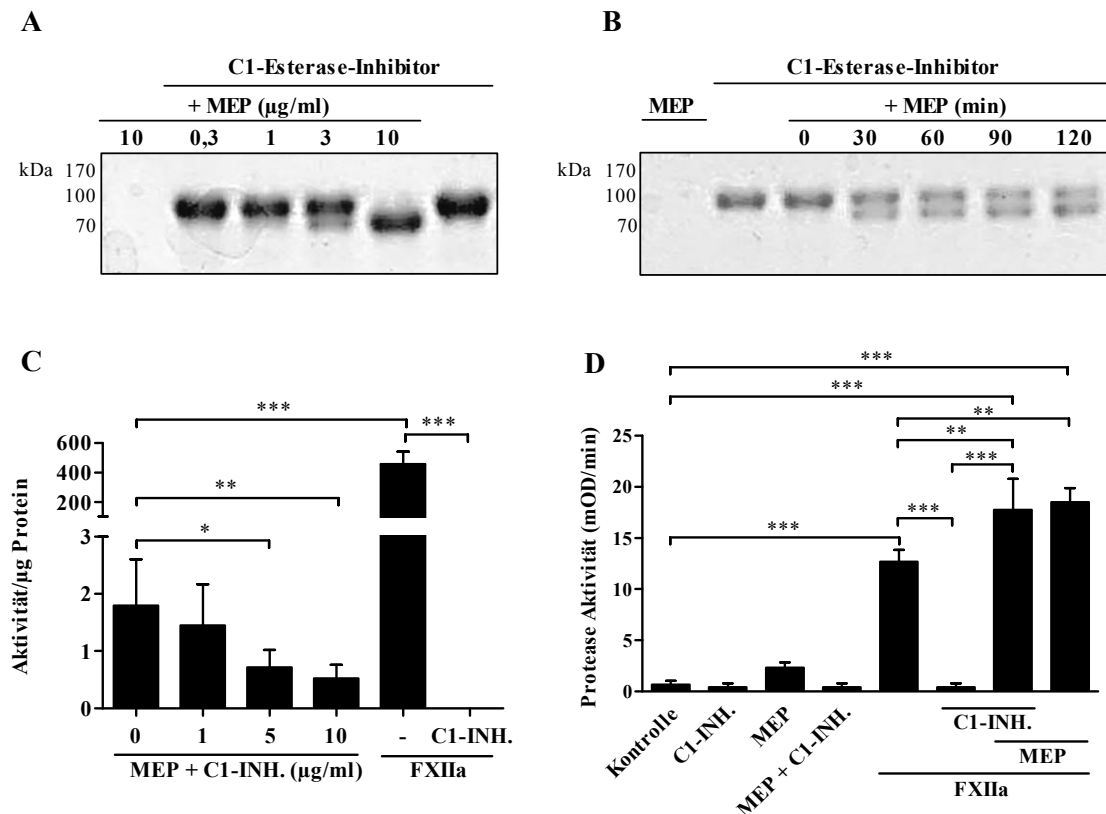


Abbildung 18: Interaktion von MEP mit dem C1-Esterase-Inhibitor.

(A) C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH., 7,6 µg) wurde für 60 min bei 37°C mit steigenden MEP-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE separiert. (B) Zeitabhängige Spaltung des C1-INH. durch MEP (3 µg/ml) nach Inkubation bei 37°C und folgender SDS-PAGE (n=3). Abbildungen sind repräsentativ für unabhängige Wiederholungen. (C) Serinprotease-Aktivität von MEP (10 µg/ml) nach 30 min Inkubation mit steigenden Konzentrationen an C1-INH. bei 37°C, gemessen an der Proteolyse des chromogenen Substrates S-2288 und dargestellt als spezifische Aktivität pro 1 µg Gesamtprotein. Die Inhibierung von aktiviertem Faktor XII (FXIIa, 3 nM) durch den C1-INH. (10 µg/ml) dient als Kontrolle für die Funktionalität des Inhibitors. (D) Die Aktivität von FXIIa (20 nM) nach Inkubation mit Puffer, unbehandeltem C1-INH. (150 nM) oder C1-INH. nach 30 min Inkubation mit MEP (3 µg/ml) (n=3). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

4.1.6 Charakterisierung der aktiven Komponenten in MEP

Zur weiteren Charakterisierung der aktiven Komponenten in MEP wurde der Gesamtextrakt in Ultrafiltrationsröhrchen mit Ausschlussgrößen von 10 kDa und 30 kDa aufgetrennt, und so drei MEP-Fraktionen <10 kDa (Fraktion 1), 10-30 kDa (Fraktion 2) und >30 kDa (Fraktion 3) generiert. Die Fraktionen wurden im Weiteren mittels Gelelektrophorese und in verschiedenen gerinnungsrelevanten Testsystemen untersucht, um die funktionsrelevanten Fraktionen mit aktiven Proteasen zu charakterisieren.

In einem ersten Schritt wurde hierzu die Effektivität der Größenauftrennung mittels SDS-PAGE untersucht und festgestellt, dass in Fraktion 3 auch Proteinbanden <30 kDa vorhanden waren (Abbildung 19). Die Proteine in Fraktion 3 waren im Vergleich zum Gesamtextrakt

aufkonzentriert. In Fraktion 2 waren nur Banden im Bereich von 10-25 kDa und in Fraktion 1 nur Banden von 10 kDa oder kleiner sichtbar. Im chromogenen Serinprotease-Aktivitätstest wurde die Aktivität von MEP mit der Aktivität der Fraktionen 1-3 verglichen. Hier hatte Fraktion 1 eine im Vergleich zu MEP signifikant verringerte Serinprotease-Aktivität, während die Aktivität in Fraktion 2 sich nicht von der des Gesamtextraktes unterschied. Die Aktivität von Fraktion 3 war im Vergleich zum Gesamtextrakt signifikant erhöht. Das Ergebnis wurde bei der Bestimmung der Kallikrein-Aktivität in MEP und den Fraktionen 1-3 bestätigt. Hier war die Kallikrein-Aktivität in den Fraktionen 1 und 2 im Vergleich zu MEP signifikant verringert, die der Fraktion 3 im Gegensatz dazu aber erhöht.

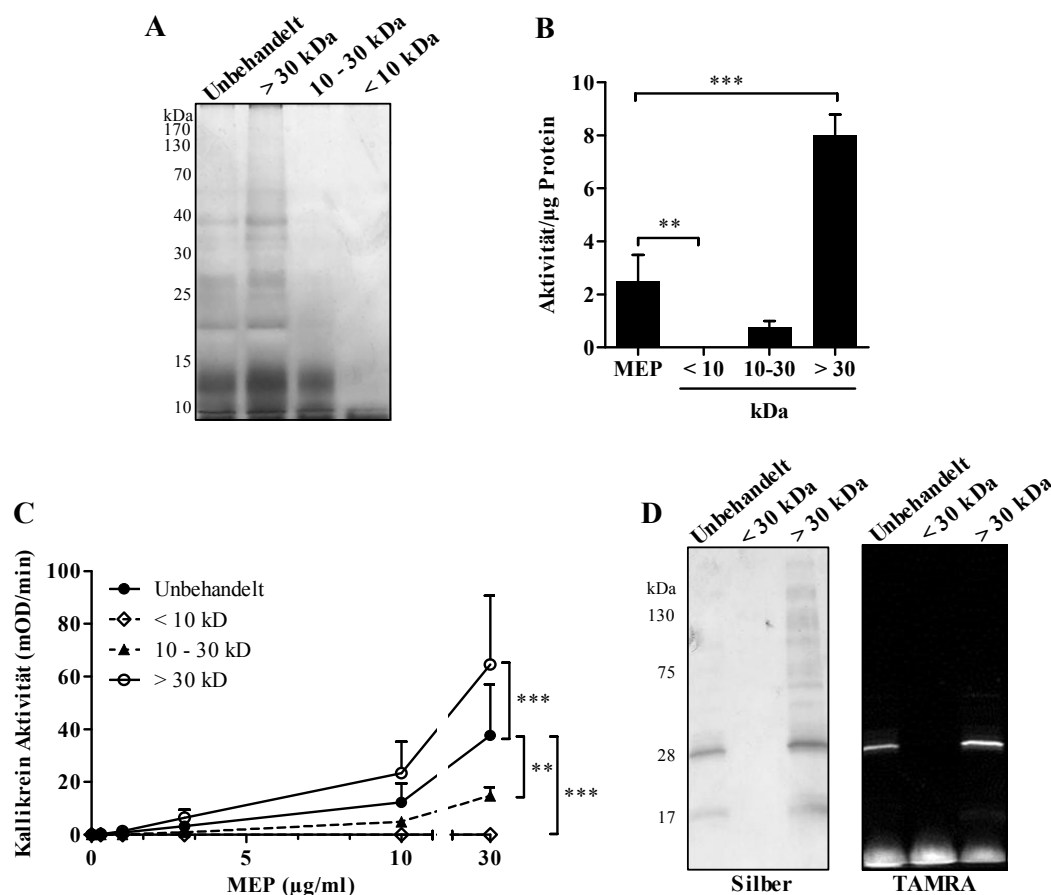


Abbildung 19: Protease-Aktivität von MEP-Fraktionen.

(A) MEP wurde durch Zentrifugation mit 10 kDa und 30 kDa *cut-off* Membranen behandelt und die erhaltenen Fraktionen anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. (B) Serinprotease-Aktivität der MEP-Fraktionen gemessen an der Proteolyse des chromogenen Substrates S-2288 und dargestellt als spezifische Aktivität pro 1 µg Gesamtprotein (n=3). (C) Kallikrein-Aktivität steigender Konzentrationen an unbehandeltem MEP sowie den hergestellten MEP-Fraktionen. Die Aktivität wurde anhand der Spaltung des Substrates S-2302 im chromogenen Test gemessen (n=3). Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SD (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (D) Aktive Serinproteasen in den jeweiligen MEP-Fraktionen wurden durch eine fluoreszierende Sonde (TAMRA) markiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und bei 528 nm detektiert (n=3).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse sollte die Markierung aktiver Serinproteasen im Gesamtextrakt und den Fraktionen Aufschluss über die Verteilung der aktiven Proteasen in den Fraktionen geben. Hierzu wurden die Fraktionen 1 und 2 gemischt (<30 kDa) und mit dem Gesamtextrakt und Fraktion 3 (>30 kDa) verglichen. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnte eine aktive Bande in MEP bei 25 kDa detektiert werden. Diese war in den Fraktionen 1 und 2 nicht sichtbar, in Fraktion 3 jedoch war das Signal bei 25 kDa deutlich stärker als im Gesamtextrakt.

Weiterhin wurde die prokoagulatorische Aktivität der Fraktionen in humanem Plasma und im Vollblut im Vergleich zu MEP gemessen. Im Vollblut waren MEP und die Fraktion 3 in der Lage, die Gerinnungszeit signifikant zu verkürzen (Abbildung 20), während das Gemisch aus Fraktion 1 und Fraktion 2 keinen Einfluss auf die Gerinnungszeit hatte. Dieses Ergebnis konnte mittels APTT-Test und turbidimetrischen Clot-Lyse-Test in Plasma bestätigt werden.

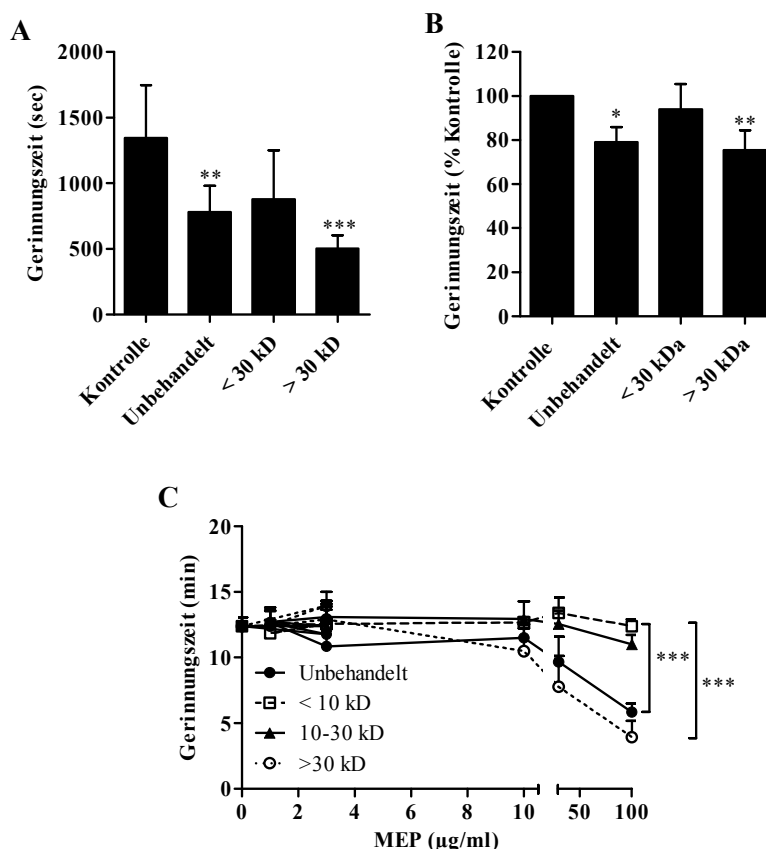


Abbildung 20: Prokoagulatorische Effekte von MEP-Fraktionen.

(A) Die prokoagulatorische Aktivität von unbehandeltem und fraktioniertem MEP (30 µg/ml) wurde mittels Thromboelastometrie in Vollblut untersucht (n≥5). (B) Die Gerinnungszeit von Plasma nach Zugabe von unbehandeltem und fraktioniertem MEP (30 µg/ml), gemessen nach Rekalifizierung im APTT-Test. Als Kontrolle wurde Plasma mit 0,1 M Imidazolpuffer wurde gleich 100% gesetzt (n≥4). (C) Steigende Konzentrationen der Fraktionen <10 kDa, 10-30 kDa und >30 kDa wurden im turbidimetrischen Clot-Lyse-Test nach Rekalifizierung analysiert (n=3). Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

Zusammenfassend wird deutlich, dass sowohl die Protease- als auch die prokoagulatorische Aktivität von MEP von Komponenten vermittelt wird, die sich nach einem molarem Größenausschluss in der Fraktion 3 wiederfinden. Weiterhin führte die Fraktionierung des Gesamtextraktes zu einer Konzentration der aktiven Serinprotease-Bande bei 25 kDa.

4.1.7 Vergleich prokoagulatorischer Aktivitäten von MEP-Präparationen aus proteinfrei und auf Blut-Agar gezüchteten Maden

In einer Vielzahl von Studien werden die Effekte von Madenexkreten oder -sekreten auf verschiedene Teilprozesse der Wundheilung beschrieben. Die Maden, aus denen das MEP isoliert wurde, sind auf Fleisch oder Blut-Agar kultiviert worden. Da die Maden im Zuge der Kultivierung Bestandteile aus diesen Matrices aufnehmen und verdauen, könnten sich Bestandteile davon auch im Madenexkret wiederfinden und somit die Ergebnisse in den durchgeführten Analysen verfälschen. Besonders im Hinblick auf die Untersuchung fibrinolytischer und gerinnungsrelevanter Einflüsse kann dies von Bedeutung sein, wenn zum Beispiel aus dem Blut-Agar in das Exkret gelangte Komponenten mit Gerinnung und Fibrinolyse interagieren. Deshalb wurden die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente mit Madenexkret von proteinfrei kultivierten Maden durchgeführt. Um trotzdem eine Vergleichbarkeit zu bisher veröffentlichten Daten herzustellen, wurden MEP von proteinfrei und auf Blut-Agar kultivierten Maden in den bereits vorgestellten Testsystemen miteinander verglichen.

In einem ersten Schritt wurden die unterschiedlichen MEP-Präparationen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Während in proteinfreiem Exkret die Banden bei 15 und 25 kDa deutlich sichtbar waren, zeigte sich in der Blut-Agar-Präparation zudem eine weitere starke Bande bei ca. 70 kDa, welche anhand ihrer Größe Albumin (66 kDa)²⁶⁴ zugeordnet werden konnte (Abbildung 21). Im Vergleich zum proteinfreien Exkret war außerdem die Bande bei 25 kDa stärker ausgeprägt.

Um herauszufinden, ob diese Verstärkung der Bande bei 25 kDa auch mit einer erhöhten Konzentration an aktiven Proteasen einhergeht, wurden aktive Serinproteasen vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mit einer fluoreszenten Sonde markiert.

Die Intensität der Bande bei 25 kDa in der Blut-Agar-Präparation war deutlich niedriger als in der proteinfreien Präparation. Dieses Ergebnis wurde durch die durchgeführten Protease-Aktivitätstests bestätigt. Sowohl die Serinprotease- als auch die Kallikrein-ähnliche Aktivität der Blut-Agar-Präparation waren im Vergleich zu proteinfreiem Exkret signifikant vermindert. Im turbidimetrischen Clot-Lyse-Test, sowie im APTT-Test führte die Blut-Agar-Präparation, anders als die proteinfreie, nicht zu einer signifikanten Verkürzung der Gerinnungszeit.

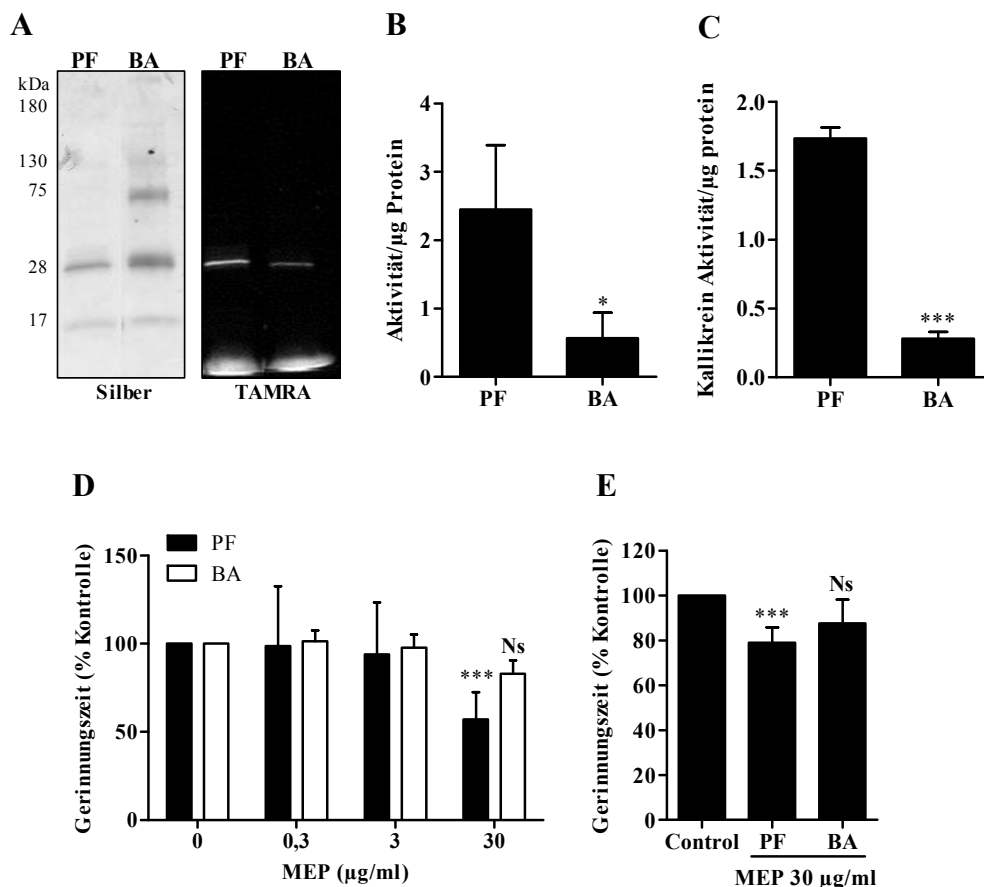


Abbildung 21: Protease-Aktivität und prokoagulatorische Effekte von MEP proteinfrei und auf Blut-Agar gezüchteter Maden.

(A) Aktive Serinproteasen in den MEP-Präparationen aus proteinfrei kultivierten (PF) und auf Blut-Agar gezüchteten (BA) Maden wurden mit einer fluoreszierenden Sonde (TAMRA) markiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und bei 528 nm detektiert ($n=3$). Die (B) Serinprotease-Aktivität sowie die (C) Kallikrein-Aktivität der unterschiedlichen MEP-Präparationen (10 µg/ml) wurde anhand der Proteolyse der Substrate S-2288 und S-2302 im chromogenen Test bestimmt und als spezifische Aktivität/1 µg Gesamtprotein dargestellt ($n\geq 3$). (D) Die Gerinnungszeit von humanem Plasma nach Rekalifizierung wurde nach Zugabe steigender Konzentrationen der MEP-Präparationen aus PF und BA gezüchteten Maden im turbidimetrischen Clot-Lyse-Test untersucht ($n\geq 3$). (E) Die Gerinnungszeit von humanem Plasma nach Inkubation mit den verschiedenen MEP-Präparationen bestimmt im APTT-Test ($n\geq 3$). Die Gerinnung wurde in beiden Experimenten durch Rekalifizierung gestartet. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SD (* $P<0,05$, *** $P<0,001$, Ns=Nicht signifikant).

Aus den beschriebenen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass das aus Blut-Agar gezüchteten Maden isolierte MEP eine andere Proteinzusammensetzung aufweist als das aus proteinfrei kultivierten Maden. Zudem unterscheiden sich die Präparationen in ihrer Protease-Aktivität und der prokoagulatorischen Aktivität mit einer signifikanten Verringerung seitens der Blut-Agar-Präparation.

4.1.8 Fibrinolytisches und fibrinogenolytisches Potenzial von MEP

Die Fibrinolyse dient der Auflösung von Fibringerinnseinseln und ist sowohl an dem Um- und Abbau der ECM im Rahmen der Wundheilung aber auch intravasal bei der Auflösung von Blutgerinnseinseln beteiligt. In der Behandlung chronischer Wunden wurden Maden zum biochirurgischen Débridement erfolgreich eingesetzt. Zudem beschreiben viele Studien einen Abbau von Fibrinogen oder fibrinösen Wundbelägen durch MEP oder daraus isolierten Komponenten. Basierend auf diesen Tatsachen galt es im Weiteren zu klären, ob MEP und die darin enthaltenen Proteasen eine signifikante Rolle bei der Auflösung von intravasalen Blutgerinnseinseln spielt.

4.1.8.1 MEP-vermittelte Proteolyse von Plasminogen

Die aus ihrer inaktiven Vorstufe Plasminogen durch t-PA generierte Protease Plasmin stellt den Hauptakteur der Fibrinolyse dar, indem sie direkt vernetztes Fibrin spaltet. Um den Einfluss von MEP auf die Fibrinolyse zu analysieren, wurde untersucht, ob in MEP enthaltene Proteasen entweder selbst Plasmin-Aktivität oder Plasminogen-Aktivierungskapazität besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurde Plasminogen mit MEP inkubiert und eine mögliche Spaltung nach Auftrennung der Proben im SDS-Gel untersucht. Genau wie die Behandlung von Plasminogen mit t-PA resultierte die Inkubation von Plasminogen mit MEP in einer Proteolyse, welche durch das Auftreten zusätzlicher Banden im Gel sichtbar war (Abbildung 22). Jedoch unterschieden sich die resultierenden Bandenmuster nach dem Verdau mit t-PA und MEP. Um herauszufinden, ob die nach MEP Einwirkung gebildeten Fragmente auch Plasmin-Aktivität aufweisen, wie das durch t-PA generierten Enzyme, wurde entweder Puffer oder Plasminogen mit MEP oder t-PA inkubiert und anschließend die gebildete Menge aktiven Plasmins bestimmt. Während der Verdau von Plasminogen mit t-PA zu einer Plasminogenaktivierung führte, war nach Inkubation von MEP mit Plasminogen keine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Pufferkontrolle ersichtlich. Zudem war MEP selbst nicht in der Lage das Plasmin-spezifische Substrat zu spalten, was auf eine fehlende intrinsische Plasmin-Aktivität hinweist. Eine Zugabe von Fibrin als Kofaktor der t-PA-vermittelte Plasminogenaktivierung erhöhte die Menge an gebildetem Plasmin signifikant in diesem Versuchsansatz. Dies war im Falle von MEP nicht der Fall. Hier zeigte sich nach Zugabe von Fibrin keine Erhöhung der Plasminaktivität. Diese Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass MEP selbst zwar Plasminogen spaltet, aber nicht zu dessen Aktivierung führt.

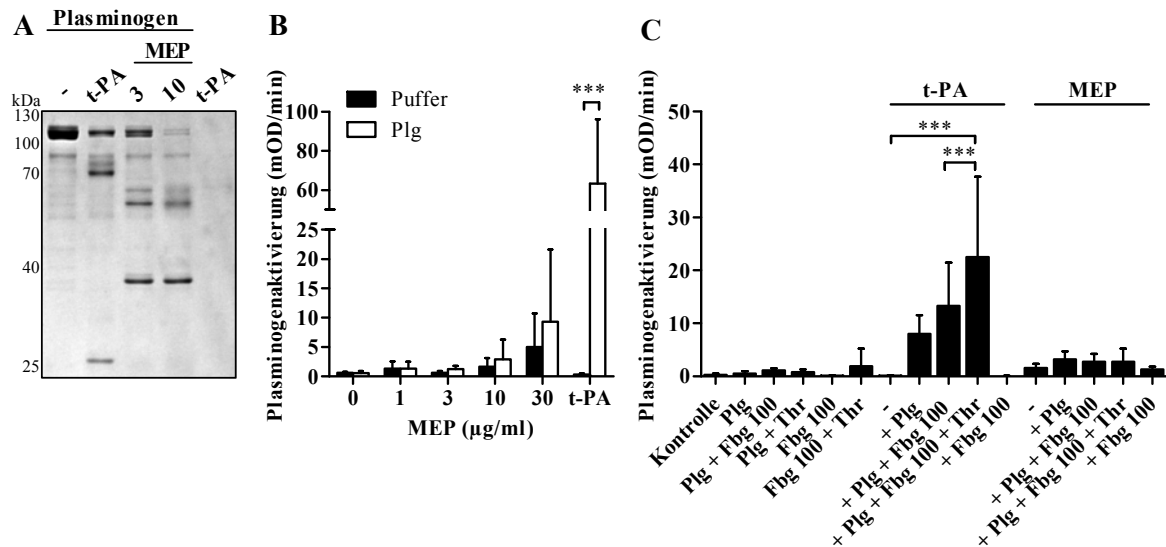


Abbildung 22: Plasminogenspaltung durch MEP.

(A) Plasminogen (2 µg) wurde mit ddH₂O, MEP (3 und 10 µg/ml) und dem gewebspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA, 0,3 µg/ml) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Spaltung des Plasminogens mittels SDS-PAGE analysiert. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche. (B) Humanes Plasminogen (Plg, offene Balken) oder Puffer (geschlossene Balken) wurden 15 min mit steigenden MEP-Konzentrationen oder t-PA (1 µg/ml) bei 37°C inkubiert und anschließend die Umwandlung zu Plasmin anhand der Spaltung des chromogenen Substrates S-2251 gemessen (n≥3). (C) Die Plasminogenaktivierung (25 µl Plg) in An- und Abwesenheit von Fibrinogen (Fbg, 100 µg/ml) und Thrombin (3,7 mU) wurde nach Zugabe von MEP (10 µg/ml) und t-PA (0,1 µg/ml) anhand der Proteolyse des chromogenen Substrates S-2251 bestimmt (n=3). Dargestellte Daten sind Mittelwerte ± SD (***P<0,001).

4.1.8.2 Einfluss von MEP auf die intravasale Fibrinolyse

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MEP nicht in der Lage ist die Fibrinolyse durch eine verstärkte Generierung aktiven Plasmins positiv zu beeinflussen, sollten nun mögliche direkte proteolytische Effekte auf Fibrinogen und Fibrin untersucht werden. Hierzu wurde zuerst ein stabiler Fibrin-Clot aus Plasma generiert und nach Zugabe von MEP und/oder t-PA die Zeit bis zur Lyse des Gerinnsels photometrisch detektiert. Wie t-PA verkürzte MEP die Zeit bis zur Lyse des Gerinnsels signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 23). Nach Kombination von t-PA und MEP war jedoch keine zusätzliche Verkürzung der Lysezeit im Vergleich zu t-PA allein ersichtlich.

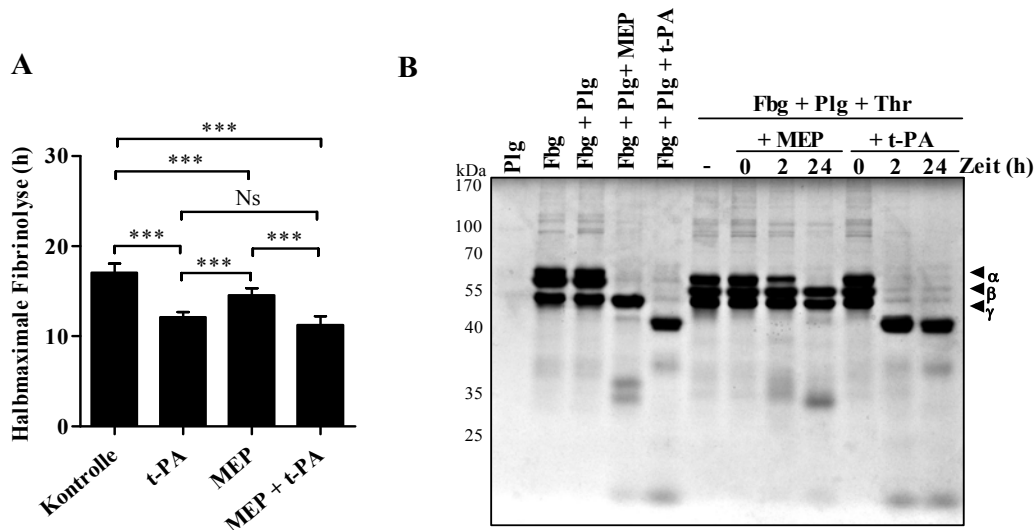


Abbildung 23: Fibrinogenolytische und fibrinolytische Eigenschaften von MEP.

(A) Humanes Plasma wurde durch Rekalzifizierung geronnen. Die fibrinolytische Aktivität von MEP (30 $\mu\text{g/ml}$), gewebsspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA, 0,5 ng/ml) oder MEP und t-PA in Kombination wurde im turbidimetrischen Test gemessen und als Zeit (h) bis zur halbmaximalen Lyse des Fibringerinnsels dargestellt ($n \geq 6$). Dargestellte Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD (** $P < 0,001$; Ns=Nicht signifikant). (B) Fibrinogen (Fbg, 12,12 μg), Plasminogen (Plg, 0,2 μg) und Thrombin (Thr, 0,3 μg) alleine oder Kombination wurden für verschiedene Zeitintervalle mit MEP (1 μg) und t-PA (0,1 μg) bei 37°C inkubiert und die Proteolyse von Fibrinogen und Fibrin mittels SDS-PAGE analysiert ($n=3$). Die Buchstaben α , β und γ stehen für die α -, β - und γ -Ketten des Fibrinogens. Die Abbildung ist repräsentativ für voneinander unabhängige Versuche.

Um die Reaktionen von MEP und t-PA mit den isolierten Komponenten Fibrinogen und Plasminogen zu analysieren und zu vergleichen, wurden diese miteinander inkubiert und die Proben anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 23). Nach Zugabe von t-PA kam es zur vollständigen Spaltung der α -, β - und γ -Kette des Fibrinogens, was durch das Verschwinden der ursprünglichen Banden und dem Auftauchen einer neuen kleineren Bande deutlich wurde. Auch MEP war in der Lage, Fibrinogen zu degradieren, allerdings war in diesem Fall nur ein Verschwinden der α - und β -Kette sichtbar, während die γ -Kette erhalten blieb.

Da Plasmagerinnsel nach Einwirkung von Thrombin vorwiegend aus vernetztem Fibrin und nicht aus Fibrinogen bestehen, wurde aus den isolierten Komponenten Fibrinogen und Plasminogen durch Zugabe von Thrombin ein Fibringerinnsel hergestellt, bevor wie zuvor beschrieben t-PA und MEP zugegeben wurden. Eine Zugabe von t-PA führte auch unter diesen Reaktionsbedingungen zur Spaltung aller drei Fibrinogen-Ketten. Nach Inkubation des Fibringerinnsels mit MEP hingegen konnte nur die Spaltung der α -Kette beobachtet werden.

Insgesamt zeigte sich, dass MEP die Zeit bis zur Lyse des Gerinnsels senken konnte, jedoch in Anwesenheit von t-PA keinen zusätzlichen Einfluss auf die Lyse-Geschwindigkeit hatte. Zudem war MEP in der Lage, Fibrinogen und Fibrin in bedingtem Maße zu spalten.

4.1.9 Thrombin-ähnliche Aktivität von MEP und sein Einfluss auf die Aktivierung von Thrombozyten

Wie bereits beschrieben, ist für die Verstärkung der Thrombinproduktion im Zuge der plasmatischen Gerinnung die Oberfläche aktivierter Thrombozyten unabdingbar (siehe 1.4.2). Das gebildete Thrombin führt in einer positiven Rückkopplungsreaktion zu einer zusätzlichen Verstärkung der Thrombozytenaktivierung. Da in der hier vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass die Protease-Aktivität von MEP durch das endogene SERPIN Antithrombin inaktiviert wurde, stellte sich die Frage ob MEP selbst eine Thrombin-ähnliche Aktivität besitzt und diese möglicherweise über eine verstärkte Thrombozytenaktivierung zur Propagation der Gerinnung beiträgt.

Tatsächlich zeigte MEP in der höchsten gemessenen Konzentration verglichen zur Pufferkontrolle eine signifikante Thrombin-Aktivität im chromogenen Test (Abbildung 24). Diese war jedoch, anders als die von Thrombin selbst, nicht durch den spezifischen Inhibitor Hirudin hemmbar. Im Weiteren wurde untersucht, ob die von MEP vermittelte Thrombin-Aktivität zur Aktivierung von Thrombozyten führt. Hierzu wurde die Aggregation als Maß für die Aktivierung von Thrombozyten in Plasma bestimmt. Anders als durch die bekannten Thrombozyten-Aktivatoren Thrombin und Kollagen hatte MEP im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation. Dieses Ergebnis konnte im turbidimetrischen Test bestätigt werden. Hier wurden die Gerinnungszeiten von Thrombozyten-reichem (*Platelet rich plasma*, PRP) und Thrombozyten-armem Plasma (*Platelet poor plasma*, PPP) nach Zugabe von MEP verglichen. Während PPP eine Gerinnungszeit von ca. 22,5 min aufwies, war das PRP bereits nach ca. 13 min geronnen. MEP hatte in beiden Plasmen signifikante prokoagulatorische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, die Gerinnungszeiten der MEP-behandelten Plasmen unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander.

Zusammengefasst deutet die Spaltung des chromogenen Substrates zwar auf eine Thrombin-ähnliche Aktivität von MEP hin, diese wurde jedoch weder durch den spezifischen Inhibitor Hirudin gehemmt, noch führte sie zu einer Aktivierung von Thrombozyten.

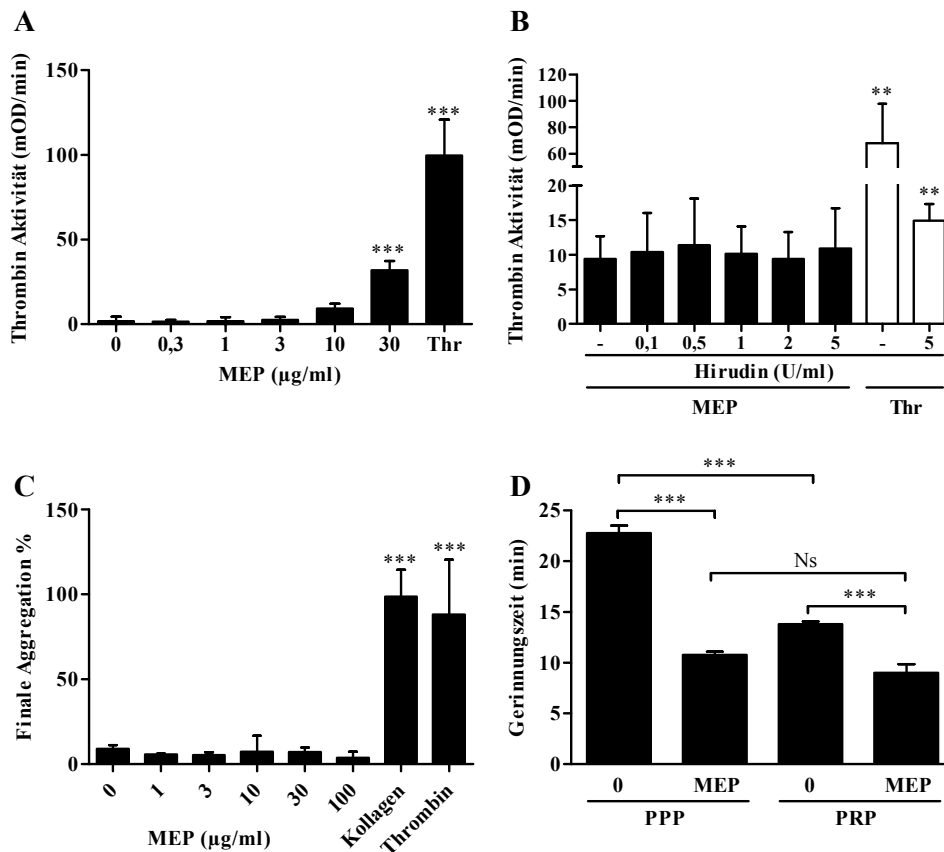


Abbildung 24: Thrombin-Aktivität von MEP.

(A) Die Thrombin-Aktivität bei steigenden MEP-Konzentrationen wurde im Vergleich zu 1 µg/ml Thrombin (Thr) anhand der proteolytischen Spaltung des chromogenen Substrates S-2238 ermittelt (n=6). (B) Bestimmung der Thrombin Aktivität von MEP (30 µg/ml) und Thrombin (0,5 µg/ml) nach 30 min Inkubation mit steigenden Hirudin Konzentrationen bei 37°C im chromogenen Test (n=3). (C) Die Aktivierung von Thrombozyten in Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) nach Zugabe von steigenden MEP-Konzentrationen wurde durch Aggregometrie bestimmt (n=3). Kollagen (4µg/ml) und Thrombin (25 nM) dienten als Positivkontrolle. (D) Vergleich der prokoagulatorischen Aktivität von MEP (30 µg/ml) in humanem Thrombozyten-armen Plasma (PPP) und Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) im turbidimetrischen Clot-Lyse-Test nach Rekalifizierung (n≥3). Alle Daten sind Mittelwerte ± SD (**P<0,01, ***P<0,001, Ns=Nicht signifikant).

4.2 Identifizierung prokoagulatorischer Komponenten in MEP

4.2.1 Fraktionierung von MEP mittels Ionenaustausch-Chromatographie

Zur Identifizierung der in MEP enthaltenen Proteasen mit Kallikrein-ähnlicher und prokoagulatorischer Aktivität wurde der MEP-Gesamtextrakt mittels einer Anionenaustauscher- und auch einer Kationenaustauscher-Säule aufgetrennt. Das Eluat wurde während dessen in Fraktionen gesammelt.

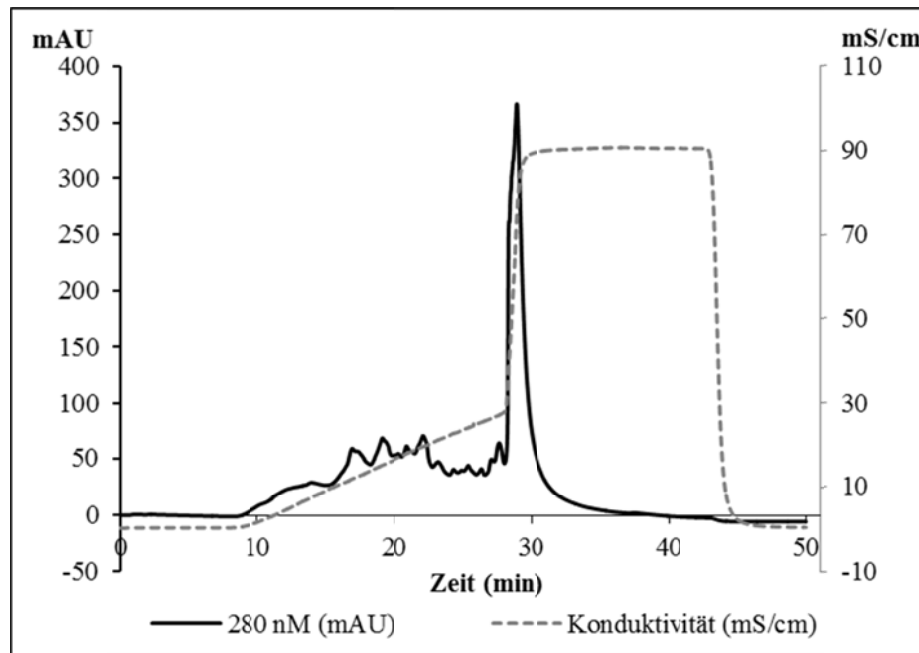


Abbildung 25: Anionenaustausch-Chromatographie von MEP.

Die zuvor 1:2 mit 0,2% CHAPS-Puffer verdünnte Probe wurde in 5 mM Tris-Puffer (pH 8, 0,1% CHAPS) auf die Säule injiziert und mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten (Endkonzentration 1 mM) eluiert und fraktioniert. Währenddessen wurden Proteine bei 280 nm, sowie die Konduktivität detektiert (mAU=Milli absorbance units; mS/cm=Milli Siemens/Zentimeter).

Wie in Abbildung 25 dargestellt, konnten in den ersten 8 Min nach Beginn der Elution von der Anionenaustauscher-Säule mittels UV-Detektion keine Proteine im Eluat bestimmt werden. Nach 10 Min eluierten die ersten Proteine, die größere Menge an Proteinen wurde bei einer Retentionszeit von 28 min während des Spülvorgangs detektiert. Die Absorption stieg in Form eines steilen Peaks auf bis zu 350 *milli absorbance units* (mAU) an, um bei 30 min, der Zeitpunkt bei dem der Natriumchlorid-Gradient 100% erreicht hatte, wieder auf ein basales Absorptionsniveau abzufallen. Die an der Anionenaustauscher-Säule nicht gebundenen Proteinfractionen (Durchfluss) wurden einer Kationenaustauscher-Säule zugeführt. Nach einer Retentionszeit von ca. 17 min wurde eine geringe Menge an Protein im Eluat detektiert. Die Peakhöhe lag bei ca. 10 mAU.

Für weitere Untersuchungen wurden sowohl die während der Anionenaustausch-, als auch während der Kationenaustausch-Chromatographie (Abbildung 32) von den Säulen eluierten Proteine in jeweils 40 Fraktionen á 0,5 ml gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert und die Effektivität der Fraktionierung von Peptiden und Proteinen in MEP untersucht.

Wie in Abbildung 26 exemplarisch für das Eluat des Anionenaustauschers gezeigt, konnten die in MEP enthaltenen Proteine fraktioniert werden, was sich durch Veränderungen des Proteinmusters der Fraktionen 1-40 beobachten ließ. Während keine Proteinbanden in den Fraktionen 1-19 zu

erkennen waren, zeigte das Bandenmuster in den Fraktionen 20-30 vorwiegend Proteine mit einer Größe von 20-28 kDa. Zudem waren ab Fraktion 25 sehr schwache Proteinbanden bei 50 und 55 kDa sichtbar. Nach Fraktion 31 nahm die Stärke der Banden deutlich zu. Fraktion 32 zeigt eine besonders starke Konzentrierung an Protein im Gel, wobei anzumerken ist, dass die Anzahl größerer Proteine (<25kDa) ebenfalls anstieg. Das in Fraktion 32 zu erkennende Bandenmuster nahm bis Fraktion 38 in seiner Stärke ab, sodass in den Fraktionen 39 und 40 keine Banden mehr sichtbar waren. Insgesamt zeigt das Ergebnis eine Fraktionierung der in MEP enthaltenen Peptide und Proteine durch die Ionenaustausch-Chromatographie.

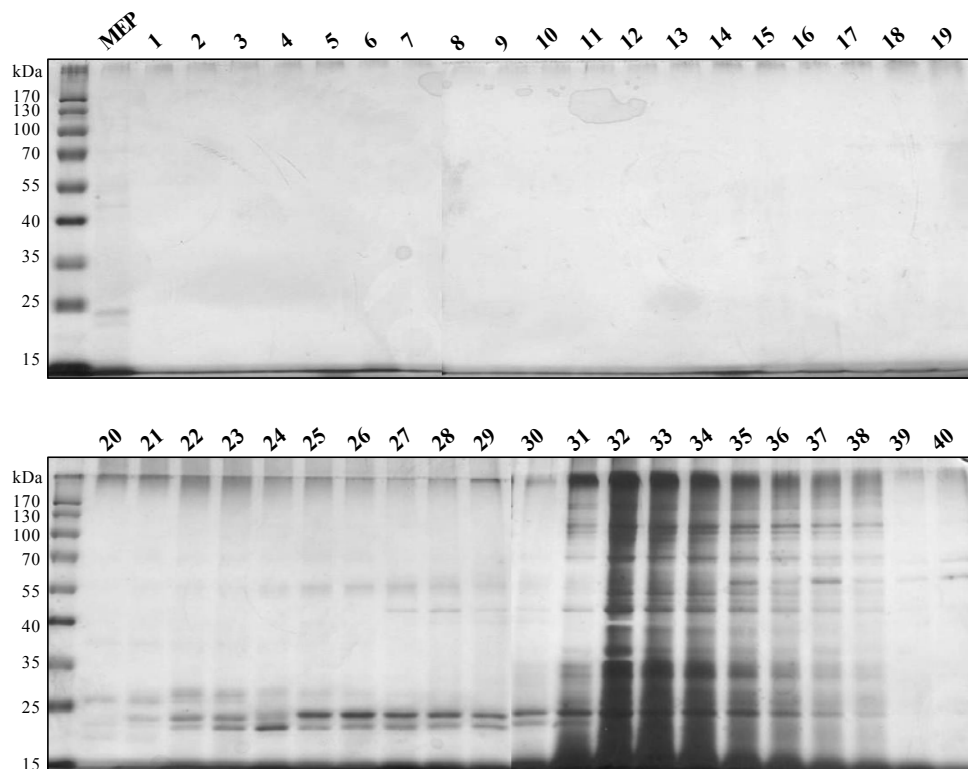


Abbildung 26: Proteinmuster der mittels Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennten Fraktionen im SDS-Gel.

Das Ausgangsmaterial MEP und die erhaltenen Fraktionen 1-40 (jeweils 10 µl) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Abbildung ist repräsentativ für mehrere unabhängige Versuche.

4.2.2 Untersuchung der MEP-Fractionen in gerinnungsrelevanten Tests

Die mittels Ionenaustausch-Chromatographie hergestellten MEP-Fractionen wurden im chromogenen Serinprotease- und Kallikrein-Aktivitätstest sowie im turbidimetrischen Clot-Lyse-Test untersucht. Von den nach Anionenaustausch-Chromatographie gesammelten Fraktionen hatten, neben MEP, die Fraktionen 15-20 und 24-35 signifikante Protease-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, wobei Fraktion 32 die höchste Aktivität aufwies (Abbildung 27). Dieses Aktivitätsmuster in den einzelnen Fraktionen zeigte sich auch nach Analyse der Kallikrein-

Aktivität. Hier zeigten ebenfalls die Fraktionen 15-20 und 24-35 signifikante Aktivität verglichen mit der Kontrolle, wobei Fraktion 32 mit einer Absorptionszunahme von ca. 120 mOD/min klar ersichtlich die Hauptaktivität beinhaltete. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen senkten die Fraktionen 28-33 verglichen mit der Pufferkontrolle, auch im turbidimetrischen Clot-Lyse-Test die Gerinnungszeit von Plasma signifikant.

Analog wurden auch die während der Kationenaustausch-Chromatographie gesammelten Fraktionen untersucht. Hier zeigten nur die Fraktionen 17-20 (ca. 30 mOD/min) sowie 23 und 24 (ca. 20 mOD/min) signifikante Protease-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, wobei die detektierte Aktivität jedoch im Vergleich zu den durch Anionenaustausch-Chromatographie fraktionierten Proben weitaus geringer war (Abbildung 33). Wie sich im turbidimetrischen Test zeigte, hatte keine der vom Kationenaustauscher gesammelten Fraktionen signifikanten Einfluss auf die Gerinnungszeit von Plasma.

Um Einflüsse der NaCl-Konzentration in den Anionenaustauscher-Fraktion 28-33 auf die beschriebene prokoagulatorische Aktivität auszuschließen, wurde der Einfluss verschiedene NaCl-Konzentrationen auf die Gerinnungszeit von Plasma im turbidimetrischen Test untersucht. Eine 1M NaCl-Konzentration verlängerte die Gerinnungszeit von Plasma signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 28). Als weitere Kontrolle wurde exemplarisch die Fraktion 32 vor der Analyse der Gerinnungszeit hitzebehandelt, was weitere Puffereinflüsse als Ursache für die prokoagulatorischen Effekte ausschließen sollte. Tatsächlich war Fraktion 32 nach Hitze-Inaktivierung nicht mehr im Gerinnungstest aktiv.

Um die aktiven Proteasen in den Fraktionen 31 und 32 darzustellen, wurden diese mit einer fluoreszenten Sonde markiert bevor die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden. In beiden Fraktionen zeigte sich eine deutliche Bande bei 25 kDa und eine etwas schwächere bei 15 kDa. Erstgenannte stimmt mit den bereits beschriebenen aktiven Banden in MEP überein, während die Bande bei 15 kDa im Gesamtextrakt nicht zu erkennen war. Darüber hinaus zeigte sich in Fraktion 32 eine weitere aktive Bande bei ca. 45 kDa.

Zusammenfassend zeigten die von der Anionenaustauschersäule eluierten Fraktionen 31-33 in allen Aktivitätstests die deutlichsten Effekte in den durchgeführten Protease-Aktivitätstests wie auch im Clot-Lyse-Test.

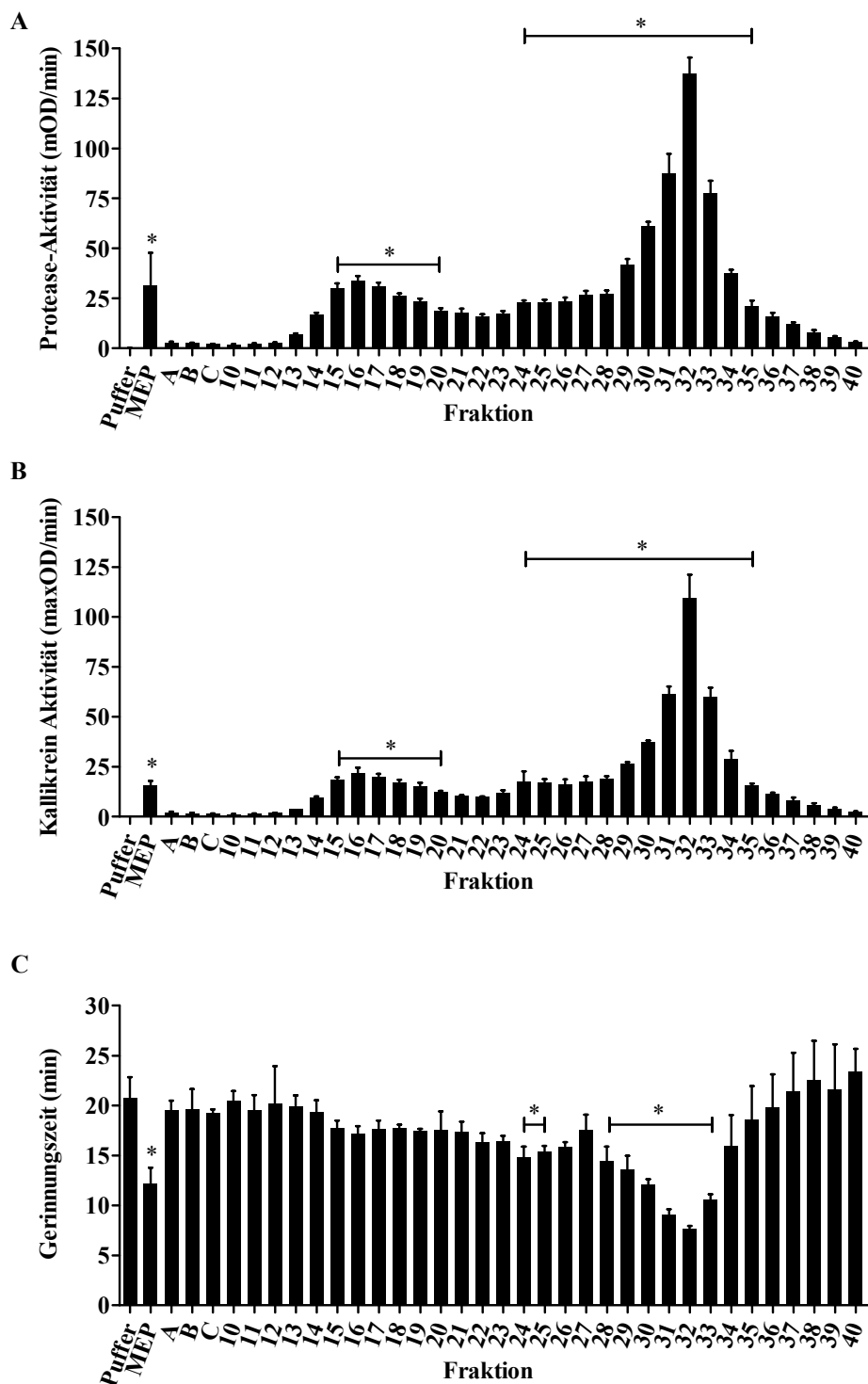


Abbildung 27: Bestimmung gerinnungsrelevanter Aktivitäten in MEP-Fractionen gewonnen mittels Anionenaustausch-Chromatographie.

(A) Serinprotease-Aktivität der mittels Anionenaustausch-Chromatographie gewonnenen Fractionen aus MEP (5 μ l), bestimmt anhand der Proteolyse des chromogenen Substrates S-2288 (n=3). (B) Kallikrein-Aktivität der MEP-Fractionen (5 μ l) gemessen im chromogenen Test mit S-2302 (n=3). (C) Gerinnungszeit in humanem Plasma nach Zugabe der MEP-Fractionen (10 μ l) (n=3). Die Gerinnung wurde hierbei durch Rekalzifizierung initiiert. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SD (* P <0,05; A=Fraktion 1-3; B=Fraktion 4-6; C=Fraktion 7-9).

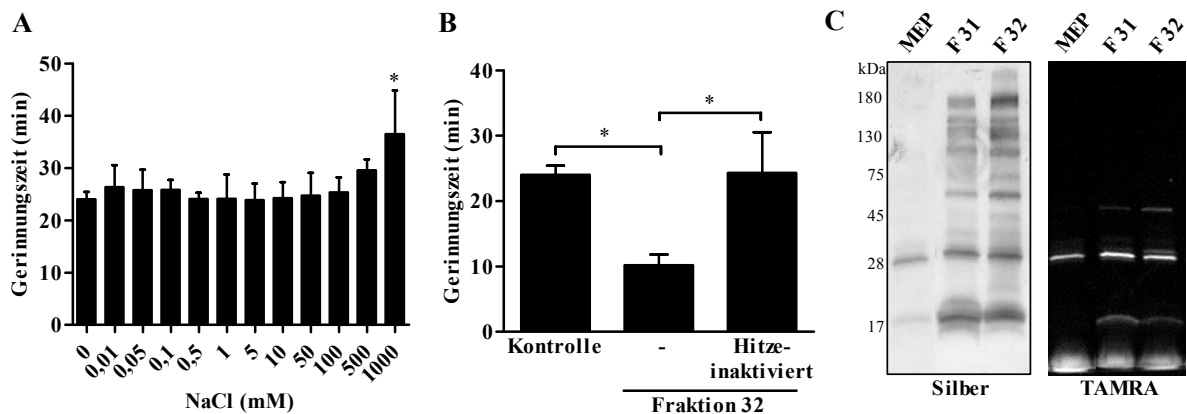


Abbildung 28: Kontrolle der prokoagulatorischen Aktivitäten der Fraktionen 31 und 32 nach Anionenaustausch-Chromatographie von MEP.

Die Gerinnungszeit von humanem Plasma wurde nach (A) Zugabe steigender Konzentrationen an Natriumchlorid (NaCl) und (B) unbehandelter und hitzeinaktivierte Fraktion 32 (5 µl) bestimmt (n=3). Die Gerinnung wurde durch Rekalifizierung gestartet. (C) Aktive Serinproteasen in den MEP und den MEP-Fraktionen 31 (F 31) und 32 (F 32) wurden mit einer fluoreszierenden Sonde (TAMRA) markiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und bei 528 nm detektiert. Dargestellte Werte sind Mittelwerte ± SD (*P<0,05).

4.2.3 Identifikation aktiver Proteine in MEP.

Nachdem die Hauptaktivität von MEP den Fraktionen 28-33 zugeschrieben werden konnte, sollten im Folgenden die darin enthaltenen Proteine identifiziert werden. Massenspektrometrische Analysen und Vergleiche mit bekannten Transkriptomdaten von *Lucilia sericata* sowie einer allgemeinen NCBI-Datenbankrecherche durch das Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena ermöglichten die Identifizierung der in Tabelle 3 aufgelisteten Proteine in Fraktion 31.

Bei den identifizierten Proteinen handelt es sich vorwiegend um Proteasen mit Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen aus *Drosophila* ssp. und *Lucilia cuprina*. Neben Aminopeptidase- und Carboxypeptidase-ähnlichen Enzymen, fanden sich zudem Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Proteasen. Letztere scheinen Homologien zu den aus *Drosophila* bekannten Jonah-Serinproteasen zu zeigen.

Nach Vergleich der Größe der ausgeschnittenen Banden und der dazugehörigen identifizierten Proteine (Abbildung 7, Tabelle 3) mit den durch die fluoreszierenden Sonden markierten Serinproteasen in MEP (Abbildung 28) schien die Bande 13 mit der größten Wahrscheinlichkeit das für die prokoagulatorischen Effekte des MEP-Gesamtextraktes verantwortliche Enzym zu enthalten.

Tabelle 3: Mittels MS und Transkriptom-Vergleich identifizierte Proteine in Fraktion 31.

Die Tabelle zeigt die anhand von Transkriptomdaten und Datenbankrecherchen identifizierten Proteine, sowie die dazugehörigen Blast-Ergebnisse und Organismen für die analysierten Banden 1-17 aus Fraktion 31²⁶³. (BLAST®=Basic Local Alignment Search Tool).

Bande	Mögliche Beschreibung	BLAST® Ergebnis	Organismus
1	Chymotrypsinogen / Protease Vorläufer		
2	Unbekannt // Jonah 65	XP_001361679.2	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
3	Unbekannt // Jonah 65	XP_001361679.2	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
4	Aminopeptidase N (Metalloprotease), Leukotriene A-4 Hydrolase // Jonah 65 / Unbekanntes Protein	XP_002014036.1	<i>Drosophila persimilis</i>
5	Alpha-Amylase (Alpha-Glucosidase) / Peritrophin Vorläufer	XP_002006188.1 / AAB70878.1	<i>Drosophila mojavensis</i> / <i>Lucilia cuprina</i>
6	Dipeptidyl Carboxydipeptidase/Angiotensin converting enzyme // Nitrilase (Vanin- ähnlich)	NP_477046.1 / NP_572297	<i>Drosophila melanogaster</i>
7	Dipeptidyl Carboxydipeptidase/Angiotensin Converting Enzyme // Alkalische Phosphatase		
8	Pro-x Carboxypeptidase // Dipeptidyl Carboxydipeptidase/Angiotensin converting enzyme // Aminopeptidase	XP_001954825.1 / NP_477046.1 / AAM77681.1	<i>Drosophila ananassae</i> / <i>Drosophila melanogaster</i> / <i>Lucilia cuprina</i>
9	Serinprotease (Trypsin) // Chitinase	NP_787956.1	<i>Drosophila melanogaster</i>
10	Niemann-pick Typ c-2e // Carboxypeptidase // Serine Protease (Trypsin)	XP_002070719.1	<i>Drosophila willistoni</i>
11	Serin Protease (Trypsin) // Niemann-pick Typ c-2e // Carboxypeptidase // Angiotensin Converting Enzyme		
12	Serinprotease (Trypsin) // Jonah 65aiv // Angiotensin Converting Enzyme	XP_001965734.1 / P51588.1 / XP_002070719.1	<i>Drosophila ananassae</i> / <i>Neobellieria bullata</i> / <i>Drosophila willistoni</i>
13	Chymotrypsinogen // Jonah 65aiv	AAA17382.1 / AAA68986.1	<i>Lucilia cuprina</i>
14	Serin Protease // Jonah 65aiv // Niemann-pick Typ c-2e	AAA68986.1 / XP_002026421.1	<i>Lucilia cuprina</i> / <i>Drosophila persimilis</i>
15	Niemann-pick Typ c-2e		
16	Jonah 65aiv // Niemann-pick Typ c-2e		
17	Niemann-pick Typ c-2e		

Die vorhandenen Transkriptomdaten von *Lucilia sericata* ermöglichten die Klonierung und Expression des in Bande 13 identifizierten Enzyms durch Mitarbeiter des Fraunhofer Instituts für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (IME) in der Projektgruppe „Bioressourcen“. Das

als „Jonah“ bezeichnete Enzym zeigte im direkten Strukturvergleich mit humanem Plasma Kallikrein, FXII und t-PA große Ähnlichkeiten in der Zymogen-Aktivierungssequenz und besitzt zudem die für Proteine der Trypsin-Superfamilie typische katalytische Triade (Abbildung 29).

Dieses, im Weiteren als „Jonah“ bezeichnete Protein, war nach seiner Expression und der nachfolgenden Aufreinigung mittels HPLC inaktiv und wurde deshalb durch Dialyse zurückgefaltet. Im Anschluss daran sollte das als Zymogen exprimierte Enzym aktiviert werden. Hierzu wurde das Dialysat für verschiedene Zeitintervalle mit Trypsin-Agarose inkubiert und anschließend im chromogenen Serinprotease-Aktivitätstest untersucht und der Einfluss auf die Gerinnungszeit bestimmt.

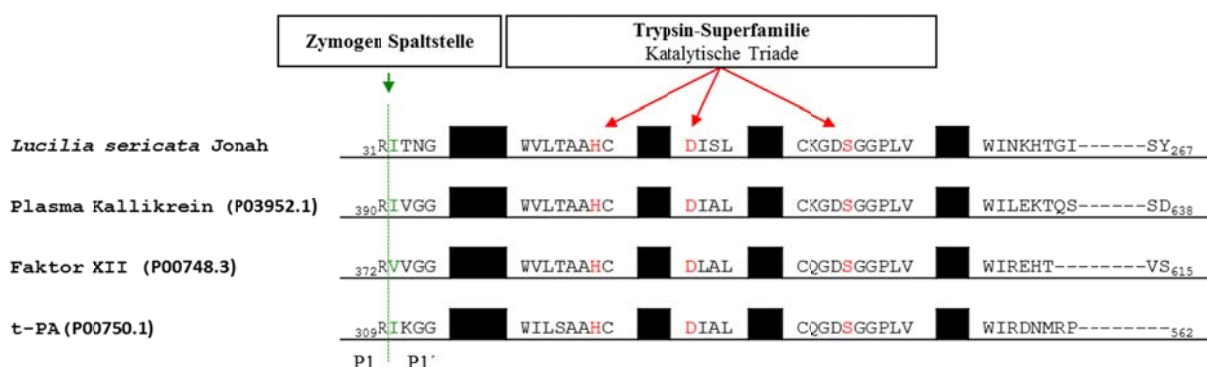


Abbildung 29: Vergleich der Aminosäuresequenzen des rekombinant hergestellten Jonah Proteins aus *Lucilia sericata* und humanem Plasma-Kallikrein, Faktor XII und gewebsspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA).

In Klammern dargestellt sind die UniProtKB-Identifikationsnummern²⁶⁴ der zum Vergleich genutzten Proteine. Tiefgestellte Nummern zeigen die Anzahl der Aminosäuren vor der ersten dargestellten Aminosäure (vorn) bzw. die Gesamtaminosäureanzahl (hinten). P1 ist der Rest des Substrats, der N-terminal der zu spaltenden Peptidbindung liegt, P1' bezeichnet den Rest C-terminal der zu spaltenden Bindung liegend. Die roten Buchstaben bezeichnen die Aminosäuren der katalytischen Triade (H=Histidin, D=Asparagin, S=Serin). Sequenzvergleich wurde mittels *Constraint-based Multiple Alignment Tool* (COBALT) durchgeführt²⁶⁵.

Wie in Abbildung 30 dargestellt, zeigte sich nach 20 h Aktivierung der Jonah-Protease eine signifikante Zunahme der Absorption im Vergleich zum unbehandelten Dialysat. Auch die Serinprotease-Aktivität war im Vergleich zum Ausgangsmaterial signifikant erhöht. Im Clot-Lyse-Test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Um auch optisch eine mögliche Spaltung und Aktivierung nachvollziehen zu können, wurden während der Aktivierung des Dialysats mit Trypsin-Agarose zu bestimmten Zeitpunkten Aliquots entnommen und analysiert. Das dialysierte Protein konnte nach SDS-PAGE in zwei Banden bei ca. 25 kDa detektiert werden (Abbildung 30). Zudem war eine größere Bande bei ca. 55 kDa, sowie einige kleinere <25 kDa sichtbar. Wie sich zeigte, nahm die Menge an Gesamtprotein im Probenansatz schon nach einstündiger Inkubation mit Trypsin-Agarose ab und die Bande bei

55 kDa war nur noch schwach zu erkennen, während eine zusätzliche Bande bei ca. 18 kDa sichtbar wurde. Nach achttündiger Inkubation des Jonah Proteins hatte die Menge an Protein bei 25 kDa weiter abgenommen und gleichzeitig die Anzahl kleinerer Banden <25 kDa zugenommen. 20 h nach Beginn der Aktivierung mit Trypsin-Agarose war die Hauptbande bei 25 kDa nahezu verschwunden, was von der Zunahme kleinerer Fragmente (<15 kDa) begleitet wurde.

Zusammenfassend wurde ein Enzym der Trypsin-Superfamilie aus *Lucilia sericata* als möglicher aktiver Kandidat für die prokoagulatorischen, von MEP vermittelten Eigenschaften identifiziert. Das Protein konnte bislang exprimiert, zurückgefaltet, und aktiviert werden. Erste Untersuchungen bestätigen eine Serinprotease-Aktivität des Enzyms, ein Einfluss auf die Gerinnungszeit von Plasma konnte jedoch nicht beobachtet werden.

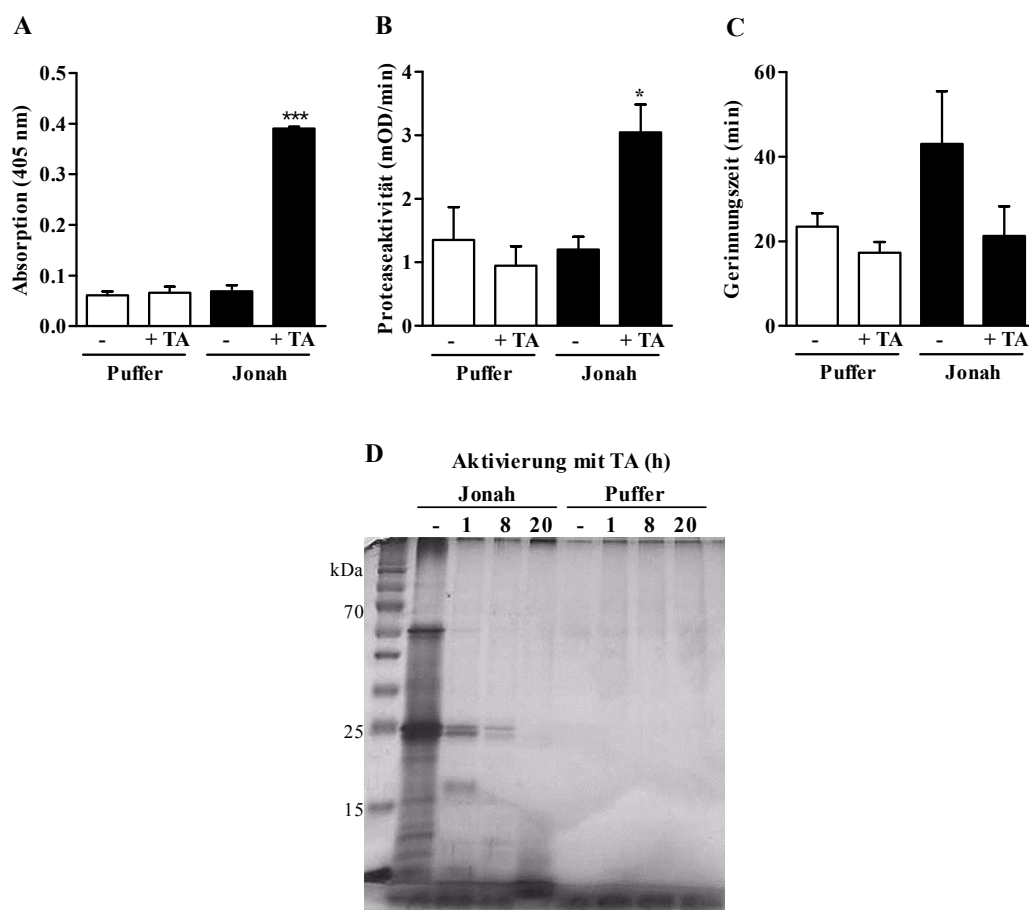


Abbildung 30: Aktivierung der Jonah Serinprotease mit Trypsin-Agarose.

(A) Absorption und (B) Serinprotease-Aktivität nach 20 stündiger Inkubation von Dialysepuffer und Jonah Dialysat mit Trypsin-Agarose (TA, 10% v/v) gemessen anhand der Proteolyse des Substrates S-2288 nach Zugabe von 20 µl Probe (n=3). (C) Prokoagulatorische Aktivität von 30 µl Dialysepuffer und Jonah Dialysat nach 20 stündiger Inkubation mit Trypsin-Agarose (n=3). Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD. (D) Zeitabhängige Aktivierung des Jonah Dialysates (20 µl) nach Inkubation mit Trypsin-Agarose (TA, 10% v/v). Als Negativkontrolle wurde Dialysepuffer mit Trypsin-Agarose für die verschiedenen Zeitintervalle inkubiert. Die Proben wurden nach Ende der Inkubationszeit mittels SDS-PAGE analysiert. Repräsentative Darstellung mehrerer unabhängiger Versuche.

4.3 Einfluss von MEP auf die Viabilität verschiedener Zelltypen

Wie unter 1.3.4.3 beschrieben, analysierten bereits in einigen Arbeitsgruppen den Einfluss von MEP auf die Viabilität verschiedener Zelltypen, zum Teil mit widersprüchlichen Ergebnissen. Zudem sind keine Untersuchungen bekannt, in denen der Einfluss des Exkret/Sekrets von proteinfrei kultivierten Maden bestimmt wurde. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Zytotoxizität von MEP aus proteinfrei gehaltenen Maden auf Endothelzellen und Fibroblasten untersucht und der Einfluss von proteinfreiem MEP auf die Proliferation dieser Zellen bestimmt.

4.3.1 Zytotoxizität

Um die Zytotoxizität von MEP auf das Wachstum von humanen primären Endothelzellen oder die murine Fibroblasten-Zelllinie L929 zu untersuchen, wurden Zellen für 48 h mit steigenden MEP-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Zytotoxizität mittels Lactatdehydrogenase (LDH)-Test bestimmt. Während MEP in einer Konzentration von 30 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle signifikant zytotoxisch für HUVEC war, wirkte keine der untersuchten MEP-Konzentrationen zytotoxisch in L929-Zellen (Abbildung 35).

4.3.2 Einfluss auf die Zellproliferation

Der Einfluss von MEP auf die Zellproliferation der beschriebenen Zelltypen wurde nach 24 h Inkubation der Zellen mit steigenden MEP-Konzentrationen im XTT-Proliferations-Test bestimmt. MEP zeigte in keiner Konzentration signifikanten Einfluss auf die Proliferation von HUVEC, führte aber in einer Konzentration von 30 µg/ml zu einer signifikanten Senkung der Fibroblasten-Proliferation, verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 36).

5 DISKUSSION

Der positive Einfluss von MEP in dem Débridement chronischer Wunden ist schon lange bekannt^{1,48} und konnte vor allem in den letzten Jahren einigen isolierten Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen zugeordnet werden^{77,295}. Obwohl Serinproteasen neben der Fibrinolyse zudem Hauptakteure der Blutgerinnung sind, fehlten bisher aussagekräftige Untersuchungen zu dem Einfluss von MEP auf die humane Gerinnung als Teilprozess der Wundheilung. In dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss von proteinfrei präpariertem MEP auf verschiedene Teilreaktionen der Gerinnung untersucht.

5.1 Interaktionen von MEP mit der humanen Blutgerinnung

Übereinstimmend mit vorherigen Untersuchungen^{75,76} wurden aktive Serinproteasen vom Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Typ mit einer Größe von ca. 25 kDa in dem MEP von proteinfrei kultivierten Maden nachgewiesen (Abbildung 10, Abbildung 11). Bekanntermaßen gehören zu den von Insekten im Rahmen ihrer extrakorporalen Verdauung sezernierten Proteinen sowohl Trypsin-, als auch Chymotrypsin-ähnliche Proteasen, welche eine entsprechende Größe besitzen und somit für die beobachtete Aktivität im MEP verantwortlich sein können¹³⁴.

Zur weiteren Charakterisierung des in MEP enthaltenen Protease-Typs verwendeten bereits Chambers *et al.* (2003) spezifische Serinprotease-Inhibitoren und konnten so eine Inhibierung der Serinprotease-Aktivität durch den Breitband-Inhibitor PMSF, jedoch nicht durch den Trypsin-spezifischen Inhibitor APMSF beobachten, was zu der Schlussfolgerung führte, dass das MEP vorwiegend Proteasen vom Chymotrypsin-ähnlichen Typ enthalte⁷⁶. Da die Autoren keinen Chymotrypsin-Inhibitor verwendet haben, sondern lediglich durch Ausschluss nach Behandlung des MEP mit einem Trypsin-Inhibitor und der verbleibenden Aktivität zu ihrer Annahme gelangten, kann letztendlich eine Beteiligung beider Protease-Typen (Trypsin- und Chymotrypsin-like) angenommen werden. Für die beschriebenen Unterschiede in der Charakterisierung der Proteasen könnten die verschiedenen zur Aufzucht der Maden verwendeten Medien eine Erklärung liefern. Während für die Aufzucht der Maden in dieser Arbeit proteinfreies Insektenzellmedium verwendet wurde, um eine Kontaminierung der Exkrete/Sekrete durch in Nahrungsbestandteilen enthaltene Proteasen zu vermeiden, verwendeten andere Autoren eine Gewebe-basierte Diät aus Leber, Agar, Hefe und Trypsin^{76,296}. Um den Einfluss der Maden-Nahrung auf das MEP-Proteom zu untersuchen und ggf. hieraus resultierende Unterschiede in der Aktivität des MEP zu testen, wurden in der vorliegenden Arbeit MEP-Extrakte aus proteinfrei und auf Blut-Agar kultivierten Maden verglichen. Es zeigten sich deutliche Unterschiede im Proteinmuster der beiden MEP-Präparationen (Abbildung 21) sowie eine signifikant verringerte

Serinprotease-, und Kallikrein-Aktivität der Blut-Agar-Präparation im chromogenen Test und nach Markierung aktiver Serinproteasen mittels Sonde im SDS-Gel. Nach Gelelektrophorese der markierten Proben konnten die bereits beschriebenen aktiven Serinproteasen bei 25 kDa in beiden Präparationen detektiert werden, die Stärke der Bande in der Blut-Agar-Präparation war jedoch geringer als in der proteinfreien Präparation, obwohl die entsprechende Proteinbande im Silbergel deutlich stärker als die des proteinfrei hergestellten MEP war. Die größere Proteinmenge in der Blut-Agar-Präparation bei verringerter Aktivität der Probe spricht dafür, dass Proteine aus dem Nährmedium von den Maden aufgenommen werden und ihre Produkte sich im Exkretions-Produkt wiederfinden, was zu einer Verunreinigung der Probe mit Fremdprotein führt und einer Verringerung der Konzentration an aktiven Enzymen führt. Die Art und Menge der im MEP enthaltenen Proteine ist also abhängig von der Art der Kulturmedien der Maden und bestimmt zudem die Aktivitäten des MEP-Gesamtextraktes. Um sicherzustellen, dass die im Gesamtextrakt identifizierten aktiven Moleküle tatsächlich von den Maden sezerniert/exkretiert wurden und keine Verunreinigungen darstellen, wurde in der vorliegenden Arbeit MEP von proteinfrei kultivierten Larven verwendet.

Außerdem zeigen die beschriebenen Ergebnisse eine bisher unbekannte prokoagulatorische Aktivität des MEP aus proteinfrei kultivierten Maden in humanem Plasma und im Vollblut (Abbildung 13). In einer Konzentration von 3 µg/ml verringerte MEP die Gerinnungszeit von humanem Plasma im turbidimetrischen Test. Übereinstimmend hiermit wurde auch die Latenzzeit bis zur Gerinnung von Plasma und humanem Vollblut im APTT-Test bzw. der ROTEM[®]-Analyse signifikant verkürzt, hierzu wurde allerdings eine vergleichsweise hohe Konzentration von 30 µg/ml MEP benötigt, was durch eine geringere Sensitivität der letztgenannten Testsysteme gegenüber dem turbidimetrischen Test zu erklären ist. Die für die Durchführung des Clot-Lysis Tests gewählten Mengen an CaCl₂ und t-PA führen zu in einer glockenförmigen Absorptionskurve (Abbildung 8), welche die Untersuchung sowohl von Gerinnungszeit-verkürzenden als auch –verlängernden Einflüssen zulässt und eine hohe Sensitivität gewährleistet. Die prokoagulatorische Aktivität korreliert mit dem schon 1933 von Weil *et al.* beschriebenen hämostatischen Effekt des MEP *in vivo*²⁵². Hitze-Inaktivierung, genau wie eine Vorbehandlung des MEP mit dem Inhibitor PMSF führten zum Verlust der prokoagulatorischen Wirkung (Abbildung 13), was die Vermutung nahe legt, dass die beobachteten Effekte von Serinproteasen in MEP vermittelt werden. Auch van der Plas *et al.* (2014) untersuchten den Einfluss von MEP auf die Gerinnung, konnten die beschriebenen prokoagulatorischen Effekte jedoch nicht bestätigen⁸¹. Allerdings erscheint hier die Vergleichbarkeit der Studien auf Grund verschiedener eingesetzter Materialien und Unterschiede in der Testdurchführung begrenzt. Während das in dieser Arbeit untersuchte MEP von proteinfrei kultivierten Maden stammte, gibt die von den

Autoren zitierte Quelle keinen Aufschluss über die Diät der Maden¹¹⁹. Die Proteinzusammensetzung des MEP ist, wie bereits beschrieben, abhängig von der Art der Maden-Diät und hat Einfluss auf die Protease-Aktivität der untersuchten Präparationen. Auch die prokoagulatorische Aktivität von MEP unterschied sich in den proteinfreien und den Blut-Agar-Präparationen, deutlich durch den fehlenden Einfluss der Blut-Agar-Probe auf die Gerinnungszeit (Abbildung 21). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von van der Plas *et al.* (2014)⁸¹ zeigte MEP in Konzentrationen unter 100 µg/ml keinen Einfluss auf die Gerinnungszeit von Normalplasma im APTT-Test (Abbildung 13). Unter Verwendung von Mangelplasmen, defizient an Kontaktphasen-Proteinen mit einer signifikant verlängerten Gerinnungszeit, wurden jedoch prokoagulatorische Effekte von MEP schon bei einer Konzentration von 30 µg/ml sichtbar (Abbildung 16, Abbildung 17). APTT-Reagens führt zu einer starken Gerinnungsaktivierung, sodass die Aktivität von MEP in Normalplasma durch eine übermäßige Induktion der Gerinnung überlagert sein kann und nur bei verlängerter Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung sichtbar wird. Zudem kombinierten die Autoren APTT- und Thromborel-Reagenzien mit CaCl₂, was diesen Effekt noch verstärkt haben könnte.

Des Weiteren wurde MEP wieder mit den in Tabelle 1 beschriebenen Inhibitoren vorbehandelt. Übereinstimmend mit den Serinprotease-Aktivitätstests wurde der prokoagulatorische Effekt des MEP durch SBTI und Chymostatin aufgehoben, sodass auch die Gerinnungszeit-verkürzende Wirkung von MEP auf Trypsin- und Chymotrypsin-ähnlichen Enzyme zurückzuführen ist (Abbildung 13). Da auch die Gerinnungsfaktoren zur Trypsin-Superfamilie der Serinproteasen gehören (siehe 1.4.1) erscheint der prokoagulatorische Einfluss des MEP durch die Ähnlichkeiten der enthaltenen Proteasen mit den Gerinnungsfaktoren schlüssig. Die Hemmung der prokoagulatorischen Aktivität von MEP durch die Inhibitoren PPACK, rHA-Infestin-4 und C1-Esterase-Inhibitor im durchgeführten Gerinnungstest (Abbildung 13) korreliert mit dem Verlust der Serinprotease-Aktivität von MEP nach Vorbehandlung mit diesen Inhibitoren. Da diese Inhibitoren spezifisch die Kontaktphasen-Proteine FXIa, FXIIa und Plasma Kallikrein hemmen (Tabelle 1) ist davon auszugehen, dass Trypsin- und Chymotrypsin-ähnliche Proteine in MEP, eine strukturelle/funktionelle Ähnlichkeit mit den Kontaktphasen-Proteinen FXIa, FXIIa oder Kallikrein besitzen und so die prokoagulatorische Aktivität in MEP vermitteln.

Tatsächlich führte MEP zu einer dosisabhängigen Spaltung des Kallikrein-spezifischen chromogenen Substrates S-2303 (Abbildung 14) und übereinstimmend hiermit, zur Spaltung von FXII und HMWK (Abbildung 15). Diese Ergebnisse belegen zum ersten Mal eine Kallikrein-ähnliche Aktivität von MEP.

Die Kallikrein-ähnlichen Aktivitäten von MEP erklären auch die in dieser Arbeit beobachtete Hemmung von MEP durch den Trypsin-Inhibitor SBTI, während Chambers *et al.* (2003) keine Hemmung der Protease-Aktivität durch den Trypsin-spezifischen Inhibitor AEBSF zeigen konnte⁷⁶. Während SBTI zu den bekannten Kallikrein-Inhibitoren²⁷⁹ zählt und zudem in geringem Maße auch Chymotrypsine inaktiviert²⁸¹, ist keine Hemmung dieser Enzyme durch APMSF beschrieben²⁹⁷. Die fehlende Inhibitor-Spezifität des CTI für Kallikrein könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass MEP's Protease-Aktivität nicht durch Vorbehandlung mit CTI gehemmt wurde. Allerdings ist CTI auch ein bekannter FXIIa-Inhibitor in Plasma. Deshalb ist auffällig, dass ein anderer FXIIa-Inhibitor, rHA-Infestin-4²⁷⁸, MEP schon in geringen Konzentrationen vollständig inaktivierte.

Die MEP-vermittelte Spaltung von FXII im isolierten System und im Plasma korrelierte mit einer Aktivierung des Enzyms zu Faktor XIIa, was mit chromogenem Substrat im Aktivitätstest verifiziert wurde (Abbildung 15). Auch die MEP-abhängige Verminderung der Gerinnungszeit in Präkallikrein-defizientem Plasma bestätigt diese Befunde. In diesem Plasma kann FXIIa nach Aktivierung kein Präkallikrein zu Kallikrein spalten, sodass eine Amplifikation der FXIIa-Bildung im Rahmen der Kontaktphasen-Aktivierung ausbleibt, was in einer signifikanten Verlängerung der Gerinnungszeit resultiert. MEP stellte im turbidimetrischen Test die Gerinnungszeit des Präkallikrein-defizienten Plasmas wieder her (Abbildung 16), was mit der Kallikrein-ähnlichen Aktivität von MEP und resultierender FXIIa-Bildung zu erklären ist. Anzumerken ist, dass eine Supplementation mit Präkallikrein selbst in unphysiologisch hohen Mengen nicht zu einer signifikanten Verkürzung der Gerinnungszeit in dem Präkallikrein-defizienten Plasma führte. Die Gerinnungszeit in dem Präkallikrein-defizienten Plasma war zwar im Vergleich zu Normalplasma verlängert, der Effekt jedoch insgesamt gering, sodass die hohe Standardabweichung der mit Präkallikrein supplementierten Versuchsgruppe zum Ausbleiben eines signifikanten Effektes geführt haben könnte. Die Stärke der prokoagulatorischen Aktivität des MEP in diesem Plasma deutet darauf hin, dass MEP neben der Aktivierung von FXII durch seine Ähnlichkeit zu Kallikrein noch weitere Kontaktphasen-Proteine ersetzen bzw. aktivieren kann. Dies wurde durch die Supplementation von Plasmen defizient an FXII, FXI und HMWK und anschließender Bestimmung der Gerinnungszeiten dieser Plasmen, bestätigt (Abbildung 16, Abbildung 17). Auch hier senkte MEP die Gerinnungszeit signifikant, was möglicherweise durch eine direkte Ähnlichkeit zu FXIIa oder FXI zu erklären ist. Kallikrein und FXI sind zu 58% strukturhomolog²⁰⁷, sodass eine direkte Aktivierung von FIX durch MEP denkbar wäre. Zudem wurde MEP durch den FXIIa-Inhibitor rHA-Infestin-4 vollständig in seiner prokoagulatorischen Aktivität gehemmt, was neben der beobachteten Kallikrein-Aktivität auch auf Ähnlichkeiten zu FXIIa hindeutet.

In Übereinstimmung mit der beschriebenen Kallikrein-Aktivität wurde zudem eine Inhibierung der Serinprotease-Aktivität von MEP durch den C1-Esterase-Inhibitors beobachtet (Abbildung 18), was die Ähnlichkeit der Proteasen untermauert. Neben den Kontaktphasen-Proteinen, welche durch den Inhibitor gehemmt werden (siehe 1.4.4), sind zudem Chymotrypsine in der Lage den Inhibitor zu spalten²⁹⁸. Übereinstimmend hiermit konnte eine Spaltung des C1-Esterase-Inhibitors nach Inkubation mit MEP durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich im Aktivitätstest, dass der mit MEP behandelte Inhibitor nicht mehr in der Lage war, FXIIa zu hemmen, was einem „Verbrauch“ des Inhibitors gleichkommt und insgesamt zu einem netto-prokoagulatorischen Effekt führen kann²⁹⁹.

Während nachgewiesen werden konnte, dass die Spaltung von FXII durch MEP auch zu einer erhöhten FXIIa-Aktivität führt, wurde die Spaltung des HMWK durch MEP nur durch Gelelektrophorese nachvollzogen (Abbildung 15), wohingegen Aktivitätstest bislang fehlen. Besonders im Hinblick auf die bekannten antibakteriellen Effekte des MEP (siehe 1.3.4.2) ist die beobachtete Spaltung des HMWK durch MEP aber von Interesse. Im Zuge der Kallikrein-vermittelten Aktivierung von HMWK wird das vasoaktive Peptid Bradykinin freigesetzt³⁰⁰. Dieses vasodilatorische Peptid erhöht die Gefäßpermeabilität, was im Rahmen des Wundheilungsvorgangs die Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen (siehe 1.2.1) erleichtern und somit die Abtötung von Bakterien in der Wunde beschleunigen kann. Das aktivierte HMWK (HKa) konnte von unserer Arbeitsgruppe als anti-inflammatorisches Peptid identifiziert werden²³⁴ und kann so die Bradykinin-Wirkung regulieren. Zudem besitzen sowohl die D3-, als auch die D5-Domäne des HMWK selbst antibakterielle Aktivität^{235,236}. Die Aktivierung von HMWK und die Freisetzung von Bradykinin wäre ein bisher unbekannter antibakterieller Mechanismus von MEP, der zudem durch die Freisetzung von HKa reguliert und die Inaktivierung des C1-Esterase-Inhibitors unterstützt wird.

Cazander *et al.* 2012 zeigten, dass MEP durch Spaltung der Komplementfaktoren C3 und C4 zu deren „Verbrauch“ führt und somit die Aktivierung des Komplement-Systems reduzieren kann¹²². Eine solche Spaltung von Komplementfaktoren ist auch für Kallikrein bekannt³⁰⁰. Die beschriebene Inaktivierung des C1-Esterase-Inhibitors durch MEP würde allerdings im Bezug auf das Komplementsystem zu einem gegensätzlichen Effekt, nämlich einer Netto-Steigerung der Komplement-Aktivierung durch Wegfall der C1-Esterase-Inhibitor vermittelten Hemmung der Komplementproteasen führen. Letztendlich scheint MEP durch seine Kallikrein-ähnliche Aktivität nicht nur prokoagulatorische Effekte zu vermitteln, sondern über verschiedene Mechanismen auch einen Einfluss auf das Immunsystem auszuüben. So kann die Inaktivierung des C1-Esterase-Inhibitors durch MEP zu einer Erhöhung der Komplement-vermittelten antibakteriellen Immunantwort führen und überdies die Wundheilung fördern.

FXIIa ist zwar der Hauptaktivator von Präkallikrein, aber Kallikrein zeigt selbst autokatalytische Wirkung bei längerer Inkubationszeit³⁰¹. Nach 60 min Inkubation von Präkallikrein mit MEP (3 µg/ml) war im SDS-Gel keine Spaltung des Proenzym zu beobachten (Abbildung 15), was zu der Annahme führt, dass MEP Präkallikrein selbst nicht aktivieren kann. Im chromogenen Kallikrein-Aktivitätstest wurde nach Zusatz von Präkallikrein durch eine sehr hohe MEP-Konzentration (30 µg/ml) jedoch eine ca. 50%igen Steigerung der Substratspaltung nachgewiesen (Abbildung 14), was möglicherweise durch die höhere MEP-Konzentration in diesem Versuchsansatz zu erklären ist.

Die in MEP enthaltenen Proteasen scheinen also funktionale Ähnlichkeiten zu dem Kontaktphasen-Protein Kallikrein zu besitzen. Hieraus leiten sich sowohl das beschriebene Inhibitorprofil von MEP, als auch seine prokoagulatorischen Wirkungen in Plasma und Vollblut ab. Die Kontaktphasen-*Bypassing*-Aktivität von MEP in Plasma deutet zudem auf eine Ähnlichkeit zu den Gerinnungsfaktoren FXIIa und FXIa hin.

Der endogene SERPIN Antithrombin hemmt die Protease-Aktivität von MEP dosisabhängig (Abbildung 12). Da bereits seit 1975 bekannt ist, dass Antithrombin neben Thrombin und den Gerinnungsfaktoren FXa und FXIa (Tabelle 1) auch Plasma Kallikrein in seiner Aktivität hemmt^{302,303}, bestätigt diese Beobachtung die in dieser Arbeit entdeckte Kallikrein-ähnliche Aktivität von MEP. Wie bereits beschrieben führt die Interaktion eines SERPINs mit der zu inhibierenden Proteasen zur Ausbildung eines Komplexes in dem das SERPIN als Suizidsubstrat nachfolgend gespalten wird (siehe 1.4.1). Der Thrombin-Antithrombin-Komplex kann im Plasma nachgewiesen werden und dient als Marker für eine Gerinnungsaktivierung¹⁶⁴. Plasma-Kallikrein als auch Trypsin bilden ebenfalls einen nachweisbaren Komplex mit Antithrombin^{283,304}. Nach Inkubation von MEP mit Antithrombin und anschließender elektrophoretischer Auftrennung konnte jedoch keine Komplexbildung nachgewiesen werden (Abbildung 12), was möglicherweise die Folge einer zu geringen Menge an aktiven und mit Antithrombin reagierenden Proteasen im Probenansatz ist.

Die antikoagulatorische Aktivität von Antithrombin wird durch unterschiedliche natürliche und synthetische Heparinoide um ein Vielfaches verstärkt. Dabei sind die vom Gefäßendothel luminal exponierten Heparansulfate von Bedeutung¹³⁶. Heparinide führen zu einer Konformationsänderung des Antithrombinmoleküls, sodass der im nativen Zustand im Inneren des Moleküls versteckte RSL (siehe 1.4.1) exponiert und somit leichter für Proteasen zugänglich wird¹³⁷. Burrowes *et al.* (1975) als auch Venneröd *et al.* (1975) zeigten, dass die Inhibierung von Plasma-Kallikrein durch Heparin verstärkt wird^{302,303}. Laut unseren Ergebnissen war die Inhibierung von MEP durch Antithrombin unabhängig von Heparin (Abbildung 12). Eine solche Heparin-

unabhängige Inaktivierung durch Antithrombin ist für Trypsin beschrieben²⁸³, sodass die Inhibierung von MEP nicht auf eine spezifische Aktivität, sondern vielmehr auf das Vorhandensein von Trypsin-ähnlichen Domänen in MEP-Molekülen zurückzuführen zu sein scheint.

In Übereinstimmung diesen Angaben war MEP zwar in der Lage, das Thrombin-spezifische Substrat S-2238 zu spalten, wurde jedoch nicht durch den Thrombin-selektiven und höchst affinen Inhibitor Hirudin gehemmt^{164,274} (Abbildung 24). Da das eingesetzte chromogene Substrat neben Thrombin eine hohe Trypsin-Spezifität aufweist, wurden auch hier eher unspezifische Spaltung durch MEP erfolgt zu sein. Das während der plasmatischen Gerinnung gebildete Thrombin aktiviert in einer positiven Rückkopplungsreaktion Thrombozyten durch Spaltung von deren Protease-aktivierten Rezeptoren (*Protease-activated-receptor*, PAR) 1 und 4, was momentan zu einer Aggregation der Thrombozyten führt (siehe 1.4.2). MEP hingegen zeigte weder in einem Thrombozyten-Aggregations-Test noch im Gerinnungstest einen Einfluss auf die Thrombozytenaktivität (Abbildung 24), was mit den Beobachtungen anderer Autoren, die keinen Einfluss von MEP auf die Thrombin-Zeit feststellten, korreliert⁸¹.

Um die für die Kallikrein-ähnliche Aktivität verantwortlichen Proteasen im MEP näher zu charakterisieren, wurde eine Größenfraktionierung des Gesamtextraktes vorgenommen (Abbildung 19). Hierbei hatte die Fraktion 3 (> 30 kDa) die höchste Protease-Aktivität (Abbildung 19) und den stärksten Einfluss auf die Gerinnungszeit (Abbildung 20). Interessanterweise enthält die Fraktion 3 nicht, wie erwartet, nur Proteine mit einem Molekulargewicht von mehr als 30 kDa, sondern zudem eine Vielzahl kleinerer Proteine. Die Markierung aktiver Serinproteasen mittels einer fluoreszierenden Sonde zeigte zudem eine deutliche Aktivität in der bereits für den Gesamtextrakt beschriebenen Bande bei 25 kDa. Die Ursache für das Vorhandensein von Proteinen <30 kDa in der Fraktion 3 könnte eine Komplexbildung mit anderen in MEP vorhandenen Proteinen sein. Diese Komplexe verbleiben auf der Ausschlussmembran und werden erst unter den reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE voneinander getrennt im Gel sichtbar. Die Konzentration der aktiven Serinprotease-Bande in Fraktion 3, die zudem in den beschriebenen Tests die stärksten Aktivitäten zeigte, legt die Vermutung nahe, dass diese unbekannte(n) Enzyme maßgeblich für die Vermittlung der prokoagulatorischen Aktivität von MEP verantwortlich ist (sind).

5.2 Einfluss von MEP auf die Fibrinolyse

Die Aktivierung des Hämostasesystems nach Gefäßverletzungen hat zum einen das Ziel größere Blutverluste zu verhindern und durch die Produktion eines Fibrinnetzwerkes

Zellmigrationsvorgänge im Wundheilungsprozess zu erleichtern. Erreicht wird dies durch eine dynamische regulierte Interaktion von Gerinnung und Fibrinolyse¹²³. Als Zielprotease des fibrinolytischen Systems ist Plasmin intravasal für den Fibrinabbau/Thrombolyse und damit für die Aufrechterhaltung des Blutflusses verantwortlich (siehe 1.4.5), spielt aber auch extravasal eine entscheidende Rolle bei Prozessen wie Matrixabbau und –Umbau/Zellinvasion und ist somit an Wundheilungsreaktionen beteiligt (siehe 1.2).

Eine Rolle von MEP im Abbau von Matrixkomponenten und fibrinösen Wundbelägen wurde bereits beschrieben und die dafür verantwortlichen Enzyme in MEP identifiziert^{74,76,77,81,305}. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von MEP speziell auf Prozesse der intravasalen Fibrinolyse, d.h. auf die Plasminogenaktivierung und die Auflösung von Fibringerinnseln, untersucht. Im chromogenen Plasminaktivitätstest zeigte MEP keine intrinsische Plasminaktivität und obwohl MEP Plasminogen spaltete wurde dabei kein aktives Plasmin generiert (Abbildung 22). Letzteres korrespondiert mit der Beobachtung, dass auch die Kontakphasenproteine Kallikrein, FXIIa und FXI Plasminogen spalten können, jedoch mit wesentlicher schwächerer Aktivität als der physiologische Plasminogenaktivator t-PA^{199,306,307}. In Übereinstimmung mit den beschriebenen Ergebnissen beobachteten bereits van der Plas *et al.* (2014) eine MEP-vermittelte Proteolyse von Plasminogen⁸¹. Die MEP-vermittelte Plasminogen-Proteolyse wurde in dieser Arbeit mit der durch den intravasalen Plasminogenaktivator t-PA verglichen und es zeigte sich, dass die entstehenden Produkte sich sowohl in ihrer Größe als auch ihrer Plasminaktivität deutlich unterschieden, was auf eine unspezifische Proteolyse von Plasminogen durch MEP hindeutet. Bei der t-PA-induzierten Plasminogenaktivierung dient Fibrin als wichtiger Kofaktor und die Zugabe von diesem führt im chromogenen Test zu einer deutlichen Verstärkung der Plasminogenaktivierung durch t-PA. Die fehlende Spezifität in dieser Reaktion von MEP mit Plasminogen wird dadurch deutlich, dass auch die Zugabe des Kofaktors Fibrin keinen Einfluss auf die Plasminogenaktivierung zeigte (Abbildung 23). Anzumerken ist aber, dass MEP, genau wie t-PA, im Plasma-Fibrinolysetest signifikante profibrinolytische Wirkung hatte. Nach Kombination von MEP und t-PA in diesem Versuchsansatz war jedoch kein zusätzlicher Einfluss des MEP erkennbar, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Einfluss des MEP auf die intravasale Fibrinolyse in Anwesenheit von t-PA zu vernachlässigen ist.

5.3 Einfluss von MEP auf die Zellviabilität

Lange ging man davon aus, dass Maden nur nekrotisches Gewebe und Bakterien aus Wunden entfernen und kein gesundes Gewebe angreifen^{3,4}. Diese Annahme ist heute widerlegt und es ist zudem bekannt, dass in zu hohen Mengen applizierte Maden gewebeschädigende Effekte vermitteln⁵. Bisher gibt es keine Untersuchungen, die den Einfluss des Exkret/Sekrets von

proteinfrei kultivierten Maden auf die Viabilität von Zellen bestimmen. In dieser Arbeit war die proteinfreie MEP-Präparation in Konzentrationen von 30 µg/ml zytotoxisch für Endothelzellen, hatte aber verglichen mit der Kontrolle, kein signifikanter Einfluss auf die Proliferation dieser Zellen (Abbildung 35, Abbildung 36). In der untersuchten Fibroblasten-Zelllinie hatte MEP keine zytotoxische Wirkung, senkte die Proliferation der Zellen aber signifikant in einer Konzentration von 30 µg/ml.

Zusammenfassend scheint die Zytotoxizität von MEP sowohl abhängig vom Zelltyp als auch der eingesetzten MEP-Konzentration zu sein. Insgesamt spiegeln die Ergebnisse die Widersprüchlichkeit der bereits vorhandenen Daten zum Einfluss von MEP auf die Vitalfunktionen von verschiedenen Zelltypen wider (siehe 1.3.4.3) und korrelieren mit Berichten über negative Auswirkungen der Maden und/oder deren sezernierten Protease im Wundheilungsprozess⁵. Im Hinblick auf die prokoagulatorischen Effekte von MEP, welche abhängig vom Testsystem in Konzentrationen von 3-30 µg zu beobachten waren, legt es jedoch den Bedarf an weiteren Untersuchungen offen, mit dem Ziel aktive Proteine künstlich herzustellen und diese in standardisierten und kontrollierbaren Mengen für die Wundtherapie nutzbar zu machen.

5.4 Identifizierung der aktiver Proteasen in MEP

Nach Fraktionierung des MEP und Untersuchung der Fraktionen wurde die Hauptaktivität in MEP durch chromogene Protease-Aktivitätstests und Clot-Lyse-Test den Fraktionen 31-33 nach Anionenaustausch-Chromatographie zugeordnet (Abbildung 27). Das aktive Enzym oder der Enzymkomplex eluierte somit nach einer Retentionszeit von 28-29 Min von der Säule (Abbildung 25) und findet sich mit steigender Menge in diesen Fraktion konzentriert wieder. Stellvertretend für die aktiven Fraktionen 31-33 wurden die Proteine in Fraktion 31 durch massenspektrometrische Analysen untersucht und identifiziert. Die in Bande 13 (Abbildung 7, Tabelle 3) identifizierten Proteine entsprechen in ihrem Molekulargewicht den aktiven Serinproteasen bei 25 kDa in MEP (Abbildung 28). Die Sequenz des identifizierten Proteins zeigt Homologien zu bekannten Serinproteasen aus *Lucilia cuprina*^{308,309} und den aus *Drosophila* ssp. bekannten Jonah Proteasen³¹⁰ und ähnelt den Aminosäuresequenzen der Gerinnungsproteinen Plasma Kallikrein und FXII, sowie t-PA (Abbildung 29). Neben Ähnlichkeiten in den Zymogenspaltstellen, verfügt das Enzym zudem über die für Proteasen der Trypsin-Superfamilie typische katalytische Triade, sodass das Protein theoretisch für die MEP-vermittelte Serinprotease-Aktivität und die daraus resultierende prokoagulatorische Wirkung mitverantwortlich sein konnte. Das identifizierte Protein wurde deshalb in der Fraunhofer

Projektgruppe „Bioressourcen“ in *E.coli* kloniert und exprimiert. Nach Rückfaltung des Proteins wurden Aktivierungsversuche mit Trypsin-Agarose in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Tatsächlich konnte nach 20 h Inkubation der Protease mit Trypsin-Agarose ein Anstieg der Serinprotease-Aktivität detektiert werden (Abbildung 30). Verglichen mit der MEP-vermittelten Serinprotease-Aktivität (Abbildung 10) wird jedoch deutlich, dass die Aktivität der Jonah-Protease deutlich geringer als die des MEP-Gesamtextraktes ist. Im Plasma Clot-Lyse Test wurde kein Einfluss des Enzyms auf die Gerinnungszeit festgestellt (Abbildung 30). Gründe hierfür können ein zu geringer Proteingehalt im Dialysat oder eine ineffiziente Aktivierung des Enzyms sein. Die Proteinkonzentration des Jonah-Dialysats beträgt $12,01 \pm 2,92$ mg/ml (laut Proteinbestimmung mittels BCA), sodass bei Einsatz von 20 µl Jonah im Clot-Lysis-Test eine Endkonzentration von 2,4 mg/ml vorlag. Bei Betrachtung des Aktivierungsprozesses nach SDS-PAGE war nach 1 h Aktivierung des Dialysats eine deutliche Abnahme der Bandenintensität bei 25 kDa sichtbar und nach 20 h schienen nur noch kleinere Fragmente des Proteins vorhanden zu sein. Das zur Aktivierung verwendete Trypsin spaltete das Protein schon nach kurzer Zeit in kleine Bruchstücke. Die Zunahme der Protease-Aktivität nach 20 h jedoch, deutet darauf hin, dass geringe Menge an aktivem Protein oder Spaltstücke dessen noch vorhanden sind.

Im Clot-Lyse-Test verlängerte das unbehandelte Dialysat die Gerinnungszeit augenscheinlich, auch wenn nach statistischer Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen vorlagen (Abbildung 30). Gründe hierfür können während Reste des β -Mercaptoethanols im Dialysat oder Interaktionen des inaktiven Proteins mit Faktoren in Plasma oder dem zugesetztem t-PA sein. Letztendlich besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass das rekombinant hergestellte Jonah Protein, trotz seiner Anwesenheit in den aktiven MEP-Fractionen, den Ähnlichkeiten zu den Kontaktphasen-Proteinen und der nachgewiesenen Serinprotease-Aktivität nicht an der Vermittlung der prokoagulatorischen Wirkung des MEP beteiligt ist. Für die Klärung dieser Frage bleiben eine optimale Aktivierung des Enzyms und seine Untersuchung in verschiedenen Gerinnungstests unabdingbar. Hierzu müssen verschiedene Aktivatoren und deren Einfluss auf das Enzym untersucht werden. Des Weiteren sollte der Aktivator nach Ende der Inkubation z.B. mittels chromatographischer Methoden aus der Probe entfernt werden können. Um eine autokatalytische Spaltung und Zerstückelung des aktivierten Enzyms für weitere Untersuchungen auszuschließen und eine Produktion und Lagerung in größerem Umfang zu gewährleisten sind zudem Stabilitäts-Untersuchungen notwendig. Außerdem muss, im Hinblick auf die unter 4.3 beschriebenen Ergebnisse, für einen späteren therapeutischen Einsatz der Einfluss des Proteins auf die Viabilität verschiedener Zelltypen analysiert werden. Im dem Falle, dass die Jonah Protease nicht das gerinnungsfördernde Enzym ist, sollte versucht werden, die Fraktion 31 zunächst weiter zu fraktionieren um die in Tabelle 3 identifizierten Proteine weiter zu

separieren, mit dem Ziel, die prokoagulatorische Aktivität einem anderen Protein zuzuordnen. Ein weiterer viel versprechender Kandidat könnte nach Vergleich der Banden mit Serinprotease-Aktivität in den Fraktionen 31 und 32 (Abbildung 28) die in den Banden 9-12 entdeckte Trypsin-ähnliche Serinprotease sein.

Insgesamt konnten bisher sowohl die Serinprotease-Aktivität als auch die prokoagulatorische Wirkung des MEP einer Fraktion zugeordnet und die darin enthaltene Proteine identifiziert werden. Das Protein, dass nach den durchgeführten Untersuchungen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für die Aktivitäten von MEP verantwortlich ist, konnte rekombinant hergestellt, zurückgefaltet und seine Serinprotease-Aktivität im chromogenen Test bestätigt werden. Für eine aussagekräftige Analyse des Enzyms im Hinblick auf seine gerinnungsfördernden Eigenschaften sind jedoch noch weitere Arbeitsschritte und Untersuchungen notwendig.

5.5 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen basierten auf der Hypothese, dass die im Rahmen der Madentherapie von den Larven sezernierten Verdauungsenzyme Ähnlichkeiten zu den Faktoren des humanen Hämostasesystems besitzen und somit den Wundheilungsvorgang über eine Beeinflussung der humanen Blutgerinnung positiv regulieren können.

Zur Überprüfung der Hypothese sollte in einer ersten Zielstellung dieser Arbeit deshalb die Interaktionen zwischen MEP und dem Hämostasesystem analysiert werden. Während kein Einfluss von MEP auf die thrombozytäre Blutstillung festgestellt werden konnte, zeigte sich, dass Serinproteasen in MEP die humane Blutgerinnung durch eine proteolytische Aktivierung der Kontaktphase förderten und in Reaktionen mit endogenen SERPINEN inhibiert wurden. Die beobachteten Effekte konnten des Weiteren einer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit der MEP-Proteasen mit humanem Plasma Kallikrein zugeordnet werden. Neben der Spaltung der Kontaktphasen-Proteine FXII und HMWK hatte MEP eine Kallikrein-*Bypassing*-Aktivität in Mangelplasmen und wurde zudem durch den Kontaktphasen-spezifischen Inhibitor C1-Esterase-Inhibitor gehemmt. Weitere Untersuchungen deuten zudem auf Ähnlichkeiten mit FXIIa und FXIa hin. In MEP enthaltene Proteasen führten außerdem zur Spaltung von Plasminogen, was jedoch nicht zu einer Generierung aktiven Plasmins führte, letztendlich jedoch eine strukturelle Ähnlichkeit mit t-PA andeutet. Insgesamt konnten also vielfältige, auf strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten der beteiligten Serinproteasen basierende Interaktionen von MEP mit dem Hämostasesystem aufgedeckt werden.

Hohe MEP-Konzentrationen haben zytotoxische Wirkungen auf Endothelzellen, was den Bedarf einer Modernisierung der Madentherapie zur modernen Biochirurgie mit dem gezielten und standardisierten Einsatz isolierter Moleküle aus dem MEP verdeutlicht. Als Beitrag hierzu sollten als weitere Zielstellung die für die prokoagulatorischen Aktivitäten verantwortlichen Enzyme identifiziert und charakterisiert werden. Tatsächlich konnte die Serinprotease Jonah identifiziert werden, bislang war jedoch keine aussagekräftige funktionelle Charakterisierung des Enzyms in gerinnungsrelevanten Tests möglich. Die Ähnlichkeit des Enzyms mit Kallikrein und anderen Faktoren des Hämostasesystems bekräftigt jedoch die Richtigkeit der Arbeitshypothese. Zur vollständigen Bearbeitung dieser Zielstellung sollen weitere Analysen zur Aktivität und Zytotoxizität des identifizierten rekombinanten Enzyms vorgenommen werden. Eine effiziente Aktivierung des Jonah Proteins steht hier an erster Stelle um das Protein im Clot-Lyse-Test und weiteren gerinnungsrelevanten Untersuchungen eindeutig als Vermittler der prokoagulatorischen Aktivität zu identifizieren. Um die *in vitro* beobachteten Aktivitäten auch im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz *in vivo* zu verifizieren sind aussagekräftige Tiermodelle zu etablieren, in denen Zytotoxizitätsanalysen sowie konzentrations- und zeitabhängige Charakterisierungen des isolierten Proteins vorgenommen werden können.

Neben der Bearbeitung der beschriebenen Zielstellungen konnte in dieser Arbeit zudem weiterer Forschungsbedarf zu den wundheilungsfördernden Effekten des MEP aufgedeckt werden. MEP führte zur Spaltung von HMWK, was mittels Gelelektrophorese nachgewiesen wurde. Ob die im Rahmen der MEP-vermittelten HMWK-Spaltung freigesetzten Moleküle HKa- bzw. Bradykinin-Aktivität zeigen und somit einen zusätzlichen antibakteriellen Mechanismus des MEP darstellen, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zusammenfassend erklärt die Ähnlichkeit zu Kallikrein zudem den multifunktionalen Charakter des MEP im Wundheilungsgeschehen trägt so maßgeblich zur Aufklärung der wundheilungsfördernden Mechanismen der Madentherapie bei (Abbildung 31):

1. MEP aktiviert die Kontaktphase der Gerinnung, wirkt so Blutverlusten entgegen und sichert das notwendige Grundgerüst für Zellmigration und Immunreaktionen
2. Durch Förderung der extravasalen Fibrinolyse wird die Invasion von inflammatorischen Zellen erleichtert und Raum für Matrixumbauprozesse geschaffen²
3. MEP reguliert die Protease-Aktivität im Komplement-System und verhindert so überschießende Immunreaktionen¹²²
4. Die Kallikrein-ähnliche Aktivität von MEP und die damit einhergehende Spaltung von HMWK zu Bradykinin und HKa eröffnen zudem neue Erklärungsmodelle für die bekannten antibakteriellen Wirkungen von MEP im Wundheilungsgeschehen.

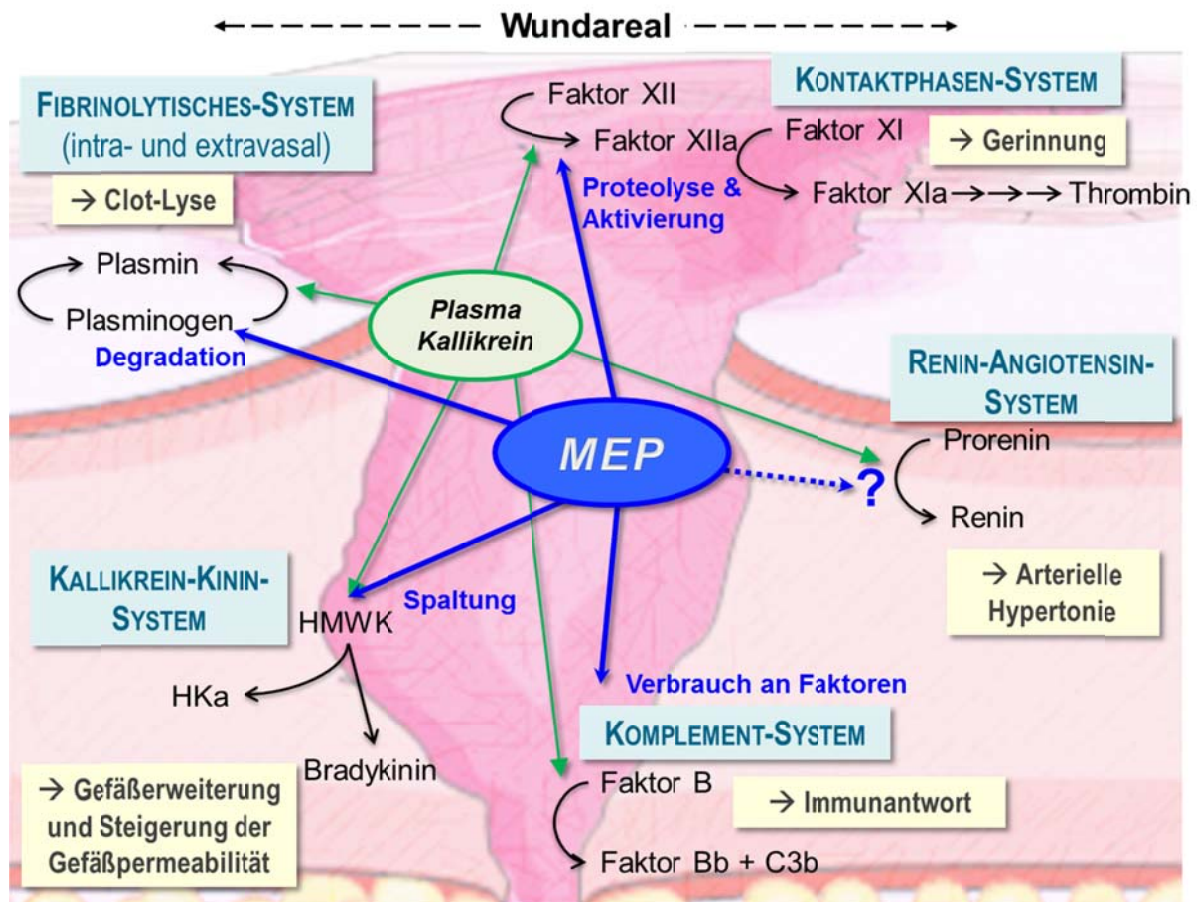


Abbildung 31: Die Kallikrein-ähnliche Natur von MEP in der Wundheilung.

Plasma Kallikrein spielt in verschiedenen mit der Wundheilung assoziierten Signalwegen, wie dem fibrinolytischen System, der Kontaktphase, dem Renin-Angiotensin-System, dem Komplement-System oder dem Kallikrein-Kinin-System eine Rolle. Basierend auf der Ähnlichkeit zu Kallikrein induziert auch MEP die Blutgerinnung über eine Kontaktphasen-Aktivierung und verhindert so Blutverluste und liefert ein Grundgerüst für die Einwanderung inflammatorischer Zellen ins Wundareal. Zudem unterstützt MEP durch seine proteolytischen Eigenschaften die extravasale Fibrinolyse und trägt so maßgeblich zu Gewebeneubildung und -umbau bei. Durch eine Beeinflussung des Komplement-Systems werden immunologische Prozesse reguliert und eine überschießende Immunreaktion verhindert. Die Spaltung von hochmolekularem Kininogen (HMWK) und die Bildung von vasodilatorischem Bradykinin kann zudem die Invasion von Leukozyten erleichtern, die in ihrer antimikrobiellen Aktivität durch das antimikrobielle und anti-inflammatorische aktivierte Kininogen (HKa) reguliert werden^{2,109,235,300}.

LITERATURVERZEICHNIS

1. **Fleischmann W, Grassberger M, Sherman RA** (2003) Maggot Therapy. *Thieme Verlag* (Stuttgart).
 2. **Cazander G, Pritchard DI, Nigam Y, Jung W, Nibbering PH** (2013) Multiple actions of *Lucilia sericata* larvae in hard-to-heal wounds: Larval secretions contain molecules that accelerate wound healing, reduce chronic inflammation and inhibit bacterial infection. *Bioessays* 35(12): 1083-1092.
 3. **Sherman RA** (2009) Maggot therapy takes us back to the future of wound care: new and improved maggot therapy for the 21st century. *DST* 3(2): 336-344.
 4. **Nigam Y, Bexfield A, Thomas S, Ratcliffe NA** (2006) Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I-History and Bacterial Resistance. *Evid Based Complement Alternat Med* 3(2): 223-227.
 5. **Heuer H, Fleck** (2011) Wound Pain in Larval Therapy <http://www.bmj.com/rapid-response/2011/11/03/wound-pain-larval-therapy-part-1> 19.03.2014
 6. **Parnés A, Lagan KM** (2007) Larval therapy in wound management: a review. *Int J Clin Pract* 61(3): 488-493.
 7. **Vilcinskas A** (2011) From Traditional Maggot Therapy to Modern Biosurgery. In: Vilcinskas A. *Insect Biotechnology*. Springer (Berlin, Heidelberg). pp. 67-75.
 8. **Martin P** (1997) Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* 276(5309): 75-81.
 9. **Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE** (2006) The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 117(7 Suppl): 12S-34S.
 10. **Gosain A, DiPietro LA** (2004) Aging and wound healing. *World J Surg* 28(3): 321-326.
 11. **Guo S, DiPietro LA** (2010) Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* 89(3): 219-229.
 12. **Singer AJ, Clark RAF** (1999) Cutaneous Wound Healing. *New Engl J Med* 341(10): 738-746.
 13. **Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A** (2004) How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* 7(1): 62-66.
- physiologic and pathologic processes. *Wound Repair Regen* 7(6): 410-422.
15. **Saffarzadeh M, Preissner KT** (2013) Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr Opin Hematol* 20(1): 3-9.
 16. **Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, et al.** (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663): 1532-1535.
 17. **Park JE, Barbul A** (2004) Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 187(5, Supplement 1): S11-S16.
 18. **Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT** (2008) Wound Repair Regen. *Nature* 453(7193): 314-321.
 19. **Heinlin J, Schreml S, Babilas P, Landthaler M, Karrer S** (2010) Wundheilung. *Der Hautarzt* 61(7): 611-628.

20. **Scharffetter-Kochanek K, Schüller J, Meewes C, Hinrichs R, Eich D, et al.** (2003) Das chronisch venöse Ulcus cruris. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 1(1): 58-68.
21. **Piatek T, Lobmann** (2012) Pathogenese und Therapie chronischer Wunden. In: Lippert. Wundatlas - Kompendium der komplexen Wundbehandlung. *Thieme* (Stuttgart). pp. 307-351.
22. **Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF** (2007) Impaired wound healing. *Clin Dermatol* 25(1): 19-25.
23. **Stücker M, Harke K, Rudolph T, Altmeyer P** (2003) Zur Pathogenese des therapieresistenten Ulcus cruris. *Der Hautarzt* 54(8): 750-755.
24. **Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, et al.** (2010) Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 163(2): 257-268.
25. **Peschen M, Lahaye T, Hennig B, Weyl A, Simon JC, et al.** (1999) Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 and VLA-4 in the skin is modulated in progressing stages of chronic venous insufficiency. *Acta Derm Venereol* 79(1): 27-32.
26. **Mast BA, Schultz GS** (1996) Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 4(4): 411-420.
27. **Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, et al.** (2002) Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 45(7): 1011-1016.
28. **Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, et al.** (1995) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 104(2): 236-240.
29. **Agren MS, Werthen M** (2007) The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds. *Int J Low Extrem Wounds* 6(2): 82-97.
30. **Hunt TK, Niinikoski J, Zederfeldt B** (1972) Role of oxygen in repair processes. *Acta Chir Scand* 138(2): 109-110.
31. **Siddiqui A, Galiano RD, Connors D, Gruskin E, Wu L, et al.** (1996) Differential effects of oxygen on human dermal fibroblasts: acute versus chronic hypoxia. *Wound Repair Regen* 4(2): 211-218.
32. **Mendez MV, Stanley A, Park HY, Shon K, Phillips T, et al.** (1998) Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* 28(5): 876-883.
33. **Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J, Bready J, Chang D, et al.** (1995) Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *J Clin Invest* 96(3): 1336-1350.
34. **Shukla A, Dubey MP, Srivastava R, Srivastava BS** (1998) Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. *Biochem Biophys Res Commun* 244(2): 434-439.
35. **Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW** (2002) Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 19(6): 440-447.

36. **Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC** (2000) Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 8(1): 13-25.
37. **Galkowska H, Olszewski WL, Wojewodzka U** (2005) Keratinocyte and dermal vascular endothelial cell capacities remain unimpaired in the margin of chronic venous ulcer. *Arch Dermatol Res* 296(7): 286-295.
38. **Drinkwater SL, Burnand KG, Ding R, Smith A** (2003) Increased but ineffectual angiogenic drive in nonhealing venous leg ulcers. *J Vasc Surg* 38(5): 1106-1112.
39. **Siddiqui AR, Bernstein JM** (2010) Chronic wound infection: facts and controversies. *Clin Dermatol* 28(5): 519-526.
40. **Dowd SE, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, et al.** (2008) Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* 8(43): 1471-2180.
41. **Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P** (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 70(11): 6339-6345.
42. **Bergmann S, Hammerschmidt S** (2007) Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost* 98(3): 512-520.
43. **Enright MC** (2003) The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol* 3(5): 474-479.
44. **Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz PM** (2003) A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatol Surg* 29(6): 631-635.
45. **Dissemond J, Goos M** (2004) Optionen des Debridements in der Therapie chronischer Wunden. *J Dtsch Dermatol Ges* 2(9): 743-751.
46. **Gupta A** (2008) A review of the use of maggots in wound therapy. *Ann Plast Surg* 60(2): 224-227.
47. **Wollina U, Liebold K, Schmidt W-D, Hartmann M, Fassler D** (2002) Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds – clinical data and remittance spectroscopy measurement. *Int J Dermatol* 41(10): 635-639.
48. **Grassberger M** (2002) Ein historischer Rückblick auf den therapeutischen Einsatz von Fliegenlarven. *NTM Zeitschrift für Geschichte der Wissenschaften, Technik und Medizin* 10(1): 13-24.
49. **Baer WS** (2011) The classic: The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blow fly). 1931. *Clin Orthop Relat Res* 469(4): 920-944.
50. **Nenoff P, Herrmann A, Gerlach C, Herrmann J, Christoph Simon J** (2010) Biochirurgisches Débridement mittels *Lucilia sericata* Maden – ein Update. *Wien Med Wochenschr* 160(21): 578-585.
51. **Dumville JC, Worthy G, Bland JM, Cullum N, Dowson C, et al.** (2009) Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomised controlled trial. *BMJ* 338.
52. **Wayman J, Nirojogi V, Walker A, Sowinski A, Walker MA** (2000) The cost effectiveness of larval therapy in venous ulcers. *J Tissue Viability* 10(3): 91-94.

53. **Fleischmann W, Russ M, Moch D, Marquardt C** (1999) Biochirurgie – Sind Fliegenmaden wirklich die besseren Chirurgen? *Der Chirurg* 70(11): 1340-1346.
54. **Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedmann R, et al.** (1998) Maggot therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 21(11): 2030-2031.
55. **Sherman RA** (2003) Maggot Therapy for Treating Diabetic Foot Ulcers Unresponsive to Conventional Therapy. *Diabetes Care* 26(2): 446-451.
56. **Armstrong DG, Salas P, Short B, Martin BR, Kimbriel HR, et al.** (2005) Maggot therapy in "lower-extremity hospice" wound care: fewer amputations and more antibiotic-free days. *J Am Podiatr Med Assoc* 95(3): 254-257.
57. **Sherman RA, Wyle F, Vulpe M** (1995) Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injury patients. *J Spinal Cord Med* 18(2): 71-74.
58. **Sherman RA** (2002) Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 10(4): 208-214.
59. **Wolff H, Hansson C** (1999) Larval therapy for a leg ulcer with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Derm Venereol.* 1999 Jul;79(4):320-1.
60. **Dissemond J, Koppermann M, Esser S, Schultewolter T, Goos M, et al.** (2002) Therapie eines Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) im Rahmen der Behandlung eines chronischen Ulkus mittels Biochirurgie. *Der Hautarzt* 53(9): 608-612.
61. **Zarchi K, Jemec GBE** (2012) The efficacy of maggot debridement therapy – a review of comparative clinical trials. *Int Wound J* 9(5): 469-477.
62. **Davydov L** (2011) Maggot therapy in wound management in modern era and a review of published literature. *J Pharm Pract* 24(1): 89-93.
63. **Heuer H, Fleck** (2010) Seraticin-ein antibiotischer Wirkstoff von Fliegenlarven. *Deutsche Apotheker Zeitung* 150(4): 394-395.
64. **Eggert A-K, Müller J, Wimmer E, Zissler D** (2010) Fortpflanzung und Entwicklung. In: Dettner K, Peters W. Lehrbuch der Entomologie. *Spektrum Akademischer Verlag* (Heidelberg). pp. 357-463.
65. **Dettner K, Peters W** (2010) Übersicht über die Vielfalt der Insekten. In: Dettner K, Peters W. Lehrbuch der Entomologie. *Spektrum Akademischer Verlag* (Heidelberg). pp. 753-887.
66. **Peters W** (2010) Integument. In: Dettner K, Peters W. Lehrbuch der Entomologie. *Spektrum Akademischer Verlag*. pp. 1-46.
67. **Bulet P, Hetru C, Dimarcq J-L, Hoffmann D** (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* 23(4-5): 329-344.
68. **Grassberger M, Frank C** (2003) Wundheilung durch sterile Fliegenlarven: mechanische, biochemische und mikrobiologische Grundlagen. *Wien Med Wochenschr* 153(9): 198-201.
69. **Wiesner J, Vilcinskis A** (2011) Therapeutic Potential of Anti-Microbial Peptides from Insects. In: Vilcinskis A. Insect Biotechnology. *Springer* (Berlin, Heidelberg). pp. 29-65.
70. **Neumann J** (2008) Das Immunsystem der Invertebraten. In: Neumann J. Immunbiologie. *Springer Berlin Heidelberg*. pp. 245-269.

71. **Eleftherianos I, Revenis C** (2011) Role and Importance of Phenoloxidase in Insect Hemostasis. *J Innate Immun* 3(1): 28-33.
72. **Loof TG, Schmidt O, Herwald H, Theopold U** (2011) Coagulation systems of invertebrates and vertebrates and their roles in innate immunity: the same side of two coins? *J Innate Immun* 3(1): 34-40.
73. **Ziffren SE, Heist HE, May SC, Womack NA** (1953) The secretion of collagenase by maggots and its implication. *Ann Surg* 138(6): 932-934.
74. **Hobson RP** (1931) On an enzyme from blow-fly larvae *Lucilia sericata* which digests collagen in alkaline solution. *Biochem J* 25(5): 1458-1463.
75. **Schmidtchen A, Wolff H, Rydengard V, Hansson C** (2003) Detection of serine proteases secreted by *Lucilia sericata* in vitro and during treatment of a chronic leg ulcer. *Acta Derm Venereol* 83(4): 310-311.
76. **Chambers L, Woodrow S, Brown AP, Harris PD, Phillips D, et al.** (2003) Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *Br J Dermatol* 148(1): 14-23.
77. **Telford G, Brown AP, Seabra RA, Horobin AJ, Rich A, et al.** (2010) Degradation of eschar from venous leg ulcers using a recombinant chymotrypsin from *Lucilia sericata*. *Br J Dermatol* 163(3): 523-531.
78. **Telford G, Brown AP, Kind A, English JSC, Pritchard DI** (2011) Maggot chymotrypsin I from *Lucilia sericata* is resistant to endogenous wound protease inhibitors. *Br J Dermatol* 164(1): 192-196.
79. **Britland S, Smith A, Finter W, Eagland D, Vowden K, et al.** (2011) Recombinant *Lucilia Sericata* chymotrypsin in a topical hydrogel formulation degrades human wound eschar ex vivo. *Biotechnol Progr* 27(3): 870-874.
80. **Pritchard DI, Telford G, Diab M, Low W** (2012) Expression of a cGMP compatible *Lucilia sericata* insect serine proteinase debridement enzyme. *Biotechnol Progr* 28(5): 567-572.
81. **van der Plas MJA, Andersen AS, Nazir S, van Tilburg NH, Oestergaard PR, et al.** (2014) A Novel Serine Protease Secreted by Medicinal Maggots Enhances Plasminogen Activator-Induced Fibrinolysis. *PLoS ONE* 9(3): e92096.
82. **Altincicek B, Vilcinskas A** (2009) Septic injury-inducible genes in medicinal maggots of the green blow fly *Lucilia sericata*. *Insect Mol Biol* 18(1): 119-125.
83. **Andersen AS, Sandvang D, Schnorr KM, Kruse T, Neve S, et al.** (2010) A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemoth* 65(8): 1646-1654.
84. **Grenier D, Mayrand D** (2001) Cleavage of Human Immunoglobulin G by *Treponema denticola*. *Anaerobe* 7(1): 1-4.
85. **Telford G, Brown AP, Rich A, English JSC, Pritchard DI** (2012) Wound debridement potential of glycosidases of the wound-healing maggot, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 26(3): 291-299.

86. **Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M** (2001) Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 38(2): 161-166.
87. **Jaklič D, Lapanje A, Zupančič K, Smrke D, Gunde-Cimerman N** (2008) Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol* 57(5): 617-625.
88. **Cazander G, van Veen KE, Bernards AT, Jukema GN** (2009) Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *J Tissue Viability* 18(3): 80-87.
89. **van der Plas MJ, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HC, Lagendijk EL, et al.** (2008) Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 61(1): 117-122.
90. **Brown A, Horobin A, Blount DG, Hill PJ, English J, et al.** (2012) Blow fly *Lucilia sericata* nuclease digests DNA associated with wound slough/eschar and with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Med Vet Entomol* 26(4): 432-439.
91. **Harris LG, Bexfield A, Nigam Y, Rohde H, Ratcliffe NA, et al.** (2009) Disruption of *Staphylococcus epidermidis* biofilms by medicinal maggot *Lucilia sericata* excretions/secretions. *Int J Artif Organs* 32(9): 555-564.
92. **van der Plas MJA, Dambrot C, Dogterom-Ballering HCM, Kruithof S, van Dissel JT, et al.** (2010) Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *J Antimicrob Chemother* 65(5): 917-923.
93. **Cazander G, Pawiroredjo JS, Vandenbroucke-Grauls CM, Schreurs MW, Jukema GN** (2010) Synergism between maggot excretions and antibiotics. *Wound Repair Regen* 18(6): 637-642.
94. **Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens JR** (2005) Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 19(3): 333-337.
95. **Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Breuer E, Bhusare SR, et al.** (2007) Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 21(2): 127-131.
96. **Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA** (2004) Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect* 6(14): 1297-1304.
97. **Bexfield A, Bond AE, Roberts EC, Dudley E, Nigam Y, et al.** (2008) The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes Infect* 10(4): 325-333.
98. **Čeřovský V, Žďárek J, Fučík V, Monincová L, Voburka Z, et al.** (2010) Lucifensin, the long-sought antimicrobial factor of medicinal maggots of the blowfly *Lucilia sericata*. *Cell Mol Life Sci* 67(3): 455-466.
99. **Čeřovský V, Slaninová J, Fučík V, Monincová L, Bednářová L, et al.** (2011) Lucifensin, a Novel Insect Defensin of Medicinal Maggots: Synthesis and Structural Study. *ChemBioChem* 12(9): 1352-1361.

100. **Zhang Z, Wang J, Zhang B, Liu H, Song W, et al.** (2013) Activity of antibacterial protein from maggots against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Int J Mol Med* 31(5): 1159-1165.
101. **Kruglikova AA, Chernysh SI** (2011) Antimicrobial compounds from the excretions of surgical maggots, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). *Entomol Rev* 91(7): 813-819.
102. **Hoffmann JA** (1995) Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol* 7(1): 4-10.
103. **Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Block C, Galun R** (2007) Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J Wound Care* 16(3): 123-127.
104. **Kawabata T, Mitsui H, Yokota K, Ishino K, Oguma K, et al.** (2010) Induction of antibacterial activity in larvae of the blowfly *Lucilia sericata* by an infected environment. *Med Vet Entomol* 24(4): 375-381.
105. **Harris LG, Nigam Y, Sawyer J, Mack D, Pritchard DI** (2013) *Lucilia sericata* chymotrypsin disrupts protein adhesin-mediated staphylococcal biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 79(4): 1393-1395.
106. **Okshevsky M, Meyer RL** (2013) The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol* 44.
107. **Tetz GV, Artemenko NK, Tetz VV** (2009) Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 53(3): 1204-1209.
108. **Pöppel AK, Koch A, Kogel KH, Vogel H, Kollwe C, et al.** (2014) Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the common green bottle fly *Lucilia sericata*. *Biol Chem* 395(6): 649-656.
109. **Sherman RA** (2014) Mechanisms of Maggot-Induced Wound Healing: What Do We Know, and Where Do We Go from Here? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014:13.
110. **Prete PE** (1997) Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci* 60(8): 505-510.
111. **Wang S-y, Wang K, Xin Y, Lv D-c** (2010) Maggot excretions/secretions induces human microvascular endothelial cell migration through AKT1. *Mol Biol Rep* 37(6): 2719-2725.
112. **van der Plas M, Baldry M, van Dissel J, Jukema G, Nibbering P** (2009) Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia* 52(9): 1962-1970.
113. **Zhang Z, Wang S, Tian X, Zhao Z, Zhang J, et al.** (2010) A new effective scaffold to facilitate peripheral nerve regeneration: chitosan tube coated with maggot homogenate product. *Med Hypotheses* 74(1): 12-14.
114. **Bexfield A, Bond AE, Morgan C, Wagstaff J, Newton RP, et al.** (2010) Amino acid derivatives from *Lucilia sericata* excretions/secretions may contribute to the beneficial effects of maggot therapy via increased angiogenesis. *Br J Dermatol* 162(3): 554-562.
115. **Smith AG, Powis RA, Pritchard DI, Britland ST** (2006) Greenbottle (*Lucilia sericata*) Larval Secretions Delivered from a Prototype Hydrogel Wound Dressing Accelerate the Closure of Model Wounds. *Biotechnol Progr* 22(6): 1690-1696.

116. **Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI** (2006) Promotion of Human Dermal Fibroblast Migration, Matrix Remodelling and Modification of Fibroblast Morphology within a Novel 3D Model by *Lucilia sericata* Larval Secretions. *J Invest Dermatol* 126(6): 1410-1418.
117. **Zhang Z, Wang S, Diao Y, Zhang J, Lv D** (2010) Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. *Lipids Health Dis* 9: 24.
118. **van der Plas MJA, van Dissel JT, Nibbering PH** (2009) Maggot Secretions Skew Monocyte-Macrophage Differentiation Away from a Pro-Inflammatory to a Pro-Angiogenic Type. *PLoS ONE* 4(11): e8071.
119. **van der Plas MJA, van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HCM, van Gulpen C, et al.** (2007) Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect* 9(4): 507-514.
120. **Pecivova J, Macickova T, Takac P, Kovacsova M, Cupanikova D, et al.** (2008) Effect of the extract from salivary glands of *Lucilia sericata* on human neutrophils. *Neuro Endocrinol Lett* 29(5): 794-797.
121. **Cazander G, Jukema GN, Nibbering PH** (2012) Complement activation and inhibition in wound healing. *Clin Dev Immunol* 2012: 534291.
122. **Cazander G, Schreurs MW, Renwarin L, Dorresteijn C, Hamann D, et al.** (2012) Maggot excretions affect the human complement system. *Wound Repair Regen* 20(6): 879-886.
123. **Preissner KT** (2008) Physiologie der Blutgerinnung und Fibrinolyse - Biochemie. *Hamostaseologie* 28(5): 259-271.
124. **Mann KG, Brummel-Ziedins K, Orfeo T, Butenas S** (2006) Models of blood coagulation. *Blood Cells Mol Dis* 36(2): 108-117.
125. **Monroe DM, Hoffman M** (2012) The clotting system – a major player in wound healing. *Haemophilia* 18: 11-16.
126. **Macfarlane RG** (1964) An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* 202: 498-499.
127. **Davie EW, Ratnoff OD** (1964) Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* 145(3638): 1310-1312.
128. **Hoffman M, Monroe DM, 3rd** (2001) A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 85(6): 958-965.
129. **Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH** (2013) New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev* 93(1): 327-358.
130. **Hemker HC, van Rijn JL, Rosing J, van Dieijen G, Bevers EM, et al.** (1983) Platelet membrane involvement in blood coagulation. *Blood Cells* 9(2): 303-317.
131. **Furie B, Furie BC** (1988) The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53(4): 505-518.
132. **Page MJ, Di Cera E** (2008) Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* 65(7-8): 1220-1236.
133. **Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A** (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue): D503-509.

134. **Muhlia-Almazan A, Sanchez-Paz A, Garcia-Carreno FL** (2008) Invertebrate trypsins: a review. *J Comp Physiol B* 178(6): 655-672.
135. **Krem MM, Di Cera E** (2002) Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem Sci* 27(2): 67-74.
136. **Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, Church FC** (2007) Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 5102-115.
137. **Pike RN, Buckle AM, le Bonniec BF, Church FC** (2005) Control of the coagulation system by serpins. *FEBS Journal* 272(19): 4842-4851.
138. **Jennings LK** (2009) Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 102(2): 248-257.
139. **Luo GP, Ni B, Yang X, Wu YZ** (2012) von Willebrand Factor: More Than a Regulator of Hemostasis and Thrombosis. *Acta Haematol* 128(3): 158-169.
140. **Bevers EM, Comfurius P, Van Rijn JLML, Hemker HC** (1982) Generation of Prothrombin-Converting Activity and the Exposure of Phosphatidylserine at the Outer Surface of Platelets. *Eur J Biochem* 122(2): 429-436.
141. **Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP, Lindhout T** (1997) Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca²⁺ responses. *Blood* 90(7): 2615-2625.
142. **Stafford DW** (2005) The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* 3(8): 1873-1878.
143. **Chesney CM, Pifer D, Colman RW** (1981) Subcellular localization and secretion of factor V from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(8): 5180-5184.
144. **Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR** (2002) Platelets and Thrombin Generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(9): 1381-1389.
145. **Coughlin SR** (2005) Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 3(8): 1800-1814.
146. **Tracy PB, Rohrbach MS, Mann KG** (1983) Functional prothrombinase complex assembly on isolated monocytes and lymphocytes. *J Biol Chem* 258(12): 7264-7267.
147. **Østerud B, Rapaport SI** (1980) Activation of 125I-Factor IX and 125I-Factor X: Effect of Tissue Factor and Factor VII, Factor Xa and Thrombin. *Scand J Haematol* 24(3): 213-226.
148. **Engelmann B** (2006) Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis* 36(2): 188-190.
149. **Zwaal RFA** (1978) Membrane and lipid involvement in blood coagulation. *BBA - Biomembranes* 515(2): 163-205.
150. **Lollar P, Knutson GJ, Fass DN** (1985) Activation of porcine factor VIII:C by thrombin and factor Xa. *Biochemistry* 24(27): 8056-8064.
151. **Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M** (1999) Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(1): 170-177.

-
152. **Monkovic DD, Tracy PB** (1990) Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry* 29(5): 1118-1128.
153. **Gailani D, Ho D, Sun MF, Cheng Q, Walsh PN** (2001) Model for a factor IX activation complex on blood platelets: dimeric conformation of factor XIa is essential. *Blood* 97(10): 3117-3122.
154. **Osterud B, Laake K, Prydz H** (1975) The activation of human factor IX. *Thromb Diath Haemorrh* 33(3): 553-563.
155. **Hornyak TJ, Shafer JA** (1992) Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry* 31(2): 423-429.
156. **Laurens N, Koolwijk P, De Maat MPM** (2006) Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 4(5): 932-939.
157. **Lorand L** (2005) Factor XIII and the clotting of fibrinogen: from basic research to medicine. *J Thromb Haemost* 3(7): 1337-1348.
158. **Weisel JW** (2007) Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost* 5116-124.
159. **Fukudome K, Esmon CT** (1994) Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 269(42): 26486-26491.
160. **Esmon CT, Xu J, Gu JM, Qu D, Laszik Z, et al.** (1999) Endothelial protein C receptor. *Thromb Haemost* 82(2): 251-258.
161. **Crawley JTB, Lane DA** (2008) The Haemostatic Role of Tissue Factor Pathway Inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(2): 233-242.
162. **Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J** (2006) Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(9): 3106-3111.
163. **Hoffman M, Monroe DM, 3rd** (2001) The action of high-dose factor VIIa (FVIIa) in a cell-based model of hemostasis. *Semin Hematol* 38(4 Suppl 12): 6-9.
164. **Obergfell A WU, Preissner KT** (2006) Thromboseprophylaxe und Thrombolytika. In: Estler C-J SH. Pharmakologie und Toxikologie. *Schattauer* (Stuttgart). pp. 508-546.
165. **Oehmcke S, Herwald H** (2010) Contact system activation in severe infectious diseases. *J Mol Med* 88(2): 121-126.
166. **Colman RW, Schmaier AH** (1997) Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes. *Blood* 90(10): 3819-3843.
167. **Cochrane CG, Revak SD, Wuepper KD** (1973) Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *J Exp Med* 138(6): 1564-1583.
168. **Griffin JH** (1978) Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(4): 1998-2002.
169. **Samuel M, Pixley RA, Villanueva MA, Colman RW, Villanueva GB** (1992) Human factor XII (Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate. Circular dichroism, fluorescence, and ultraviolet difference spectroscopic studies. *J Biol Chem* 267(27): 19691-19697.

-
170. Kirby EP, McDevitt PJ (1983) The binding of bovine factor XII to kaolin. *Blood* 61(4): 652-659.
171. Espana F, Ratnoff OD (1983) Activation of Hageman factor (factor XII) by sulfatides and other agents in the absence of plasma proteases. *J Lab Clin Med* 102(1): 31-45.
172. Wilner GD, Nossel HL, LeRoy EC (1968) Activation of Hageman factor by collagen. *J Clin Invest* 47(12): 2608-2615.
173. Hojima Y, Cochrane CG, Wiggins RC, Austen KF, Stevens RL (1984) In vitro activation of the contact (Hageman factor) system of plasma by heparin and chondroitin sulfate E. *Blood* 63(6): 1453-1459.
174. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, et al. (2006) Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(4): 903-908.
175. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, et al. (2007) Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(15): 6388-6393.
176. Maas C, Govers-Riemslog JW, Bouma B, Schiks B, Hazenberg BP, et al. (2008) Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest* 118(9): 3208-3218.
177. Oehmcke S, Morgelin M, Herwald H (2009) Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun* 1(3): 225-230.
178. Dunn JT, Silverberg M, Kaplan AP (1982) The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein. *J Biol Chem* 257(4): 1779-1784.
179. Kaplan AP, Austen KF (1971) A prealbumin activator of prekallikrein. II. Derivation of activators of prekallikrein from active Hageman factor by digestion with plasmin. *J Exp Med* 133(4): 696-712.
180. Røjkjær R, Schousboe I (1997) Partial Identification of the Zn²⁺-Binding Sites in Factor XII and its Activation Derivatives. *Eur J Biochem* 247(2): 491-496.
181. Revak SD, Cochrane CG, Johnston AR, Hugli TE (1974) Structural changes accompanying enzymatic activation of human Hageman factor. *J Clin Invest* 54(3): 619-627.
182. Clarke BJ, Cote HC, Cool DE, Clark-Lewis I, Saito H, et al. (1989) Mapping of a putative surface-binding site of human coagulation factor XII. *J Biol Chem* 264(19): 11497-11502.
183. Citarella F, Ravon DM, Pascucci B, Felici A, Fantoni A, et al. (1996) Structure/function analysis of human factor XII using recombinant deletion mutants. Evidence for an additional region involved in the binding to negatively charged surfaces. *Eur J Biochem* 238(1): 240-249.
184. Revak SD, Cochrane CG (1976) The relationship of structure and function in human Hageman factor. The association of enzymatic and binding activities with separate regions of the molecule. *J Clin Invest* 57(4): 852-860.
185. Griffin JH, Cochrane CG (1976) Mechanisms for the involvement of high molecular weight kininogen in surface-dependent reactions of Hageman factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(8): 2554-2558.

186. **Motta G, Rojkjaer R, Hasan AA, Cines DB, Schmaier AH** (1998) High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. *Blood* 91(2): 516-528.
187. **Hasan AA, Cines DB, Ngaiza JR, Jaffe EA, Schmaier AH** (1995) High-molecular-weight kininogen is exclusively membrane bound on endothelial cells to influence activation of vascular endothelium. *Blood* 85(11): 3134-3143.
188. **Joseph K, Nakazawa Y, Bahou WF, Ghebrehiwet B, Kaplan AP** (1999) Platelet glycoprotein Ib: a zinc-dependent binding protein for the heavy chain of high-molecular-weight kininogen. *Mol Med* 5(8): 555-563.
189. **Mandle RJ, Colman RW, Kaplan AP** (1976) Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(11): 4179-4183.
190. **Thompson RE, Mandle R, Jr., Kaplan AP** (1979) Studies of binding of prekallikrein and Factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(10): 4862-4866.
191. **Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, et al.** (1985) Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem* 260(14): 8610-8617.
192. **Herwald H, Hasan AA, Godovac-Zimmermann J, Schmaier AH, Muller-Esterl W** (1995) Identification of an endothelial cell binding site on kininogen domain D3. *J Biol Chem* 270(24): 14634-14642.
193. **Hasan AA, Cines DB, Herwald H, Schmaier AH, Muller-Esterl W** (1995) Mapping the cell binding site on high molecular weight kininogen domain 5. *J Biol Chem* 270(33): 19256-19261.
194. **Kunapuli SP, DeLa Cadena RA, Colman RW** (1993) Deletion mutagenesis of high molecular weight kininogen light chain. Identification of two anionic surface binding subdomains. *J Biol Chem* 268(4): 2486-2492.
195. **Tait JF, Fujikawa K** (1986) Identification of the binding site for plasma prekallikrein in human high molecular weight kininogen. A region from residues 185 to 224 of the kininogen light chain retains full binding activity. *J Biol Chem* 261(33): 15396-15401.
196. **Tait JF, Fujikawa K** (1987) Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI. *J Biol Chem* 262(24): 11651-11656.
197. **Wiggins RC, Bouma BN, Cochrane CG, Griffin JH** (1977) Role of high-molecular-weight kininogen in surface-binding and activation of coagulation Factor XI and prekallikrein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(10): 4636-4640.
198. **Rocha ESM, Beraldo WT, Rosenfeld G** (1949) Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 156(2): 261-273.
199. **Mandle R, Jr., Kaplan AP** (1977) Hageman factor substrates. Human plasma prekallikrein: mechanism of activation by Hageman factor and participation in hageman factor-dependent fibrinolysis. *J Biol Chem* 252(17): 6097-6104.

200. **van der Graaf F, Tans G, Bouma BN, Griffin JH** (1982) Isolation and functional properties of the heavy and light chains of human plasma kallikrein. *J Biol Chem* 257(23): 14300-14305.
201. **Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW** (1986) Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 25(9): 2410-2417.
202. **Page JD, Colman RW** (1991) Localization of distinct functional domains on prekallikrein for interaction with both high molecular weight kininogen and activated factor XII in a 28-kDa fragment (amino acids 141-371). *J Biol Chem* 266(13): 8143-8148.
203. **Page JD, You JL, Harris RB, Colman RW** (1994) Localization of the binding site on plasma kallikrein for high-molecular-weight kininogen to both apple 1 and apple 4 domains of the heavy chain. *Arch Biochem Biophys* 314(1): 159-164.
204. **McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW** (1991) Location of the disulfide bonds in human plasma prekallikrein: the presence of four novel apple domains in the amino-terminal portion of the molecule. *Biochemistry* 30(8): 2050-2056.
205. **Griffin JH, Cochrane CG** (1976) Human factor XII (Hageman factor). *Methods Enzymol* 45:56-65.
206. **Kurachi K, Davie EW** (1977) Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIa (activated Hageman factor). *Biochemistry* 16(26): 5831-5839.
207. **Fujikawa K, Chung DW, Hendrickson LE, Davie EW** (1986) Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein. *Biochemistry* 25(9): 2417-2424.
208. **Thompson RE, Mandle R, Jr., Kaplan AP** (1977) Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest* 60(6): 1376-1380.
209. **Fujikawa K, Legaz ME, Kato H, Davie EW** (1974) The mechanism of activation of bovine factor IX (Christmas factor) by bovine factor XIa (activated plasma thromboplastin antecedent). *Biochemistry* 13(22): 4508-4516.
210. **Forbes CD, Pensky J, Ratnoff OD** (1970) Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma thromboplastin antecedent by purified serum C1 inactivator. *J Lab Clin Med* 76(5): 809-815.
211. **Gigli I, Mason JW, Colman RW, Austen KF** (1970) Interaction of plasma kallikrein with the C1 inhibitor. *J Immunol* 104(3): 574-581.
212. **Meijers JCM, Vlooswijk RAA, Bouma BN** (1988) Inhibition of human blood coagulation factor XIa by C.hivin.1 inhibitor. *Biochemistry* 27(3): 959-963.
213. **Stead N, Kaplan AP, Rosenberg RD** (1976) Inhibition of activated factor XII by antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 251(21): 6481-6488.
214. **Lahiri B, Bagdasarian A, Mitchell B, Talamo RC, Colman RW** (1976) Antithrombin-heparin cofactor: an inhibitor of plasma kallikrein. *Arch Biochem Biophys* 175(2): 737-747.
215. **Soons H, Janssen-Claessen T, Tans G, Hemker HC** (1987) Inhibition of factor XIa by antithrombin III. *Biochemistry* 26(15): 4624-4629.

216. **Berrettini M, Schleef RR, Espana F, Loskutoff DJ, Griffin JH** (1989) Interaction of type 1 plasminogen activator inhibitor with the enzymes of the contact activation system. *J Biol Chem* 264(20): 11738-11743.
217. **Meijers JC, Kanters DH, Vlooswijk RA, van Erp HE, Hessing M, et al.** (1988) Inactivation of human plasma kallikrein and factor XIa by protein C inhibitor. *Biochemistry* 27(12): 4231-4237.
218. **Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Blumberg H, Hamamoto T, et al.** (1996) Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry* 35(1): 266-272.
219. **Ratnoff OD, Colopy JE** (1955) A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 34(4): 602-613.
220. **Bolton M** (2000) Factor XI deficiency and its management. *Haemophilia* 6:100-109.
221. **Gailani D, Broze G** (1991) Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 253(5022): 909-912.
222. **Pedicord DL, Seiffert D, Blat Y** (2007) Feedback activation of factor XI by thrombin does not occur in plasma. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 104(31): 12855-12860.
223. **Scott CF, Colman RW** (1992) Fibrinogen blocks the autoactivation and thrombin-mediated activation of factor XI on dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23): 11189-11193.
224. **Brunnee T, La Porta C, Reddigari SR, Salerno VM, Kaplan AP, et al.** (1993) Activation of factor XI in plasma is dependent on factor XII. *Blood* 81(3): 580-586.
225. **Wang X, Cheng Q, Xu L, Feuerstein GZ, Hsu MY, et al.** (2005) Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost* 3(4): 695-702.
226. **Wang X, Smith PL, Hsu MY, Gailani D, Schumacher WA, et al.** (2006) Effects of factor XI deficiency on ferric chloride-induced vena cava thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 4(9): 1982-1988.
227. **Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, Tanne D, Seligsohn U** (2008) Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency. *Blood* 111(8): 4113-4117.
228. **Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, et al.** (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 202(2): 271-281.
229. **Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, Schuh K, Pauer HU, et al.** (2006) Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 203(3): 513-518.
230. **Gailani D, Renne T** (2007) The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost* 5(6): 1106-1112.
231. **Ghebrehiwet B, Silverberg M, Kaplan AP** (1981) Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Exp Med* 153(3): 665-676.
232. **Woodruff RS, Sullenger B, Becker RC** (2011) The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 32(1): 9-20.

233. **Guo YL, Colman RW** (2005) Two faces of high-molecular-weight kininogen (HK) in angiogenesis: bradykinin turns it on and cleaved HK (HKa) turns it off. *J Thromb Haemost* 3(4): 670-676.
234. **Chavakis T, Kanse SM, Pixley RA, May AE, Isordia-Salas I, et al.** (2001) Regulation of leukocyte recruitment by polypeptides derived from high molecular weight kininogen. *FASEB J* 15(13): 2365-2376.
235. **Frick IM, Akesson P, Herwald H, Morgelin M, Malmsten M, et al.** (2006) The contact system--a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *EMBO J* 25(23): 5569-5578.
236. **Nordahl EA, Rydengard V, Morgelin M, Schmidtchen A** (2005) Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial. *J Biol Chem* 280(41): 34832-34839.
237. **von dem Borne PA, Meijers JC, Bouma BN** (1995) Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood* 86(8): 3035-3042.
238. **Kluft C, Dooijewaard G, Emeis JJ** (1987) Role of the contact system in fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost* 13(1): 50-68.
239. **Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE** (1997) Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thromb Haemost* 77(3): 522-525.
240. **Renné T** (2010) Kontaktfaktoren. In: Pötzsch B, Madlener K. Hamostaseologie. *Springer* (Berlin Heidelberg). pp. 203-212.
241. **Carmeliet P, Collen D** (1997) Molecular genetics of the fibrinolytic and coagulation systems in haemostasis, thrombogenesis, restenosis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 8(2): 118-125.
242. **Cesarman-Maus G, Hajjar KA** (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Brit J Haematol* 129(3): 307-321.
243. **Huber D, Cramer EM, Kaufmann JE, Meda P, Masse JM, et al.** (2002) Tissue-type plasminogen activator (t-PA) is stored in Weibel-Palade bodies in human endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood* 99(10): 3637-3645.
244. **van Zonneveld AJ, Veerman H, Pannekoek H** (1986) 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* 261(30): 14214-14218.
245. **Wiman B, Wallén P** (1977) The specific interaction between plasminogen and fibrin. A physiological role of the lysine binding site in plasminogen. *Thromb Res* 10(2): 213-222.
246. **Plow EF, Allampallam K, Redlitz A** (1997) The Plasma Carboxypeptidases and the Regulation of the Plasminogen System. *Trends Cardiovas Med* 7(3): 71-75.
247. **Suenson E, Lutzen O, Thorsen S** (1984) Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis. *Eur J Biochem* 140(3): 513-522.
248. **Collen D, Lijnen HR** (1991) Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78(12): 3114-3124.
249. **Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, et al.** (1992) Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature* 355(6357): 270-273.

250. **Declerck PJ, De Mol M, Alessi MC, Baudner S, Paques EP, et al.** (1988) Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). *J Biol Chem* 263(30): 15454-15461.
251. **Bouma BN, Meijers JC** (2003) Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). *J Thromb Haemost* 1(7): 1566-1574.
252. **Weil GC, Simon RJ, Sweadner WR** (1933) A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyogenic infections. *Am J Surg* 19(1): 36-48.
253. **Herwald H, Morgelin M, Bjorck L** (2003) Contact activation by pathogenic bacteria: a virulence mechanism contributing to the pathophysiology of sepsis. *Scand J Infect Dis* 35(9): 604-607.
254. **Altincicek B, Stötzel S, Wygrecka M, Preissner KT, Vilcinskas A** (2008) Host-Derived Extracellular Nucleic Acids Enhance Innate Immune Responses, Induce Coagulation, and Prolong Survival upon Infection in Insects. *J Immunol* 181(4): 2705-2712.
255. **Dushay MS** (2009) Insect hemolymph clotting. *Cell Mol Life Sci* 66(16): 2643-2650.
256. **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, et al.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1): 76-85.
257. **Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD** (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 175(1): 231-237.
258. **Laemmli UK** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
259. **Echan LA, Speicher DW** (2001) Protein Detection in Gels Using Fixation. Current Protocols in Protein Science. *John Wiley & Sons, Inc.*
260. **Merril C, Goldman D, Sedman S, Ebert M** (1981) Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211(4489): 1437-1438.
261. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
262. **Gultekin H, Heermann KH** (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* 172(2): 320-329.
263. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-410.
264. **Consortium TU** (2014) Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 42(D1): D191-D198.
265. **Papadopoulos JS, Agarwala R** (2007) COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23(9): 1073-1079.
266. **Pingoud A UC** (1999) Arbeitsmethoden der Biochemie. *De Gruyter* (Berlin).

267. **Miller-Andersson M, Borg H, Andersson L-O** (1974) Purification of antithrombin III by affinity chromatography. *Thromb Res* 5(4): 439-452.
268. **Davis AE, Lu F, Mejia P** (2010) C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost* 104(11): 886-893.
269. **Feinstein G, Malemud CJ, Janoff A** (1976) The inhibition of human leucocyte elastase and chymotrypsin-like protease by elastatinal and chymostatin. *Biochim Biophys Acta* 429(3): 925-932.
270. **Beynon RBJS**, editor (2001) Proteolytic Enzymes: A Practical Approach. 2. ed. *Oxford University Press* (Oxford). 117, 207, 243.
271. **Hojima Y, Pierce JV, Pisano JJ** (1980) Hageman factor fragment inhibitor in corn seeds: purification and characterization. *Thromb Res* 20(2): 149-162.
272. **Chong GL, Reeck GR** (1987) Interaction of trypsin, beta-factor XIIa, and plasma kallikrein with a trypsin inhibitor isolated from barley seeds: a comparison with the corn inhibitor of activated Hageman factor. *Thromb Res* 48(2): 211-221.
273. **Persson K, Morgelin M, Lindbom L, Alm P, Bjorck L, et al.** (2000) Severe lung lesions caused by Salmonella are prevented by inhibition of the contact system. *J Exp Med* 192(10): 1415-1424.
274. **Greinacher A, Warkentin TE** (2008) The direct thrombin inhibitor hirudin. *Thromb Haemost* 99(5): 819-829.
275. **Turini P, Kurooka S, Steer M, Corbascio AN, Singer TP** (1969) The action of phenylmethylsulfonyl fluoride on human acetylcholinesterase, chymotrypsin and trypsin. *J Pharmacol Exp Ther* 167(1): 98-104.
276. **Campos IT, Amino R, Sampaio CA, Auerswald EA, Friedrich T, et al.** (2002) Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol* 32(9): 991-997.
277. **Campos IT, Guimaraes BG, Medrano FJ, Tanaka AS, Barbosa JA** (2004) Crystallization, data collection and phasing of infestin 4, a factor XIIa inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 11): 2051-2053.
278. **Hagedorn I, Schmidbauer S, Pleines I, Kleinschnitz C, Kronthaler U, et al.** (2010) Factor XIIa Inhibitor Recombinant Human Albumin Infestin-4 Abolishes Occlusive Arterial Thrombus Formation Without Affecting Bleeding. *Circulation* 121(13): 1510-1517.
279. **Tans G, Janssen-Claessen T, Rosing J, Griffin JH** (1987) Studies on the effect of serine protease inhibitors on activated contact factors. Application in amidolytic assays for factor XIIa, plasma kallikrein and factor XIa. *Eur J Biochem* 164(3): 637-642.
280. **Nanninga LB, Guest MM** (1964) On the Interaction of Fibrinolysin (Plasmin) with the Inhibitors Antifibrinolysin and Soybean Trypsin Inhibitor. *Arch Biochem Biophys* 108:542-551.
281. **De Vonis Bidlingmeyer U, Leary TR, Laskowski M, Jr.** (1972) Identity of the tryptic and alpha-chymotryptic reactive sites on soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry* 11(17): 3303-3310.

282. **Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN** (2004) Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol* 36(3): 386-389.
283. **Danielsson A, Bjork I** (1982) Mechanism of inactivation of trypsin by antithrombin. *Biochem J* 207(1): 21-28.
284. **Hopmeier P** (2010) Faktor XI. In: Pötzsch B, Madlener K. Hamostaseologie. *Springer* (Berlin Heidelberg). pp. 191-202.
285. **Monroe DM, Roberts HR, Hoffman M** (1994) Platelet procoagulant complex assembly in a tissue factor-initiated system. *Br J Haematol* 88(2): 364-371.
286. **Lang T, von Depka M** (2006) Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie. *Hamostaseologie* 26(5): 20-29.
287. **Calatzis A** Zielgerichtete behandlung akuter Hämostasestörungen mit Hilfe der ROTEMTM-Analyse
288. **Bang NU, Mattler LE** (1978) Sensitivity and specificity of plasma serine protease chromogenic substrates. *Haemostasis* 7(2-3): 98-104.
289. **Schambeck CM** (2004) Blutungsneigung: Diagnostische Strategie zur Abklärung einer Thrombozytendysfunktion. Consensus-Papier der DGKL-Arbeitsgruppe "Hämostaseologische Labordiagnostik". *J Lab Med* 28453-462.
290. **Deutsch DG, Mertz ET** (1970) Plasminogen: Purification from Human Plasma by Affinity Chromatography. *Science* 170(3962): 1095-1096.
291. **Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR** (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52(11): 2745-2756.
292. **Korzeniewski C, Callewaert DM** (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 64(3): 313-320.
293. **Decker T, Lohmann-Matthes ML** (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115(1): 61-69.
294. **Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, et al.** (1988) Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 48(17): 4827-4833.
295. **van der Plas MJ, Andersen AS, Nazir S, van Tilburg NH, Oestergaard PR, et al.** (2014) A novel serine protease secreted by medicinal maggots enhances plasminogen activator-induced fibrinolysis. *PLoS ONE* 9(3).
296. **Sherman RA, My-Tien Tran JM** (1995) A simple, sterile food source for rearing the larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Med Vet Entomol* 9(4): 393-398.
297. **Laura R, Robison DJ, Bing DH** (1980) (p-Amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride, an irreversible inhibitor of serine proteases. *Biochemistry* 19(21): 4859-4864.
298. **Schoenberger OL, Sprows JL, Schechter NM, Cooperman BS, Rubin H** (1989) Limited proteolysis of C1-inhibitor by chymotrypsin-like proteinases. *FEBS Lett* 259(1): 165-167.

299. **Cugno M, Cicardi M, Bottasso B, Coppola R, Paonessa R, et al.** (1997) Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies. *Blood* 89(9): 3213-3218.
300. **Bjorkqvist J, Jamsa A, Renne T** (2013) Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. *Thromb Haemost* 110(3): 399-407.
301. **Burger D, Schleuning WD, Schapira M** (1986) Human plasma prekallikrein. Immunoaffinity purification and activation to alpha- and beta-kallikrein. *J Biol Chem* 261(1): 324-327.
302. **Burrowes CE, Habal FM, Movat HZ** (1975) The inhibition of human plasma kallikrein by antithrombin III. *Thromb Res* 7(1): 175-183.
303. **Vennerød AM, Laake K** (1975) Inhibition of purified plasma kallikrein by antithrombin III and heparin. *Thromb Res* 7(1): 223-226.
304. **van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN** (1983) Inactivation of kallikrein in human plasma. *J Clin Invest* 71(1): 149-158.
305. **Pritchard DI, Brown AP** (2013) Degradation of MSCRAMM target macromolecules in VLU slough by *Lucilia sericata* chymotrypsin 1 (ISP) persists in the presence of tissue gelatinase activity. *Int Wound J*.
306. **Colman RW** (1969) Activation of plasminogen by human plasma kallikrein. *Biochem Biophys Res Commun* 35(2): 273-279.
307. **Goldsmith GH, Jr., Saito H, Ratnoff OS** (1978) The activation of plasminogen by Hageman factor (Factor XII) and Hageman factor fragments. *J Clin Invest* 62(1): 54-60.
308. **Casu RE, Pearson RD, Jarmey JM, Cadogan LC, Riding GA, et al.** (1994) Excretory/secretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity and amino acid sequence deduced from mRNA. *Insect Mol Biol* 3(4): 201-211.
309. **Elvin CM, Vuocolo T, Smith WJ, Eisemann CH, Riddles PW** (1994) An estimate of the number of serine protease genes expressed in sheep blowfly larvae (*Lucilia cuprina*). *Insect Mol Biol* 3(2): 105-115.
310. **Akam ME, Carlson JR** (1985) The detection of Jonah gene transcripts in *Drosophila* by in situ hybridization. *The EMBO Journal* 4:155-161.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
a	aktiviert (Gerinnungsfaktoren)
A	Apple
AMP	antimikrobielles Peptid (<i>Antimicrobial peptide</i>)
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of variance</i>)
APC	aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumpersulfat
APTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit (<i>Activated Partial Thromboplastin Time</i>)
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Absorbance unit</i>
BCA	Bicinchinoninsäure
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BLAST®	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C1-INH.	C1-Esterase-Inhibitor
Ca	Calcium
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHAPS	3-[[3-Cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-Propansulfonat
CHY	Chymostatin
Cl	Chlorid
CO ₂	Kohlendioxid
COBALT	<i>Constraint-based Multiple Alignment Tool</i>
CT	Gerinnungszeit (<i>Clotting time</i>)
CTI	Corn-Trypsin-Inhibitor
D	Domäne
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>Extracellular matrix</i>)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal growth factor</i>)
EPCR	endothelialen Protein C Rezeptor (<i>Endothelial Protein C receptor</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	et alteri (und andere)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FII	Faktor II (Prothrombin)
FIX	Faktor IX
FV	Faktor V
FVII	Faktor VII
FVIII	Faktor VIII

FX	Faktor X
FXI	Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIII	Faktor XIII
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>)
Gla	γ -Carboxyglutaminsäure
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GP	Glykoprotein
h	Stunde
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HCl	Salzsäure
HMWK	Hochmolekulares Kininogen (<i>High molecular weight kininogen</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1 (<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>)
IL	Interleukin
IMS	Ionenmobilitäts-Spektrometrie
Infestin	rHA-Infestin-4
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
k	Kilo
KGF (FGF7)	Keratinozyten-Wachstumsfaktor (<i>Keratinocyte growth factor</i>)
l	Liter
L929	Murine Fibroblasten-Zelllinie
LC	Flüssigchromatographie (<i>Liquid chromatography</i>)
LDH	Lactatdehydrogenase
LFA-1	Lymphozytenfunktion-Antigen-1 (<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LTB4	Leukotrien B4
m	milli
M	Molar (Mol pro Liter)
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MAMP	<i>Anti bacterial protein from maggots</i>
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (<i>Molecular weight</i>)
n	nano oder Anzahl
Na	Natrium
NAD ⁺	Oxidierter Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

NADH	Reduzierte Form von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid (<i>Nitric oxide</i>)
Ns	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAF	Plättchenaktivierenden Faktor (<i>Platelet activating factor</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PAMPs	Pathogenstrukturen (<i>Pathogen-associated microbial patterns</i>)
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor (<i>Protease-activated-receptor</i>)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor (<i>Platelet-derived growth factor</i>)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PF4	Plättchenfaktor 4 (<i>Platelet factor 4</i>)
PGRPs	Peptidoglykan-erkennende Proteine (<i>Peptidoglycan recognition proteins</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PK	Präkallikrein
Plg	Plasminogen
Pln	Plasmin
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPACK	H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethyketon
PPP	Thrombozyten-armes Plasma (<i>Platelet poor plasma</i>)
PRP	Thrombozyten-reiches Plasma (<i>Platelet rich plasma</i>)
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>Pattern recognition receptor</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale (<i>Reactive oxygen species</i>)
ROTEM®	Rotations-Thromboelastometrie
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Revolutions per minute</i>)
RSL	<i>Reactive site loop</i>
RT	Raumtemperatur
S/cm	Siemens (Elektrischer Leitwert)
SBTI	Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (<i>Soybean-Trypsin-Inhibitor</i>)
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
Sec	Sekunde
SERPIN	Serinprotease-Inhibitor
TAFI	Thrombin-aktivierbarer Inhibitor der Fibrinolyse (<i>Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor</i>)
TAMRA	spezifischen Fluorophosphonat-Sonde (<i>ActivX TAMRA FP Serine Hydrolase Probe</i>)
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline with tween</i>
TEM	Thromboelastometrie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	<i>Tissue factor</i> (Thromboplastin)
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i> (Thromboplastin-Inhibitor)
TGF	Transformierenden Wachstumsfaktor (<i>Transforming growth factor</i>)

Thr	Thrombin
TIMP	Gewebeinhibitor der Metalloproteasen (<i>Tissue inhibitors of metalloproteases</i>)
TM	Thrombomodulin
TNF- α	Tumornekrosefaktor α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
t-PA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator (<i>Tissue-type plasminogen activator</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRY	Trypsin
TXA2	Thromboxan A2
u-PA	Urokinase-Typ Plasmin Aktivator (<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>)
uPAR	Urokinase-Rezeptor (<i>Urokinase receptor</i>)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VCAM-1	Vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>)
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>
Vs.	Gegenüber (<i>Versus</i>)
vWF	von-Willebrand-Faktor
w/v	Gewicht pro Volumen
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid-Salz
Zn	Zink
α -Chy	α -Chymotrypsin

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Phasen der Wundheilung.....	7
Abbildung 2: Behandlung eines diabetischen Fußes mit Fliegenmaden.....	12
Abbildung 3: Biologie der Goldfliege <i>Lucilia sericata</i>	14
Abbildung 4: Modelle der Gerinnungsaktivierung.....	28
Abbildung 5: Die Kontaktphasen-Aktivierung.....	32
Abbildung 6: Reaktionen des Fibrinolyse-Systems.....	33
Abbildung 7: Identifikation aktiver Komponenten in Fraktion 31.....	43
Abbildung 8: Turbidimetrische Bestimmung der Gerinnungszeit von Citratplasma.....	45
Abbildung 9: Prinzip und Parameter der ROTEM®-Analyse ^{286,287}	48
Abbildung 10: Serinprotease-Aktivität von MEP.....	56
Abbildung 11: Charakterisierung aktiver Serinproteasen in MEP nach Inaktivierung durch verschiedene Inhibitoren.....	58
Abbildung 12: Inaktivierung von MEP durch Antithrombin.....	59
Abbildung 13: Prokoagulatorische Aktivität von MEP.....	60
Abbildung 14: Kallikrein-ähnliche Aktivität von MEP.....	62
Abbildung 15: Proteolyse von Kontaktphasen-Proteinen durch MEP.....	63
Abbildung 16: Prokoagulatorische Aktivität von MEP in defizienten Plasmen.....	65
Abbildung 17: Prokoagulatorische Aktivität von MEP in defizienten Plasmen im APTT-Test.....	66
Abbildung 18: Interaktion von MEP mit dem C1-Esterase-Inhibitor.....	67
Abbildung 19: Protease-Aktivität von MEP-Fraktionen.....	68
Abbildung 20: Prokoagulatorische Effekte von MEP-Fraktionen.....	69
Abbildung 21: Protease-Aktivität und prokoagulatorische Effekte von MEP proteinfrei und auf Blut-Agar gezüchteter Maden.....	71
Abbildung 22: Plasminogenspaltung durch MEP.....	73
Abbildung 23: Fibrinogenolytische und fibrinolytische Eigenschaften von MEP.....	74
Abbildung 24: Thrombin-Aktivität von MEP.....	76
Abbildung 25: Anionenaustausch-Chromatographie von MEP.....	77
Abbildung 26: Proteinmuster der mittels Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennten Fraktionen im SDS-Gel.....	78
Abbildung 27: Bestimmung gerinnungsrelevanter Aktivitäten in MEP-Fraktionen gewonnen mittels Anionenaustausch-Chromatographie.....	80
Abbildung 28: Kontrolle der prokoagulatorischen Aktivitäten der Fraktionen 31 und 32 nach Anionenaustausch-Chromatographie von MEP.....	81
Abbildung 29: Vergleich der Aminosäuresequenzen des rekombinant hergestellten Jonah Proteins aus <i>Lucilia sericata</i> und humanem Plasma-Kallikrein, Faktor XII und gewebsspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA).....	83
Abbildung 30: Aktivierung der Jonah Serinprotease mit Trypsin-Agarose.....	84

Abbildung 31: Die Kallikrein-ähnliche Natur von MEP in der Wundheilung.....	98
Abbildung 32: Kationenaustausch-Chromatographie von MEP.....	133
Abbildung 33: Bestimmung der Protease-Aktivitäten in MEP-Fractionen nach Kationenaustausch-Chromatographie.	133
Abbildung 34: Einfluss der während der Kationenaustausch-Chromatographie gesammelten MEP-Fractionen auf die Gerinnungszeit.	134
Abbildung 35: Zytotoxizität von MEP.....	134
Abbildung 36: Einfluss von MEP auf die Zellproliferation.....	135

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Spezifitäten und Molekulargewichte der eingesetzten Serinprotease-Inhibitoren.....	46
Tabelle 2: Plasmakonzentrationen und eingesetzte Mengen der Kontaktphasen-Proteine.	46
Tabelle 3: Mittels MS und Transkriptom-Vergleich identifizierte Proteine in Fraktion 31.....	82
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	125
Tabelle 5: Geräte und sonstige Materialien.....	126
Tabelle 6: Versuchs-Kits.....	128
Tabelle 7: Antikörper	128
Tabelle 8: Verwendete Inhibitoren, Enzyme und Proteine	129
Tabelle 9: Blot-Puffer	129
Tabelle 10: Dialysepuffer.....	129
Tabelle 11: HBS-Puffer für Protease-Aktivitätstests.....	129
Tabelle 12: HEPES-Puffer für die ROTEM™-Analyse.....	130
Tabelle 13: PBS-Puffer	130
Tabelle 14: Sammelgelpuffer	130
Tabelle 15: SDS-Laufpuffer	130
Tabelle 16: Stripping-Puffer für Western Blot.....	130
Tabelle 17: TBS-T-Puffer.....	130
Tabelle 18: Trenngelpuffer	131
Tabelle 19: Vierfach konzentrierter Probenpuffer für die SDS-PAGE.....	131
Tabelle 20: Wachstumsmedien für die verwendeten Zelltypen.....	131
Tabelle 21: Zusammensetzung einiger verwendeter Trenngele und eines Sammelgels.....	131
Tabelle 22: Coomassie-Färbelösung	131
Tabelle 23: Entfärbelösung nach Coomassie-Färbung.....	132
Tabelle 24: Verlaufsschema für die Silberfärbung.....	132
Tabelle 25: Fixierlösung für Silber- und Flamingo-Färbung.....	132

A ANHANG: MATERIALIEN

A.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanzen	Firma	Firmensitz
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-(HEPES)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Actin [®] FS	Siemens Healthcare Diagnostics	Marburg (Deutschland)
<i>ActivX TAMRA-FP Serine Hydrolase Probe</i>	Thermo Fisher Scientific (Pierce)	Rockford (USA)
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Albumin (aus Kälberserum)	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Bromphenolblau	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Chromogene Substrate (S-2288, S-2238, S-2302, S-2251)	Haemochrom diagnostica	Essen (Deutschland)
Columbia Agar mit Schafblut PLUS	Oxoid	Wesel (Deutschland)
<i>Coomassie Brilliant Blue R250</i>	Thermo Fisher Scientific (Pierce)	Rockford (USA)
<i>Developer</i>	Agfa	Mortsel Belgien
D-Glucose	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
<i>Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)</i>	LGC-Standards	Middelex (UK)
Endothelzellbasalmedium	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Endothelzellbasalmedium (Phenolrot-frei)	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Essigsäure	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Ethanol	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Fetales Kälberserum HyClone [™] (FCS)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Fixierer	Agfa	Mortsel (Belgien)
<i>Flamingo[™] Fluorescent Gel Stain</i>	Bio-Rad	München (Deutschland)
Glycerin	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Glycin	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
<i>Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)</i>	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Imidazol	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Insect-XPRESS [™] Proteinfreies Insektenzellmedium	Lonza	Basel (Schweiz)
Isopropanol	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Calciumchloriddihydrat	Merck	Darmstadt (Deutschland)

Substanzen	Firma	Firmensitz
Kollagenase	Worthington	Lakewood (Kanada)
Kollagenreagens Horm	Nycomed	Opfikon (Schweiz)
Magermilchpulver	Sigma Aldrich (Fluka)	Taufkirchen (Deutschland)
Mangelplasmen (Präkallikrein, Kininogen, Faktor XII und Faktor XI)	Haemochrom diagnostica	Essen (Deutschland)
Methanol	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Nativer Marker	SERVA	Heidelberg (Deutschland)
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphatdihydrat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Natronlauge	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Penicillin-Streptavidin	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Pferdeserum	LGC-Standards	Middelex (UK)
Ponceau S Färbelösung	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Proteinmarker (<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>)	Thermo Fisher Scientific (Fermentas)	Rockford (USA)
Rattenschwanzkollagen (Typ I)	BD	Heidelberg (Deutschland)
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Salzsäure 1 mol/l- 1 N Lösung	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Salzsäure rauchend (37%)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat ultra rein (SDS)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
<i>Supplement Pack Endothelial Cell Growth Medium</i>	Promo Cell	Heidelberg (Deutschland)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Trinatriumcitrat	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Tris	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Triton-X-100	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
<i>TrypLETM Express</i>	Invitrogen (Gibco)	Darmstadt (Deutschland)
Trypsin-Agarose	Sigma Aldrich	Taufkirchen (Deutschland)
Tween-20	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Zinkchlorid	Roth	Karlsruhe (Deutschland)

A.2 Geräte und sonstige Materialien

Tabelle 5: Geräte und sonstige Materialien

Geräte bzw. Materialien	Firma	Firmensitz
96-Well Zellkulturplatten (steril)	Thermo Fisher Scientific (Nunc)	Rockford (USA)
AMELUNG KC 10A micro	ABW Medizintechnik	Lemgo (Deutschland)
Amicon Ultra Ultrafiltrations-Röhrchen (Ausschlussgröße 10 und 30 kDa)	Millipore	Billerica (USA)
Tube Spin [®] Bioreaktor	TPP	Trasadingen (Schweiz)
Citrat-Blutentnahmeröhrchen (S-Monovette [®])	Sarstedt	Nümbrecht (Deutschland)
Combitips plus	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Dialyseeinheit <i>Float-A-Lyzer G2</i>	Spectrum Labs	Los Angeles (USA)
Dreiwegehahn	Braun	Melsungen (Deutschland)
Eismaschine	Scotsman	Vernon Hills (USA)
Elektrophoresekammern für SDS-Gele	Bio-Rad	München (Deutschland)
Flüssigstickstoff	Linde	Pullach (Deutschland)
Flüssigstickstofftank	Messer	Bad Soden (Deutschland)

Geräte bzw. Materialien	Firma	Firmensitz
Gefrierbehälter (Nalgene Kryo 1°C Freezing Container)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific	Rockford (USA)
Gel-Dokumentationsgerät mit Software <i>Gene5 Software</i>	Intas BioTek Instruments	Göttingen (Deutschland) Bad Friedrichshall (Deutschland)
Glasgefäße <i>HPLC- System Dionex Ultimate 3000</i>	Schott Thermo Fisher Scientific	Mainz (Deutschland) Rockford USA
Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare	Frankfurt (Deutschland)
Inkubationsmischer (TS1)	Biometra	Göttingen (Deutschland)
Inkubationsschüttler Ampere Chart Multitron II	Infors	Bottmingen (Schweiz)
Inkubator Ampere Chart Multitron II	Infors AG	Bottmingen (Schweiz)
Inkubator für die Zellkultur (IR Sensor)	Sanyo	San Diego (USA)
Ionenaustauschersäulen	YMC Europe GmbH	Dinslaken (Deutschland)
Knopfkanüle	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Kreisschüttler (Rotamax120)	Heidolph	Schwabach (Deutschland)
Kryoröhrchen (Kryo Tube Vials)	Thermo Fisher Scientific (Nunc)	Rockford (USA)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch	Gerlingen-Schillerhöhe (Deutschland)
Küvetten Test Tuben micro	möLab	Langenfeld (Deutschland)
LaminAir Sterilbank	Thermo Fisher Scientific (Holten)	Rockford (USA)
Larven	Biomonde	Barsbüttel (Deutschland)
Lesegerät für Mikrotiterplatten (EL808i Ultra)	BioTek Instruments	Bad Friedrichshall (Deutschland)
Magnetrührer mit Heizplatte (MR-Hei-Standard)	Heidolph	Schwabach (Deutschland)
Mikropipetten	Gilson	Limburg (Deutschland)
Mikroskop für die Zellkultur	Hund	Wetzlar (Deutschland)
<i>Molecular Imager[®] VersaDoc[™] MP 4000</i>	Bio-Rad	München (Deutschland)
Multipipette plus	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Nadeladapter	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Nitril-Handschuhe (Peha-Soft)	Hartmann	Oslo (Norwegen)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging	Chicago (USA)
pH-Meter (Hi208)	HANNA	Kehl am Rhein (Deutschland)
Photopapier (K65HM-CE)	Mitsubishi Electric	Ratingen (Deutschland)
Pinzette aus Federstahl	Roth	Karlsruhe (Deutschland)
Pipetboy	Integra Bioscience	Fernwald (Deutschland)
Plastikzentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Sarstedt	Nürnberg (Deutschland)
Platelet Aggregation Profiler PAP 8E	Bio/Data Corporation	Horsham (USA)
PowerPac Universal	Bio-Rad	München (Deutschland)
PowerPac [™] Universal Power Supply	Bio-Rad	München (Deutschland)
Quantity One Software	Bio-Rad	München (Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf	Hamburg (Deutschland)
Reinstwasser-Aufbereitungssystem (Milli-Q Direct 8)	Millipore	Billerica (USA)

Geräte bzw. Materialien	Firma	Firmensitz
Roller Mixer (SRT9)	Stuart	Staffordshire (Großbritannien)
ROTEM™ delta	Pentapharm	Basel (Schweiz)
Schlauch	NeoLab	Heidelberg (Deutschland)
Skalpell	Braun	Melsungen (Deutschland)
Spritzen (10 ml, 30 ml, 50 ml)	Braun	Melsungen (Deutschland)
Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,22 µm und 0,45 µm)	Millipore	Billerica (USA)
Sterile Einwegpipetten für die Zellkultur	Greiner Bio-One	Frickenhausen (Deutschland)
Tank- Blot System Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad	München (Deutschland)
TC10 Automatisierter Zellzähler	Bio-Rad	München (Deutschland)
Testküvetten und Kugeln KC10A micro	ABW Medizintechnik	Lemgo (Deutschland)
Tischzentrifuge (Fresco17)	Thermo Fisher Scientific (Heraeus)	Rockford (USA)
Tischzentrifuge (Mikro200)	Hettich	Tuttlingen (Deutschland)
Vakuum-Absaugpumpe (Vario18)	Medela	Eching (Deutschland)
Vortexer (Charley2)	Süd-Laborbedarf GmbH	Gauting (Deutschland)
Waage (SI-2002)	Denver Instruments	Bohemia (USA)
Wasserbad	Memmert	Schwabach (Deutschland)
Zellkulturschalen (Cell Star; 10 cm Durchmesser)	Greiner Bio-One	Frickenhausen (Deutschland)
Zentrifuge (Labofuge 400R)	Thermo Fisher Scientific (Heraeus)	Rockford (USA)
Zentrifuge (Rotina 46R)	Hettich	Tuttlingen (Deutschland)

A.3 Verwendete Kits

Tabelle 6: Versuchs-Kits

Kit	Firma	Firmensitz
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Pierce)	Rockford (USA)
ECL Prime Western Blot Detektiersystem	GE Healthcare	Frankfurt (Deutschland)
Silver Stain Kit	Bio-Rad	München (Deutschland)
Zellproliferations-Testkit	AppliChem	Darmstadt (Deutschland)
Zytotoxizitätstest	Roche	Grenzach-Wyhlen (Deutschland)

A.4 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Primär-Antikörper	Firma	Firmensitz
Faktor XII (<i>Mouse monoclonal factor XII heavy chain</i>)	Abcam	Cambridge (UK)
HKH 18 (<i>Mouse monoclonal HMW Kininogen domain I</i>)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Werner Müller-Esterl	
Sekundär-Antikörper	Firma	Firmensitz
Goat polyclonal anti-mouse IgG-HRP	Dako	Hamburg (Deutschland)

A.5 Inhibitoren, Enzyme und sonstige Proteine

Tabelle 8: Verwendete Inhibitoren, Enzyme und Proteine

Bezeichnung	Firma
Aktivierter Faktor XII	American Diagnostica (Standford, USA)
Beriner C1-Esterase-Inhibitor	CSL Behring (Marburg, Deutschland)
Chymostatin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Corn-Trypsin-Inhibitor (CTI)	Haemochrom diagnostica (Essen, deutschland)
Faktor XI	American Diagnostica (Standford, USA)
Faktor XII	American Diagnostica (Standford, USA)
Fibrinogen	Sigma Aldrich
Gewebspezifischer Plasminogenaktivator (t-PA)	Haemochrom diagnostica (Essen, Deutschland)
H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketon (PPACK)	BACHEM (Bubendorf, Schweiz)
Hirudin	Sigma Aldrich
Hochmolekulares Kininogen (HMWK)	Haemochrom diagnostica (Essen, Deutschland)
Humanes Präkallikrein	American Diagnostica (Standford, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
rHA-Infestin-4	CSL-Behring (Marburg, Deutschland)
Thrombin	Sigma Aldrich
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen (SBTI)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
α -Chymotrypsin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

A.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Blot-Puffer

Blot-Puffer	
Tris	0,02 M
Glycin	0,15 M
Methanol	20% (v/v)

Tabelle 10: Dialysepuffer

Dialysepuffer: pH 7,5	
NaCl	150 mM
Tris	25 mM

Tabelle 11: HBS-Puffer für Protease-Aktivitätstests

HBS (HEPES-buffered-saline): pH 7,4	
NaCl	118 mM
KCl	0,36 mM
HEPES	1,81 mM
D-Glucose	1 mM
Lagerung: 4°C	

Tabelle 12: HEPES-Puffer für die ROTEM™-Analyse

HEPES-(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure-) Puffer: pH 7,4	
HEPES	10 mM
CaCl ₂	100 mM

Tabelle 13: PBS-Puffer

PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>): pH 7,4	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	8,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM

Tabelle 14: Sammelgelpuffer

Sammelgelpuffer: pH 8,8	
Tris	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Tabelle 15: SDS-Laufpuffer

SDS-Laufpuffer	
Tris	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1% (w/v)

Tabelle 16: Stripping-Puffer für Western Blot

Stripping-Puffer 1: Glycin-HCL Puffer (pH 2,5)	
Glycin	0,1 M
Konzentrierte Salzsäure	10% (v/v)

Tabelle 17: TBS-T-Puffer

TBS (<i>Tris-buffered-saline</i>): pH 7,4	
Tris	25 mM
NaCl	150 mM
KCl	3 mM

Für die Herstellung von TBS-T wurde zusätzlich 0,1% Tween-20 (w/v) hinzugefügt

Tabelle 18: Trenngelpuffer

Trenngelpuffer: pH 6,8	
Tris	1,5 M
SDS	0,4% (w/v)

Tabelle 19: Vierfach konzentrierter Probenpuffer für die SDS-PAGE

Vierfach konzentrierter Probenpuffer	
Sammelgelpuffer	25% (v/v)
SDS	5% (v/v)
Glycerin	40% (w/v)
Bromphenolblau	Eine Spatelspitze

Tabelle 20: Wachstumsmedien für die verwendeten Zelltypen

L929 Wachstumsmedium	HUVEC Wachstumsmedium
<i>Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)</i>	<i>Endothelial Cell Basal Medium</i>
10% Pferdeserum	5% fetales Kälberserum (FCS) (v/v)
1% Penicillin/Streptomycin (v/v)	1% Penicillin/Streptomycin (v/v)
1% HEPES	Supplements: 0,1 ng/ml <i>Epidermal Growth Factor</i> 1 ng/ml <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> 1 µg/mml Hydrocortison

Tabelle 21: Zusammensetzung einiger verwendeter Trenngele und eines Sammelgels

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12,5%	16%	5%
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid (30%)	3,3 ml	4,2 ml	5,3 ml	1,65 ml
Wasser	4,1 ml	3,2 ml	2,1 ml	5,7 ml
Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Endvolumen	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

A.7 Verwendete Färbelösungen und Protokolle

Tabelle 22: Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Färbelösung	
Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie Blue R 250	0,1% (w/v)

Tabelle 23: Entfärbelösung nach Coomassie-Färbung

Entfärbelösung	
Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

Tabelle 24: Verlaufsschema für die Silberfärbung

Reagenz	Volumen (ml)	Dauer
Fixierlösung	200	30 min
Fixierlösung	200	15 min
Fixierlösung	200	15 min
Oxidationslösung	100	5 min
ddH ₂ O	200	5 min*
Silberreagenz	100	20 min
ddH ₂ O	200	1 min
Entwicklerlösung	100	ca. 30 sec
Entwicklerlösung	100	ca. 5 min
Entwicklerlösung	100	ca. 5 min
Stopplösung	200	ca. 5-15 min

*Wiederholt, bis die gelbe Farbe aus dem Gel entfernt war

Tabelle 25: Fixierlösung für Silber- und Flamingo-Färbung

Fixierlösung	
Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

B ANHANG: ERGEBNISSE

B.1 Kationenaustausch-Chromatographie und Aktivitäten der gesammelten MEP-Fraktionen

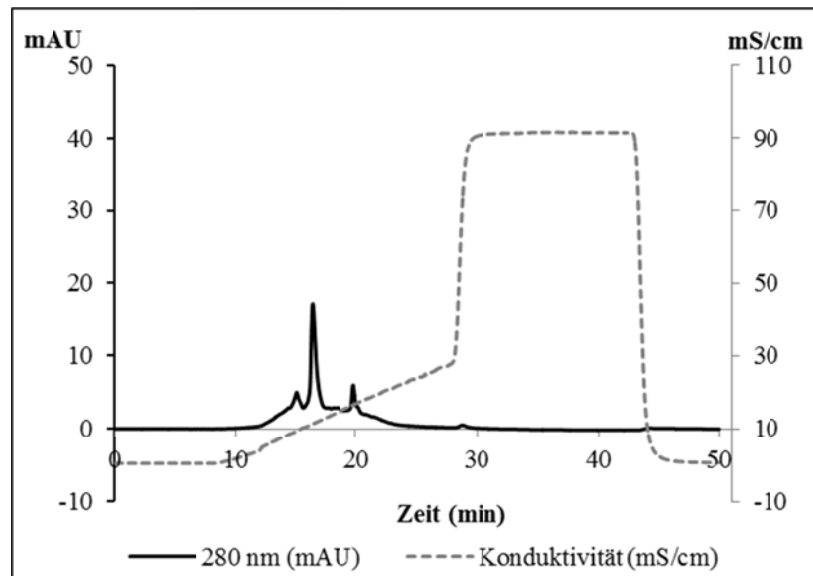


Abbildung 32: Kationenaustausch-Chromatographie von MEP.

Der während der Elution der Proteine von der Anionenaustauscher-Säule gesammelte Durchfluss wurde auf eine Kationenaustauscher-Säule injiziert und mit einem linearen Gradienten (5 mM Tris, pH 7, Natriumchlorid 1M final) getrennt. Das Eluat in Fraktionen (0,5 ml/min) gesammelt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Zudem wurde die Konduktivität im Zeitverlauf erfasst.

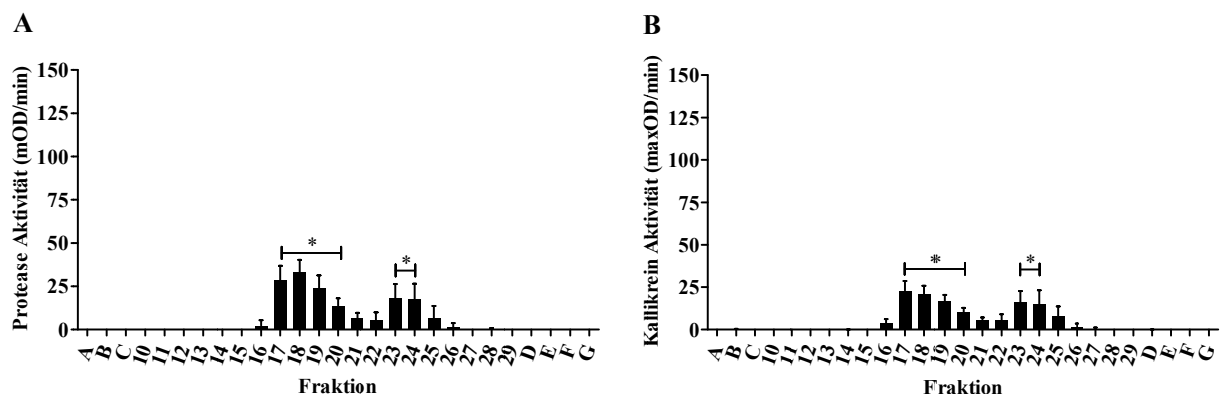


Abbildung 33: Bestimmung der Protease-Aktivitäten in MEP-Fraktionen nach Kationenaustausch-Chromatographie.

(A) Serinprotease-Aktivität der mittels Ionenaustausch-Chromatographie gewonnen Fraktionen aus MEP (5 μ l), bestimmt anhand der Proteolyse des chromogenen Substrates S-2288 ($n=3$). (B) Kallikrein-Aktivität der MEP-Fraktionen (5 μ l) gemessen im chromogenen Test mit S-2302 ($n=3$). Werte sind Mittelwerte $\pm$ SD (A=Fraktion 1-3; B=Fraktion 4-6; C=Fraktion 7-9).

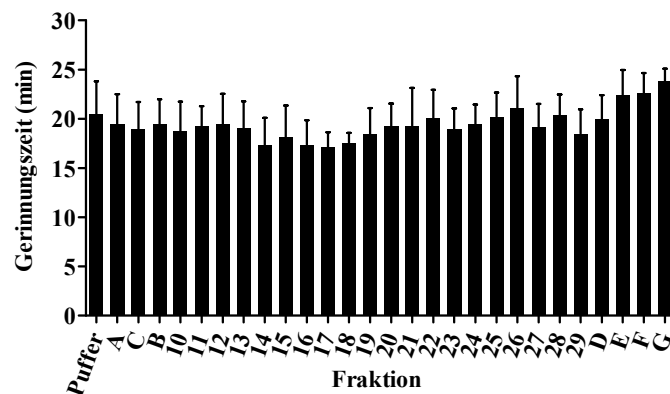


Abbildung 34: Einfluss der während der Kationenaustausch-Chromatographie gesammelten MEP-Fraktionen auf die Gerinnungszeit.

Gerinnungszeit in humanem Plasma nach Zugabe der MEP-Fraktionen (10 µl) (n=3). Die Gerinnung wurde hierbei durch Rekalkifizierung initiiert. Werte sind Mittelwerte ± SD (A=Fraktion 1-3; B=Fraktion 4-6; C=Fraktion 7-9).

B.2 Einfluss von MEP auf die Viabilität verschiedener Zelltypen

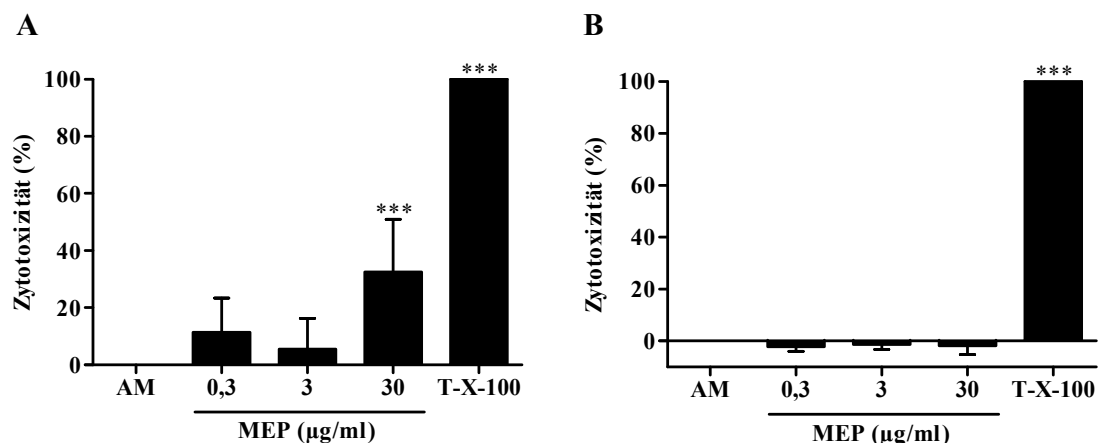


Abbildung 35: Zytotoxizität von MEP

Die Zytotoxizität steigender MEP-Konzentrationen auf (A) HUVEC und (B) L929-Zellen wurde nach 48 h anhand der Lactatdehydrogenase-Aktivität ermittelt (n≥3). Als Positivkontrolle diente eine Inkubation der Zellen mit 0,1% Triton-X-100. Alle Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD (***) $P < 0,001$; AM=Assaymedium (Basalmedium + 0,5% FCS), T-X-100 = Triton-X-100).

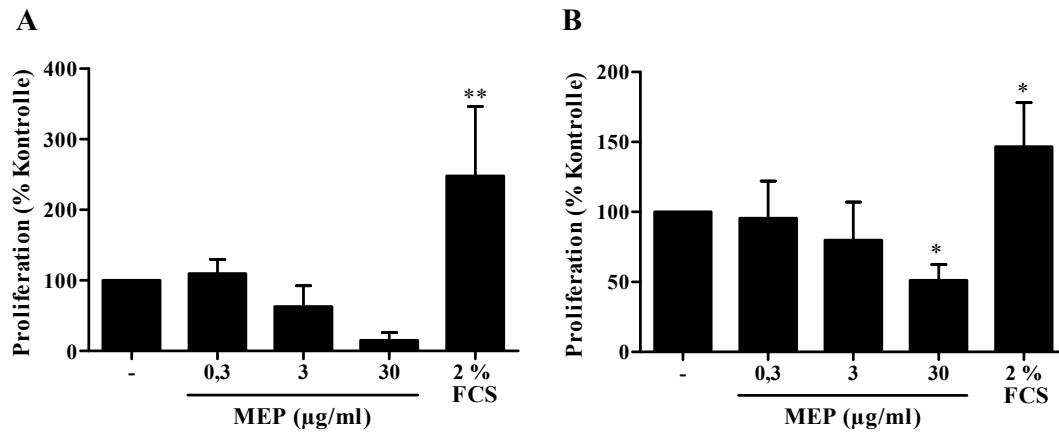


Abbildung 36: Einfluss von MEP auf die Zellproliferation

Der Einfluss steigender MEP-Konzentrationen auf die Proliferation von (A) HUVEC und (B) L929-Zellen nach 24 h. Basalmedium mit 2% FCS diente als Positivkontrolle ($n \geq 3$). Alle Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SD (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

DANKSAGUNG

Zu guter Letzt möchte ich diese Seite allen widmen, die mich in den letzten Jahren begleitet und mir mit Ihrer Hilfe und Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben:

Zunächst möchte ich dem hessischen Ministerium für Wissenschaft und Kunst danken, ohne deren Promotionsstipendium im Rahmen des Forschungsförderungsprogramms LOEWE – Schwerpunkt „Insektenbiotechnologie“ die Durchführung des Projekts in dieser Art nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Preissner für die Vergabe des spannenden Forschungsthemas die Bereitstellung der ausgezeichneten Forschungsmöglichkeiten. Seine jederzeit konstruktive Unterstützung und kritische Auseinandersetzung mit der Thematik in zahlreichen Gesprächen und Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin bedanke ich mich für die offene Bürotür und die Geduld, mit der Prof. Preissner jederzeit für fachliche und persönliche Fragen ansprechbar war.

Prof. Wilke danke ich für die Übernahme der Erstgutachterschaft und die konstruktiven Vorschläge zu Aufbau und Inhalt dieser Arbeit.

Zudem gilt mein Dank Silvia Fischer für die Korrektur des Manuskripts und dieser Arbeit, für Ihre Unterstützung in vielen persönlichen wie auch fachlichen Fragestellungen und dafür, dass sie Ihr Büro mit mir geteilt hat.

Ich danke meinen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen aus dem Rundlabor für ihre freundschaftliche Unterstützung in den letzten Jahren. Uwe und Christiane danke ich dafür, dass sie mir einen leichten Einstieg in die Gruppe bereitet haben. Ich danke Ute, Jessy und Dimi für das gute Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und die tatkräftige Unterstützung. Furthermore it's a pleasure to thank Mona and Hector for their friendship during the last years, their kindness, their professional advice and the funny evenings, we have had in the roundlab. Julia, Bärbel, Barbara, Susanne und Silke haben alle Höhen und Tiefen während meiner Promotion mit mir durchlebt, mit mir gelacht, sich mit mir geärgert, mich beruhigt und mich immer wieder aufs neue motiviert. Darüber bin ich über alle Maßen dankbar.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Kanse und Wygrecka für ihre Hilfsbereitschaft, die freundliche Zusammenarbeit und die wichtigen Denkanstöße bedanken.

Ich danke Andreas Vilcinskas, Jochen Wiesner, Anke Gökçen, Annika Beckert und Anne Pöppel von der Projektgruppe „Bioressourcen“ des Fraunhofer Instituts für Molekularbiologie und

Angewandte Ökologie (IME) für die freundschaftliche, wie auch fachliche Unterstützung sowie die Bereitstellung von Gerätschaften und Materialien.

Außerdem danke ich meiner Freundin Charlotte Regitz. Wir sind ein ganzes Stück des Weges bis hierher zusammen gegangen und ich bin dankbar für den einen Menschen an meiner Seite, der immer zur gleichen Zeit das Selbe gefühlt hat, vor dem ich mich für nichts rechtfertigen musste, dem ich mich nicht erklären musste und auf den ich immer zählen konnte. Danke Lotti!

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, für den uneingeschränkten Rückhalt, dafür dass sie an mich geglaubt haben und für ihre moralische Unterstützung. Ohne sie wäre ich heute nicht die, die ich bin und wäre nicht da wo ich bin.

Ich danke meinem Freund Fabian für den Rückhalt und die Unterstützung in den letzten Jahren. Du hast mein Projekt „Promotion“ zu unserem gemeinsamen werden lassen, indem Du meine Launen ertragen, mir zugehört und mitgeföhlt hast und mir eine große Hilfe warst, wenn ich Dich gebraucht habe. Das alles werde ich Dir nie vergessen. Danke!

ERKLÄRUNG

Ich erkläre:

Ich, Mareike Kahl (geb. 04.11.1982 in Geseke), habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 28. Juli 2014