



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Isolierung, Charakterisierung und Analytik von
cysteinreichen Peptiden aus *Sambucus nigra* L.“

Verfasserin

Johanna Hellmayr

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ. - Prof. Sabine Glasl-Tazreiter

Danksagung

Ich danke Frau Univ-Prof. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

Ich danke Ao. Univ. - Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für ihre engagierte Betreuung und ihre Hilfestellungen, wann immer ich sie brauchte.

Ich danke Dr. Martin Zehl für die Vergabe des Themas, für die gesamte Betreuung während der Laborarbeit und besonders während des Schreibens der Diplomarbeit.

Ich danke Dr. Andreas Schinkowitz für die Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

Ich danke Christina Dangl für ihre Unterstützung und ihre wertvollen Hilfestellungen.

Ich danke dem ganzen Team der Arbeitsgruppe Glasl/Krenn/Reznicek für die tolle Atmosphäre während der ganzen Dauer der Diplomarbeit und die herzliche Aufnahme ins Team.

Ich danke allen anderen, die mich während meines Studiums und meiner Diplomarbeit immer wieder unterstützt haben und mir so eine schöne Zeit am Pharmaziezentrum ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
1.1	<i>Sambucus nigra</i>	1
1.2	Flechten	5
1.3	Extrazelluläre Pflanzenpeptide	6
1.3.1	Elektrosprayionisations-Ionenfallen-Massenspektrometrie	10
1.3.2	Massenspektrometrische Analytik von Peptiden und Aminosäuresequenzierung	13
1.4	Problemstellung und Zielsetzung.....	17
2.	Material und Methoden.....	18
2.1	Material	18
2.1.1	Pflanzenmaterial Screening.....	18
2.1.2	Flechten	19
2.1.3	<i>Sambucus nigra</i>	19
2.1.4	Enzyme.....	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Probenextraktion.....	21
2.2.2	Festphasenextraktion	22
2.2.3	Peptidanalytik von <i>Sambucus nigra</i>	30
2.2.4	Peptidanalytik von <i>Lobaria scrobiculata</i>	37
2.2.5	LC und LC/MS	38
3.	Resultate.....	44
3.1	Screening der Pflanzen und Flechten auf Peptide	44
3.1.1	Kriterien für die Identifizierung von Peptiden	44
3.1.2	Resultate des Screenings der 22 ausgewählten Pflanzen	46
3.1.3	Screening der Lichenes	48
3.2	<i>Lobaria scrobiculata</i> – Aufreinigung und Charakterisierung des Hauptpeptids	50
3.2.1	Aufreinigung der Peptide	50
3.2.2	Reduktion und Alkylierung	52
3.2.3	Enzymatischer Verdau des <i>Lobaria scrobiculata</i> Peptids mittels Trypsin	52
3.3	Resultate - <i>Sambucus nigra</i>	54
3.3.1	<i>Sambucus nigra</i> – Vergleich der verschiedenen Organe	54
3.3.2	Aufreinigung der Peptide aus Cortex <i>Sambuci nigrae</i> und Fructus <i>Sambuci nigrae</i> ...	58
3.3.3	Reduktion und Alkylierung von Fructus <i>Sambuci nigrae</i>	68

3.3.4	Enzymatische Spaltung der Peptide aus Fructus Sambuci nigrae	70
3.3.5	Sequenzierung	77
4.	Diskussion	86
5.	Zusammenfassung	88
6.	Abstract	89
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	90
8.	Verzeichnis des Einbuchstaben-Codes von Aminosäuren	91
9.	Literaturverzeichnis.....	92
10.	Anhang.....	96
11.	Curriculum vitae.....	104

1 Einleitung und Problemstellung

Dieses Projekt besteht aus mehreren Teilen: einerseits wurden 22 verschiedene Pflanzen auf Peptide gescreent, andererseits wurden auch neun Flechten auf Peptide untersucht. Die beiden Arten mit dem größten Potential für Erkenntnisse im Bereich der Peptide waren *Sambucus nigra* und *Lobaria scrobiculata*. Die in diesen beiden Arten enthaltenen Peptide wurden mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden genauer untersucht und teilweise charakterisiert.

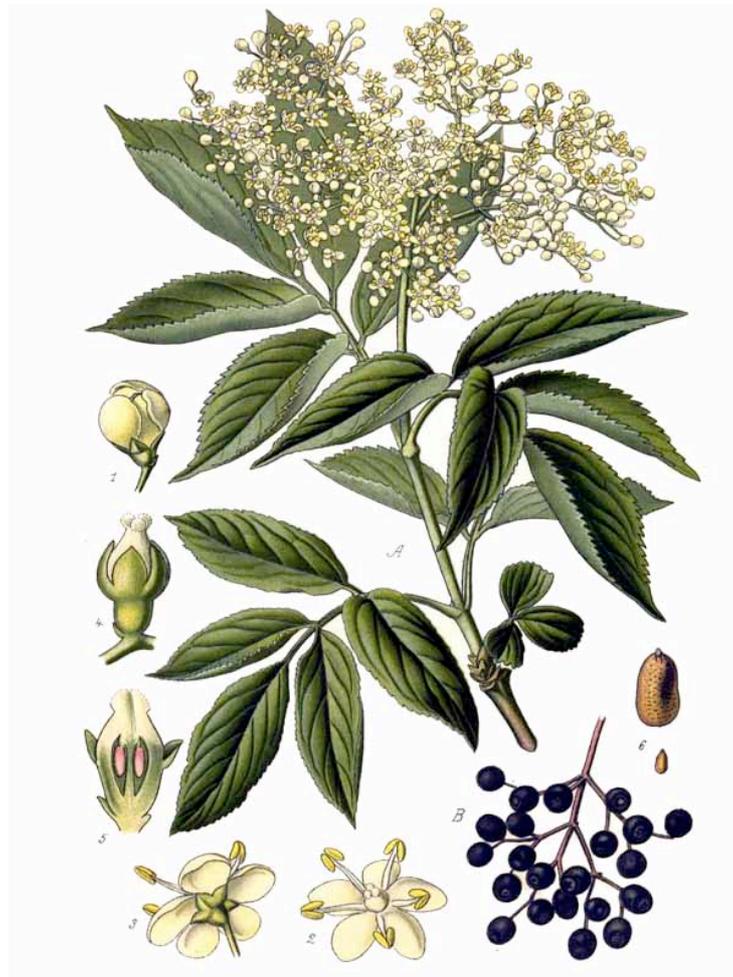
1.1 *Sambucus nigra*

Sambucus nigra ist ein vom europäischen Raum bis hin nach Westsibirien beheimateter Baum (Wenigmann, 1999), der wie alle anderen Vertreter der Gattung *Sambucus*, laut der Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol (Fischer et al., 2008), zur Familie der Sambucaceae gezählt wird. In anderen Publikationen findet man auch Zuordnungen zu der Familie der Caprifoliaceae und der Familie der Adoxaceae. Die taxonomischen Zuordnungen in dieser Arbeit richten sich jedoch in erster Line nach der genannten Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol (Fischer et al., 2008). Die Hauptinhaltsstoffe des schwarzen Holunders sind neben den cyanogenen Glykosiden, wie dem bekannten Sambunigrin, verschieden lange Fettsäuren, Lektine, Flavonoidglykoside, Anthocyane und Triterpene. Weiters finden sich besonders in den Blüten Schleim- und Gerbstoffe und auch ätherisches Öl, (Wenigmann, 1999 und Atkinson und Atkinson, 2002).

Die charakteristischen kleinen weißen Blüten auf den großen Dolden (siehe Abbildung 1), wie auch der betörende Duft, sind den meisten Menschen geläufig, vor allem, weil der schwarze Holunder als Kulturfolger häufig in der Nähe besiedelter Gebiete wächst. Auch die dunkelblauen Beeren kennt man noch aus früheren Zeiten als Allheilmittel gegen Verkühlungen und Fieber.

Schwarzer Holunder ist aber auch ein wichtiger Teil der traditionellen europäischen Küche, wobei sowohl die Blüten gebacken oder in Form eines Sirups als auch die Beeren als Saft oder gekocht als Hollersuppe genossen werden können. Hierbei gilt es allerdings anzumerken, dass bei selbstgemachten Spezialitäten darauf geachtet werden sollte, die Früchte gut durchzukochen, da es ansonsten zu Vergiftungserscheinungen in Form von Übelkeit und Erbrechen kommen kann (Vlachojannis et al., 2010). Außerdem sollten die reifen Beeren des schwarzen Holunders nicht mit jenen des Zwergholunders (*Sambucus ebulus*) verwechselt werden, da diese gerade bei Kindern häufig Erbrechen auslösen (Hemgesberg, 1998).

Eingesetzt wurde der schwarze Holunder schon in der Antike als harntreibendes Mittel und Laxans, später wurden auch die Blätter bei kleineren Verletzungen und Blutergüssen angewandt, die Rinde wurde ebenfalls als Diuretikum verwendet. Die Blüten von *Sambucus nigra*, welche als einziger Teil der Pflanze auch offizinell sind, werden in Form von schweißtreibenden Tees verabreicht.



Pl.150. Sureau noir. *Sambucus nigra* L.

Abbildung 1: Darstellung von *Sambucus nigra* aus Atlas des plantes de France (Masclef, 1891).

Noch heute werden die Früchte von schwarzen Holunders, in gekochter Form, aufgrund ihres hohen Vitamingehalts bei grippalen Infekten gerne volksheilkundlich eingesetzt (Hemgesberg, 1998). Neuere Studien belegen, dass es sich bei dem wirksamen Prinzip der Extrakte der Früchte des *Sambucus nigra* aber keineswegs nur um eine erhöhte Vitamin C Zufuhr handelt:

Bei in vitro Versuchen mit Monozyten von Gesunden kam es nach Inkubation mit Sambucol[®], einem Nahrungsergänzungsmittel, das den Extrakt der Beeren des schwarzen Holunders enthält, zu einer deutlichen Erhöhung der Cytokinproduktion, besonders von $TNF\alpha$, dessen Konzentration sich um das mehr als Vierzigfache erhöhte. Dies kann gerade bei Patienten mit beeinträchtigtem

Immunsystem, zum Beispiel während einer Chemo- oder HIV-Therapie, zu einer Verbesserung des Zustandes bzw. zu einer geringeren Anfälligkeit gegenüber Sekundärinfektionen führen (Barak et al., 2001 und Sambucol® Black Elderberry Extract, 2012).

Auch kam es bei in vitro Versuchen mit ebendiesem Sambucol® mit zehn verschiedenen Virenstämmen, darunter auch der durch die Schweinegrippe bekannt gewordene H1N1-Virus, zu einer Hemmung viraler Reproduktion (Vlachojannis et al., 2010).

In einer weiteren Studie mit Patienten, die an Influenza A oder B litten, konnte belegt werden, dass es durch die Einnahme dieses Extraktes aus schwarzem Holunder im Vergleich zu einem Placebo nach 4 anstatt nach 8 Tagen zu einer kompletten Reduktion der Symptome kommt, wie man auch in Abbildung 2 sehen kann (Zakay-Rones et al., 2004). Auch wenn diese Ergebnisse beeindruckend sind, fehlt es an weiteren Studien, die diese Resultate untermauern könnten.

Außerdem wurde bei in vitro Untersuchungen festgestellt, dass wässrige Extrakte von den Blüten des *Sambucus nigra* die Insulinausschüttung wie auch die Glucoseaufnahme in den Muskel erhöhen. Zusätzlich konnte von einer anderen Forschungsgruppe die hohe antioxidative Wirkung des sprühgetrockneten Saftes der Früchte auf LDL (low density lipoprotein – siehe auch Abkürzungsverzeichnis auf Seite 96) nachgewiesen werden, welcher in Zukunft bei der Prävention von arteriosklerotischen Erkrankungen eine Rolle spielen könnte (Atkinson und Atkinson, 2002).

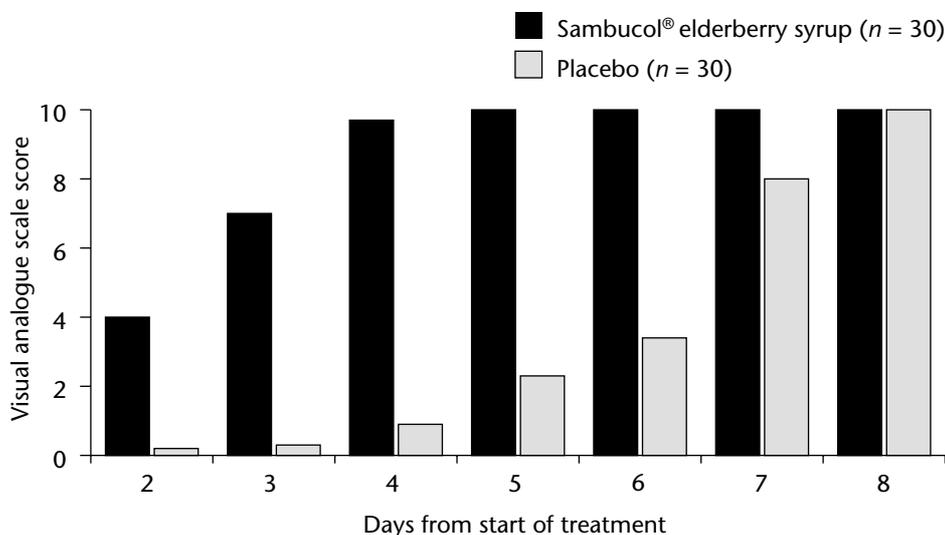


Abbildung 2: Besserung der Symptome von Patienten mit Influenza nach Einnahme von Sambucol® bzw. einem Placebo. Je höher der „Visual analogue scale score“ ausfällt, desto besser fühlen sich die Probanden. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass sich Patienten nach Einnahme von Sambucol® bereits nach 4 Tagen gesund fühlen, wogegen es bei jenen Probanden, die ein Placebo erhalten hatten, 8 Tage dauerte, um den gleichen Effekt zu erzielen. Die Abbildung wurde aus Zakay-Rones et al. (2004) entnommen.

Extrakte von *Sambucus nigra* wurden von Hearst, et al. (2010) auch auf ihre antibakterielle Wirkung gegenüber Hospitalismuskeimen wie MRSA (Methicillin-resistanter *Staphylococcus aureus*) hin getestet. Die durchgeführten in vitro Untersuchungen ergaben, dass verschiedene, teilweise lyophilisierte Extrakte aus den Blüten und den Früchten des schwarzen Holunders eine starke bakteriostatische Wirkung nicht nur gegenüber *Escherichia coli* aufweisen, sondern auch gegen den gefürchteten MRSA wirksam sind.

Zukünftig könnten also antibakteriell wie auch antiviral wirksame Arzneien auf Basis der Inhaltsstoffe des schwarzen Holunders entwickelt werden, die besonders im Hinblick auf die immer größer werdende Anzahl an gegen konventionelle Antibiotika resistenten Keimen einen wichtigen Teil der medizinischen Versorgung ausmachen könnten.

1.2 Flechten

Als Flechten, mit dem lateinischen Fachbegriff auch *Lichen* genannt, bezeichnet man jene Lebensgemeinschaften, die aus jeweils einem Pilz und einer Grünalge oder einer Gruppe Cyanobakterien, also Blaualgen, besteht, welche miteinander in Symbiose leben. Dabei dient die Photosyntheseleistung der Alge als Nahrungslieferant für den Pilz - teilweise geht die Symbiose sogar soweit, dass sich der Pilz selbst gar nicht mehr an der Nahrungsbeschaffung beteiligt. Umgekehrt dient der Pilz der Alge als Schutz vor Fressfeinden und zu hoher Trockenheit. Generell sind Flechten aber so gut auf ihre Umwelt eingestellt, dass sie sowohl in tropischen als auch arktischen Gegenden gut überleben können (Sauermost, 1994). Allerdings reagiert diese Gruppe ausgesprochen sensibel auf klimatische Veränderungen in ihrer Umgebung. Daher werden Flechten als Bioindikatoren genutzt, die je nach Art mit einer Abnahme oder aber auch einer Zunahme des Wachstums auf Luftverschmutzung reagieren (Stapper und Kricke, 2004 und Windisch, 1999).

Wirtschaftlich gesehen sind die Extrakte einiger Flechten, darunter auch die in dieser Arbeit untersuchten Arten *Pseudoevernia furfuracea* und *Evernia prunastri*, wichtige Duftstofflieferanten in der Parfümindustrie. Sie sind vor allem für moosige Duftnoten wie Chypre verantwortlich. Auch als Farbstoffe werden Auszüge von Flechten bis heute in Schottland zum Einfärben bestimmter Tweedstoffe und früher auch zur Herstellung von Lackmuspapier verwendet (Reichholf und Steinbach., 1997 und Nash, 1996).

Vertreter der Flechten werden aber nicht nur in diesen Branchen genutzt, sondern auch in der Pharmazie. Schon seit jeher werden Flechten, in Abhängigkeit ihrer optischen Erscheinung, Heilkräfte nachgesagt, wie etwa Arten der Gattung *Usnea*, der Bartflechte, dass sie Bärte wachsen ließe, oder aber auch der Lungenflechte *Lobaria pulmonaria*, der aufgrund ihres Aussehens eine heilende Wirkung auf die Atmungsorgane nachgesagt wurde (Reichholf und Steinbach, 1997).

Heutzutage werden verschiedene Arten in der traditionellen chinesischen Medizin und auch von Nord-Amerikanischen Ureinwohnern als Expektorantien benutzt, genauso wie das in Europa für ihre antibakterielle Wirkung beliebte Isländische Moos (*Cetraria islandica*) auch in Form von Hustensäften oder Pastillen bei ähnlichen Indikationen verabreicht wird, wobei für die Wirkung vor allem die Flechtensäuren sowie die Schleimstoffe verantwortlich sind (Nash, 1996 und Hunnius, 2004).

Im Laufe der Jahre haben weitere Forschungsergebnisse gezeigt, dass aufgrund der immunstimulierenden wie auch der cytostatischen Wirkung mancher Arten gerade auf dem Gebiet der Tumorthherapie Hoffnung besteht, neue Wirkstoffe aus Flechten isolieren zu können (Nash, 1996). Die Analytik der Inhaltsstoffe der Flechten in dieser Arbeit, allen voran der Peptide, könnte eventuell einen kleinen Teil dazu beitragen.

1.3 Extrazelluläre Pflanzenpeptide

Eine wichtige Substanzgruppe, die von Pflanzen produziert wird, ist die der pflanzlichen Peptide. Diesen extrazellulär wirkenden Peptiden kommt die Aufgabe der Abwehr von Pathogenen, wie Bakterien oder Pilzen, und von Fressfeinden, wie Insekten, zu (Farrokhi et al., 2008).

Die Erforschung dieser Peptidgruppe ist allerdings nicht nur für die Landwirtschaft von immer größerer Bedeutung, die sich durch gezielte erhöhte Exprimierung dieser natürlichen Abwehrstoffe eine erhöhte Resistenz der angebauten Obst- und Gemüsesorten gegenüber Schädlingen erhofft. Auch für die Medizin spielt die Erforschung dieser Substanzgruppe eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuer antibiotisch und cytostatisch wirkender Medikamente. Hierbei dienen die natürlichen Pflanzenprodukte als Ausgangspunkt für die weitere Arzneistoffentwicklung (Farrokhi et al., 2008).

Eingeteilt werden die Pflanzenpeptide in verschiedene Gruppen, wobei man grob zwischen Phytohormonen, Glutathionderivaten, Proteaseinhibitoren und cysteinreichen Abwehrpeptiden unterscheiden kann. In dieser Arbeit werden allerdings nur Letztere behandelt. Diese lassen sich anhand ihrer chemischen Struktur wiederum in sieben Gruppen unterteilen, wie auch in Tabelle 1 auf Seite 7 ersichtlich ist (Farrokhi et al., 2008).

Allen gemeinsam sind die enthaltenen Cysteine, wobei pro Peptid zwischen sechs und zwölf Stück dieser Aminosäuren enthalten sein können. Diese bilden typischer Weise Disulfidbrücken aus, welche die Peptidstruktur unter den oft nicht-physiologischen extrazellulären Bedingungen stabilisieren (Farrokhi et al., 2008). Eine Sonderform der cysteinreichen Peptide stellen die Cyclotide dar. Als Charakteristikum der Cyclotide gelten die zyklische Form, also die Verknüpfung des N-Terminus mit dem C-Terminus des linearen Vorläuferpeptids über eine Peptidbindung und der Cysteinknoten in dessen Mitte. Dieser besteht aus 3 Disulfidbrücken, die so angeordnet sind, dass sie einander im Zentrum des Rings überlappen, wie in Abbildung 3 (S. 7) zu sehen ist.

Diese strukturelle Besonderheit bedingt auch die charakteristischen chemischen Eigenschaften der Cyclotide. Sie sind extrem stabil gegenüber äußeren Einflüssen wie Hitze, Chemikalien und proteolytischen Enzymen (Craik et al., 2007). Deshalb sind sie als potenzielle Arzneistoffe besonders interessant, da man sie im Gegensatz zu anderen Peptiden ohne Probleme peroral einsetzen könnte.

Tabelle 1: Auflistung der verschiedenen Klassen von cysteinreichen Abwehrpeptiden und ihrer strukturellen Eigenschaften laut UniProt (2012), PhytAMP (2012) und Farrokhi et al. (2008).

Peptidklasse	Beispiel	Vorkommen	Aminosäureanzahl	Cysteinmuster ¹
Antimikrobielle Peptide	IW4	<i>Beta vulgaris</i>	30	C5C4CC5C6C
Chitinbindende Proteine	Hevein	<i>Hevea brasiliensis</i>	43	C8C4CC5C6C4C3C
Cyclotide	Kalata B1	<i>Oldenlandia affinis</i>	29	4C3C4C4C1C4C3
Defensine	Rs-AFP2	<i>Raphanus sativus</i>	51	C10C5C3C10C8C1C3C
Lipid-Transfer-Proteine	ACE-AMP 1	<i>Allium cepa</i>	105	9C12CC18C1C23C15C
Snakine	Snakin-1	<i>Solanum tuberosum</i>	63	C3C3C8C3C2CC2C1C11C1C12C
Thionine	Purothionin A-1	<i>Triticum aestivum</i>	45	CC7C3C8C3C1C7C

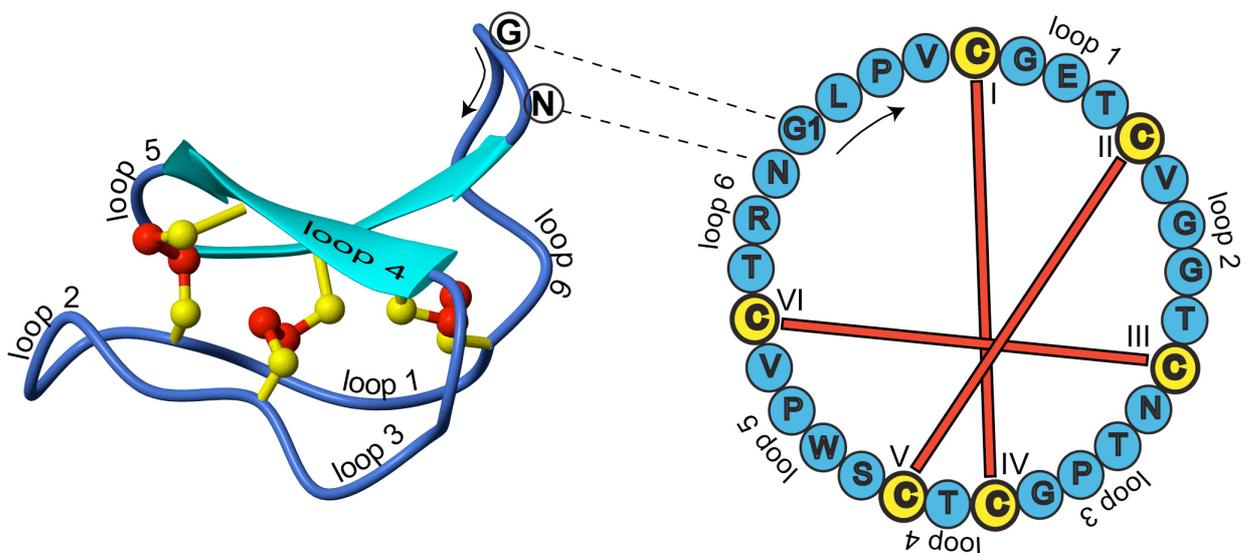


Abbildung 3: Struktureller Aufbau des Cyclotids Kalata B1; die Abbildung wurde aus Wikipedia (2012) entnommen.

Generell sind die Strukturen der zu einer Gruppe gehörenden Peptide sehr ähnlich und können über jeweils charakteristische konservierte Regionen im Peptid klassifiziert werden. Allerdings können diesen pflanzlichen Peptiden sehr ähnliche Peptide auch in ganz anderen Organismen vor-

¹ Das Cysteinmuster gibt an in welchen Abständen im Peptid Cysteine vorkommen. Die Zahlen stehen hierbei für die Anzahl an beliebigen Aminosäuren zwischen den Cysteinen.

kommen, wie am Beispiel der Defensine zu sehen ist, die man unter anderem auch in den Sekreten von Skorpionen und Bienen findet, die aber auch Teil des angeborenen Immunsystems des Menschen sind.

Es hat sich gezeigt, dass diese Peptide, neben ähnlichen strukturellen Eigenschaften, auch alle ähnliche Funktionen erfüllen können. Hierzu zählt beispielsweise die antimikrobielle Aktivität in *in vitro* Versuchen und eine vermehrte Synthese der Peptide, ausgelöst durch Pathogene und Infektionen der Pflanzen und der dadurch bedingten erhöhten Genexpression. Um Peptide zur Gruppe der pflanzlichen Abwehrpeptide zählen zu können, muss also eine direkte Korrelation zwischen der Produktion dieser Peptide und der Abwehr von Pathogenen hergestellt werden können. Allerdings spielt es keine Rolle, an welcher Stelle im pflanzlichen Organismus diese Peptide ihre Wirkung ausüben. Heveine werden von ihrem Produzenten, dem Kautschukbaum, beispielsweise bei Verletzungen als antifungaler Zusatz zu dem abgegebenen Milchsaft ausgeschüttet, während die antimikrobiellen Proteine (AMPs) ihre antibakterielle Aktivität vielfach schon während der Keimung der Samen entfalten. Eine künstlich induzierte vermehrte Genexpression führt aber nur teilweise zu einer verbesserten Abwehr der Pflanzen gegenüber Pathogenen. Bei der Gruppe der Lipid-Transfer-Proteine (LTPs) wird hingegen eher versucht, deren Synthese zu minimieren, da sich diese Proteine für eine mögliche allergische Reaktion nach dem Konsum von Tomaten verantwortlich zeigen. Wird die Ausschüttung dieser LTPs in transgenen Tomaten unterbunden, kann die Histaminausschüttung bei Allergikern um das 10 - 100-fache gesenkt werden (Farrokhi et al., 2008).

Aus pharmazeutischer Sicht erhofft man sich beispielsweise von Cyclotiden Erkenntnisse zur Entwicklung von neuen Medikamenten, da cyclotidhaltige Pflanzen und deren Extrakte schon seit Jahrhunderten als Naturheilmittel dienen, wobei an dieser Stelle besonders *Oldenlandia affinis* aus der Familie der Rubiaceae zu nennen ist, deren wirksame Substanz, genannt Kalata B1, welche auch in Abbildung 3 (S. 7) zu sehen ist, der Gruppe der Cyclotide zuzuordnen ist. Diese Pflanze wird in der traditionellen afrikanischen Medizin eingesetzt, um die Geburt durch Stimulation der Uteruskontraktionen zu beschleunigen. Weiters wurde festgestellt, dass Cyclotide auch hämolytische, anti-HIV und cytotoxische Wirkungen haben können (Gruber und O'Brien, 2010).

Auch bei der Gruppe der Defensine besteht Hoffnung, aus den bekannten Strukturen Medikamente entwickeln zu können, wobei besonders im Bereich Antibiotika und Cytostatika für die Anwendung bei Brusttumoren geforscht wird. Defensine, aber auch andere mikrobielle Abwehrpeptide sind ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems des Menschen. Diese Peptide lassen sich in zwei Gruppen gliedern, wobei die eine Gruppe dauerhaft produziert wird, wohingegen die Produktion der zweiten Gruppe erst als Reaktion auf die eine Gruppe dauerhaft produziert wird und die zweite, deren Produktion nur durch das Eindringen von pathogenen Keimen ausgelöst wird. Beide Gruppen können sowohl ins Blut abgegeben werden, als auch an Körperoberflächen bzw. Schleimhäu-

ten ihre Wirkung entfalten. Besonders wichtig sind diese Peptide beispielsweise im Gastrointestinaltrakt, am Zahnfleisch oder auch im Bereich der Atemwege. Die Auswirkungen einer fehlerhaften Immunabwehr aufgrund von funktionsuntüchtigen antimikrobiellen Abwehrpeptiden wird besonders bei der Cystischen Fibrose deutlich. Hierbei kommt es vermutlich aufgrund eines Gendefekts zu einer ungenügenden Abwehr von Pathogenen durch Abwehrpeptide, und dadurch zu einem übermäßigen Bakterienbefall, welcher eine chronische Entzündung zur Folge hat (Zasloff, 2002).

Die Erkenntnis, dass diese Peptidgruppe eine derart wichtige Rolle im Bereich der Immunabwehr spielt, hatte natürlich auch Auswirkungen auf die pharmazeutische Forschung. Besonders im Hinblick auf die immer größer werdende Problematik der Antibiotikaresistenzen, ist die Gruppe der antimikrobiellen Peptide einer der Hoffnungsträger, da diese ein breites Wirkspektrum aufweisen, gleichzeitig aber nicht so leicht Resistenzen bei Bakterien auslösen, wie herkömmliche Antibiotika. Derzeit befinden sich einige Präparate in klinischen Studien, wobei, aufgrund der geringen therapeutischen Breite, der Fokus zunächst auf Arzneimittel mit topischer Anwendung gelegt wurde, wie zum Beispiel Arzneimittel gegen diabetische Ulcera, Akne oder zur Verminderung des bakteriellen Befalls von Kathetern. Auch an sogenannten „chemischen Kondomen“ wird geforscht, die gegen sexuell übertragbare Erkrankungen, wie zum Beispiel vor einer Infektion mit HIV (human immunodeficiency virus) oder HSV (*Herpes simplex Virus*) schützen sollen. Außerdem wurde festgestellt, dass die Aminosäure Isoleucin in isolierten Zellen des Verdauungstrakts die Expression von Genen, die für β -Defensin codieren, erhöht und somit die Chance besteht eine ganz neue Gruppe der Antibiotika bzw. Antiinfektiva gefunden zu haben (Zasloff 2002).

Es zeigt sich also, dass im Bereich der mikrobiellen Abwehrpeptide noch viel Potential für neue medizinische Erkenntnisse steckt und sich eine Intensivierung der Forschungsarbeit gerade in diesem Bereich lohnt.

Während dieses Projekts wurden die vorhandenen Proben nun zunächst gescreent, um mittels Massenspektrometer mögliche Anzeichen für Peptide zu detektieren. Die Proben wurden nach bestimmten Kriterien gefiltert und all jene als positiv gewertet werden konnten, wurden weiter untersucht. Es wurden die Molekulargewichte der einzelnen Peptide bestimmt. Schlussendlich wurde auch eine strukturelle Charakterisierung und Aminosäuresequenzierung der Peptide von *Sambucus nigra* und *Lobaria scrobiculata* vorgenommen.

1.3.1 Elektrosprayionisations-Ionenfallen-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode der Analytischen Chemie mit dem Ziel, die Masse einer Substanz zu bestimmen. Es gibt verschiedenste Arten von Massenspektrometern, dieses Kapitel widmet sich allerdings nur dem während dieses Projekts verwendeten Instrumententyps mit Elektrosprayionisationsquelle (ESI), Ionenfalle und Daly-Detektor. Eine schematische Darstellung des Aufbaus ist in Abbildung 4 (S. 11) ersichtlich.

Die gelöste Probe wird entweder direkt mittels Spritzenpumpe eingebracht, oder zunächst mit Hilfe einer HPLC (die genaue Funktionsweise wird in Kapitel 2.2.5. erläutert) aufgetrennt und anschließend online, d.h. über eine direkte Verbindung, in das Massenspektrometer eingeschleust, wo die Moleküle in der Ionenquelle desolvatisiert und ionisiert werden. Hierfür gibt es verschiedenste Möglichkeiten, in diesem Fall wurde die Elektrosprayionisation, kurz ESI genannt, verwendet. Dabei wird die Probenlösung zunächst durch eine Sprühkapillare geschickt an deren Spitze eine hohe Spannung (niedriger kV Bereich) angelegt wird. Dadurch entstehen beim Versprühen Tröpfchen, die, abhängig vom Vorzeichen der Spannung, entweder eine positive oder negative Überschussladung tragen. Durch kontinuierliche Verdampfung des Lösungsmittels, welche durch zusätzlich eingeleitetes Trocknungsgas noch verstärkt werden kann, steigt die Ladungsdichte so weit an, bis schließlich das so genannte Rayleigh-Limit überschritten wird. Das passiert, wenn die Kräfte der einander abstoßenden Ladungen der Moleküle größer sind als die Oberflächenspannung der Probenlösung, wodurch es zum Zerfall in kleinere Tröpfchen kommt (Budzikiewicz und Schäfer, 2005). Dieser Vorgang wiederholt sich so lange, bis der überwiegende Teil des Lösungsmittels abgetrennt ist und nur noch die (in diesem Falle positiv – da im Positiv-Ionenmodus gearbeitet wurde) geladenen Analytionen übrig bleiben. Die Ionen werden mit Hilfe von elektrischen Feldern und verschiedenen hohen Luftdrücken durch eine Kapillare geschleust, an der sich der so genannte Skimmer anschließt (Schröder, 1991 und Bruker Daltonik, 2008). Dieser stellt den Übergang zur nächsten Vakuumstufe dar und verhindert, dass zu große Tröpfchen und zu viele Neutralteilchen zum Analysator gelangen. Über zwei Octopole, deren richtige Einstellung wichtig ist, um das unerwünschte Rauschen möglichst gering zu halten, gelangen die Analytionen nun in die Ionenfalle. In dieser können die Analytionen mit Hilfe elektrischer Felder, die durch die Kombination statischer Gleichspannungen und radiofrequenzmodulierter Wechselfspannungen entstehen, festgehalten werden und durch Änderung der angelegten Spannungen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) geordnet durch ein kleines Loch in der Endkappe zum eigentlichen Detektor gelangen (Lehmann, 1996). Zusätzlich zu den Probenmolekülen wird Helium in die Ionenfalle eingeleitet. Dieses soll zum einen durch kontrollierte Kollision mit den Analytionen deren kinetische Energie reduzieren, sie dadurch in der Mitte der Ionenfalle fokussieren und so für eine bessere Auflösung sorgen (Uni-

versität Mainz, 2012). Außerdem wird Helium auch als so genanntes Kollisionsgas verwendet, um die Analytationen, die zunächst gezielt anhand ihres m/z -Wertes mit Hilfe der Ionenfalle isoliert werden, zu fragmentieren und dadurch MS^n Spektren vermessen zu können (Universität Rostock, 2012). Diese Spektren liefern wichtige Hinweise zu Struktur und Aufbau der untersuchten Moleküle, da bestimmte Bindungen in den Molekülen bevorzugt brechen und sich so der Aufbau anhand des Spektrums zurück verfolgen lässt.

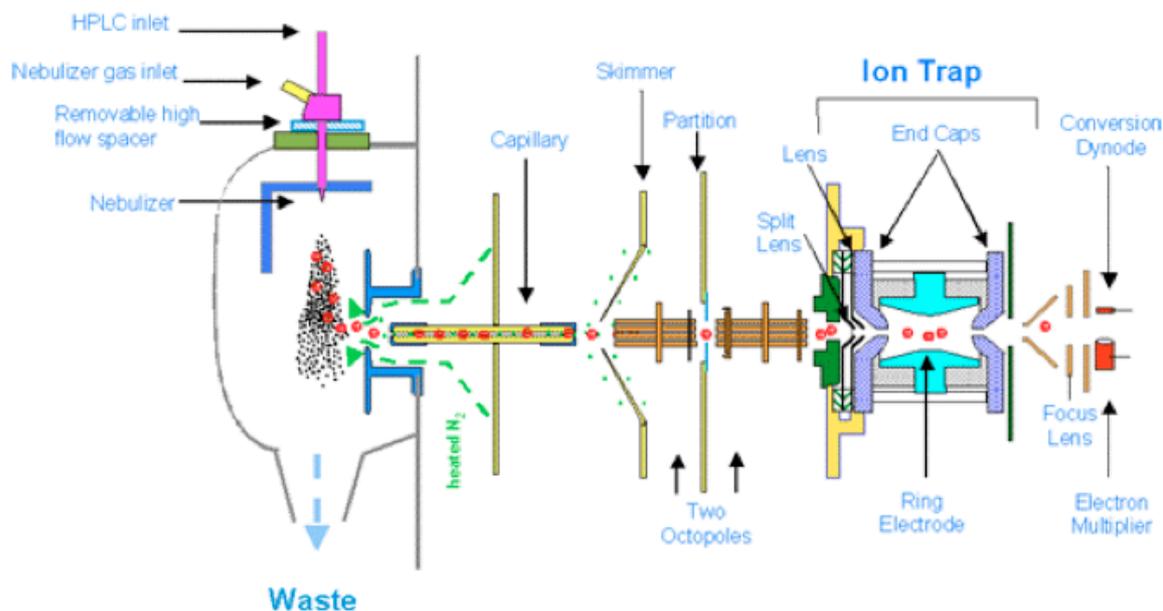


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Massenspektrometers; die Abbildung wurde von Bruker Daltonik (2008) entnommen.

Im letzten Schritt gelangen die zu analysierenden Analyt- bzw. Fragmentationen schließlich, gereiht nach ihrem m/z -Wert, zum Detektor, in diesem Fall dem Daly-Detektor. Hierbei treffen die Ionen zunächst auf einen Metallknopf, wobei durch deren Auftreffen Sekundärelektronen herausgelöst werden. Das Analytationensignal wird sozusagen in ein Elektronensignal umgewandelt. Diese Elektronen werden dann durch Auftreffen auf einen Phosphorschirm in Photonen umgewandelt, die ihrerseits wiederum auf einen Photomultiplier treffen, der das Lichtsignal in Strom umwandelt und so dafür sorgt, dass der Computer jenes Signal bekommt, das dieser schließlich in ein Massenspektrum umwandeln kann. Der Vorteil dieses Detektors liegt eindeutig darin, dass der Photomultiplier durch eine Glasscheibe vom Rest des Detektors und somit auch von den Analytationen getrennt ist, wodurch es zu keiner Kontamination des Photomultipliers durch den Analyten kommen kann, was die Lebensdauer des Photomultipliers erheblich verlängert.

In den dadurch entstandenen Massenspektren werden die einzelnen Substanzen nicht nur durch einen einzigen, ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis entsprechenden Peak abgebildet, sondern jeweils durch mehrere Peaks. Dies kommt daher, dass aufgrund der verschiedenen Isotope des

Kohlenstoffatome – unter den in Peptiden vorkommenden Elementen sind die Isotope des Kohlenstoffatoms die häufigsten – mehrere Moleküle einer Substanz nicht nur einen einzigen Peak mit hoher Intensität erzeugen, sondern mehrere Peaks mit Abständen von 1 Da zueinander. Im Falle einer massenspektrometrischen Analytik von kleineren Peptiden erhält man daher im Massenspektrum einen Peak mit hoher Intensität und zu höheren m/z -Werten folgend noch einige etwas weniger intensive Peaks, das sogenannte Isotopenmuster, wie man auch in Abbildung 5 erkennen kann (Budzikiewicz und Schäfer, 2005).

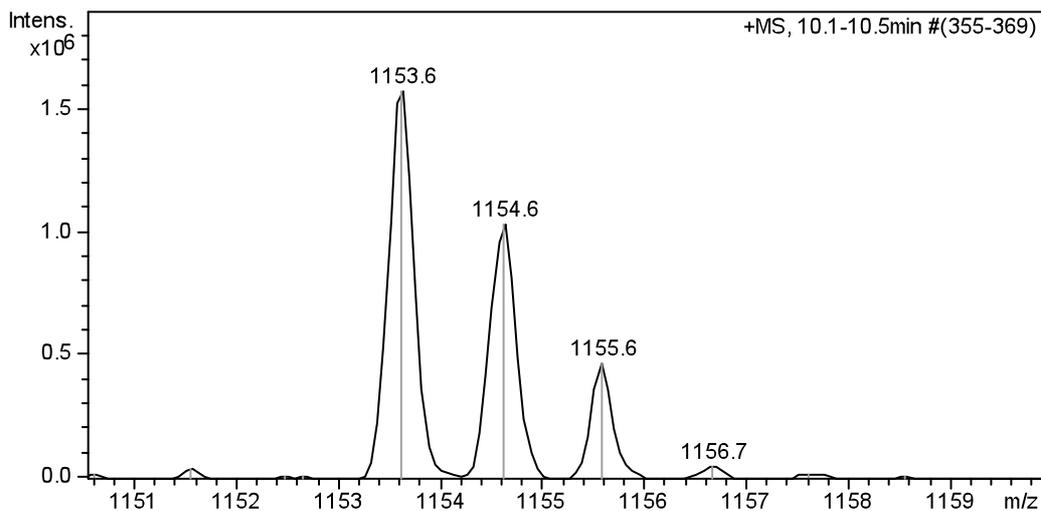


Abbildung 5: Isotopenmuster eines Peptids, das durch die Ionisierung im Massenspektrometer eine positive Ladung trägt.

Diese Massenspektren lassen dann detaillierte Rückschlüsse auf die Struktur der untersuchten Substanzen zu, auf die genaue Vorgehensweise während dieses Projekts wird in den folgenden Seiten näher eingegangen.

1.3.2 Massenspektrometrische Analytik von Peptiden und Aminosäuresequenzierung

Bei den während dieses Projekts untersuchten Peptiden handelt es sich um pflanzliche Abwehrpeptide. Diese werden von der Pflanze selbst produziert und können in ihrem Aufbau stark differieren. Eine Einführung in diese Thematik findet sich in Kapitel 1.3 (s. Seite 7).

Diese Abwehrpeptide wurden nun im Rahmen dieses Projekts angereichert und mit Hilfe von massenspektrometrischen Methoden näher analysiert und charakterisiert. Die so detektierten und nach bestimmten Kriterien, wie geradem Masse-zu-Ladungsverhältnis, mehrfachen Ladungen und einem Molekulargewicht von mindesten 500 Da, ausgewählten Peptide mussten nun noch einigen chemischen Reaktionen unterworfen werden, um die weiteren massenspektrometrischen Analysen, wie zum Beispiel die Aminosäuresequenzierung, zu erleichtern.

Hierbei muss ein besonderes Augenmerk auf mögliche Disulfidbrücken im Peptid gerichtet werden, da diese für eine größere Stabilität der Peptide – und dadurch auch für eine größere Stabilität gegenüber Enzymen – verantwortlich sind. In der Peptidanalytik ist der Einsatz von Enzymen zum Zerkleinern der Peptide oft unumgänglich, daher müssen die Disulfidbrücken zunächst möglichst schonend gespalten werden, ohne dabei dem übrigen Aminosäurerückgrad zu schaden. Dies erfolgt mittels einer Methode, auf die auch in den folgenden Kapiteln als „Reduktion und Alkylierung“ verwiesen werden wird. Zunächst werden die Disulfidbrücken mit Hilfe von Dithiothreitol zu Mercaptogruppen reduziert (siehe Abbildung 6, Schritt eins). Im nächsten Schritt werden die Mercaptogruppen mittels Iodacetamid durch Anhängen einer Carbamidomethylgruppe alkyliert (siehe Abbildung 6, Schritt 2). Dadurch kann man sicherstellen, dass die reaktiven Mercaptogruppen nicht unkontrolliert mit anderen funktionellen Gruppen reagieren.

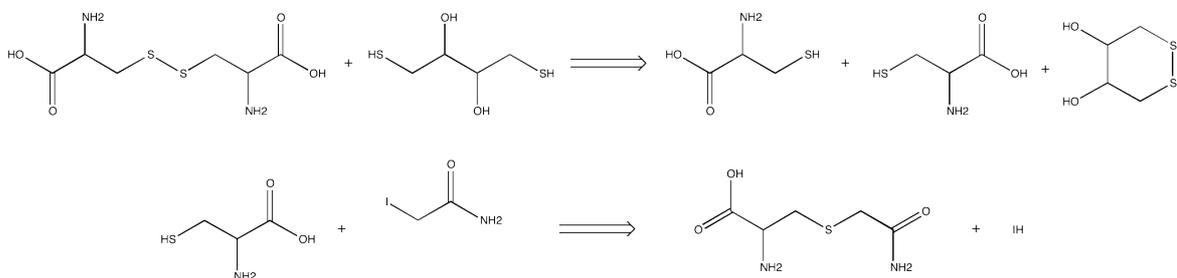


Abbildung 6: Reaktionsgleichung der Reduktion und Alkylierung von Cysteingruppen mit Hilfe von Dithiothreitol und Iodacetamid

Ein weiterer positiver Nebeneffekt ist, dass es durch die Reduktion und die Alkylierung zu einer Massenzunahme von 57 Da pro alkylierter freier Mercaptogruppe bzw. 58 Da pro alkylierter Mercaptogruppe, die Teil einer Disulfidbrücke ist, kommt, was zu einer Massenzunahme von 116 Da pro Disulfidbrücke führt. Bei den für Cyclotide typischen drei Disulfidbrücken ergibt sich zum Beispiel in Summe eine Massenzunahme von 348 Da pro Molekül, d.h. die Anzahl der im Molekül vorhandenen Mercaptogruppen und Disulfidbrücken lässt sich leicht mittels massenspektrometrischer Methoden ermitteln.

Durch Reduktion und Alkylierung werden die Disulfidbrücken des Peptids geöffnet und somit die Stabilität des Peptids massiv herabgesetzt. Daher kann das Peptid anschließend mit Hilfe von verschiedenen Endopeptidasen gespalten werden. Dies dient dazu, die Fragmentierung der ansonsten sehr stabilen Moleküle zu vereinfachen und die Interpretation der Fragmentionenspektren zu erleichtern.

Die mit Hilfe der Enzyme gespaltenen Peptide werden nun mittels HPLC getrennt und im Massenspektrometer fragmentiert. Dabei kommt es durch laufende Kollision der Spaltpeptide mit dem Kollisionsgas zum Bruch der Moleküle, wobei bestimmte Bindungen bevorzugt brechen. In Abbildung 7 ist schematisch dargestellt, wo es zum Bruch eines Tripeptids kommen kann.

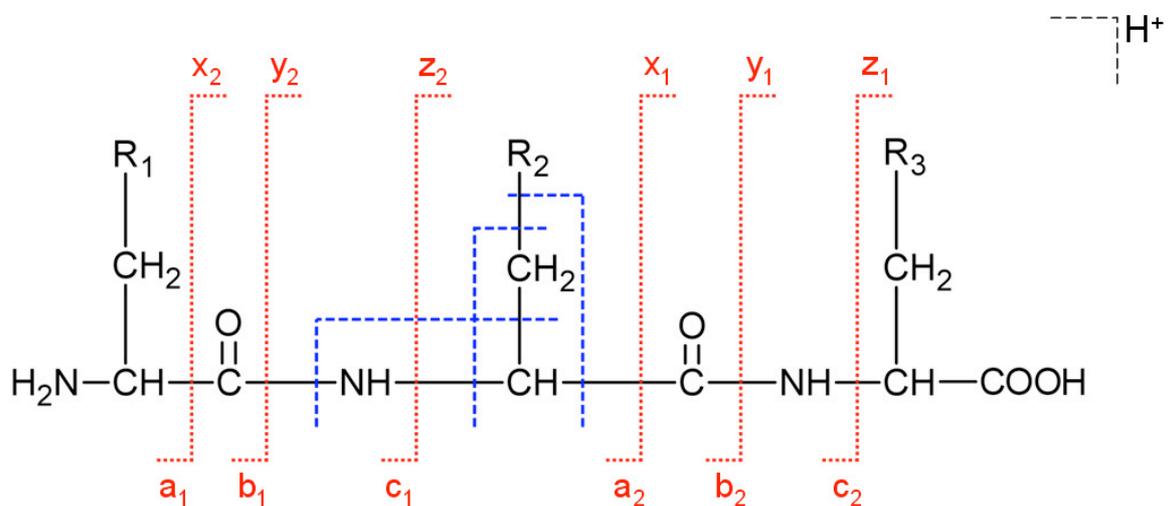


Abbildung 7: Mögliche Fragmentionen eines Tripeptids – Die Fragmentionen werden, vom N-Terminus ausgehend, mit a_i , b_i oder c_i bezeichnet und die vom C-Terminus ausgehenden Fragmentionen werden mit x_i , y_i oder z_i bezeichnet. Dabei bezeichnet der Buchstabe (a , b , c , x , y , z) die Bruchstelle des Aminosäurerückgrats und die tiefgestellte Zahl die Anzahl an Aminosäureresten im entsprechenden Fragmention. Die Abbildung wurde von der Website der MLUHW (2010) entnommen.

Während dieses Projekts lag der Fokus auf den komplementären b - und y - Ionen, also jenen Fragmentionen, die durch Bruch der Amidbindungen zwischen den Aminosäuren entstanden sind.

Grundsätzlich kann es aber, wie in Abbildung 7 (s. Seite 14) ersichtlich ist, auch an anderen Stellen im Peptid zur Fragmentierung kommen (Steen und Mann 2004).

Im Massenspektrum lassen sich nach Fragmentierung im Idealfall so genannte Peptideleitern erkennen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Differenz der m/z -Werte zweier Peaks immer genau der Masse einer² Aminosäure minus der 18 Da für ein Molekül Wasser entspricht (residue mass³) da im Zuge der Amidbindung zweier Aminosäuren immer ein Molekül Wasser abgespalten wird. Da ein Peptid während der Fragmentierung zumeist nur einmal gespalten wird, allerdings mit unterschiedlicher Häufigkeit an verschiedenen Stellen des Aminosäurerückgrats, gibt es Spaltpeptide mit einer Länge von einer, zwei, drei, ...etc. Aminosäuren, die dann im Spektrum die besagte Peptideleiter ergeben. Dies ist in Abbildung 8 gut zu erkennen.

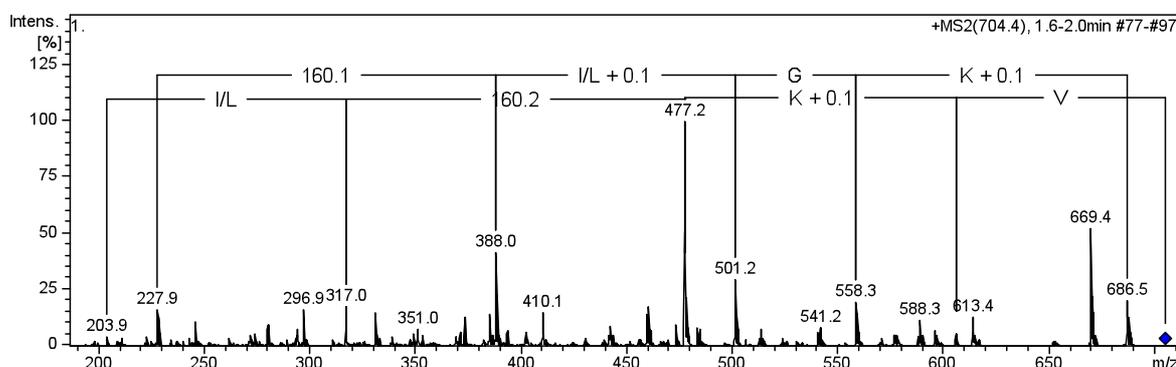


Abbildung 8: MS²-Spektrum eines durch Trypsinverdau entstandenen Spaltpeptids mit einer Masse von 703,4 Da. Die Peptideleitern, aus denen die Sequenz V[Q|K]C[I|L]G[Q|K] herausgelesen werden konnten, sind klar ersichtlich.

Da beim Bruch des Aminosäurerückgrats aber nicht nur die sogenannten „b“-Ionen entstehen, also jene Fragmentionen, die den intakten N-Terminus des Peptids enthalten, sondern auch die komplementären „y“-Ionen, die Teilsequenzen mit intaktem C-Terminus darstellen, sind in den Massenspektren auch beide Peptideleitern zu erkennen (Lehmann, 1996). Dies verursacht zwar eine gewisse Verwechslungsgefahr der Peaks untereinander, allerdings hat es den Vorteil, dass

² Aufgrund der isomeren Struktur der Aminosäuren Leucin und Isoleucin und der sehr ähnlichen Molekulargewichte von Lysin (K) und Glutamin (Q) (siehe auch Verzeichnis des Einbuchstaben-Codes von Aminosäuren auf Seite 97) können diese Aminosäuren mit den während dieses Projekts angewendeten Geräten nicht unterschieden werden. Um eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Aminosäuren zu ermöglichen, wären nachträglich umfangreiche Untersuchungen nötig.

³ Residue mass: Entspricht jener Masse, die eine Aminosäure innerhalb eines Peptids einnimmt und ist aufgrund der Amidbindung der Aminosäuren untereinander um 18 Da geringer als das jeweilige Molekulargewicht der freien Aminosäure.

jene Aminosäuren, die am Anfang des C-Terminus sitzen und so mit ihren niedrigen m/z -Werten mit den hier verwendeten Methoden nicht nachweisbar wären, durch die komplementären „b“-Ionen in den hohen m/z -Werten eindeutig nachweisbar sind.

Der Anfang bzw. das Ende einer solchen Peptideiter lassen sich auch relativ einfach feststellen. Die N-terminal erste Aminosäure lässt sich dadurch erkennen, dass sie auf der einen Seite durch jenen Peak begrenzt wird, der dem m/z des gesamten Spaltpeptids (Molekulargewicht + 1) entspricht und auf der anderen Seite dem des m/z des gesamten Spaltpeptids minus der residue mass der jeweiligen Aminosäure entsprechenden Peak. Die C-terminal erste Aminosäure wird einerseits (durch Abspaltung einer Hydroxygruppe pro C-Terminus, welche an den N-Terminus gehängt wird) durch den Peak begrenzt, der dem m/z des gesamten Spaltpeptids minus einem Molekül Wasser (18 Da) entspricht und auf der anderen Seite von dem Peak begrenzt der dem m/z des gesamten Spaltpeptids minus der residue mass der jeweiligen Aminosäure entspricht.

Es ist also so, dass jene Peptideiter, die beim einem m/z beginnt welches dem Molekulargewicht + 1 entspricht, die N-terminale Seite des Spaltpeptids darstellt und die Peptideiter, die bei einem m/z beginnt, das dem Molekulargewicht – 18 entspricht, das C-terminale Ende darstellt.

Auf diese Weise konnten die Aminosäuresequenzen einzelner Peptide entschlüsselt werden, wie auch in den folgenden Kapiteln noch näher beschrieben werden wird.

1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren die Erkenntnisse, die Birgit Semper in ihrer Arbeit „Phytochemisches Screening auf Pflanzenpeptide in ausgewählten Drogen“ (2012) gewonnen hatte. Während dieses Projekts wurden bereits bekannte Methoden aus der Peptidanalytik angewandt und weiterentwickelt, um schlussendlich ein gut funktionierendes Procedere für das Screening von Pflanzen auf Peptide zu erhalten. Das Screening von 48 Pflanzen verschiedenster Familien ergab, dass die Früchte des *Sambucus nigra* cysteinreiche Peptide enthalten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die bereits entwickelten Methoden des Pflanzenscreenings zu nutzen, um weitere peptidhaltige Pflanzen zu identifizieren. Außerdem sollten einige Flechten gescreent werden. Auf Grund der daraus gewonnen Erkenntnisse wurden die Peptide der Flechte *Lobaria scrobiculata* näher analysiert. Besonderes Augenmerk wurde auf die Peptide von *Sambucus nigra* gelegt. Hier sollten die, durch die oben genannte Arbeit, bereits bekannten Ergebnisse bestätigt werden und sowohl die Struktur als auch die Aminosäuresequenz der gefundenen Peptide näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Im folgenden Kapitel wird auf das verwendete Material eingegangen. Einerseits wurden für das Screening die getrockneten Teile von 22 verschiedenen Pflanzenarten andererseits wurden auch neun getrocknete Flechtenarten untersucht. Außerdem wurden von *Sambucus nigra* nicht nur ein Teil der Pflanze, sondern sogar Blüte, Blatt, Rinde und Früchte untersucht.

Zu guter Letzt sind noch all jene Enzyme angeführt, die für die enzymatische Spaltung der Peptide im Rahmen der Aminosäuresequenzierung nötig waren.

2.1.1 Pflanzenmaterial Screening

Es wurde während des ganzen Projekts ausschließlich mit getrocknetem Pflanzenmaterial gearbeitet. Die 22 im Screening untersuchten Drogen stammten alle aus dem Depot des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien. In Tabelle 2 sind alle untersuchten Proben ersichtlich, wie auch, wenn bekannt, deren Herkunft. Die Spalte „Zerkleinerungsgrad“ gibt Auskunft darüber, in wie weit das Pflanzenmaterial vor der Extraktion zerkleinert wurde.

Tabelle 2: Im Rahmen des Screenings analysierte Pflanzen und deren Zerkleinerungsgrad vor der Extraktion

Art	Familie	Pflanzenteil	Quelle	Zerkleinerungsgrad
<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	flos	-	Zungenblüten ganz
<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	folium	Kottas	geschnitten, fermentiert
<i>Capsicum frutescens</i>	Solanaceae	fructus	-	pulverisiert
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Lauraceae	cortex	-	pulverisiert
<i>Citrus aurantium ssp. aurantium</i>	Rutaceae	pericarpum	Kottas	zerkleinert
<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	fructus	Kottas	zerkleinert
<i>Foeniculum vulgare,</i>	Apiaceae	fructus	-	pulverisiert
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	folium	-	geschnitten
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Malvaceae	flos	-	pulverisiert
<i>Humulus lupulus</i>	Cannabaceae	flos	-	geschnitten
<i>Ilex paraguariensis</i>	Aquifoliaceae	folium	Kottas	geschnitten
<i>Juglans regia</i>	Juglandaceae	folium	-	geschnitten
<i>Lavandula angustifolia,</i>	Lamiaceae	flos	-	pulverisiert
<i>Matricaria chamomilla</i>	Asteraceae	flos	-	Blütenkörbchen ganz
<i>Olea europaea</i>	Oleaceae	folium	-	geschnitten
<i>Pimpinella sp.</i>	Apiaceae	radix	-	pulverisiert

Tabelle 2: Fortsetzung von Seite 18

Art	Familie	Pflanzenteil	Quelle	Zerkleinerungsgrad
<i>Primula sp.</i>	Primulaceae	radix	-	pulverisiert
<i>Pulmonaria officinalis</i>	Boraginaceae	herba	Kottas	geschnitten
<i>Rheum officinale</i> ,	Polygonaceae	radix	-	pulverisiert
<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	flos	-	pulverisiert
<i>Taraxacum officinale</i>	Asteraceae	radix	-	pulverisiert
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Ericaceae	folium	Kottas	geschnitten

2.1.2 Flechten

Alle in diesem Projekt untersuchten Flechten werden in Tabelle 3 aufgeführt. Bis auf *Cetraria islandica* stammten alle Flechten aus einem Projekt von Dr. Andreas Schinkowitz (Department für Pharmakognosie, Universität Wien). Da Flechten generell phytochemisch eher wenig untersucht sind, wurde beschlossen, diese Flechten auch in das vorliegende Projekt miteinzubeziehen und auf Peptide zu untersuchen.

Mit Ausnahme von *Cetraria islandica* wurden alle hier genannten Flechten von Dr. Schinkowitz gesammelt und bestimmt. Die Herbarbelege befinden sich bei selbigem.

Tabelle 3: Im Screening untersuchte Flechten; die Zuordnung der Familien erfolgte laut Cannon und Kirk (2007) bzw. der PLANTS Database (2012).

Art	Familie	Herkunftsort	Zerkleinerungsgrad
<i>Cetraria islandica</i>	Parmeliaceae	Kottas	zerkleinert
<i>Evernia prunastri</i>	Parmeliaceae	Meymac, Frankreich	ganz
<i>Lasallia pustulata</i>	Umbilicariaceae	Angers, Frankreich	zerkleinert
<i>Lobaria pulmonaria</i>	Lobariaceae	Meymac, Frankreich	zerkleinert
<i>Lobaria scrobiculata</i>	Lobariaceae	Meymac, Frankreich	zerkleinert
<i>Platismatia glauca</i>	Parmeliaceae	Meymac, Frankreich	ganz
<i>Pseudoevernia furfuracea</i>	Parmeliaceae	Meymac, Frankreich	ganz
<i>Ramalina farinacea</i>	Ramalinaceae	Meymac, Frankreich	zerkleinert
<i>Ramalina fastigiata</i>	Ramalinaceae	Angers, Frankreich	zerkleinert
<i>Usnea florida</i>	Parmeliaceae	Meymac, Frankreich	ganz

2.1.3 *Sambucus nigra*

Sambucus nigra hat in dieser Arbeit, aufgrund der Erkenntnisse, die Birgit Semper in ihrer Arbeit „Phytochemisches Screening auf Pflanzenpeptide in ausgewählten Drogen“ (2012) gewinnen konnte, einen besonderen Stellenwert. Um diese Pflanze genauer zu untersuchen, wurden nicht

nur die Früchte dem für das Screening üblichen Procedere unterzogen, sondern auch alle anderen verfügbaren Pflanzenteile wie Blatt, Blüte und Rinde. Alle Pflanzenteile stammten aus dem Depot des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien und werden sofern bekannt mit genauer Herkunft in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Analyisierte Pflanzenteile von *Sambucus nigra*

Pflanze	Familie	Pflanzenteil	Quelle	Zerkleinerungsgrad
<i>Sambucus nigra</i>	Sambucaceae	cortex	-	geschnitten
<i>Sambucus nigra</i>	Sambucaceae	flos	-	Blüten ganz
<i>Sambucus nigra</i>	Sambucaceae	folium	-	geschnitten
<i>Sambucus nigra</i>	Sambucaceae	fructus	Kottas	zerkleinert

2.1.4 Enzyme

Die während des Projektes verwendeten Enzyme werden untenstehend genannt. Sie wurden benötigt, um die zuvor isolierten Peptide zu spalten und so eine Aminosäuresequenzierung mittels LC-MS zu ermöglichen.

Trypsin:

Gewonnen aus bovinem Pankreas, TPCK behandelt, salzfreies, lyophilisiertes Pulver

T 1426 – 100 MG

Bezugsquelle: Sigma-Aldrich

Lot. No.: 031 M 7358 V

Pcode.: 1001 05 3638

Glu C:

Endoproteinase Glu C von *Staphylococcus aureus* V8

Bezugsquelle: Roche

Lot. No.: 703 010 22

Ref.: 10791 156 001

Pepsin:

Immobilisiert auf quervernetzten, 6%igen Agarose Partikeln

Inhaltsstoffe: 50% Glycerolaufschlammung beinhaltet 0,1 M Natriumacetat, 0,05% Natriumazid,

pH 4,5

Bezugsquelle: Thermo Scientific

Lot. No.: ML 166 155

Prod. No.: 20343

2.2 Methoden

Die Aufarbeitung aller Proben beginnt mit der Extraktion des Pflanzenmaterials. Die in den erhaltenen Extrakten enthaltenen Peptide wurden dann mit Hilfe einer Festphasenextraktion angereichert. Nach der MS Analyse konnte zwischen jenen Proben differenziert werden, die keine Anzeichen für Peptide aufwiesen und jene, von denen vermutet wurde, dass sie Peptide enthielten.

Die beiden Proben mit dem größten Potential auf positive Ergebnisse, nämlich *Sambucus nigra* und *Lobaria scrobiculata* wurden genauer untersucht. Als Vorbereitung für die Fragmentierung im Massenspektrometer wurden die Proben reduziert, alkyliert und mit verschiedenen Enzymen gespalten. Nach der anschließenden Fragmentierung konnten einige Aminosäuresequenzen ausgelesen werden und so die Struktur der enthaltenen Peptide genauer charakterisiert werden.

2.2.1 Probenextraktion

Das folgende Procedere diente der Extraktion von Peptiden aus getrocknetem Pflanzenmaterial und wurde nach den Angaben von Semper (2012) durchgeführt. Die Extraktion von 2 g des getrockneten und gegebenenfalls zerkleinerten Pflanzenmaterials erfolgte mit 20 mL einer Mischung aus Acetonitril und wässriger 2%iger Ameisensäure im Verhältnis 1:1 (v/v).

Da die getrockneten Zungenblüten von *Calendula officinalis* ausgesprochen großvolumig waren, reichten die 20 mL an Lösungsmittel nicht aus, um sie ausreichend zu befeuchten. Daher wurde bei dieser Probe die Menge an Extraktionsmittel auf 40 mL erhöht, das nachfolgende Procedere entspricht jedoch dem der anderen im Screening untersuchten Pflanzen.

Von allen untersuchten Flechten wurden aufgrund der geringen Probenmenge weniger als 2 g des getrockneten Flechtenmaterials extrahiert, allerdings wurde die Menge an Extraktionsmittel mit 20 mL beibehalten.

Die Extraktion von Fructus Sambuci nigrae erfolgte mit wesentlich mehr Pflanzenmaterial, hierbei wurde mit 10 g der getrockneten Früchte gearbeitet und auch mit der fünffachen Menge an Extraktionsmittel im Vergleich zu der im Screening verwendeten Menge von 20 mL. Diese Hochskalierung war nötig, um die erforderliche Menge von 2,5 g an Extrakt zu erhalten, welche für die große fraktionierte Festphasenextraktion, die in Kapitel 2.2.2.4. näher beschrieben wird, notwendig war.

Die mit ausreichend Extraktionsmittel versetzten Proben wurden anschließend im Ultraschallbad für 30 Minuten extrahiert und sogleich filtriert. Nach der Filtration, um diesen Vorgang zu beschleunigen wurde hier mit einem Faltenfilter gearbeitet, wurden die Proben getrocknet. Dies erfolgte unter leichter Erwärmung und stark vermindertem Druck in einer Evaporatorzentrifuge (EZ-2 Plus der Firma Genevac). Der gewonnene Extrakt wurde, mit einer Konzentration von 10 mg/100 µL, in einer Mischung aus wässriger 1%iger Ameisensäure: Acetonitril 9:1 (v/v) wieder gelöst, mittels

einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend jener Festphasenextraktion unterzogen, die in Kapitel 2.2.2.2. näher beschrieben wird.

2.2.2 Festphasenextraktion

2.2.2.1 Einführung

Die Festphasenextraktion (solid phase extraction – SPE) ist eine chromatographische Methode zur Auftrennung von Substanzgemischen und zur Anreicherung von Analyten. Hierbei wird der Analyt auf eine mit stationärer Phase, in diesem Fall RP-18 Material, gepackten Säule aufgetragen. Aufgrund von unterschiedlichen Affinitäten der einzelnen Substanzen zu stationärer und mobiler Phase stellt sich ein Gleichgewicht zwischen in mobiler Phase gelöster Substanz und an fester Phase adsorbierter Substanz ein. Nach und nach werden dann durch Zugabe von entweder einem einzigen Lösungsmittel (isokratische Elution) oder von schrittweise verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelmischungen verschiedener Polarität (Stufengradient) die nunmehr getrennten Substanzen eluiert. All jene Substanzen, die eine höhere Affinität zur mobilen Phase als zur stationären Phase aufweisen, werden zuerst eluiert, und jene, deren Affinität zur stationären Phase größer ist, werden erst danach eluiert. Dies hat zur Folge, dass sich die Substanzgemische entsprechend ihrer Affinität zu den beiden Phasen auftrennen.

Um die Flussrate der mobilen Phase zu erhöhen, kann unter leichtem Unterdruck gearbeitet werden, jedoch sollte darauf geachtet werden, dass die Tropfgeschwindigkeit nicht zu hoch wird, da ansonsten die Auftrennung der Substanzen darunter leiden könnte.

Zur Vorbereitung der Säule sind, noch vor dem Auftragen der Probe, einige Schritte nötig. Zunächst beginnt man damit, die Säule zu waschen, d.h. man lässt ein Lösungsmittel mit hoher Elutionskraft durch die Säule laufen, um sie von Verunreinigungen zu befreien. Anschließend wird equilibriert, das bedeutet, man wäscht das zuvor zur Reinigung verwendete Lösungsmittel mit dem danach verwendeten Elutionsmittel aus der Säule heraus. Dann wird die Probe aufgetragen und nachfolgend mit verschiedenen Lösungsmittelmischungen mit steigender Elutionskraft eluiert, um eine Auftrennung des Substanzgemisches zu erreichen.

Üblicherweise werden Lösungsmittelmengen immer in Reservoirvolumina (RV) angegeben, wobei ein Reservoirvolumen dem Volumen entspricht, das sich in einer gepackten Kartusche zwischen Säulenmaterial und dem oberen Rand der Säule befindet. Da das Säulenmaterial meist maximal ein Drittel des Kartuschenvolumens ausmacht, hat man darüber noch genügend Platz die Kartusche mit dem jeweiligen Elutionsmittel zu füllen.

In den folgenden Kapiteln werden nun die genauen Parameter der verschiedenen verwendeten SPE-Methoden beschrieben.

2.2.2.2 Screening SPE

Die im Screening verwendete Festphasenextraktion diente im Wesentlichen der Abtrennung von Zuckern und anderen sehr polaren Molekülen sowie andererseits Lipiden und anderen sehr apolaren Molekülen aus dem zuvor gewonnenen Extrakt (siehe Kapitel 2.2.1.). Durch die zuvor von Birgit Semper (2012) durchgeführte Methodenentwicklung konnte die Festphasenextraktion als eine für diese Problemstellung geeignete Methode identifiziert werden.

Der, wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben, durch Extraktion mit einer Mischung aus Acetonitril und wässriger Ameisensäure gewonnene Extrakt wurde, nach Filtration und Trocknung, mit einer Konzentration von 10 mg/100 µL in einer Mischung aus wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 9:1 (v/v) wieder gelöst und anschließend wurden mit Hilfe einer Tischzentrifuge eventuell ungelösten Anteile abgetrennt. Die Probenlösung wurde anschließend mit der in Tabelle 5 beschriebenen SPE von ungewollten Inhaltsstoffen befreit.

Tabelle 5: Protokoll für die Festphasenextraktion im Rahmen des Screenings

Arbeitsschritt	Volumina	Elutionsmittel / Probe
Waschen (Säule)	3 Reservoirvolumina	Methanol redest.
Equilibrieren	3 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1%
Auftragen	100 µL	10 mg Probe gelöst in 100 µL wässrige Ameisensäure 1% : Acetonitril 9:1 (v/v)
Waschen (Probe)	3 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1% : Acetonitril 9:1 (v/v)
Elution	2 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1% : Acetonitril 2:8 (v/v)

Säule	
Bezeichnung	Discovery® DSC-18 SPE-96-Plate
Menge RP-18 Füllmaterial	100 mg
Reservoirvolumen	2 mL
Prod. No.	575 603 – U
Lot. No.	174 59 01
Produzent	Supelco

Die mit einer Mischung aus wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 2:8 (v/v) eluierten Fraktionen wurden gesammelt und anschließend in einer Evaporatorzentrifuge getrocknet. Sofern die gereinigten Extrakte nicht sofort weiteren Analysen unterzogen wurden, wurden sie bis zu ihrer Verwendung bei minus 20 °C gelagert.

Die oben beschriebene Methode wurde aber nicht nur für die Abtrennung von Zuckern aus den Extrakten des Screenings verwendet, sondern auch für die Abtrennung der Reagenzien nach dem Verdau der Proben mit Enzymen (siehe auch Kapitel 2.2.3.2.-2.2.3.4.). Es wird genauso vorgegangen wie oben beschrieben, allerdings werden nicht nur 100 µL der Probe aufgetragen, sondern die gesamte vorhandene Probenmenge. Auch hier werden nur die mit einer Mischung aus wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 2:8 (v/v) eluierten Fraktionen gesammelt, anschließend in einer Evaporatorzentrifuge getrocknet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei minus 20 °C gelagert.

2.2.2.3 SPE mit einem Stufengradienten von 10% Acetonitril bis 80% Acetonitril

Die in diesem Kapitel beschriebene Festphasenextraktion diente dazu, zwei aus dem zuvor durchgeführten Screening erhaltene Hits und das Elutionsverhalten der erhaltenen Peptide genauer zu charakterisieren. Hierbei handelte es sich um die Extrakte von Cortex Sambuci nigrae und Lichen Lobariae scrobiculatae.

Die Auftrennung der im Extrakt enthaltenen Substanzen erfolgte mittels eines Stufengradienten, der von Semper (2012) übernommen wurde. Der bereits für das Screening hergestellte Extrakt aus 2 g Droge, extrahiert mit einer Mischung aus 2%iger wässriger Ameisensäure und Acetonitril, wurde in 1%iger wässriger Ameisensäure : Acetonitril 9:1 (v/v) gelöst. Der Extrakt von Cortex Sambuci nigrae wurde mit einer Konzentration von 100 mg/mL gelöst, jener von *Lobaria scrobiculata* nur mit einer Konzentration von 50 mg/mL, da aufgrund der geringeren Menge des zur Verfügung stehenden Drogenmaterials auch die Menge des gewonnenen Extraktes wesentlich geringer war. Anschließend wurde die Probe, nach dem Waschen und Equilibrieren der Säule, aufgetragen. Die Details der Festphasenextraktion sind der Tabelle 6 (S.25) zu entnehmen.

Die mit einer Mischung aus 1%iger wässriger Ameisensäure : Acetonitril 9:1 (v/v) eluierte Fraktion wurde verworfen, alle darauffolgenden Fraktionen wurden gesammelt und mittels Evaporatorzentrifuge getrocknet. Die Fraktionen wurden bis zur weiteren Bearbeitung und Analytik bei minus 20 °C gelagert und anschließend, wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben, mittels HPLC-MS analysiert. Eine Fraktion der Flechte *Lobaria scrobiculata* wurde außerdem noch einigen Schritten der in Kapitel 2.2.3. beschriebenen Peptidanalytik unterzogen.

Tabelle 6: Details der fraktionierten Festphasenextraktion für Cortex Sambuci nigrae und Lichen Lobariae scrobiculatae

Arbeitsschritt	Volumina	Elutionsmittel / Probe
Waschen (Säule)	3 Reservoirvolumina	Methanol redest.
Equilibrieren	3 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1%
Auftragen	1 mL	100 mg/mL Extrakt gelöst in wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 9:1 (v/v)
Waschen (Probe)	3 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1% : Acetonitril 9:1 (v/v)
Elution ⁴ :	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 8:2 (v/v)
	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 7:3 (v/v)
	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 6:4 (v/v)
	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 5:5 (v/v)
	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 4:6 (v/v)
	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 3:7 (v/v)
	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 2:8 (v/v)
Säule		
Bezeichnung	Mega Bond Elut™ C-18	
Größe	6CC	
Menge RP-18 Füllmaterial	1 g	
Reservoirvolumen	6 mL	
MFG-Code	1124	
Part. No.	1225-6001	
Lot. No.	070 814	
Produzent	Varian	

⁴ Jedes Reservoirvolumen wurde separat gesammelt, bei gleicher Acetonitrilkonzentration wurden die Fraktionen mit A+B benannt.

2.2.2.4 SPE für *Fructus Sambuci nigrae*

Diese Festphasenextraktion, die von Birgit Semper speziell für die Auftrennung der Inhaltsstoffe der Früchte von *Sambucus nigra* entwickelt wurde, diente zur Anreicherung und Auftrennung von Peptiden in verschiedene Fraktionen.

2,5 g des, zuvor in Kapitel 2.2.1. beschriebenen, Extrakts wurden in 15 mL einer Mischung von 1%iger wässriger Ameisensäure : Acetonitril im Verhältnis 9:1 (v/v) gelöst und mit Hilfe der in Tabelle 7 (S.27) beschriebenen Festphasenextraktion aufgetrennt.

Die mit 1%iger wässriger Ameisensäure : Acetonitril 9:1 (v/v) eluierte Fraktion wurde verworfen, alle übrigen Fraktionen wurden gesammelt, wobei diese pro Reservoirvolumen in jeweils vier Unterfraktionen, welche mit A bis D benannt wurden, aufgeteilt wurden. Aufgrund einer Verwechslung zweier Lösungsmittelmischungen wurde bei der ersten Festphasenextraktion (Extrakt 1) von *Fructus Sambuci nigrae* zuerst mit 1%iger wässriger Ameisensäure : Acetonitril 57:43 (v/v) eluiert und erst danach mit 1%iger wässriger Ameisensäure : Acetonitril 61:39 (v/v). Trotz dieser Verwechslung wurde mit diesen Fraktionen weitergearbeitet. Die zweite Festphasenextraktion (Extrakt 5) von *Fructus Sambuci nigrae* wurde allerdings in der ursprünglich vorgesehenen Reihenfolge durchgeführt und aufgrund der zuvor erhaltenen Ergebnisse schon mit Fraktion 47% D beendet, da alle folgenden Fraktionen für die nachfolgenden Untersuchungen nicht mehr von Relevanz waren.

Alle Fraktionen wurden mittels Evaporatorzentrifuge getrocknet - die jeweiligen Ausbeuten finden sich in den Tabellen 9 und 10. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei minus 20 °C gelagert.

Nachfolgend wurden die enthaltenen Peptide, wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben, näher analysiert.

Tabelle 7: Details der fraktionierten Festphasenextraktion für Fructus Sambuci nigrae

Arbeitsschritt	Volumina	Elutionsmittel / Probe
Waschen (Säule)	3 Reservoirvolumina	Methanol redest.
Equilibrieren	3 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1%
Auftragen	15 mL	Probe – 2,5 g gelöst in 15 mL wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 9:1 (v/v)
Waschen (Probe)	3 Reservoirvolumina	wässrige Ameisensäure 1% : Acetonitril 9:1 (v/v)
Elution ⁵ :	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 73:27 (v/v)
	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 69:31 (v/v)
	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 65:35 (v/v)
	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 61:39 (v/v)
	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 57:43 (v/v)
	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 53:47 (v/v)
	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 49:51 (v/v)
	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 45:55 (v/v)
	1 Reservoirvolumen	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 40:60 (v/v)

Säule	
Bezeichnung	Mega BE-C18 (Bond Elut C-18)
Reservoirvolumen	60 mL
Menge RP-18 Füllmaterial	10 g
MFG-Code	17311
Part. No.	1225 603 1
Lot. No.	0000 704 811
Produzent	Agilent Technologies

⁵ pro Reservoirvolumen 4 Fraktionen zu je 15 mL gesammelt. Deren Nomenklatur erfolgte entsprechend der Prozentigkeit an Acetonitril im jeweiligen Elutionsmittel und entsprechend der Fraktion (A-D), siehe auch Tabelle 9, Seite 32.

2.2.2.5 SPE nach Reduktion und Alkylierung

Diese, nach Reduktion und Alkylierung, welche genauer in Kapitel 2.2.3.1. (ab. S. 31) beschrieben wird, angewandte Festphasenextraktion unterscheidet sich von den bisher beschriebenen dadurch, dass hier nicht das Ziel war, die Peptide von anderen Inhaltsstoffen oder voneinander zu trennen. Vielmehr diente diese SPE dazu, die bei der weiteren Analytik, wie der LC-MS, störenden Reagenzien abzutrennen.

Großteils stimmen die Parameter dieser Methode mit jenen der Screening SPE überein, allerdings wurde hier ein zusätzlicher Waschschrift durchgeführt, um die als Puffersalze zugesetzten Carbonate auszuwaschen, und somit eine CO₂ Bildung und damit einhergehende Minderung des Trennergebnisses beim nachfolgenden Säurezusatz zu vermeiden.

Es wurde bei allen Fraktionen immer die gesamte Probe aufgetragen, jedoch wurden jene Fraktionen, bei denen die Ausbeute mehr als 1 mg betrug, auf mehrere SPE-Säulchen aufgeteilt, sodass die Beladung pro Säule immer bei ungefähr 1 mg lag.

Die Details der Festphasenextraktion finden sich in Tabelle 8 (S. 29)

Bei Extrakt 1 wurde die, durch Elution mit wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 2:8 (v/v) erhaltene Fraktion so aufgeteilt, dass sich in jedem Eppendorfgefäß ein Äquivalent von 0,2 mg an zuvor ausgewogener Ausbeute befand. Teilweise wurden die nach Elution mit dem zweiten Reservoirvolumen mit wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 2:8 (v/v) eluierten Fraktionen getrennt gesammelt und mit dem Zusatz „B“ bezeichnet. Bei Extrakt 5 wurden zuerst beide Fraktionen, die mit wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 9:1 (v/v) gewonnen wurden, vereinigt und erst danach in 0,2 mg Äquivalente aufgeteilt. Alle Fraktionen wurden mittels Evaporatorzentrifuge getrocknet und vor der weiteren Bearbeitung bei minus 20 °C gelagert.

Anschließend wurden die Proben, wie in Kapitel 2.2.3.2. – 2.2.3.4. beschrieben, unter Einsatz von verschiedenen Enzymen gespalten und, wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben, mit Hilfe der HPLC-MS analysiert.

Tabelle 8: Details zur Festphasenextraktion nach Reduktion und Alkylierung

Arbeitsschritt	Volumina	Elutionsmittel / Probe
Waschen (Säule)	3 Reservoirvolumina	Methanol redest.
Equilibrieren	3 Reservoirvolumina	doppeltdestilliertes Wasser
Auftragen	Variable Volumina	Probe
Waschen (Probe)	1 Reservoirvolumen	doppeltdestilliertes Wasser
	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 9:1 (v/v)
Elution:	2 Reservoirvolumina	wässriger Ameisensäure 1% : Acetonitril 2:8 (v/v)

Säule	
Bezeichnung	Discovery® DSC-18 SPE-96-Plate
Menge RP-18 Füllmaterial	100 mg
Reservoirvolumen	2 mL
Prod. No.	575 603 – U
Lot. No.	174 59 01
Produzent	Supelco

2.2.3 Peptidanalytik von *Sambucus nigra*

Aufgrund der bereits zuvor durch Semper (2012) gewonnenen Erkenntnisse, welche Grund zur Annahme gaben, dass es sich bei den in Fructus Sambuci nigrae gefundenen Peptiden um Cycloptide oder andere cysteinreiche Peptide handeln könnte, wurde weitestgehend so vorgegangen, wie es laut Literatur, unter anderem bei Colgrave, et al. (2010), Göransson, et al. (2003) und Poth, et al. (2011), bei der Charakterisierung von cysteinreichen Peptiden üblich ist.

Um eine genauere Analytik der gefundenen Peptide zu ermöglichen, wurden die Peptide zunächst reduziert und alkyliert, um einerseits Disulfidbrücken nachzuweisen und andererseits eine anschließende Spaltung mit Hilfe von verschiedenen Enzymen zu erleichtern. Durch die Spaltung der Peptide konnten MSⁿ Daten gewonnen werden, die zur Aminosäuresequenzierung der Peptide dienten.

2.2.3.1 Reduktion und Alkylierung

Die hierfür angewendete Methode folgt dem allgemein bekannten Protokoll für Peptidanalytik, welche auch gerne im Bereich der Cyclotidanalytik angewendet wird. Es wurde auch hier nach der schon bei Semper (2012) angewendeten Methode vorgegangen, die aber unter anderem auch von Poth, et al. (2011) beschrieben wurde.

Als Ausgangsmaterial für die weitere Bearbeitung wurden die getrockneten Fraktionen von Fructus Sambuci nigrae verwendet, die durch Auftrennung mit Hilfe der Festphasenextraktion, gewonnen wurden (siehe Kapitel 2.2.2.4.) und die sich nach der Analyse mittels HPLC-MS (siehe Kapitel 2.2.5.) für die weitere Analytik als geeignet erwiesen. Aufgrund der teilweise sehr geringen Ausbeute wurden einige Fraktionen, die laut HPLC-MS Analyse die gleiche bzw. eine ähnliche Zusammensetzung aufwiesen, vereinigt.

Die Fraktionen wurden in wässriger 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst, mit wässriger 0,1 M Dithiothreitolösung (DTT) versetzt und für 30 min bei 60 °C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Probengefäße in Eiswasser gekühlt und mit wässriger 0,1 M Iodacetamidlösung unter gelegentlichem Schütteln und Lichtausschluss für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert (Reaktionsmechanismus siehe Abb. 6, Seite 13). Abschließend wurde, als Neuerung zu der von Semper (2012) übernommenen Methode, Acetonitril zugesetzt, um eine bessere Löslichkeit der Peptide zu gewährleisten und Verluste durch Adsorption an der Gefäßwand zu verhindern. Die genauen Mengen an zugesetzter Ammoniumhydrogencarbonatlösung sowie die der anderen verwendeten Reagenzien sind in den Tabellen 9 und 10 aufgeschlüsselt.

Tabelle 9: Fructus Sambuci nigrae Extrakt 1 – Ausbeute der einzelnen Fraktionen SPE und Menge der Reagenzien (sofern nicht anders angegeben in μL) für Reduktion und Alkylierung.; Details zu den verwendeten Fraktionen finden sich auf Seite 26 und Seite 27, Tabelle 7.

Fraktion	Acetonitrilanteil im Eluent	Ausbeute	NH_4HCO_3	DTT	Iodacetamid	Acetonitril	H_2O
31%C-35%A	31%-35%	3,76 mg	1504	376	1128	376	376
35%B	35%	2,04 mg	816	204	612	204	204
35%C	35%	1,23 mg	400	123	369	100	8
35%D	35%	0,43 mg	400	43	129	100	328
43%A	43%	0,65 mg	400	65	195	100	240
43%B	43%	0,91 mg	400	91	273	100	136
43%C	43%	0,95 mg	380	95	285	95	95
43%D	43%	0,11 mg	44	11	33	11	11
39%A-D	39%	0,41 mg	164	41	123	41	41
47%A	47%	-	40	10	30	10	10
47%B	47%	0,01 mg	40	10	30	10	10
47%C	47%	0,06 mg	40	10	30	10	10
47%D	47%	0,35 mg	140	35	105	35	35

Die Mengen der Reagenzien entsprachen immer dem gleichen Verhältnis untereinander und orientierten sich an der Menge der zugesetzten DTT-Lösung, welche für den Extrakt 1 im mindestens zehnfachen Überschuss, bezogen auf die Menge an vorhandenen⁶ Disulfidbrücken, zugegeben wurde. Es wurden also 100 μL 0,1 M wässrige DTT-Lösung pro mg Ausbeute der jeweiligen Fraktion zugesetzt. Bei all jenen Proben, deren Auswaage weniger als 0,1 mg betrug, entsprachen die zugesetzten Mengen an Reagens einer Ausbeute von 0,1 mg. Dies war nötig, da die verwendeten Volumina ansonsten verschwindend gering gewesen wären. Generell wurden die Reagenzien in einem Verhältnis von 4:1:3 von wässriger 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung : wässriger 0,1 M DTT-Lösung : wässriger 0,1 M Iodacetamidlösung zugegeben, wobei die zugesetzte Menge an Iodacetamidlösung einem 1,5 fachen Überschuss entspricht, da zunächst die zuvor nicht oxidierte DTT-Lösung reagiert und erst wenn alle Thiolgruppen des Reagens alkyliert wurden, auch das Peptid vollständig alkyliert wird. Hierbei muss man allerdings achtgeben, dass der Überschuss an Iodacetamidlösung nicht zu groß ist, da sonst sehr leicht Nebenreaktionen mit anderen Aminosäu-

⁶ Es wurde angenommen, dass die gesamte Ausbeute ausschließlich Peptide mit drei Disulfidbrücken und einem Molekulargewicht von 3000 Da enthält.

ren als Cystein ablaufen können. Anschließend wurden jeweils 10% des schlussendlichen Gesamtvolumens an doppeltdestilliertem Wasser und Acetonitril zugegeben.

Es gab jedoch einige Fraktionen bei denen von den oben beschriebenen Mengenangaben abgewichen wurde, wobei die verwendeten Lösungsmittel und deren Konzentration stets gleich blieben. Die Fraktionen 35%C – 43%B des Extrakts 1 (siehe Seite 27) wurden alle, unabhängig von ihrer Auswaage, in 400 µL Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst, die Menge an DTT-Lösung und Iodacetamid-Lösung entsprach aber der zuvor beschriebenen und orientierte sich an der Auswaage (siehe Tab 9, Seite 31). Die Menge an Acetonitril stand im Verhältnis zur Menge der zugegebenen Ammoniumhydrogencarbonatlösung, während schlussendlich mit doppeltdestilliertem Wasser auf 1 mL aufgefüllt wurde. Die exakten Mengen der eingesetzten Reagenzien für Extrakt 1 finden sich in Tabelle 9 (S. 31)

Tabelle 10: Fructus Sambuci nigrae Extrakt 5 - Ausbeute der einzelnen Fraktionen und Menge der Reagenzien (sofern nicht anders angegeben in µL) für Reduktion und Alkylierung; Details zu den verwendeten Fraktionen finden sich auf Seite 26 und Seite 27, Tabelle 7.

Fraktion	Acetonitrilanteil im Eluent	Ausbeute	NH ₄ HCO ₃	DTT	Iodacetamid	Acetonitril	H ₂ O
31%B	31%	2,16 mg	288	72	216	72	72
31%C-35%A	31%-35%	6,55 mg	873	218	655	218	218
35%B	35%	3,48 mg	464	116	348	116	116
35%C	35%	2,14 mg	285	71	214	71	71
35%D	35%	1,66 mg	221	55	166	55	55
39%A	39%	1,67 mg	223	56	167	56	56
39%B	39%	2,21 mg	295	74	221	74	74
39%C	39%	1,58 mg	211	53	158	53	53
39%D	39%	1,07 mg	143	36	107	36	36
43%A-B	43%	2,35 mg	313	78	235	78	78
43%C-47%B	43%-47%	-	160	40	120	40	40

Da in Extrakt 5 generell höhere Auswaagen erzielt wurden, die Volumina der Reaktionsmischung jedoch nicht weiter gesteigert werden sollten, wurden die Fraktionen mit nur einem Drittel der Reagenzienmenge versetzt, wobei das Verhältnis der Mengen an Reagenzien untereinander unverändert blieb. Diese Änderung hatte keine Folgen für die weiteren Ergebnisse, da selbst nach Reduktion der Menge der Reagenzien immer noch ein mindestens dreifacher Überschuss an DTT bezogen auf die vermutete Anzahl der in den Peptiden enthaltenen Disulfidbrücken zugesetzt wurde.

Nach erfolgter Reduktion und Alkylierung wurden die zugeführten Reagenzien mittels Festphasenextraktion abgetrennt (siehe Kapitel 2.2.2.5, Tab. 8, Seite 29).

Anschließend wurden alle Fraktionen mittels Evaporatorzentrifuge getrocknet und vor der weiteren Bearbeitung bei minus 20 °C gelagert.

In weiterer Folge galt es, die Peptide mit Hilfe verschiedener Enzyme, wie in den Kapiteln 2.2.3.2. bis 2.2.3.4. beschrieben, zu spalten.

2.2.3.2 Enzymatischer Verdau mittels Trypsin

Da die untersuchten Peptide für eine aussagekräftige direkte Fragmentierung in dem Massenspektrometer zu groß waren, wurden sie mit Hilfe einiger Endopeptidasen gespalten. Auch diese Methode ist im Bereich der Protein- und Peptidanalytik allgegenwärtig und wird, unter anderem, bei Burman, et al. (2009) beschrieben.

Die ersten Versuche wurden mit Trypsin durchgeführt. Das lyophilisierte Enzym wurde, laut Anleitung des Herstellers, mit einer Konzentration von 1 mg/10 mL in wässriger 1 mM Salzsäure gelöst. Die Enzymlösung wurde in größeren Mengen bereitet, aliquotiert und bis zu Verwendung bei minus 20 °C gelagert.

Die zuvor reduzierten, alkylierten und nach der Festphasenextraktion zu 0,2 mg Äquivalenten getrockneten Fraktionen wurden in 100 µL wässriger 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst, mit 100 µL der oben beschriebenen Trypsinlösung versetzt und bei 37°C über Nacht (16 Stunden) inkubiert. Je nach Verfügbarkeit wurden, um die gewünschte Inkubationstemperatur zu gewährleisten, ein Heizblock, ein Inkubator oder ein Wasserbad benutzt.

Nach der Inkubation wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit wässriger 2%iger Ameisensäure (HCOOH) verdünnt. Schlussendlich wurden noch zu jedem Äquivalent 44 µL Acetonitril zugefügt, um die Löslichkeit zu erhöhen (siehe auch „Original“, Tab. 11, Seite 34). Die auf diese Weise vorbereitete Probe wurde anschließend mittels einer, in Kapitel 2.2.2.2. (s. Tab. 8, S. 29) beschriebenen, Festphasenextraktion von den zugegebenen Reagenzien gereinigt und anschließend getrocknet. Nachdem die Proben wieder gelöst worden waren, wurden sie mit Hilfe der HPLC-MS analysiert, welche in Kapitel 2.2.4 näher beschrieben wird.

Um das Ergebnis des Trypsinverdaus zu verbessern bzw. eine Vereinfachung der Interpretation zu ermöglichen, wurden einige Versuche durchgeführt. Zunächst wurde ein Autolyseversuch (s. „Autolyse 1“, Tab. 11, Seite 34) angesetzt, bei dem wie oben beschrieben vorgegangen wurde, mit dem Unterschied, dass in der wässrigen 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung keine Probe gelöst wurde. Inkubation und Festphasenextraktion wurden exakt wie oben beschrieben vorgenommen

und anschließend wurde mittels HPLC-MS analysiert, um mögliche Fehlinterpretationen durch die Autolyse des Trypsins auszuschließen.

Danach wurden weitere Versuche durchgeführt, bei der die Inkubationsdauer von 16 Stunden auf eine Stunde reduziert (siehe „1 h“, Tab. 11) oder nur 10% der zuvor hinzugefügten Menge an Trypsin zugesetzt wurde (siehe „10% Trypsin“, Tab.11). Zu guter Letzt wurde nur noch mit 10% der ursprünglich verwendeten Menge an Trypsin inkubiert, auf eine Festphasenextraktion nach dem Verdau verzichtet (siehe „WO SPE“, Tab. 11) und mit dieser modifizierten Methode auch noch ein Autolyseversuch (siehe „Autolyse 2“, Tab. 11) gemacht. Eine genaue Aufschlüsselung der einzelnen Versuche findet sich in Tabelle 11. Da die Ergebnisse des Trypsinverdau für eine vollständige Interpretation der Aminosäuresequenz noch nicht aufschlussreich genug waren, wurden einige Fraktionen anschließend noch, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, mit der Endopeptidase Glu C und mit Pepsin verdaut.

Tabelle 11: Details zu den verschiedenen Versuchen zur Optimierung der Ergebnisse des Trypsinverdau

Versuch	NH ₄ HCO ₃	Probe	Trypsin	Inkubationszeit	2% HCOOH	Acetonitril	SPE
Original	100 µL	Ja	100 µL	16 h	200 µL	44 µL	ja
Autolyse 1	100 µL	Nein	100 µL	16 h	200 µL	44 µL	ja
10% Trypsin	100 µL	Ja	10 µL	16 h	110 µL	24 µL	ja
1 h	100 µL	Ja	100µL	1 h	200 µL	44 µL	ja
WO SPE	100 µL	Ja	10 µL	16 h	110 µL	24 µL	nein
Autolyse 2	100 µL	Nein	10 µL	16 h	110 µL	24 µL	nein

2.2.3.3 Enzymatischer Verdau mittels Glu C

Der Verdau mit Glu C ist eine häufig angewendete Methode im Bereich der Cyclotidcharakterisierung, um das Öffnen des Peptidrings zu ermöglichen, da eine konservierte Glutaminsäure in der Struktur der Cyclotide eine charakteristisches Merkmal darstellt (Göransson et al., 2003).

Die Durchführung der Versuche erfolgte in Anlehnung an die Angaben des Herstellers der Endopeptidase (Roche). Als Ausgangssubstanz wurden wieder die bereits reduzierten, alkylierten und getrockneten Proben (siehe Kapitel 2.2.3.1., ab S. 31) verwendet.

Diese 0,2 mg Aliquote wurden in 100 µL wässriger 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst, mit 100 µL einer Endopeptidase Glu C Lösung (1 mg in 10 mL doppeltdestilliertem Wasser gelöst) versetzt und für 3 Stunden bei 37°C in einem Inkubator inkubiert. Danach wurden 200 µL wässrige 2%ige Ameisensäure und 44 µL Acetonitril hinzugefügt, um eine Adsorption der Peptide an der Gefäßwand zu verhindern. Die Reagenzien wurden dann mit Hilfe einer Festphasenextraktion abgetrennt, welche in Kapitel 2.2.2.2. näher beschrieben wird.

Nach dem Trocknen der Fraktionen mit Hilfe einer Evaporatorzentrifuge wurde der Rückstand wieder gelöst und mit Hilfe der HPLC-MS analysiert.

Da die LC-MS Analytik ergab, dass die Peptide auf diesem Wege nicht gespalten werden konnten, wurden einige Versuche durchgeführt, um mögliche Fehlerquellen zu ermitteln.

Eine reduzierte, alkylierte und getrocknete Fraktion (0,2 mg Aliquot) wurde in 50 µL wässriger 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung und 50 µL wässriger 1 mM Salzsäure gelöst, um einen weniger basischen pH Wert der Lösung zu erhalten. Anschließend wurden 100 µL der obengenannten wässrigen Endopeptidase Glu C Lösung hinzugegeben und die Mischung über Nacht (16 Stunden) bei 37°C inkubiert. Die weiteren Schritte entsprechen den bereits beschriebenen.

Der zweite Versuch bestand darin, die Probe in Phosphatpuffer zu lösen, da die Endopeptidase Glu C in diesem Medium nicht nur nach jeder Glutaminsäure, sondern auch nach jeder Asparaginsäure schneidet. Die reduzierte, alkylierte und getrocknete Probe (0,2 mg Aliquot) wurde in 100 µL Phosphatpuffer (wässrige 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat Lösung, pH 7,74) gelöst und anschließend mit 100 µL der oben beschriebenen Endopeptidase Glu C Lösung versetzt. Die Mischung wurde bei 37°C über Nacht (16 Stunden) inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

Um die Funktionstüchtigkeit des von uns verwendeten Enzyms zu überprüfen, wurde auf einen bereits bestehenden Extrakt von *Viola odorata*, hergestellt von Birgit Semper, zurückgegriffen, von dem bekannt war, dass die darin enthaltenen Cyclotide sich mit der Endopeptidase Glu C spalten ließen (Colgrave et al., 2010).

Der Extrakt wurde zunächst mittels Evaporatorzentrifuge getrocknet, und anschließend wurde wie in Kapitel 2.2.3.1. (ab S. 31) beschrieben eine Reduktion und Alkylierung durchgeführt. Die Reagenzien wurden in den in Tabelle 12 beschriebenen Mengen zugegeben.

Tabelle 12: Mengen der Reagenzien (in µL) für Reduktion und Alkylierung von *Viola odorata*

Extrakt	Menge	NH ₄ HCO ₃	DTT	Iodacetamid	Acetonitril	H ₂ O
<i>Viola odorata</i>	0,66 mg	264	66	198	66	66

Mit dem wieder getrockneten Extrakt wurden zwei Versuche durchgeführt: Die Probe wurde in 100 µL wässriger 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und in zwei 50 µL Aliquote geteilt, wobei dem einen Aliquot zusätzlich 50 µL wässrige 0,1 M Salzsäure zugesetzt wurde. Beiden Aliquoten wurden je 50 µL Endopeptidase Glu C Lösung zugesetzt und über Nacht (16 Stunden) inkubiert. In weiterer Folge wurde genauso vorgegangen wie beim ersten Versuch beschrieben.

2.2.3.4 Enzymatischer Verdau mittels Pepsin

Da der Enzymverdau mit der Endopeptidase Glu C nicht die erwünschten Ergebnisse brachte, wurden die einzelnen Fraktionen stattdessen mit Pepsin verdaut. Hierzu wurde immobilisiertes Pepsin der Firma Thermo Scientific verwendet. Zunächst wurden die zuvor reduzierten und alkylierten Fraktionen (Vorgehensweise siehe Kapitel 2.2.3.1., ab S. 31) in jeweils 100 µL wässriger 0,01%iger Ameisensäure gelöst. Je 20 µL des immobilisierten Pepsins wurden zwei Mal mit je 200 µL wässriger 0,01%iger Ameisensäure gewaschen und anschließend zur gelösten Probe pipettiert. Um die ideale Inkubationsdauer zu ermitteln, wurde je ein Probenaliquot für 1, 10, 100 und 1000 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln (für eine und 10 Minuten wurde ein Vortex verwendet, für die anderen Proben ein Schüttler) inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der klare Überstand abpipettiert und das pepsinhaltige Gel nochmals mit 200 µL wässriger 0,01%iger Ameisensäure gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und einer HPLC-MS Analyse unterzogen.

2.2.4 Peptidanalytik von *Lobaria scrobiculata*

Die Vorgehensweise der Peptidanalytik bei *Lobaria scrobiculata* entspricht im Wesentlichen jener von *Sambucus nigra*, allerdings wurde nur mit einer Fraktion, nämlich der Fraktion 40% B aus der in Kapitel 2.2.2.3. bzw. Tabelle 6 (S.25) beschriebenen Festphasenextraktion, gearbeitet.

Die getrocknete Fraktion wurde in wässriger 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung wieder gelöst. Anschließend wurde eine Reduktion und eine Alkylierung, wie im Kapitel 2.2.3.1. (ab S. 31) beschrieben, durchgeführt. Die Mengenangaben der verwendeten Reagenzien entsprechen jenen in Tabelle 16 (S.43).

Tabelle 13: Menge der Reagenzien (sofern nicht anders angegeben in μL) für die Reduktion und Alkylierung von *Lobaria scrobiculata*

Fraktion	Ausbeute	NH_4HCO_3	DTT	Iodacetamid	Acetonitril	H_2O
40% B	0,077 mg	31	7,7	23	7,7	7,7

Nach erfolgter Reaktion wurde die Probe mit Hilfe einer Evaporatorzentrifuge getrocknet und, nach dem Lösen in einer Mischung aus wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 9:1 (v/v), einer HPLC-MS Analyse unterzogen.

Danach wurde die verbleibende Probe wieder in einer Evaporatorzentrifuge getrocknet, in 100 μL wässriger 0,1M Ammoniumhydrogencarbonatlösung gelöst, mit 100 μL Trypsinlösung (1 mg/10 mL in wässriger 1 mM Salzsäure) versetzt und über Nacht (16 Stunden) bei 37°C in einem Inkubator inkubiert. Nach Zusatz von 200 μL wässriger 2%iger Ameisensäure und 44 μL Acetonitril wurden die Puffersalze mit der in Tabelle 5 (s. S. 23) beschriebenen Festphasenextraktion abgetrennt. Die gesamte Probe wurde aufgetragen und beide Fraktionen, die mit einer Mischung aus wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 2:8 (v/v) eluiert wurden, wurden vereinigt und in einer Evaporatorzentrifuge getrocknet. Nach dem Lösen in wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 9:1 (v/v) wurde die Probe erneut mittels HPLC-MS analysiert.

2.2.5 LC und LC/MS

2.2.5.1 High Performance Liquid Chromatography - HPLC

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist eine Methode zur Auftrennung von Substanzgemischen aufgrund von verschieden starker Adsorption und Desorption. Die Adsorption beschreibt das „Festgehaltenwerden“ einer Substanz an der stationären Phase, d.h. der in diesem Fall festen Komponente, die üblicherweise in Form von kleinsten Partikelchen (wenige μm) in ein kleines Rohr, die so genannte Säule, gepackt ist.

Zunächst wird der Analyt gelöst und entweder händisch oder, wie während dieses Projekts, mittels Autosampler injiziert. Die mobile Phase, eine Lösungsmittelmischung, sorgt für die Desorption, also für das Loslösen der Substanz von den Partikeln der stationären Phase. Dadurch, dass sich die einzelnen Substanzen, abhängig von ihren chemischen Eigenschaften, verschieden gut in der mobilen Phase lösen, kommt es zu einer unterschiedlichen Verteilung der Komponenten der zu untersuchenden Mischung zwischen den beiden Phasen, und somit zu unterschiedlichen durchschnittlichen Wanderungsgeschwindigkeiten und schließlich Elutionszeiten. Nach der Elution passieren die jeweiligen Inhaltsstoffe einen Detektor, mit dessen Hilfe die einzelnen Komponenten qualitativ und/oder quantitativ analysiert werden können.

Im Gegensatz zu einer Festphasenextraktion, deren Grundprinzip, wie in Kapitel 2.2.2.1. beschrieben wird, jener der HPLC gleicht, wird bei der HPLC aufgrund der kleineren Partikelgröße der stationären Phase die mobile Phase unter hohem Druck durch die Säule gepresst. Um die Auftrennung des Substanzgemisches zu beschleunigen, haben wir uns eines so genannten Lösungsmittelgradienten bedient. Hierbei wird die mobile Phase, die normalerweise aus zwei verschiedenen polaren Lösungsmitteln besteht, in ihrer Zusammensetzung variiert. Ob mit einer höheren Konzentration an polarem oder unpolarem Lösungsmittel begonnen wird, hängt von der verwendeten stationären Phase ab. Handelt es sich um „normales“ Kieselgel, wird zunächst mit einer höheren Konzentration des apolaren Lösungsmittels eluiert. In diesem Projekt wurde eine Säule verwendet, die mit Reversed Phase Material (RP-Material) gepackt war, d.h. dass die stationäre Phase aufgrund von lipophilen Resten am Kieselgel-Grundgerüst wesentlich apolarer ist. Daher wird die Elution mit einer polaren Lösungsmittelmischung begonnen, um zuerst die besonders polaren Substanzen zu eluieren. Danach wird das Verhältnis der beiden Lösungsmittel kontinuierlich zu Gunsten des apolaren Lösungsmittels, welches eine höhere Elutionskraft besitzt, verschoben, wodurch immer lipophilere Substanzen den Detektor erreichen.

Um die Substanzen zu detektieren, gibt es viele verschiedene Möglichkeiten, die je nach Analyt und Zielsetzung der Analyse variiert werden. Einer der gängigsten Detektoren, der auch hier ver-

wendet wurde, ist der Diodenarray Detektor. Hierbei werden die eluierten Substanzen mit polychromatischem Licht bestrahlt und das zum Teil absorbierte Licht mit Hilfe eines optischen Gitters (Polychromator) in die einzelnen Wellenlängen aufgespalten. Anschließend fällt es auf den Diodenarraydetektor, der aus einer mit vielen Photodioden bestückten Platte besteht. Auf diese Weise können mehrere Wellenlängen gleichzeitig detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt werden, das schließlich im Computer zu einem UV-Spektrum bzw. Chromatogramm zusammengesetzt wird.

Anhand dieser Chromatogramme kann man nun erkennen, mit welcher Retentionszeit (das ist die Zeit zwischen Injektion und Detektion) eine Substanz von der Säule eluiert wird. Injiziert man in dem gleichen HPLC-System eine Referenzsubstanz, kann man aus den Ergebnissen ablesen, ob diese Komponente im Probengemisch enthalten ist. Ist von dem Standard auch noch die genaue Konzentration bekannt, so kann man, wenn man die Peakflächen miteinander vergleicht, auch auf die Konzentration des Analyts rückrechnen. Auf diese Weise wird eine qualitative und quantitative Analyse mit einer HPLC möglich.

Ein weiterer verwendeter Detektor ist der so genannte ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), auch Lichtstreuendetektor genannt. Hierbei wird die mobile Phase im Detektor versprüht und das Lösungsmittel anschließend bei geringer Temperatur verdampft. Durch das Versprühen kommt es zu einer raschen Verflüchtigung der mobilen Phase, wodurch die nicht flüchtigen Analyten Feststoffpartikel (Aerosole) bilden. Diese werden mit einem Laser bestrahlt, wobei es aufgrund der Partikel zu einer Streuung des monochromatischen Lichts kommt und die Intensität des Streulichts gemessen wird.

Das so erhaltene ELSD Chromatogramm gibt Aufschluss über die Reinheit der in der Probe vorhandenen Substanzen und erlaubt, mit geeigneten Standards, auf die Konzentration der Inhaltsstoffe in der Probe zu schließen. Der Vorteil gegenüber dem sonst verwendeten Diodenarray Detektor liegt darin, dass auch Substanzen, die keinen Chromophor enthalten, detektiert werden können, wodurch der ELSD universeller einsetzbar ist.

Schlussendlich erhält man, egal mit welcher Methode detektiert wurde, ein Chromatogramm, das heißt ein Diagramm, das angibt, zu welcher Zeit eine Substanz mit welcher Intensität, sei es aufgrund von gemessener Absorption oder Lichtstreuung, detektiert wurde.

Um die Menge an erhaltener Information aus einer sehr geringen Menge an Probe noch weiter zu steigern, gibt es die Möglichkeit, ein Massenspektrometer direkt an die HPLC anzuschließen. Diese Variante wird im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben.

Methodik:

Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HPLC-Methoden verwendet, welche gänzlich von Semper (2012) übernommen wurden.

Zunächst wurden die zuvor getrockneten Proben in wässriger 1%iger Ameisensäure : Acetonitril 9:1 (v/v) gelöst. Im Screening wurden alle Proben mit einer Konzentration von 10 mg/mL gelöst.

Die Fraktionen der in Kapitel 2.2.2.3. beschriebenen SPE mit 10% Gradienten wurden, unabhängig von ihrer Auswaage, in 1 mL der oben beschriebenen Lösungsmittelmischung gelöst, genauso wie die einzelnen Fraktionen der, in Kapitel 2.2.2.4. beschriebenen, Fructus Sambuci nigrae – SPE, mit Ausnahme der Fraktionen 27% A und B, welche mit einer Konzentration von 10 mg/mL gelöst wurden.

Alle übrigen Proben wurden in adäquaten Mengen des oben beschriebenen Lösungsmittels gelöst, aufgrund der schwankenden Konzentrationen wurden jedoch die Einspritzmengen je nach Probe bzw. – sofern vorhanden – nach den vorangegangenen Läufen angepasst.

Alle Proben wurden vor dem Einspritzen in die HPLC-MS in der Heraeus Pico 21 Zentrifuge der Firma Thermo Electron Corporation bei 18 800 g für 10 Minuten zentrifugiert.

Es wurden zwei verschiedene Geräte eingesetzt, jedoch wurden auf beiden Geräten die gleichen zwei Methoden angewendet. Einerseits wurde mit einem Dionex UltiMate 3000 RSLC-Series System gearbeitet, das mit einem Diodenarraydetektor ausgestattet war und welches, wie im nächsten Kapitel beschrieben wird, online an ein Massenspektrometer gekoppelt war. Das zweite benutzte Gerät, auf welchem ausschließlich die ELSD-Messungen durchgeführt wurden, war ein System bestehend aus:

Shimadzu DGU-20A5 Prominence Degaser

Shimadzu LC-20AD Prominence Liquid Chromatograph (Pumpe)

Shimadzu SIL-20AC HT Prominence Auto Sampler

Shimadzu CTO-20AC Prominence Column Oven

Shimadzu SPD-M20A Prominence Diod Array Detektor

Shimadzu CMB-20A Prominence Communications Bus Module

Shimadzu SEDEX Model 75 ELSD - LT

Zunächst wurden alle Proben mit Hilfe der, in Tabelle 14 (S. 41) beschriebenen, Screening-Methode (scr) analysiert, welche eine Übersicht geben sollte, ob im Extrakt bzw. in der jeweiligen Fraktion Peptide vorhanden sind, und ob man die analysierte Pflanze näher untersuchen sollte.

All jene Sambucus-Fractionen, die aufgrund der so gewonnenen Ergebnisse den Verdacht erweckten Peptide zu enthalten, wurden ein zweites Mal vermessen. Hierbei wurde eine speziell auf die, in Fructus Sambuci nigrae enthaltenen, Peptide abgestimmte Methode, die Plantpeptidomics 1 (P1) Methode (siehe Tabelle 15, S. 43), verwendet. Je nach Analyt wurde die Methode, bei ansonsten gleichbleibendem Lösungsmittelgradienten, verkürzt.

Tabelle 14: Parameter der HPLC Screening Methode (scr); diese Methode wurde sowohl für die HPLC-ELSD Messungen auf dem Gerät der Firma Shimadzu verwendet, als auch für HPLC-MS Messungen auf dem Gerät der Firma Dionex.

Screeningmethode		
Ofentemperatur	25°C	
Elutionsmittel A	wässrige 1%ige Ameisensäure	
Elutionsmittel B	Acetonitril	
Wellenlänge UV-Detektor	190 – 400 nm	
Fluss	0,5 mL/min	
Lösungsmittelgradient	Minuten	Acetonitril Anteil in %
	00.0 – 02.0	10%
	02.0 – 52.0	10% → 60%
	52.0 – 53.0	60% → 95%
	53.0 – 63.0	95%
	63.0 – 64.0	95% → 10%
	64.0 – 75.0	10%
ELSD		
Temperatur	40°C	
Druck	369 kPa	

Tabelle 15: Parameter der Plantpeptidomics-Methode 1 (P1); diese Methode wurde sowohl für die HPLC-ELSD Messungen auf dem Gerät der Firma Shimadzu verwendet, als auch für HPLC-MS Messungen auf dem Gerät der Firma Dionex.

Plantpeptidomics-Methode 1		
Ofentemperatur	55°C	
Elutionsmittel A	wässrige 1%ige Ameisensäure	
Elutionsmittel B	Acetonitril	
Wellenlänge UV-Detektor	190 – 400 nm	
Fluss	0,5 mL/min	
Lösungsmittelgradient	Minuten	Acetonitril Anteil in %
	00.0 – 02.0	30%
	02.0 – 46.0	30% → 41%
	46.0 – 57.0	41% → 95%
	57.0 – 58.0	95% → 30%
	58.0 – 68.0	30%

2.2.5.2 LC/MS - Methodenparameter

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, kann man eine HPLC zur Steigerung der Menge an detektierbarer Strukturinformation mit einem Massenspektrometer koppeln. Dadurch wird es möglich, das Molekulargewicht jener Substanzen festzustellen, die zuvor mit Hilfe der HPLC aufgetrennt wurden.

Gearbeitet wurde mit einem Massenspektrometer des Typs HCT der Firma Bruker Daltonics, das mit einer Ionenfalle ausgestattet war. Als Ionenquelle diente die Elektrosprayionisation (siehe Kapitel 1.3.1, ab Seite 11), welche gerade bei der Kopplung mit LC Methoden gerne verwendet wird, da die Ionisation zunächst bei Atmosphärendruck erfolgt und sich hierbei die mobile Phase sehr leicht abtrennen lässt (Schröder, 1991). Außerdem ist diese Methode besonders schonend für polare und große Moleküle und somit sehr gut für Peptide geeignet. Für diese Arbeit wurde das Massenspektrometer mit dem Dionex UltiMate 3000 RSLC-Series System gekoppelt.

Obwohl, je nach Probe, mit zwei verschiedenen HPLC-Methoden (siehe Tab. 14, S. 41 und Tab. 15.) gearbeitet wurde, wurde im Zuge meiner Arbeit nur eine einzige Methode am Massenspektrometer verwendet, die in Tabelle 16 (S. 43) näher beschrieben wird.

Tabelle 16: Parameter der MS 1 Methode

MS 1 Methode	
Ionenmodus	positiv
Ionisation	Elektrospray
Temperatur des Trocknungsgases	340°C
Fluss des Trocknungsgases	9.0 L/min N ₂
Vernebler	26.0 psi N ₂
Kapillarenspannung	-3700 V
Messbereich	80 – 2500 m/z
Target Mass	1000 m/z
Scan Geschwindigkeit	8100 m/z/sec
Kollisionsgas	Helium 5.0

In Abhängigkeit von den Ergebnissen der MS¹ Messungen der verschiedenen Proben, wurden auch MSⁿ Läufe durchgeführt. Diese wurden entweder manuell oder automatisch ganz individuell auf Grundlage der zuvor gemessenen Daten optimiert. Daher wird an dieser Stelle nicht näher auf die Details eingegangen.

Bei dieser manuellen Fragmentierung wurde genau festgelegt, in welchen Zeitfenstern welche Massen isoliert und fragmentiert werden sollten. In den meisten Fällen wurde jedoch die automatische Fragmentierung genutzt, die so genannte Data Dependent Acquisition oder auch DDA. Diese hat den Vorteil, dass man nicht alle Zeitfenster vorgeben muss, sondern lediglich einige Parameter wie die Mindestintensität der gesuchten Peaks, den gewünschten m/z Bereich und die maximale Anzahl an Massen, die fragmentiert werden sollen. Das Gerät adaptiert die Parameter dann je nach zuvor aufgenommenem MS¹-Spektrum selbstständig und leitet automatisch, falls die zuvor bestimmten Kriterien zutreffen, eine Fragmentierung ein. Dadurch können große Mengen an Proben wesentlich schneller analysiert werden, allerdings erhält man auf diese Weise auch eine große Menge an Daten, die für die Analyse irrelevant sind und man anschließend aussortieren muss.

3. Resultate

Im Folgenden wird nun auf die Ergebnisse dieses Projekts eingegangen. Zunächst werden die Resultate des Screenings der 22 ausgewählten Pflanzen besprochen, mit dessen Hilfe einige Pflanzen als peptidhaltig identifiziert werden konnten. Anschließend wird auf die Resultate der detaillierten Analytik von *Sambucus nigra* und *Lobaria scrobiculata* eingegangen und auf die Ergebnisse der Aminosäuresequenzierung, der in diesen beiden Arten enthaltenen Peptide.

3.1 Screening der Pflanzen und Flechten auf Peptide

3.1.1 Kriterien für die Identifizierung von Peptiden

Das Screening diente dazu weitere Pflanzenarten zu finden, in denen Peptide enthalten sind, um diese in weiterer Folge genauer zu untersuchen und mögliche unbekannte Peptide zu sequenzieren. Die hierbei angewendeten Methoden wurden im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit (Semper, 2012) entwickelt und konnten übernommen werden. Die genaue Methodik ist im Kapitel Material und Methoden (ab Seite 19) beschrieben.

Zunächst wurden die getrockneten Pflanzenteile extrahiert, filtriert und der Extrakt getrocknet. Nachdem die Extrakte wieder gelöst waren, wurden sie mit Hilfe einer Festphasenextraktion von sehr polaren, wie zum Beispiel Zuckern, und sehr apolaren Inhaltsstoffen getrennt und anschließend wieder getrocknet, gelöst und mittels HPLC-MS analysiert (siehe s. 23, Tab. 5).

Die Kriterien für einen Hit, das heißt für eine Probe, die aufgrund ihrer Massenspektren Peptide enthalten könnte, waren einfach protonierte Ionen mit geraden m/z -Werten und einem Molekulargewicht von über 500 Da und/oder mehrfach protonierte und somit mehrfach geladene Ionen ($[M+nH]^{n+}$ - Ionen mit $n \geq 2$).

Grundsätzlich wurden nur Peaks mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von über 500 beachtet, um sicher zu gehen, dass ein mögliches Peptid aus mindestens fünf Aminosäuren besteht.

Die geraden m/z -Werte von $[M+H]^+$ - Ionen wurden als Kriterium gewählt, weil man, sofern dieses Kriterium erfüllt wird, davon ausgehen kann, dass das jeweilige untersuchte Quasimolekül Stickstoff enthält. Dies lässt sich mit der sogenannten N-Regel begründen, die besagt, dass bei einer ungeraden Anzahl an Stickstoffatomen im Molekül das Molekulargewicht ungeradzahlig ist (Budzikiewicz und Schäfer, 2005 und Gross, 2004). Das Molekulargewicht bleibt, unabhängig vom genauen Aufbau des Moleküls, immer ungerade, solange es sich um ein nichtradikalisches Biomolekül, bestehend aus den typischerweise vorkommenden Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor, handelt, das eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen enthält. Im sogenannten Positiv-Ionen-Modus, in dem während dieses Projekts vermessen wurde, kommt es dann zu einer Anlagerung eines Protons und dadurch zu einer

geraden nominellen Masse des Quasimoleküls. Allerdings gilt es zu beachten, dass es neben den Peptiden auch andere Sekundärmetaboliten gibt, die Stickstoffatome enthalten.

Ein weiteres Kriterium war das Vorkommen mehrfach geladener Ionen, die charakteristischer Weise häufig in Massenspektren von Peptiden vorkommen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich nicht nur ein Proton an das Molekül anlagert, um ein Quasimolekülion zu bilden, sondern dass gleich mehrere Protonen an basische Stellen im Peptid binden können (Lehmann, 1996). Da es mehrere basische Aminosäuren bzw. Aminosäuren mit leicht protonierbaren Gruppen gibt, ist es nachvollziehbar, dass es bei Peptiden häufig zum Auftreten von mehrfach geladenen Ionen kommt. Wie in Abbildung 9 sichtbar ist, ähnelt die Verteilung der Isotopenpeaks größerer mehrfach geladener Peptide der Form einer Gauß'schen Glocke, wobei die Abstände der Peaks untereinander kleiner als eins sind.

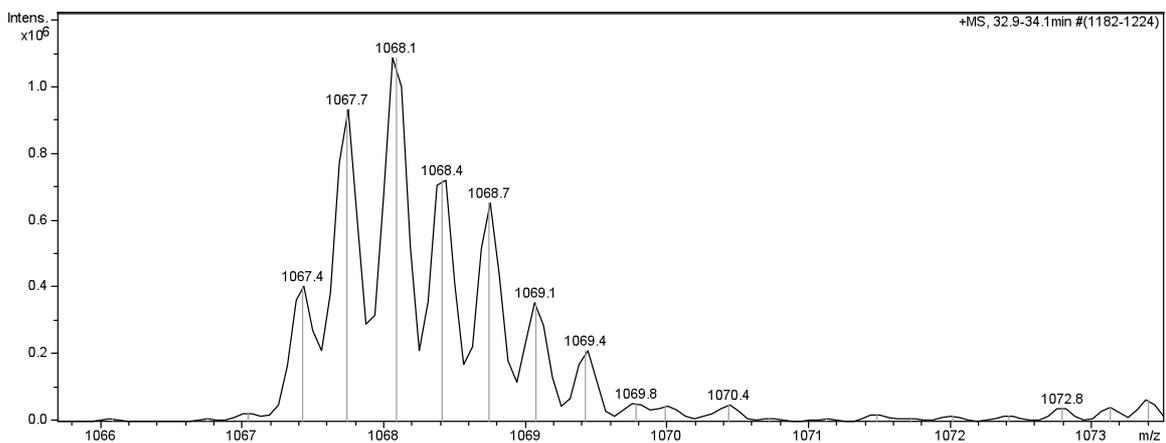


Abbildung 9: Ausschnitt eines Massenspektrums eines $[M+3H]^{3+}$ - Ions.

Dies kommt daher, dass in einem Massenspektrum jeweils das Masse-zu-Ladungsverhältnis angegeben wird. Das bedeutet, dass die Masse eines Ions (inklusive der zusätzlich angelagerten Protonen) durch die Anzahl seiner Ladungen dividiert wird und dieser Wert als m/z-Wert im Massenspektrum angezeigt wird. Daraus ergibt sich, dass beispielsweise bei einem Spektrum eines dreifach geladenen Ions, wie es auch in Abbildung 9 zu sehen ist, die Abstände der einzelnen Isotopenpeaks nicht einem m/z-Wert von eins entsprechen, sondern einem m/z-Wert von 1/3 also 0,33. Das ursprüngliche Molekulargewicht des Peptids lässt sich aber ganz einfach mit der Formel

$$m/z_{\text{ion}} * n - n = MG$$

berechnen (Budzikiewicz und Schäfer 2005), wobei n die Anzahl der Ladungen des Ions $[M+nH]^{n+}$ ist. Setzt man also das m/z des in Abb. 9 ersichtlichen dreifachgeladenen Ions in diese Formel ein, ergibt sich bei einem m/z von 1067,4 durch Multiplikation mit 3 und anschließender Subtraktion von 3 ein Molekulargewicht von 3199,2 Da.

Alle diesen Kriterien entsprechenden Proben wurden noch einer weiteren, nämlich einer LC-MS Messung mit gezielter MS^n - Fraktionierung unterzogen. Aufgrund der für Aminosäuren charakteristischen Abstände der Peaks in den Fragmentionen - Spektren konnte in der Regel festgestellt werden, ob es sich bei den gefundenen Molekülen tatsächlich um Peptide handelt oder nicht (siehe Tabelle 17 und 18, S. 47 und 48). Somit konnten mit Hilfe dieser Kriterien während des Screenings potentielle Hits identifiziert und in weiterer Folge näher analysiert werden.

3.1.2 Resultate des Screenings der 22 ausgewählten Pflanzen

Das Screening ergab, dass 12 der 22 untersuchten Proben ein, wenn auch teilweise schwaches, Signal mit einem geradzahligem m/z -Wert über 500 aufwiesen (siehe Tabelle 17, S. 47). Mehrfach geladene Ionen wurden gar nur in 4 der 22 überprüften Proben gefunden, wobei hier die Probe von *Ginkgo biloba* besonders deutliche Signale aufwies. Da die MS^n - Spektren nicht ausreichend interpretierbar waren, konnten keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, ob nun Peptide in dieser Probe enthalten waren oder nicht. Gerade in diesem Fall bedarf es also weiterer Untersuchungen und eventuell einer Optimierung der Methode, um eindeutige Schlüsse ziehen zu können.

Bei einer Probe, nämlich jener von *Syzygium aromaticum*, deren MS^1 -Spektren auf Peptide hindeuteten, musste nach der Analyse des MS^2 -Spektrums jedoch festgestellt werden, dass es sich bei den gefundenen stickstoffhaltigen Verbindungen nicht um Peptide handelte, sondern um Spermidinderivate, welche eine ähnliche Masse wie kleine Peptide aufweisen und auch eine große Menge an Stickstoff enthalten.

Eine weitere, den Kriterien für einen positiven Hit zwar entsprechende und dennoch falsch – positive Probe war jene von *Vaccinium vitis-idaea*. In diesem Fall hatten hochmassige Tannine durch Bildung schwacher $[M+2H]^{2+}$ - Ionen die geradzahligem Masse-zu-Ladungsverhältnisse in einem Bereich von über 500 Da und die mehrfach geladenen Ionen verursacht.

Diese zwei Beispiele zeigen deutlich, dass die positive Erfüllung der Kriterien alleine noch kein Garant für eine peptidhaltige Probe ist. Vielmehr handelt es sich um einen Hinweis, den es mit Hilfe weiterer Analysen genauer zu überprüfen gilt. Dennoch war aufgrund der Erfahrungen von Semper (2012) nicht zu erwarten, dass es nur einen einzigen eindeutig positiven Hit geben würde. Dies lässt sich möglicherweise mit dem wesentlich kleineren Probenumfang erklären.

Die Probe, die eindeutig als peptidhaltig identifiziert werden konnte, war die der getrockneten Schale der Bitterorange, *Citrus aurantium ssp. aurantium* aus der Familie der Rutaceae. Es zeigten sich nach der massenspektrometrischen Analyse mehrere interessante Signale, wobei hier das Ion mit dem m/z -Wert von 880,5 besonders erwähnt werden soll, da mit diesem Ion auch MS^2 - und MS^3 - Messungen durchgeführt wurden. In den so erhaltenen Spektren konnten kurze Aminosäure-

teilsequenzen ausgelesen werden, die zeigen, dass dieses Peptid höchstwahrscheinlich cyclisch ist und die Aminosäuren Alanin, Valin und Isoleucin bzw. Leucin enthält. Die genaue Sequenz konnte noch nicht ermittelt werden, die vorhandenen Informationen reichen aber aus, um festzustellen, dass es sich bei diesem Peptid nicht um eines der, bei Tan und Zhou (2006) beschriebenen, bereits bekannten Peptide der Bitterorange handelt.

Tabelle 17: Ergebnisse des Screenings der Pflanzen (s. Tab 2, S. 18) und Auflistung aller Proben von welchen MSⁿ-Spektren vermessen wurden und in welchen Peptide gefunden wurden. Wobei „+“ für ein Erfüllen der obengenannten Kriterien steht, „-“ für ein nicht – Erfüllen, bei jenen Proben, die mit „(+“ gekennzeichnet sind, wurden die Kriterien erfüllt, jedoch war das Signal schwach und bei jenen Proben, die mit „o“ gekennzeichnet sind, konnte keine eindeutige Zuordnung getroffen werden.

Pflanze	Gerade Masse	Mehrfachladung	MS ⁿ	Peptide
<i>Calendula officinalis</i>	-	-	-	-
<i>Camellia sinensis</i>	+	-	+	-
<i>Capsicum frutescens</i>	+	-	+	-
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	-	-	-	-
<i>Citrus aurantium ssp. aurantium</i>	+	-	+	+
<i>Coriandrum sativum</i>	-	-	-	-
<i>Foeniculum vulgare</i>	+	-	+	-
<i>Ginkgo biloba</i>	-	+	-	o
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	(+)	-	+	-
<i>Humulus lupulus</i>	-	-	-	-
<i>Ilex paraguariensis</i>	-	-	-	-
<i>Juglans regia</i>	-	-	-	-
<i>Lavandula angustifolia</i>	-	-	-	-
<i>Matricaria chamomilla</i>	(+)	(+)	+	-
<i>Olea europaea</i>	-	-	-	-
<i>Pimpinella species</i>	(+)	(+)	+	o
<i>Primula species</i>	(+)	-	+	-
<i>Pulmonaria officinalis</i>	+	-	+	-
<i>Rheum officinale</i>	-	-	-	-
<i>Syzygium aromaticum</i>	+	-	+	-
<i>Taraxacum officinale</i>	(+)	-	+	-
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	(+)	(+)	+	-

3.1.3 Screening der Lichenes

Im Rahmen des Screenings der Flechten wurde festgestellt, dass *Lobaria scrobiculata* Peptide enthält. Zunächst wurde in den MS¹-Spektren ein dreifach protoniertes Molekül [M+3H]³⁺ mit einem m/z-Wert von 1109,0 gefunden. Aufgrund der Mehrfachladung kann man hier auf ein Molekulargewicht von 3324,0 Da rückrechnen (Details zur Berechnung finden sich in Kapitel 3.1.1.1.). Von diesem Molekül wurden anschließend MS²-Spektren angefertigt, um die Annahme zu untermauern, dass es sich hierbei um ein Peptid handeln könnte. In besagtem MS²-Spektrum konnten nun für Aminosäuren charakteristische Peakabstände gefunden werden, sodass beschlossen wurde, dieses Molekül so gut es geht aufzureinigen und anzureichern, um anschließend noch weitere Analysen durchführen zu können, die Aufschluss über die Struktur dieser Verbindung geben sollten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Kapitel 3.2. beschrieben.

Aufgrund der obengenannten Ergebnisse des Screenings von *Lobaria scrobiculata* wurden weitere Flechten aus der Sammlung von Herrn Dr. Schinkowitz vom Institut für Pharmakognosie an der Universität Wien auf Peptide untersucht.

Tabelle 18: Aufschlüsselung der Ergebnisse des Screenings der Flechten, von welchen Proben MSⁿ-Spektren gemacht wurden und welche Extrakte Peptide enthielten. Bei allen mit „o“ gekennzeichneten Proben, war es nicht möglich, die Spektren zu interpretieren und eine klare Aussage zu treffen. Hier wären weiterführende Experimente vonnöten.

Art	Gerade Masse	Mehrfachladung	MS ⁿ	Peptide
<i>Cetraria islandica</i>	-	-	-	-
<i>Evernia prunastri</i>	-	-	-	-
<i>Lasallia pustulata</i>	+	+	+	+
<i>Lobaria pulmonaria</i>	+	+	+	o
<i>Lobaria scrobiculata</i>	+	+	+	+
<i>Platismatia glauca</i>	-	-	-	-
<i>Pseudoevernia furfuracea</i>	-	+	+	+
<i>Ramalina farinacea</i>	-	-	+	-
<i>Ramalina fastigiata</i>	+	+	+	o
<i>Usnea florida</i>	+	-	+	-

Wie in Tabelle 18 zu sehen ist, wurden in mehr als der Hälfte aller gescreenten Flechten mehrfach geladene Ionen gefunden. Von all jenen Flechten, die den Kriterien für einen Hit entsprachen, wurden MS²-Messungen gemacht, allerdings waren nur wenige der erhaltenen Spektren zur Interpretation geeignet. An dieser Stelle müssten die zur Analyse verwendeten Methoden weiterentwickelt und speziell für die Gruppe der Flechten optimiert werden, um verwertbare Daten

zu erhalten. Jene Proben, bei denen aufgrund der niedrigen Qualität der erhaltenen Massenspektren eine Interpretation nicht möglich war, wurden in Tabelle 18 mit „o“ gekennzeichnet. Trotz der zum Teil mäßigen Qualität der LC-MS Resultate konnte in drei Flechtenarten das Vorkommen von relevanten Mengen an Peptiden bestätigt werden. Dies ist besonders beachtlich wenn man bedenkt, dass von den 22, in Kapitel 3.1.1.2. beschriebenen Pflanzen, die gescreent wurden, lediglich ein einziges Peptide enthielt.

Aufgrund dieser Ergebnisse würde es sich anbieten, auch in Zukunft in der Gruppe der Flechten nach Peptiden zu suchen und sie, wie es am Beispiel der *Lobaria scrobiculata* in Kapitel 3.2. beschrieben wird, näher zu charakterisieren.

3.2 *Lobaria scrobiculata* – Aufreinigung und Charakterisierung des Hauptpeptids

3.2.1 Aufreinigung der Peptide

Aufgrund der, während des Screenings erhaltenen Ergebnisse wurde beschlossen, eine der Flechten, nämlich *Lobaria scrobiculata*, näher zu untersuchen. Diese war der erste Hit des durchgeführten Screenings und passte daher zeitlich gut zu den Untersuchungen, die auch mit *Cortex Sambuci nigrae* (siehe Kapitel 3.3.2.) durchgeführt wurden.

Zunächst galt es, mit Hilfe einer, in Kapitel 2.2.2.3. (siehe Tab. 6, S. 25) näher beschriebenen Festphasenextraktion den Extrakt in Fraktionen aufzutrennen, um anschließend das zuvor gefundene Peptid möglichst frei von Verunreinigungen analysieren zu können. Die Elution des auf das Umkehrphasen-Material aufgetragenen Extraktes, dessen Herstellung in Kapitel 2.2.1. näher beschrieben wird, erfolgte mit einer Lösungsmittelmischung bestehend aus wässriger 1%iger Ameisensäure und Acetonitril, wobei der Anteil an Acetonitril bei jedem zweiten Elutionsschritt (es wurde mit jeder Lösungsmittelmischung zwei Mal eluiert, die hierbei entstandenen Fraktionen wurden jeweils mit A und B benannt) um 10% erhöht wurde.

Tabelle 19: Ausbeuten der einzelnen Fraktionen der 10% SPE (siehe Tab. 6, S. 25) von *Lobaria scrobiculata* und die Lösungsmittelmengen, in welchen jede Fraktion nach dem Trocknen als Vorbereitung für Reduktion und Alkylierung gelöst wurden.

Fraktion	Anteil Acetonitril	Ausbeute	Lösungsmittelmenge
20% A	20%	0,53 mg	1 mL
20% B	20%	0,23 mg	1 mL
30% A	30%	0,37 mg	1 mL
30% B	30%	0,18 mg	1 mL
40% A	40%	0,22 mg	1 mL
40% B	40%	0,11 mg	1 mL
50% A	50%	0,11 mg	1 mL
50% B	50%	0,13 mg	1 mL
60% A	60%	0,11 mg	1 mL
60% B	60%	0,19 mg	1 mL
70% A	70%	0,21 mg	1 mL
70% B	70%	0,28 mg	1 mL
80% A	80%	0,25 mg	1 mL
80% B	80%	0,31 mg	1 mL

In Tabelle 19 (S. 50) sind die Ausbeuten aller Fraktionen und die Menge an Lösungsmittel (1%ige wässrige Ameisensäure : Acetonitril 9:1) ersichtlich, in der die getrockneten Fraktionen vor der weiteren Reduktion und Alkylierung gelöst wurden.

Die anschließende HPLC-MS-Auswertung, genaue Parameter siehe Kapitel 2.2.4. (Tab.14, S. 42), ergab, dass sich in den Fraktionen 30% A und 30% B zwar keine Peptide befanden, jedoch jeweils eine Substanz, die fast rein vorhanden war und somit für nachfolgende Untersuchungen mit Sicherheit von Interesse wäre. In Fraktion 40% B wurde dann jenes Peptid mit einem Molekulargewicht von 3323 Da detektiert, das auch zuvor im Screening gefunden wurde. Die zugehörigen Chromatogramme sind in Abbildung 10 ersichtlich. Im Extracted-Ion-Chromatogram⁷ ist der Peak des Peptids jener mit der höchsten Intensität und daher besonders deutlich zu erkennen.

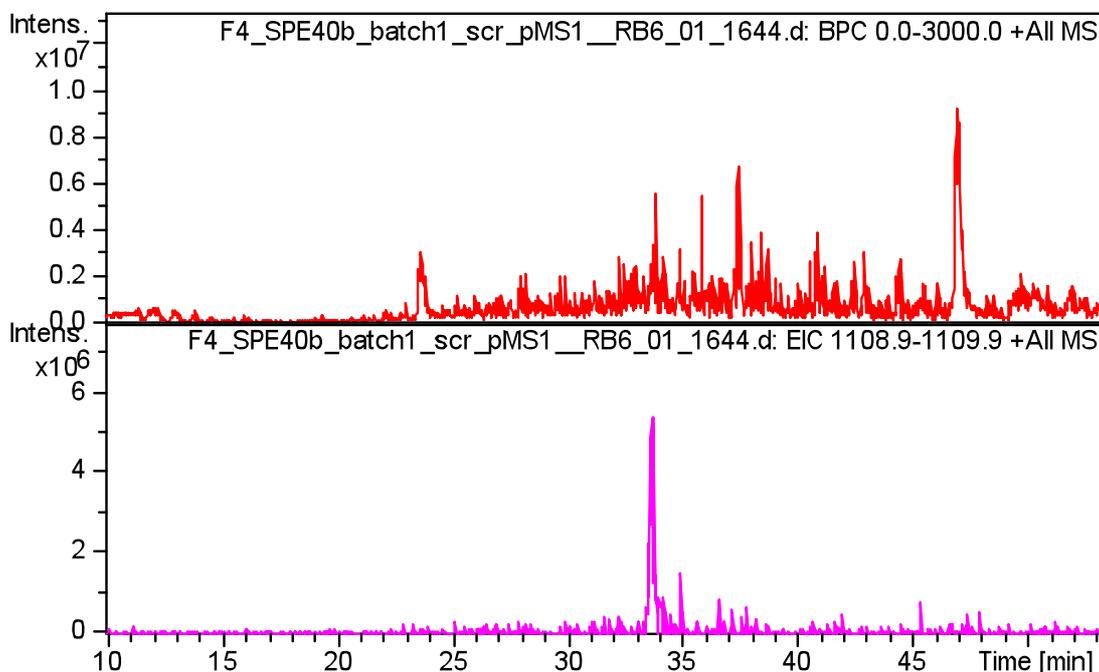


Abbildung 10: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Fraktion 40% B; oben: Base-Peak-Chromatogramm, unten: Extracted-Ion-Chromatogramm; Details zu den Methodenparametern finden sich in Tab. 14, S. 41.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurden eine Reduktion und anschließende Alkylierung vorgenommen, um eine nachfolgende enzymatische Spaltung zu ermöglichen, welche Voraussetzung für eine aussagekräftige Fragmentierung im Massenspektrometer darstellt, und somit essentiell für die Aufklärung der Aminosäuresequenz ist.

⁷ Beim Extracted-Ion-Chromatogramm lässt man sich nur das Chromatogramm eines bestimmten m/z-Wertes anzeigen. Daraus ist dann ersichtlich, zu welcher Zeit eine entsprechende Substanz mit welcher Intensität detektiert wurde (Budzikiewicz und Schäfer, 2005).

3.2.2 Reduktion und Alkylierung

Die Reduktion und Alkylierung des gefundenen Peptids dient nicht nur dem Nachweis von Disulfidbrücken, sondern ist auch eine wesentliche Voraussetzung für dessen Spaltung mit Hilfe von Enzymen, sofern das Peptid tatsächlich über Disulfidbrücken stabilisiert ist.

Die Reduktion erfolgte, wie in Kapitel 2.2.4. (s. S. 38) beschrieben, durch Zugabe von Dithiothreitol zum gelösten Extrakt. Nach der nötigen Inkubationszeit erfolgte die Alkylierung mittels Iodacetamid. Anschließend wurden die, bei der nachfolgenden HPLC-MS-Analyse möglicherweise störenden Reagenzien mit Hilfe einer Festphasenextraktion, welche im Kapitel 2.2.2.5. (s. Tab. 8, S. 29) näher beschrieben wird, abgetrennt.

Durch die Reduktion wären eventuell vorhandene Disulfidbrücken gespalten worden und durch die nachfolgende Alkylierung wurde sichergestellt, dass die entweder ursprünglich vorhandenen bzw. durch die Reduktion frei gewordenen Mercaptogruppen nicht mit anderen reaktiven Molekülen reagieren. Da die Alkylierung über die Addition einer Carbamidomethylgruppe an die freien Mercaptogruppen erfolgt war, konnte nachfolgend, über eine Zunahme des Molekulargewichts von 57 Da pro Mercaptogruppe bzw. zwei mal 58 Da pro Disulfidbrücke⁸ mit Hilfe einer HPLC-MS-Analyse (die genauen Parameter werden in Kapitel 2.2.4., S. 38 beschrieben) die Anzahl an Mercaptogruppen und auch die Anzahl an Disulfidbrücken festgestellt werden. Nach der Analyse mittels HPLC-MS wurde allerdings festgestellt, dass es in dem von uns untersuchten Peptid weder Disulfidbrücken noch freie Cysteine gab.

Zur weiteren Aufklärung der Struktur wurde die Technik der enzymatischen Spaltung mit Hilfe von Trypsin verwendet, die im nachfolgenden Kapitel näher beschrieben wird.

3.2.3 Enzymatischer Verdau des *Lobaria scrobiculata* Peptids mittels Trypsin

Trypsin, ein Enzym, welches eine Peptidkette nach (das heißt C-terminal von) jedem Arginin oder Lysin zerlegt, wurde eingesetzt, um das in *Lobaria scrobiculata* enthaltene Peptid in kleinere Spaltpeptide zu spalten und eine anschließende Fragmentierung, also eine MSⁿ-Analyse zu ermöglichen machen. Wie in Kapitel 2.2.3.2. beschrieben, wurde die Fraktion 40% B, die als einzige das zu analysierende Peptid in ausreichender Menge enthielt, mit Trypsin verdaut und anschließend

⁸ Durch ein zusätzliches Wasserstoffatom, das an die Disulfidbrücke im Zuge der Reduktion und Spaltung addiert wird, kommt es zu einer um 1 Da höheren Massezunahme als bei freien Mercaptogruppen.

mit Hilfe der HPLC-MS (Parameter siehe Kapitel 2.2.4.2, Tab. 15, S. 42) analysiert. Die Chromatogramme wie auch die Spektren zeigten, dass das Peptid durch den Einfluss des Enzyms gespalten wurde. Nun musste durch Berechnungen festgestellt werden, welche der Fragmente zusammen das gesuchte Peptid ergaben. Um von Beginn an Fehlberechnungen auszuschließen, wurde auch ein Trypsinautolyseversuch durchgeführt, bei dem vorgegangen wurde wie in Kapitel 2.2.3.2. beschrieben. Hierbei wurde ein Trypsinverdau durchgeführt, ohne, dass Probe zugegeben wurde. Dadurch konnten alle Peptidfragmente bestimmt werden, die nicht durch den Verdau des gesuchten Peptids entstanden waren, sondern durch die Autolyse des Trypsins. Diese Spaltpeptide von Trypsin wurden dann aus allen weiteren Berechnungen ausgeschlossen. Da diese Spaltpeptide in allen Proben mit sehr hoher Konzentration vorkamen, wurde die Trypsinkonzentration in weiterer Folge gesenkt, um einer zu großen Menge an Trypsin-Autolyse-Peaks vorzubeugen. Dies diente dazu die weitere Auswertung zu erleichtern.

Anschließend wurden die Spaltpeptide fragmentiert, um so eine Aminosäuresequenzierung zu ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es nicht, eine eindeutige Aminosäuresequenz herauszulesen. Zukünftig gilt es nun, die vorhandenen Daten weiter zu interpretieren, um das „Mutterpeptid“ aus den Spaltpeptiden zusammensetzen und so die Struktur des Peptids zu ermitteln.

3.3 Resultate - *Sambucus nigra*

3.3.1 *Sambucus nigra* – Vergleich der verschiedenen Organe

Aufgrund der bereits vorliegenden Ergebnisse aus der Arbeit von Birgit Semper (2012) war bekannt, dass die Früchte des *Sambucus nigra* eine große Menge an cysteinreichen Peptiden enthalten. Um die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse zu belegen, wurden die bereits zuvor untersuchten Früchte nochmals mit Hilfe der in Kapitel 2.2. beschriebenen Screening Methode untersucht. Zusätzlich wurden auch andere Organe von *Sambucus nigra*, die im Rahmen dieses Projektes noch nicht näher analysiert worden waren, dem Screening unterworfen.

Es wurden also, wie in Kapitel 2.2.1. näher beschrieben, zunächst die getrockneten und zerkleinerten Früchte, Blätter, Blüten und die getrocknete und zerkleinerte Rinde extrahiert und die Extrakte, nach der Trocknung in einer Evaporatorzentrifuge, wieder gelöst. Die nunmehr gelösten Proben wurden mit Hilfe einer Festphasenextraktion, welche in Kapitel 2.2.2.2. näher beschrieben wurde, aufgereinigt, um sehr polare und sehr apolare Komponenten abzureichern.

Die auf diese Weise aufgearbeiteten Proben wurden anschließend mittels HPLC-MS-Analytik untersucht (siehe Kapitel 2.2.5., ab S 29) und miteinander verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass sich die einzelnen Pflanzenteile zwar in den relativen Konzentrationsverhältnissen der vorhandenen Peptide zueinander unterscheiden, aber kaum in deren Zusammensetzung, wie anhand der Chromatogramme (die für Peptide typischen Retentionszeiten (t_R) sind blau unterlegt) und Spektren in Abbildung 11 und 12 (s. S. 56 und 57) zu sehen ist. Die Ausnahme bildet die Rinde von *Sambucus nigra*, die zwar eine sehr geringe Menge an Peptiden enthält, deren Zusammensetzung sich aber von jener der anderen deutlich unterscheidet.

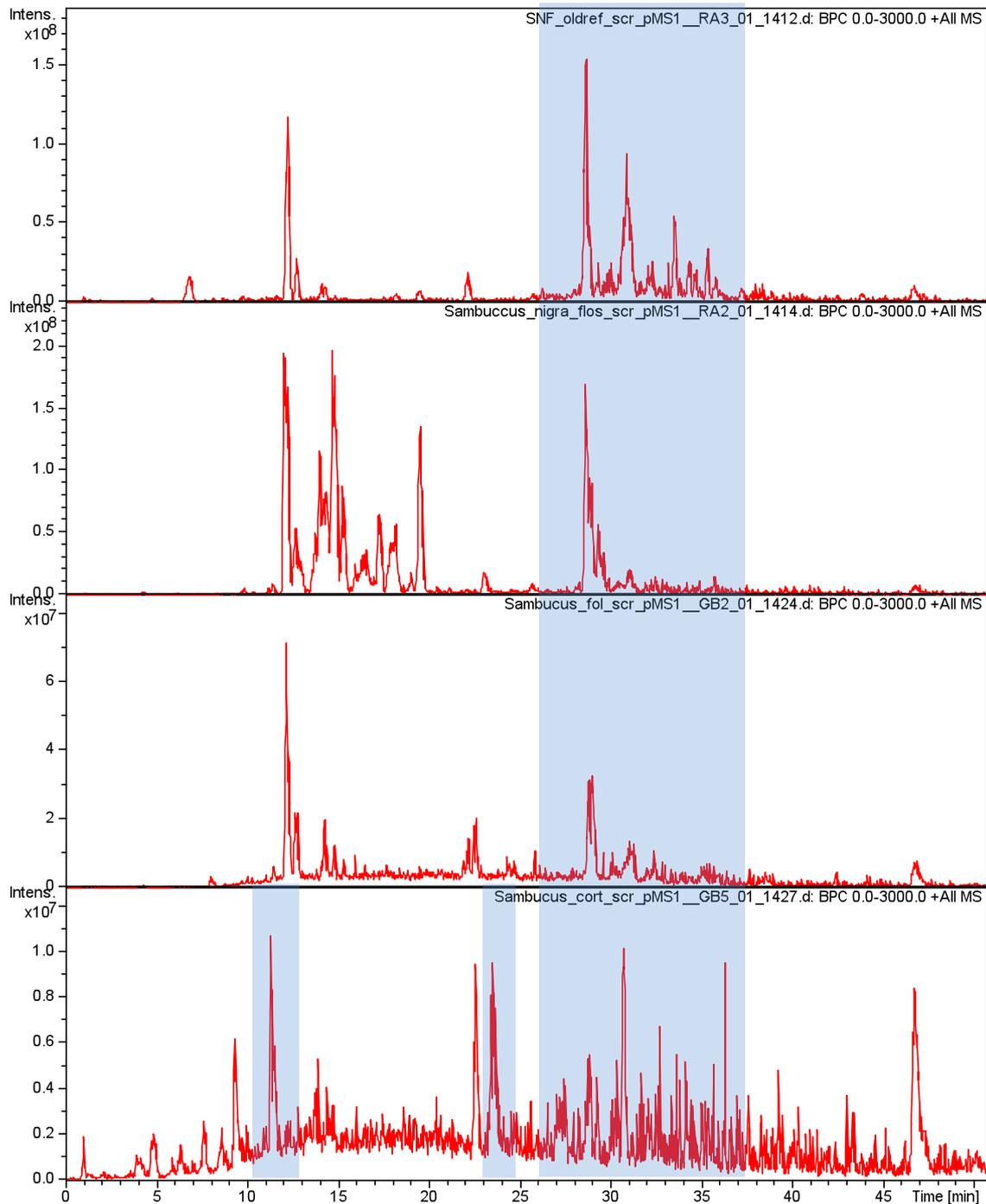


Abbildung 11: Vergleich der HPLC-MS - Chromatogramme (Base-Peak-Chromatogram BPC⁹) von Fructus Sambuci nigrae, Flos Sambuci nigrae, Folium Sambuci nigrae, Cortex Sambuci nigrae (von oben nach unten) nach Auftrennung mittels HPLC; Methodenparameter laut Tab. 15 und 16 auf S. 43 und 44.

⁹ Der Ausdruck Base-Peak-Chromatogram leitet sich von der Darstellung der gewonnenen MS Daten ab. Der Base-Peak ist der Peak in einem Spektrum mit der höchsten Intensität. In einem Base-Peak-Chromatogram werden jeweils nur die Peaks im Massenspektrum mit der höchsten Intensität abgebildet.

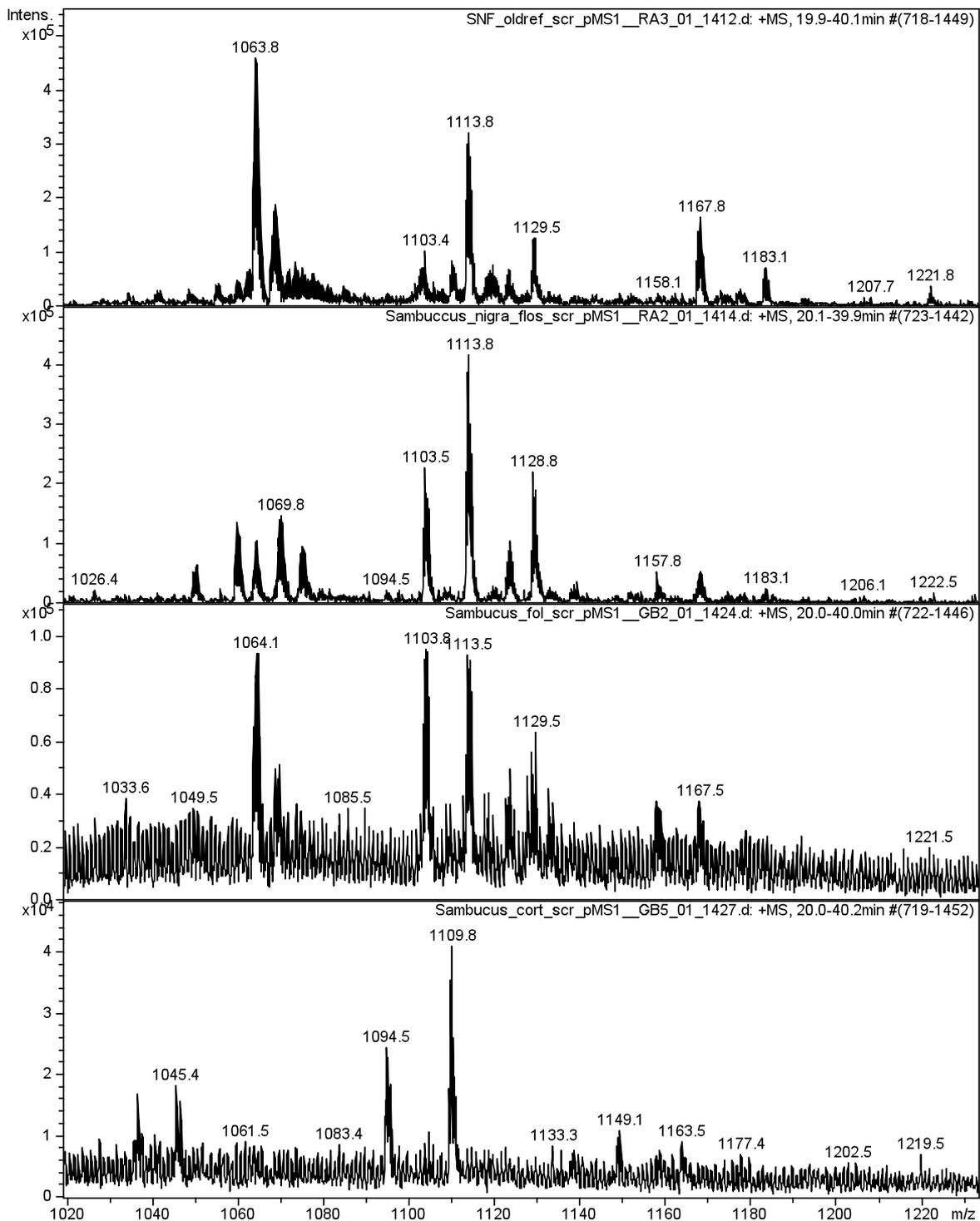


Abbildung 12: Ausschnitt der Massenspektren (t_R von 20 - 40 min.) von Fructus *Sambuci nigrae*, Flos *Sambuci nigrae*, Folium *Sambuci nigrae* und Cortex *Sambuci nigrae*, in dem deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der in Cortex *Sambuci nigrae* enthaltenen Peptide im Vergleich zu den in den anderen Pflanzenteilen enthaltenen Peptiden zu erkennen sind. Die Methodenparameter finden sich in Tab.16 auf S. 44.

In Tabelle 20 findet sich eine Auflistung jener Peptide, die in den einzelnen Pflanzenorganen gefunden werden konnten. Dies ermöglicht einen Vergleich, der in den einzelnen Organen enthaltenen Peptide. Die Nomenklatur der „Sambucelline“ wurde neu eingeführt, da diese Peptide zuvor noch nicht publiziert wurden. Die Reihung richtet sich nach dem Molekulargewicht und bei Isomeren zusätzlich nach der Retentionszeit. Die genauen Molekulargewichte, Masse-zu-Ladungsverhältnisse und Retentionszeiten finden sich in Tabelle I (S. 96 ff.) im Anhang.

Tabelle 20: Auflistung jener Hauptpeptide, die in den verschiedenen Organen des *Sambucus nigra* gefunden werden konnten. All jene Peptide die mit (x) gekennzeichnet wurden zeigten nur ein schwaches Signal. Details siehe Tabelle I (S. 96 ff.) im Anhang.

Peptid	m/z	Blüte	Frucht	Blatt	Rinde
Sambucellin 21	1069,1	x			
Sambucellin 33	1103,1	x		x	
Sambucellin 40	1113,1	x	x	x	
Sambucellin 43	1128,5	x	x	x	
Sambucellin 45	1167,2	(x)	x		
Sambucellin 20	1068,1	(x)	x	x	
Sambucellin 17	1063,5	x	x	x	
Sambucellin 18	1063,5	x	x	x	
Sambucellin 14	1059,2	x	(x)		
Sambucellin 11	1049,1	x			
Sambucellin 25	1074,5	x			
Sambucellin 39	1109,2	(x)		(x)	x
Sambucellin 31	1094,1	(x)			x
Sambucellin 1	1009,7	(x)			x
Sambucellin 38	1109,5		x		
Sambucellin 46	1182,5		x		
Sambucellin 19	1067,4		x		
Sambucellin 12	1054,4		x		
Sambucellin 15	1061,4		x		
Sambucellin 5	1035,8				x
Sambucellin 9	1045,4				x

Anschließend wurden von den gereinigten Extrakten obengenannter Organe HPLC-ELSD-Messungen durchgeführt, um abzuschätzen, in welcher relativen Konzentration die Peptide in den Proben vorlagen. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Peptide in relevanten Mengen vorhanden waren.

Abschließend lässt sich sagen, dass in den unterschiedlichen Teilen von *Sambucus nigra* Peptide enthalten sind, wobei deren Zusammensetzung in Blatt, Blüte und Frucht ähnlich ist und sich erheblich von jener in der Rinde unterscheidet. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde nun nur noch mit den Extrakten von Frucht und Rinde weitergearbeitet.

3.3.2 Aufreinigung der Peptide aus Cortex Sambuci nigrae und Fructus Sambuci nigrae

Nachdem die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des Screenings von Birgit Semper (2012) gezeigt worden war, und die Extrakte von Frucht und Rinde von *Sambucus nigra* als die für die weiterführenden Untersuchungen am geeignetsten eingestuft wurden, wurde mit der Aufreinigung dieser Extrakte begonnen. Da für die Frucht bereits durch Birgit Semper eine geeignete Methode zur Aufreinigung und Auftrennung der Peptide erarbeitet wurde (siehe Kapitel 2.2.2.4. ab S. 27), konnte diese übernommen werden. Für die Auftrennung des Extraktes der Rinde war keine spezielle SPE-Methode vorhanden, also wurde mit einer kleineren Menge an Extrakt und einem gröberen Stufengradienten gearbeitet, um eine erste Auftrennung des enthaltenen Substanzgemisches zu erhalten. Die Methode ist ident mit jener, die bereits für die Untersuchungen an *Lobaria scrobiculata* verwendet wurde und (siehe Kapitel 2.2.2.3., Tab. 6, S. 25)

Die Extrakte beider Proben (siehe 2.2.1., ab S. 22) wurden gelöst und mit Hilfe oben genannter SPE-Methode aufgetrennt. Bei den Proben der Frucht wurde zur Auftrennung allerdings eine wesentlich größere Säule verwendet. Sie enthielt 10 g RP-18 Material und hatte ein Säulenvolumen von 60 mL, im Vergleich zu der Säule, die zur Auftrennung des Rindenextraktes verwendet wurde, die mit 1 g RP-18 Material und 6 mL Säulenvolumen eine wesentlich geringere Kapazität aufwies. Dementsprechend variierten nicht nur die Mengen an aufgetragener Probe (2,5 g des Fruchtextraktes versus 100 mg des Rindenextraktes), sondern auch die daraus erhaltenen Ausbeuten, wie auch Tabelle 9 auf Seite 31 (Fructus Sambuci nigrae) und Tabelle 21 auf Seite 59 (Cortex Sambuci nigrae) zu entnehmen ist.

3.3.2.1 Cortex Sambuci nigrae

Bei dem aus der Rinde gewonnenen Extrakt war zwar die Trennung der Peptide von anderen Inhaltsstoffen weitgehend erfolgreich, allerdings war die Auftrennung der verschiedenen Peptide voneinander, aufgrund der großen Sprünge der Lösungsmittelkonzentrationen (die Elution wurde mit einer Konzentration von 10% Acetonitril in 1%iger wässriger Ameisensäure begonnen und der Acetonitril Gehalt stufenweise um 10% erhöht, wobei mit jeder Lösungsmittelkonzentration zwei Mal eluiert wurde, daher entstand auch die Bezeichnung A und B für die einzelnen Fraktionen) nicht so gut gelungen wie bei der bereits verfeinerten Methode für den Extrakt der Frucht.

Wie in den Abbildungen 13 und 14 auf der nächsten Seite zu sehen ist, enthalten die Fraktionen 20% A – 30% A des Rindenextraktes keine Peptide Die Fraktionen 30% B - 50% B enthalten jeweils mehrere Peptide, jedoch sonst kaum Verunreinigungen. Die für Peptide typischen Retentionszeiten sind in den oben genannten Chromatogrammen grau unterlegt.

Tabelle 21: Ausbeuten der einzelnen Fraktionen nach 10% SPE (s. Tab. 6, S. 25) und Lösungsmittelmenge (10%ige wässrige Ameisensäure : Acetonitril 9:1), in der die Fraktionen vor der weiteren Bearbeitung wieder gelöst wurden.

Fraktion	Anteil Acetonitril	Ausbeute	Lösungsmittelmenge
20% A	20%	2,85 mg	1 mL
20% B	20%	0,99 mg	1 mL
30% A	30%	1,88 mg	1 mL
30% B	30%	9,64 mg ¹⁰	1 mL
40% A	40%	0,51 mg	1 mL
40% B	40%	0,36 mg	1 mL
50% A	50%	1,05 mg	1 mL
50% B	50%	0,23 mg	1 mL
60% A	60%	1,29 mg	1 mL
60% B	60%	0,31 mg	1 mL
70% A	70%	0,08 mg	1 mL
70% B	70%	0,07 mg	1 mL
80% A	80%	0,02 mg	1 mL
80% B	80%	0,43 mg	1 mL

¹⁰ Aufgrund der großen Abweichung zu den anderen gemessenen Werten ist davon auszugehen, dass dieser extrem hohen Ausbeute in diesem Fall ein Wägefehler oder eine Verunreinigung zugrunde liegt.

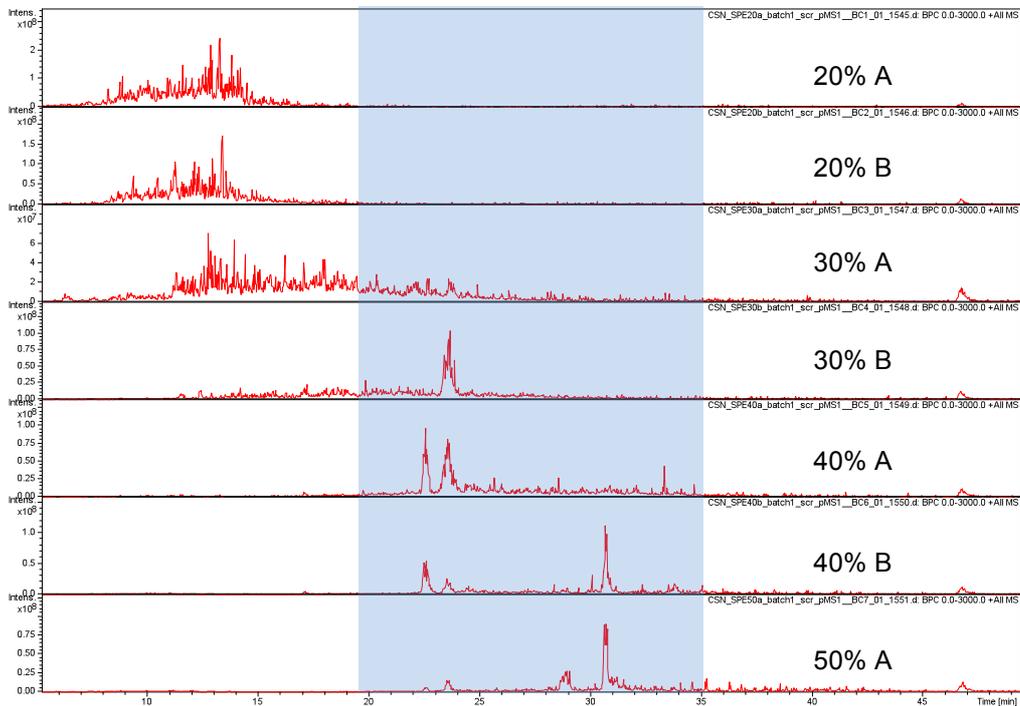


Abbildung 13: Vergleich der HPLC-MS - Chromatogramme (BPC) der Fraktionen 20% A – 50% A (von oben nach unten) von Cortex Sambuci nigrae; Methodenparameter siehe S Tab. 15 und 16, S. 42 und 43.

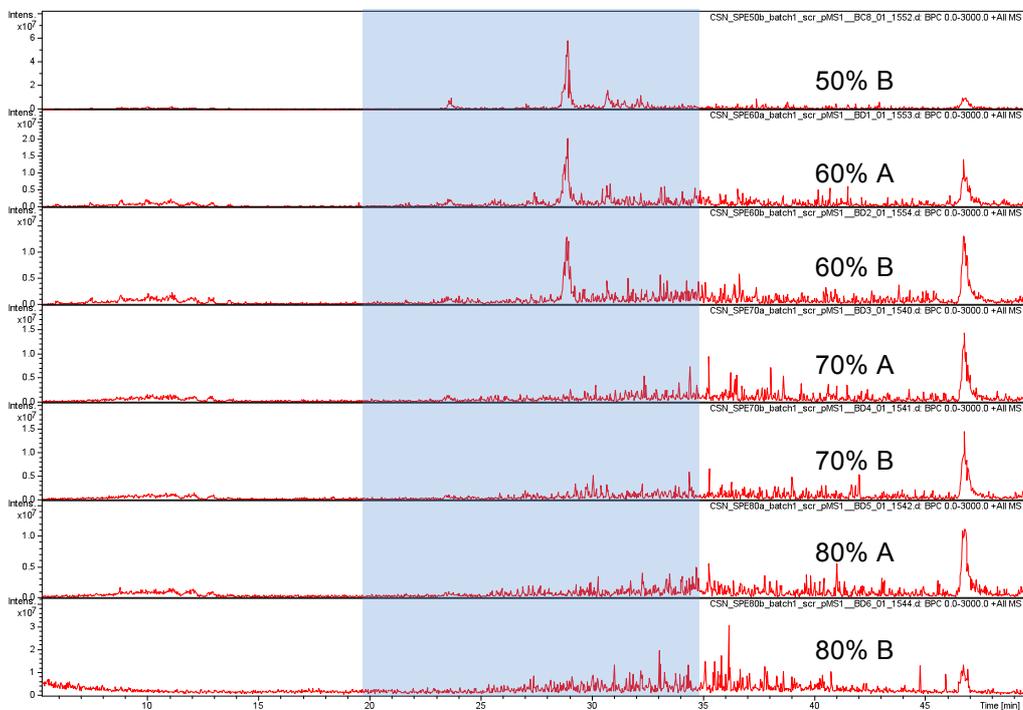


Abbildung 14: Vergleich der HPLC-MS - Chromatogramme (BPC) der Fraktionen 50% B – 80% B (von oben nach unten) von Cortex Sambuci nigrae Methodenparameter siehe S Tab. 15 und 16, S. 42 und 43.

Die Fraktionen 60% A und 60% B enthalten nur noch sehr geringe Konzentrationen der interessanten Inhaltsstoffe, jedoch könnte man diese für weitere Untersuchungen mit der Fraktion 50% B vereinigen, da sie dieselben Peptide enthalten. Die Fraktionen 70% A – 80% B enthalten keine relevanten Mengen an Peptiden mehr, sodass mit diesen Fraktionen auch nicht weitergearbeitet wurde. Eine allfällige Wiederholung dieser Festphasenextraktion könnte somit schon vorzeitig, also nach der Elution mit der Lösungsmittelmischung mit einem Anteil an Acetonitril von 60%, abgebrochen werden.

Eine Auflistung all jener Peptide, die in Cortex Sambuci nigrae gefunden wurden, findet sich in Tabelle 22, die genauen Massen, die Masse-zu-Ladungsverhältnisse der detektierten Peptide und deren ungefähre Retentionszeiten sowie die jeweiligen zur Analytik verwendeten HPLC-MS-Methoden sind in Tabelle I (S. 96 ff.) im Anhang zu finden.

Tabelle 22: Vergleich der in den einzelnen Fraktionen von Cortex Sambuci nigrae enthaltenen Peptide, die mit (x) gekennzeichneten Peptide zeigten lediglich schwache Signale; eine Erläuterung der Nomenklatur findet sich auf S. 58; Details zu m/z-Wert, Molekulargewicht, Retentionszeiten etc. finden sich in Tabelle I (S. 96 ff.) im Anhang.

Fraktion	20% A	20% B	30% A	30%B	40% A	40% B	50% A	50% B	60% A	60% B
Peptid										
Sambucellin 1	(x)	x								
Sambucellin 39			(x)	x	x	x	x	x	(x)	(x)
Sambucellin 44					(x)	(x)				
Sambucellin 6						x	x	x		
Sambucellin 31						x	x	x	x	(x)
Sambucellin 35						x	(x)			
Sambucellin 9							x	x	x	x
Sambucellin 5							x	x	x	x
Sambucellin 7							x	x		
Sambucellin 34							x	(x)		
Sambucellin 13							x	(x)	(x)	

3.3.2.2 Fructus Sambuci nigrae

Für die Auftrennung der einzelnen Peptide in der Frucht von *Sambucus nigra* wurde eine bereits vorher entwickelte SPE-Methode angewendet, bei der der Anteil an Acetonitril, statt wie bei Cortex *Sambuci nigrae* um 10%, lediglich um 4% pro Fraktion erhöht wurde. Dadurch lässt sich eine wesentlich feinere Auftrennung der verschiedenen Peptide erzielen, wie man auch in den Chromatogrammen der einzelnen Fraktionen in den Abbildungen 15-18 erkennen kann. Ein weiterer Unterschied zur Vorgehensweise zu dem aus der Rinde gewonnenen Extrakt ist der Umstand, dass mit jeder Lösungsmittelkonzentration nur einmal eluiert wurde, das Eluat aber in vier gleich große aufeinanderfolgende Fraktionen aufgeteilt wurde, die jeweils mit A - D benannt wurden.

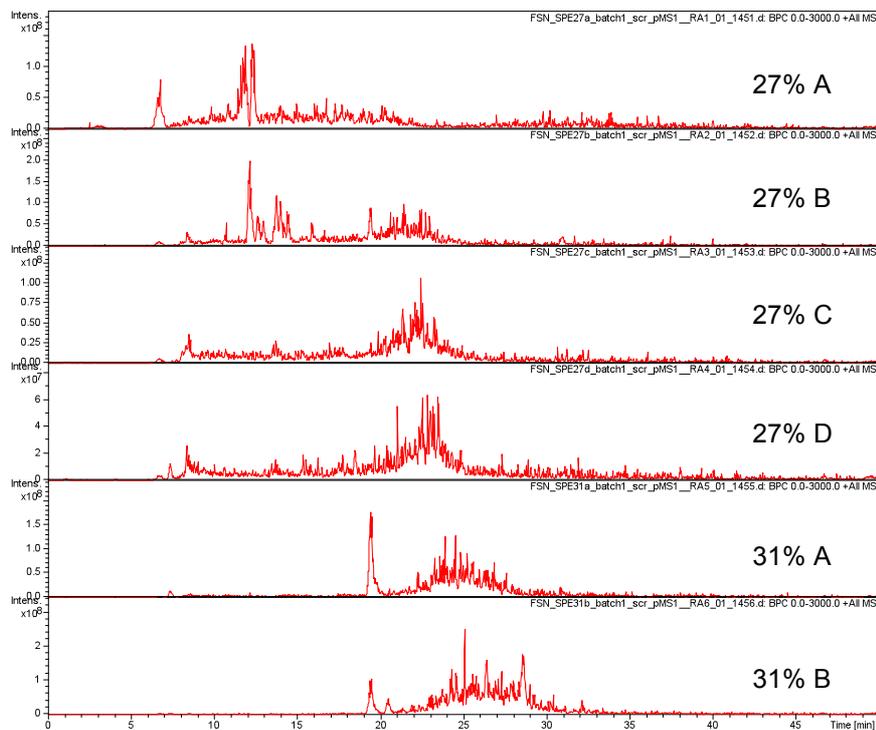


Abbildung 15: Vergleich der HPLC-MS - Chromatogramme (BPC) der Fraktionen 27% A – 31% B von Fructus *Sambuci nigrae* – Parameter laut der Screening Methode scr (siehe Kapitel 2.2.5.1. Tab. 14 und 16, auf S. 41 und 44)

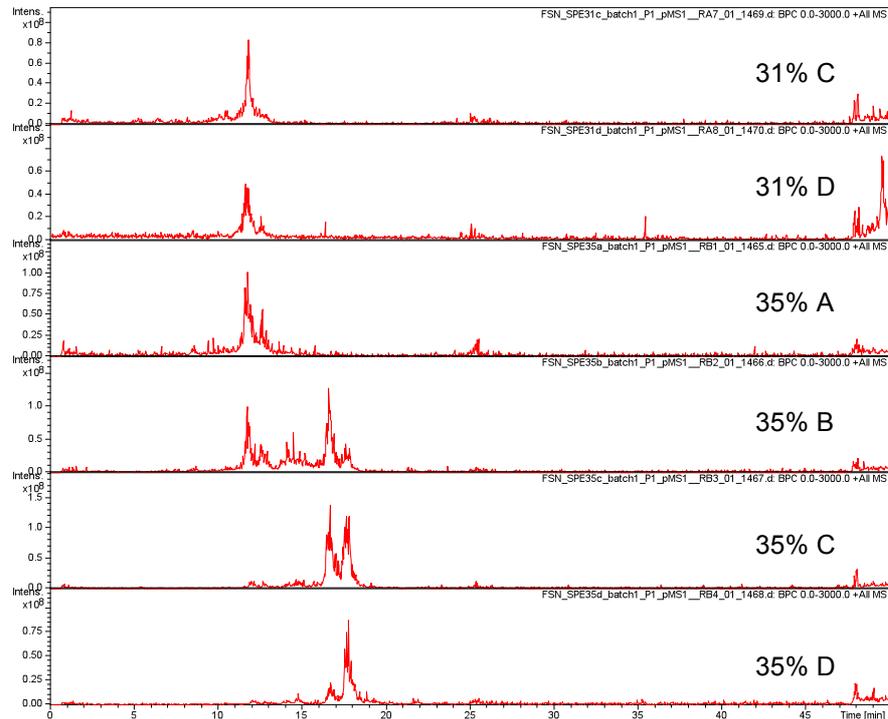


Abbildung 16: Vergleich der HPLC-MS - Chromatogramme (BPC) der Fraktionen 31% C – 35% D von Fructus Sambuci nigrae - Parameter laut der Plantpeptidomics Methode P1 (siehe Kapitel 2.2.5.1. Tab. 15, 16 auf S. 42 und 43)

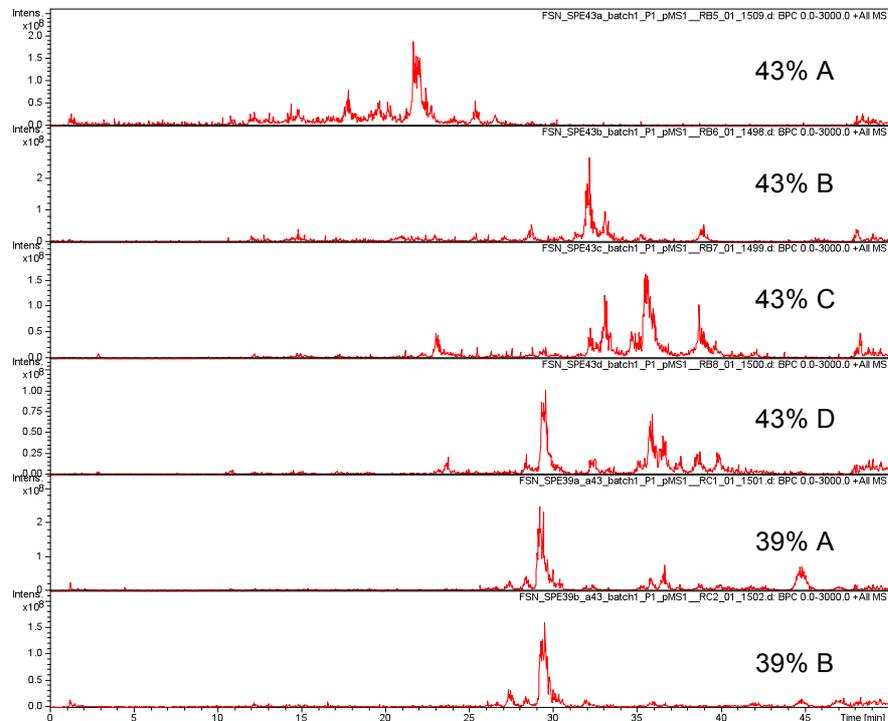


Abbildung 17: Vergleich der HPLC-MS - Chromatogramme (BPC) der Fraktionen 43% A – 39% B von Fructus Sambuci nigrae - Parameter laut der Plantpeptidomics Methode P1 (siehe Kapitel 2.2.5.1, S. 43/44)

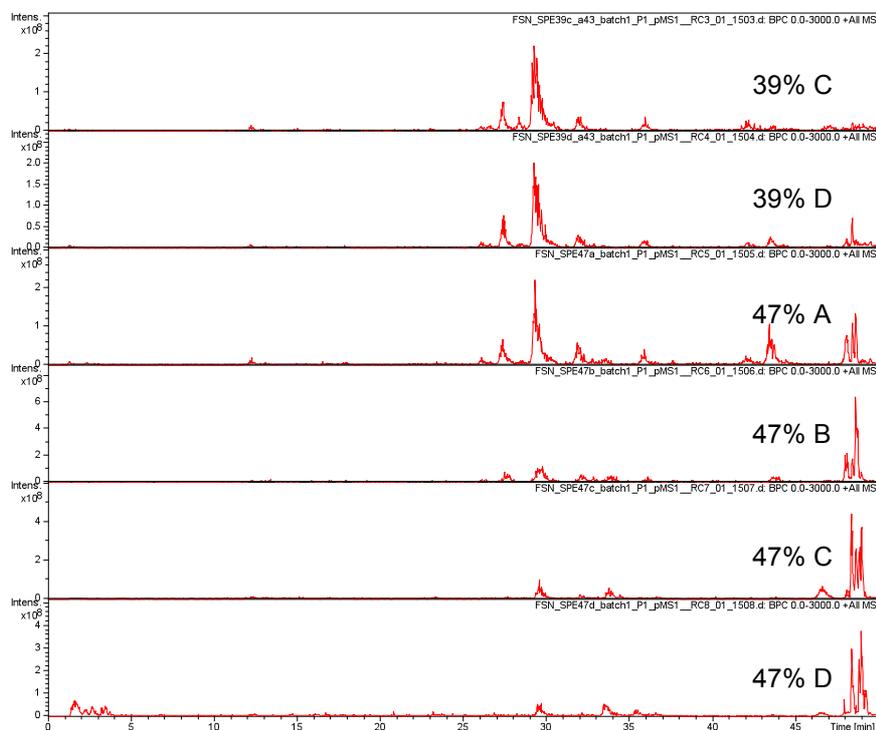


Abbildung 18: Vergleich der HPLC-MS - Chromatogramme (BPC) der Fraktionen 39% C – 47% D von Fructus Sambuci nigrae - Parameter laut der Plantpeptidomics Methode P1 (siehe Kapitel 2.2.5.1, S. 43/44)

Sämtliche Fraktionen wurden mittels HPLC-MS unter Anwendung der Screening Methode scr (s. Tab. 14, S. 41) analysiert. Um eine genauere Auftrennung der Peptide während der Analyse zu ermöglichen, wurden jene Fraktionen, die ein oder mehrere Peptide relativ sauber enthielten (Fraktionen 31% C – 47% D¹¹), nochmals mittels HPLC-MS analysiert, diesmal jedoch unter der Verwendung der Plantpeptidomics Methode P1 (s. Tab. 15, S. 42). Die genauen Parameter der jeweiligen Methoden finden sich in den Kapiteln 2.2.5.1. und 2.2.5.2. Die Anwendung der für die Analyse der Peptide aus Fructus Sambuci nigrae optimierten Methode P1 führte dazu, dass beispielsweise der größte Peak der Fraktion 35% C, welcher unter Verwendung der Screening Methode scr nur als ein einziger Peak zu erkennen war, aufgetrennt werden konnte und die entsprechenden Komponenten, die trotz der gleichen Masse zu verschiedenen Zeiten eluierten, als Isomere identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 19 auf S. 65 und Abbildung 16 auf S. 63).

¹¹ Aufgrund einer Verwechslung der Elutionsmittel während der Festphasenextraktion von Extrakt 1 (siehe Tab. 7, S. 27) erfolgt auch die Auflistung der Fraktionen zwischen 43% A und 39% D nicht in aufsteigender Reihenfolge.

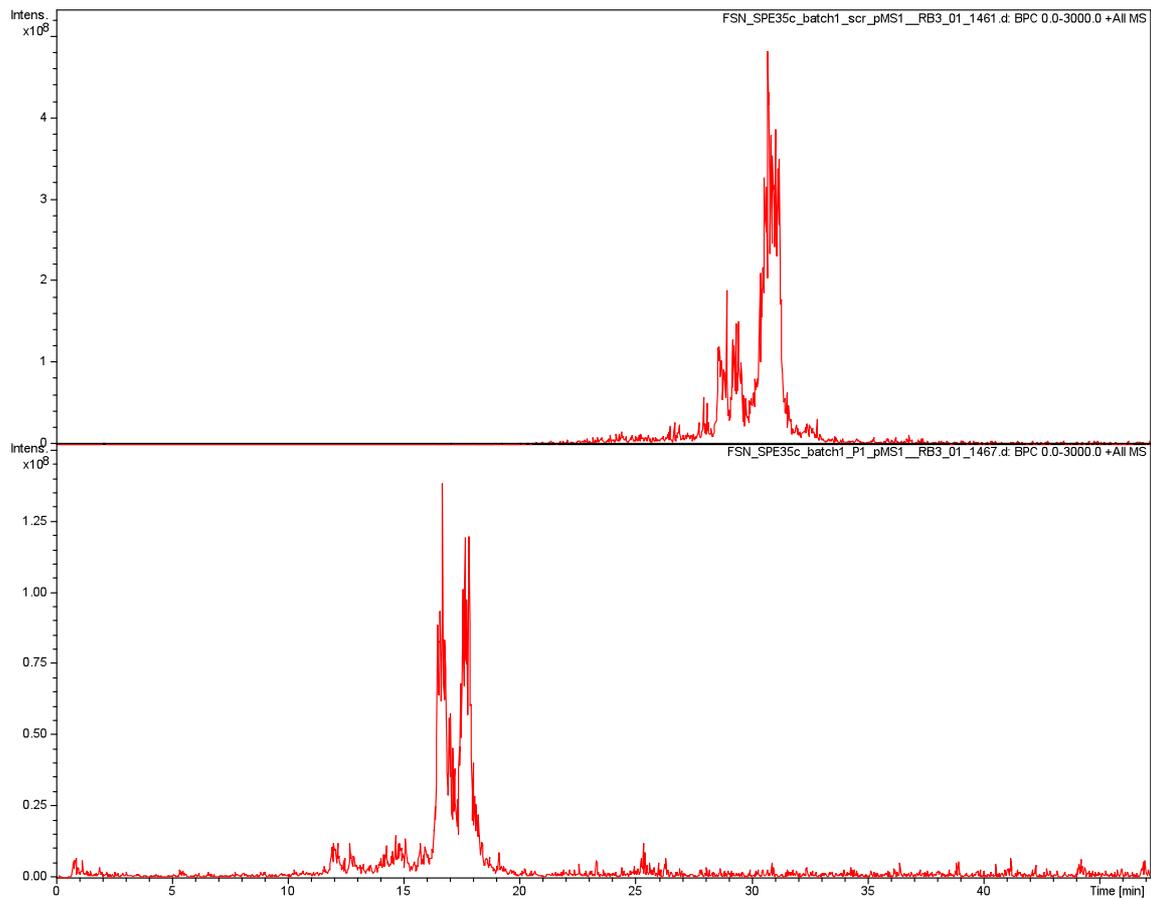


Abbildung 19: Vergleich der HPLC Methoden scr (oben) und P1 (unten) anhand der Fraktion 35% C. Durch die Anwendung der Methode P1 konnte der Hauptpeak aufgetrennt werden und so die Anwesenheit eines Paares von Peptid-Isomeren (Sambucellin 17 und 18) gezeigt werden.

In der folgenden Tabelle 23 findet sich eine Aufschlüsselung aller in den jeweiligen Fraktionen gefundenen Peptide. Die genauen Details, wie beispielsweise Masse-zu-Ladungsverhältnis, Molekulargewicht, Retentionszeit, etc., finden sich in Tabelle I (S. 96 ff.) im Anhang.

Tabelle 23: Auflistung aller in Fructus Sambuci nigrae gefundenen Peptide anhand der Fraktionen, in welchen sie detektiert wurden; Details zu Masse, m/z-Werten, Retentionszeiten etc. finden sich in Tabelle I (S. 96 ff.) im Anhang.

Fraktionen	31% C - 35% A	35% B	35% C	35% D	43% A	43% B	43% C	43% D	39% A - 39% D
Peptid									
Sambucellin 40	x	x	(x)	(x)	(x)				
Sambucellin 45	x	x	(x)						
Sambucellin 43	x	x	(x)						
Sambucellin 47	x								
Sambucellin 46	x	x							
Sambucellin 17		x	x	x	(x)				
Sambucellin 18		x	x	x	x				
Sambucellin 41		x							
Sambucellin 42		x							
Sambucellin 23		x	(x)						
Sambucellin 24		x	(x)						
Sambucellin 14			(x)	(x)	(x)				
Sambucellin 28					x				
Sambucellin 20					x				
Sambucellin 36					x	(x)			
Sambucellin 29					x				
Sambucellin 10						x	x		
Sambucellin 38						x	x	x	(x)
Sambucellin 13						x	x		
Sambucellin 32						x	x		
Sambucellin 8						x			
Sambucellin 26								x	x
Sambucellin 19							(x)	x	x
Sambucellin 16							x	(x)	
Sambucellin 37							x		

Tabelle 23: Fortsetzung von Seite 66

Fraktion	31% C - 35% A	35% B	35% C	35% D	43% A	43% B	43% C	43% D	39% A - 39% D
Peptid									
Sambucellin 4							x		
Sambucellin 15							x	x	x
Sambucellin 2								x	x
Sambucellin 22								x	
Sambucellin 30								x	
Sambucellin 3									x
Sambucellin 27									x

Anschließend wurde mit den peptidreichen Fraktionen noch eine HPLC-ELSD-Messung durchgeführt, um die Reinheit der enthaltenen Peptide zu ermitteln. Diese ergab, wie auch im HPLC-ELSD-Chromatogramm der Fraktion 35% C in Abbildung 20 ersichtlich ist, dass die Peptide nicht nur in relevanten Mengen vorhanden waren, sondern auch, dass sie mit bereits relativ hoher Reinheit vorlagen. Die genauen Methodenparameter werden in Kapitel 2.2.5.1. (Tab. 15, S. 43) näher beschrieben.

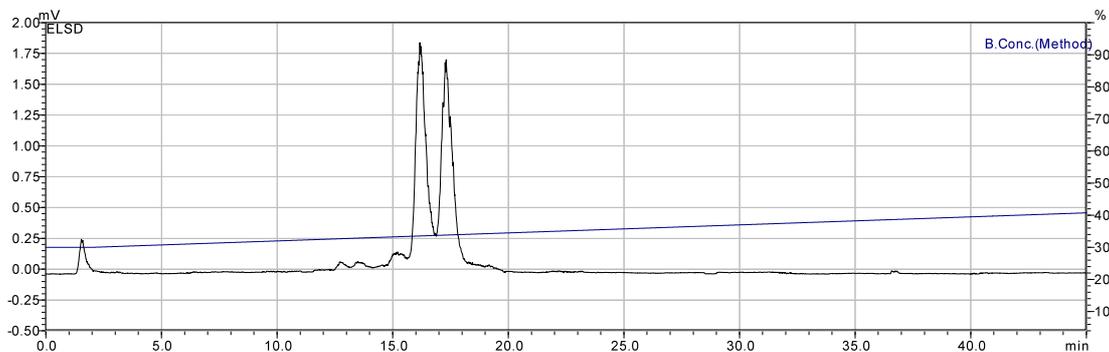


Abbildung 20: HPLC-ELSD-Chromatogramm der Fraktion 35% C von Fructus Sambuci nigrae bestätigt die hohe Reinheit der Peptide, deren Retentionszeiten sich im Bereich von 15-20 Minuten bewegen (vgl. dazu die HPLC-Analyse von Fraktion 35% C (in Abb. 16, S. 64 und Abb. 19, S. 65); die HPLC-Parameter finden sich in Tab. 15 auf S. 42).

Aufgrund der teilweise sehr geringen Mengen an enthaltenen Peptiden der einzelnen Fraktionen wurden jene Fraktionen, welche eine sehr ähnliche Zusammensetzung der Hauptkomponenten

aufwiesen, vor der weiteren Bearbeitung vereinigt bzw. jene, die keine relevanten Mengen an Peptiden enthielten, verworfen.

Dies führte zu einer Vereinigung der Fraktionen 31% C – 35% A und 39% A – 39% D. Die Fraktionen 27% A – 31% B und 51% A – 60% D wurden verworfen. Die Fraktionen 35% C und 35% D wurden trotz der großen Ähnlichkeit nicht vereinigt, da sie jeweils die beiden isomeren Peptide mit einer Masse von 3187,5 Da in unterschiedlichen Mengen enthielten und dieser Umstand ausgenutzt werden kann, um die, in den folgenden Experimenten generierten Spaltpeptide der jeweiligen intakten Isoform zuzuordnen.

Zunächst wurden jedoch alle Fraktionen vor der Weiterverarbeitung mittels Reduktion und Alkylierung getrocknet und bis zur weiteren Bearbeitung bei - 20 °C gelagert.

3.3.3 Reduktion und Alkylierung von Fructus Sambuci nigrae

Alle Fraktionen, die laut HPLC-MS-Analyse nur geringe Mengen an Verunreinigungen und größere Mengen an Peptiden enthielten, nämlich die Fraktionen 31% C – 47% C, wurden zunächst reduziert und anschließend alkyliert. Dies diente dazu, die weitere Aufarbeitung der einzelnen Fraktionen zu erleichtern, da vermutet wurde, dass es sich bei den gefundenen Peptiden um cysteinreiche Peptide handeln könnte, welche aufgrund ihrer Neigung zur Bildung von Disulfidbrücken eine hohe Stabilität aufweisen. Durch Reduktion und somit Spaltung der Disulfidbrücken wird ein nachfolgender Verdau mit Enzymen und eine Fragmentierung im Massenspektrometer, welche schlussendlich für eine Sequenzierung essentiell ist, erheblich erleichtert.

Aus diesem Grund wurden alle zur weiteren Bearbeitung ausgewählten Fraktionen zunächst durch Zugabe von Dithiothreitol reduziert, wobei es zur Öffnung der Disulfidbrücken kommt. Anschließend wurden die nun entstandenen Mercaptogruppen durch Zugabe von Iodacetamid alkyliert, was nicht nur dafür sorgte, dass die sonst sehr reaktiven Mercaptogruppen nicht unkontrolliert mit anderen reaktiven funktionelle Gruppen reagieren konnten, sondern auch, dass sich über eine Zunahme der Masse des Moleküls der positive Ablauf der Reaktion und somit auch das Vorhandensein von Disulfidbrücken mit Hilfe eines Massenspektrometers nachweisen lässt.

Durch die zusätzliche Acetamidgruppe an jeder Mercaptogruppe kommt es zu einer Zunahme des Molekulargewichts eines Peptids um 348 Da, sofern das Molekül drei Disulfidbrücken enthält. Dies wurde mit Hilfe von HPLC-MS-Messungen überprüft und auch bestätigt, wie in Abbildung 21 zu sehen ist: das Molekulargewicht des nativen Peptids mit dem dreifach geladenen Molekulation $[M+3H]^{3+}$ bei einem m/z-Wert von 1113,1 entspricht 3336,3 Da. Das Molekulargewicht des reduzierten und alkylierten Peptids mit dem im Spektrum darunter ersichtlichen Molekulation $[M+3H]^{3+}$ mit dem m/z-Wert von 1229,2 entspricht 3684,6 Da. Die Differenz der beiden ergibt nun

genau 348 Da und somit wurde das Vorhandensein dreier Disulfidbrücken bewiesen. Ein ähnliches Ergebnis erhält man nach der Berechnung der Massendifferenz der Peaks mit den m/z-Werten von 1167,2 und 1283,2. Die zusätzlichen Peaks im m/z-Bereich von 900-1000 nach Reduktion und Alkylierung lassen sich dadurch erklären, dass das Peptid durch die Spaltung der Disulfidbrücken flexibler wird und so mehr Ladungen aufnehmen kann. Die Peaks im m/z-Bereich von 900-1000 zeigen also nicht etwa andere Substanzen, sondern lediglich die $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der gleichen, bereits oben beschriebenen alkylierten Peptide.

Eine Liste der Molekulargewichte der einzelnen Peptide und der nach Reduktion und Alkylierung gefundenen Massenzunahme findet sich in Tabelle I (S. 96 ff.) im Anhang.

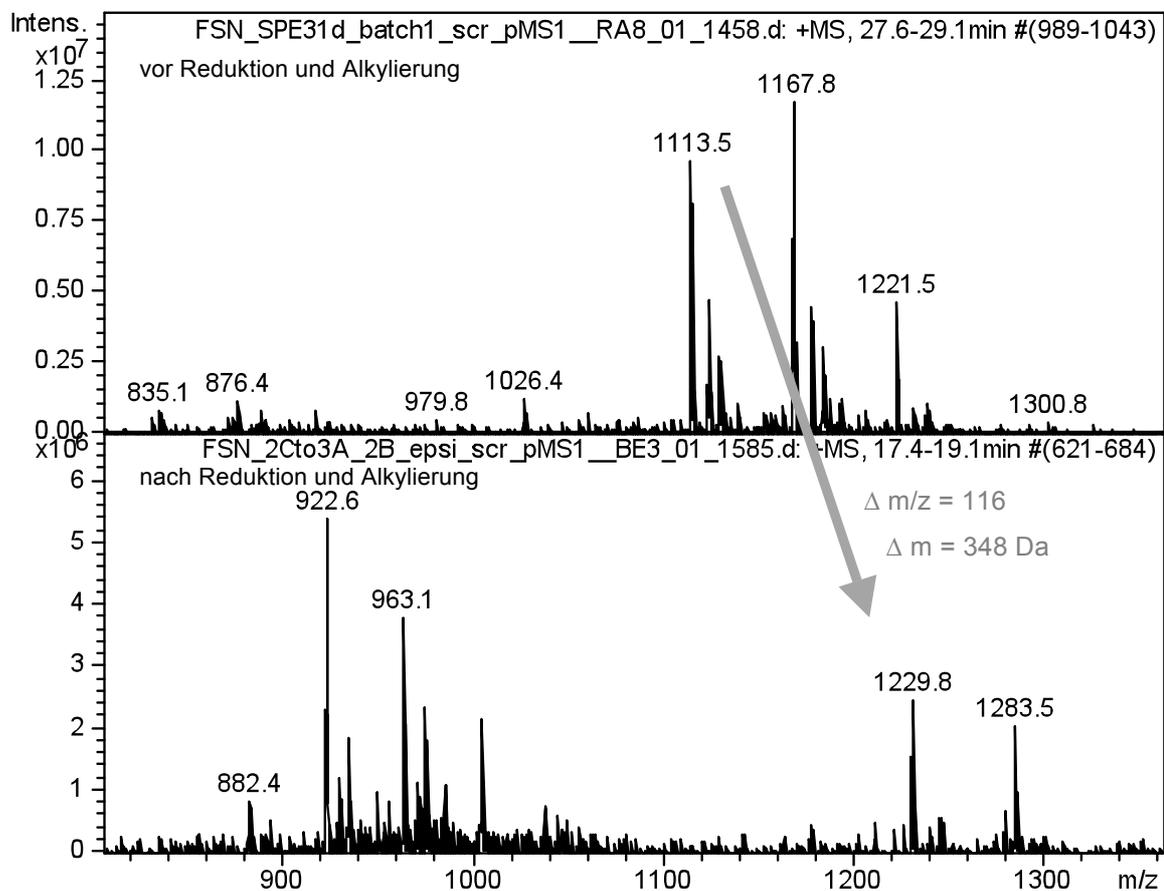


Abbildung 21: Vergleich der MS¹-Spektren vor (oben – Fraktion 31% D) und nach (unten – Fraktion 31% C-35% A) Reduktion und Alkylierung, wodurch eine Zunahme des Molekulargewichts von 348 Da deutlich wird. Die Fraktionen stammen aus der *Sambucus nigra* SPE (s. Tab. 7, S. 28).

Somit konnte nachgewiesen werden, dass alle mit ausreichender Intensität detektierten Peptide tatsächlich drei Disulfidbrücken enthielten. Aufgrund der so vorgenommenen Modifikation der Struktur der Peptide konnte nun mit der enzymatischen Spaltung begonnen werden, um weitere Details der Struktur aufzuklären.

3.3.4 Enzymatische Spaltung der Peptide aus Fructus Sambuci nigrae

Die Spaltung der Peptide mit Hilfe von Enzymen sollte weitreichende Erkenntnisse in Bezug auf den Aufbau der gefundenen Peptide bringen. Da hierbei aber nicht mit reinen Peptiden, sondern jeweils mit Peptidmischungen gearbeitet wurde, stellte das Zusammensetzen der entstandenen Spaltpeptide eine größere Herausforderung dar. Hierbei galt es die, beim Verdau entstandenen, Spaltpeptide so gut es ging wieder zum ursprünglichen Peptid zusammensetzen. Es wurde also von dem Molekulargewicht des „Mutterpeptids“ ausgegangen und berechnet aus welchen der vorhandenen Spaltpeptide man dieses wieder zusammen setzen könnte. Um dieses Problem zu bewältigen und schlussendlich auch die intakten Pflanzenpeptide, und nicht nur die gefundenen Spaltpeptide, sequenzieren zu können, wurden die Peptide mit verschiedenen Enzymen an verschiedenen Stellen im Molekül geschnitten. Dadurch erhält man in der Regel überlappende Spaltpeptide und kann durch einen Vergleich der verschiedenen Sequenzen die Spaltpeptide somit in der richtigen Reihenfolge zusammensetzen. Die genaue Herangehensweise wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.3.4.1 Trypsinverdau der Peptide aus Fructus Sambuci nigrae

Trypsin, eines der am häufigsten in der Peptidanalytik verwendeten Enzyme, war die erste Endopeptidase, die zur Anwendung kam. Die jeweils aufgereinigten, teilweise vereinigten, reduzierten und alkylierten Extrakte (siehe Kapitel 2.2.3.1.) wurden mit dem Enzym versetzt und bei 37° C inkubiert. Die anschließende Analytik mittels LC-MS (Parameter siehe 2.2.5.) ergab, dass der Verdau erfolgreich war. Dies konnte man daran erkennen, dass die Peaks mit den m/z-Werten der „Mutterpeptide“ eine so geringe Intensität aufwiesen, dass sie im Spektrum nahezu nicht mehr sichtbar waren, aber die Anzahl der Peaks bei geringen m/z-Werten, welche den Spaltpeptiden zuzuordnen waren, wesentlich zugenommen hatte. Nun sollten die Spaltpeptide durch Berechnungen zum „Mutterpeptid“ zusammengesetzt werden, was sich allerdings als schwieriger als erwartet darstellte, weil die „Mutterpeptide“ gleich mehrere Male gespalten wurden. In der Folge wurden weitere Experimente gemacht und auch die Methode optimiert, wodurch vier Gründe für die hohe Anzahl an Spaltpeptiden gefunden werden konnten:

Zunächst wurden Trypsin-Autolyse Experimente durchgeführt, bei denen der Verdau wie vorgegeben durchgeführt wurde, jedoch ohne Zugabe von Probe. Dadurch konnten all jene Peaks detektiert werden, die nicht von den in der Probe enthaltenen Spaltpeptiden stammten, sondern von dem

zugewetzten Trypsin und dessen Spaltpeptiden, die aufgrund von Autolyse entstanden waren. Somit konnten jene Spaltpeptide, die nicht von den „Mutterpeptiden“ der Probe stammten, identifiziert und aus den Berechnungen ausgeschlossen werden. Um die Anzahl der Trypsin-Autolyse-Peaks grundsätzlich zu reduzieren wurde bei allen weiteren Verdauen die Trypsinmenge wesentlich reduziert.

Weiters wurde festgestellt, dass Trypsin, trotz der relativ hohen Spezifität, leider nicht nur nach den für dieses Enzym typischen Aminosäuren (Lysin und Arginin) das „Mutterpeptid“ spaltete, sondern auch nach anderen Aminosäuren. Diese nichtspezifischen Enzymaktivitäten hatten zur Folge, dass nicht einfach davon ausgegangen werden konnte, dass am C-Terminus des Spaltpeptids nur ein Lysin oder Arginin stehen konnte, sondern dass eine Spaltung des Mutterpeptids grundsätzlich an jeder Stelle des Peptids möglich war. Eine Abnahme dieser nichtspezifischen Enzymaktivitäten konnte durch eine Reduktion des verwendeten Trypsins auf 10% der ursprünglichen Menge erzielt werden, eine weitere Reduktion der verwendeten Enzymkonzentration oder eine Kürzung der Inkubationszeiten könnten in Zukunft zu einer zusätzlichen Verbesserung beitragen.

Ein weiteres Problem beim Versuch die Spaltpeptide zusammensetzen stellte der Verlust von besonders kleinen Spaltpeptiden durch Reinigung der Probe nach dem Verdau mittels SPE dar. Eigentlich war die SPE nach dem Enzymverdau dazu gedacht, die zuvor zugewetzten Puffersalze abzutrennen, da befürchtet wurde, diese könnten bei der nachfolgenden HPLC-MS Analytik stören. Nun musste aber festgestellt werden, dass nicht nur die Puffersalze abgetrennt wurden, sondern auch kleinere Spaltpeptide, die dann schlussendlich bei den Berechnungen für das Zusammensetzen der Spaltpeptide zu ihren „Mutterpeptiden“ fehlten, und so eine genaue Berechnung unmöglich machten. Deshalb wurde beschlossen die SPE nach dem Enzymverdau (siehe Tab. 5, S. 23) nicht mehr durchzuführen. Wie in Abbildung 22 (S. 72) am Beispiel der Fraktion 31% C – 35% A zu sehen ist, war diese Optimierung von Erfolg gekrönt. Es ist deutlich zu erkennen, dass im Bereich der kürzeren Retentionszeiten eine erhebliche Zunahme der Menge an Spaltpeptiden zu verzeichnen ist. Somit wurde das Zusammensetzen der Spaltpeptide erheblich erleichtert.

Zu guter Letzt gab es noch einen Grund, der das Zusammensetzen der einzelnen Spaltpeptide erheblich erschwerte: In den einzelnen Fraktionen waren häufig nicht nur die in ihrer ursprünglichen Form vorkommenden Peptide enthalten, sondern auch modifizierte Varianten von Peptiden. Da die verwendeten Methoden die Zugabe von Ameisensäure zur Probe erforderten, wurden einige N-formylierte Spaltpeptide gefunden. Auch andere Modifikationen, wie zum Beispiel Acetylierungen, konnten detektiert werden. Diese sind aber eher auf eine biologische Modifikation im Organismus der Pflanze zurückzuführen, als auf eine chemische Modifikation, da im gesamten Prozedere mit keinen Reagenzien gearbeitet wurde, die eine solche Veränderung der chemischen Struktur hätten auslösen können.

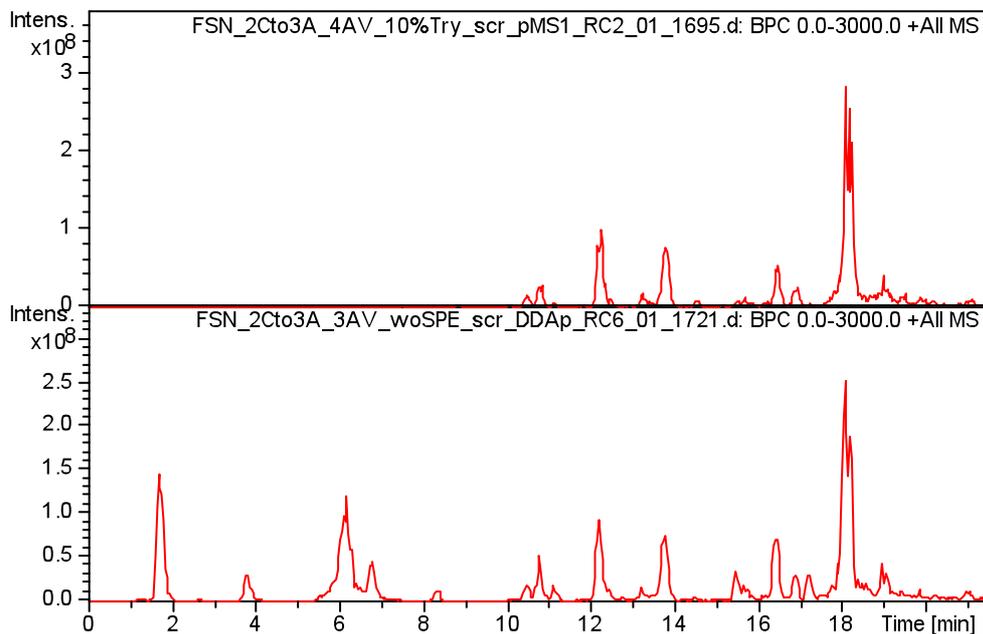


Abbildung 22: Vergleich der Chromatogramme der Fraktion 31% C – 35% A (aus der *Sambucus nigra* SPE, Tab. 7, S. 28, mit und ohne SPE nach Trypsinverdau (von oben nach unten); hier wird deutlich, dass eine Vielzahl an Peptidfragmenten durch die SPE (s. Tab. 4, S. 20) verloren gegangen sind.

Eine Auflistung aller für die Peptidsequenzierung relevanten Spaltpeptide der untersuchten Fraktionen (31% C - 35% A, 35% C und 39% A – D¹²) sowie, sofern bekannt, Aminosäuresequenzen der Spaltpeptide sind in Tabelle II (siehe Anhang, S. 98 ff.) ersichtlich.

¹² Die übrigen Fraktionen (35% B, 35% D, 43% A, 43% B, 43% C, die Fraktionen stammen aus der *Sambucus nigra* SPE Tab. 5, S. 24) des Extrakts 1 wurden an dieser Stelle nicht aufgelistet, da von ihnen lediglich ein Trypsinverdau mit nachfolgender SPE gemacht wurde und die Liste der detektierten Spaltpeptide daher unvollständig ist. Die mit Trypsin verdauten Fraktionen (35% C, 39% B, 39% C, 43% A – 43% B, 43% C – 47% B, die Fraktionen stammen aus der *Sambucus nigra* SPE Tab. 5, S. 24) des Extrakts 5 von der Frucht von *Sambucus nigra* wurden allesamt ohne vorangegangene SPE-Reinigung analysiert, gleichen aber in der Zusammensetzung jener der Extrakt 1 und werden daher an dieser Stelle auch nicht angeführt.

3.3.4.2 Enzymatischer Verdau der *Sambucus nigra* Peptide mittels Glu C

Der Verdau der einzelnen Fraktionen mit Hilfe von Glu C wurde wie in Kapitel 2.2.3.3. beschrieben durchgeführt. Ziel des Verdaus mit einem anderen Enzym als dem zunächst verwendeten Trypsin war es, die überlappenden Spaltpeptide aus Trypsin- und Glu C-Verdau vergleichen zu können, um dadurch festzustellen, wie die einzelnen Spaltpeptide des Peptids zueinanderpassen. Im Gegensatz zu Trypsin, das C-terminal von Arginin und Lysin spaltet, schneidet Glu C bevorzugt C-terminal von Glutaminsäure. Nach der HPLC-MS-Analyse stellte sich jedoch heraus, dass der erste Versuch des Verdaus des Peptids mit Glu C in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (s. Kapitel 2.2.3.3. ab S. 35) zu keiner Peptidspaltung geführt hatte. Daher wurde durch Zugabe von Salzsäure der pH-Wert etwas gesenkt, da er zuvor mit pH 8,6 doch deutlich über dem Idealbereich der Endopeptidase von pH 4 - 7,8 lag, allerdings blieb der gewünschte Erfolg weiterhin aus. Daher wurde beschlossen, den Versuch mit Phosphatpuffer (pH 7,74) als Medium zu wiederholen, da die Endopeptidase unter diesen Bedingungen, statt nur nach Glutaminsäuren, wie es bei Ammoniumhydrogencarbonat als Medium üblich ist, auch nach Asparaginsäuren spaltet. Auch dieser Verdau scheiterte. Aus diesem Grund wurde ein schon vor längerer Zeit hergestellter Extrakt von *Viola odorata* (welcher zunächst wie in Kapitel 2.2.3.1. beschrieben alkyliert und reduziert werden musste) als Positivkontrolle herangezogen, um die Funktionstüchtigkeit des Enzyms zu überprüfen, da von *Viola odorata* bekannt war, dass die enthaltenen Cyclotide durch Glu C gespalten werden können (Göransson et al., 2003, Semper, 2012 und Svängård, et al., 2004).

Nach der HPLC-MS-Messung stellte sich heraus, dass das verwendete Enzym funktionstüchtig war. Demnach konnte man aus den obigen Versuchen schließen, dass die vorliegenden *Sambucus*-Peptide weder Glutaminsäure noch Asparaginsäure enthielten. Daher wurden keine weiteren Versuche mit der Endopeptidase Glu C durchgeführt.

3.3.4.3 Enzymatischer Verdau der Peptide aus *Sambucus nigra* mittels Pepsin

Nachdem der Verdau mit der Endopeptidase Glu C nicht erfolgreich war, wurde beschlossen, ein weniger spezifisches Enzym für einen weiteren Verdau zu nutzen. Pepsin hatte nicht nur den Vorteil, dass es aufgrund seiner geringen Spezifität – es spaltet C-terminal vorwiegend nach hydrophoben und/oder aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, und Leucin, sowie auch Glutaminsäure – die Wahrscheinlichkeit erhöhte, dass die Peptide gespalten werden konnten. Es war auch wesentlich einfacher in der Handhabung als die beiden anderen zuvor verwendeten Enzyme, wie Kapitel 2.2.3.4. zu entnehmen ist, und ermöglichte so ein schnelleres Arbeiten. Um trotz der gerin-

gen Spezifität nicht zu viele Spaltpeptide zu erhalten, wurden die Inkubationszeiten variiert (1, 10, 100, und 1000 Minuten). Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, hatte die Variation der Inkubationszeiten, wie erwartet, Einfluß auf die Menge der Peptide, die gespalten werden konnten. Das Chromatogramm oben zeigt das Ergebnis des Verdaus nach einer Minute Inkubationszeit, das Chromatogramm darunter jenes nach 10 Minuten.

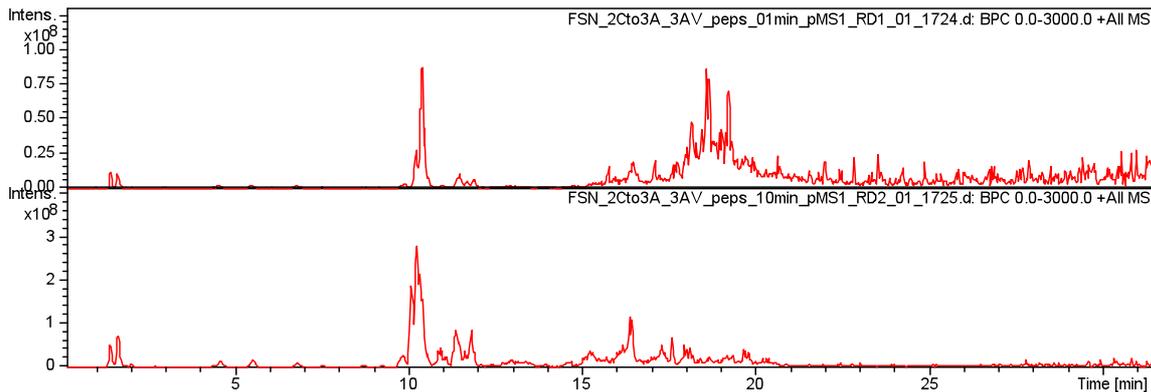


Abbildung 23: Vergleich der Chromatogramme nach Verdau der Fraktion 31% C - 35% A (die Fraktionen stammen aus der Sambucus nigra SPE s. Tab. 5, S. 23) mit Pepsin nach einer Minute (oben) bzw. nach 10 Minuten Inkubationszeit

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Peak mit einer Retentionszeit von 10 Minuten, der mehrere Spaltpeptide repräsentiert, durch die längere Inkubationszeit an Intensität zunimmt, während die Intensität der Peaks mit einer Retentionszeit zwischen 15 und 20 Minuten, entsprechend den intakten Peptiden, abnimmt. Dies zeigt nicht nur, dass mehr Peptide gespalten werden können, je länger die Inkubationszeit ist, sondern auch, dass eine Minute Inkubationszeit nicht ausreicht, um die gesamte Menge an vorhandenem Peptid zu spalten. Eine Auflistung aller nach Verdau mit Pepsin entstandenen peptischen Peptide ist in Tabelle III (siehe Anhang, S. 100 ff.) ersichtlich.

Weiters konnte durch die Spaltung der Isomere Sambucellin 17 und Sambucellin 18 an lediglich einer Stelle im Peptid festgestellt werden, dass sich jene Sequenz, durch die sich die beiden unterscheiden, im Spaltpeptid mit einem m/z-Wert von 675,3 befindet. Dies kann man in den Abbildungen 24 und 25 erkennen kann.

Die beiden Peaks mit den Retentionszeiten zwischen 3 und 5 Minuten (oben) bzw. 5 und 7 Minuten (unten), sind in Abbildung 24 (S. 75) deutlich zu erkennen. Auch hier zeigt ein Vergleich der Inkubationszeiten, dass eine Inkubationsdauer von 10 Minuten eine größere Menge an gespaltenen Peptiden bedingt.

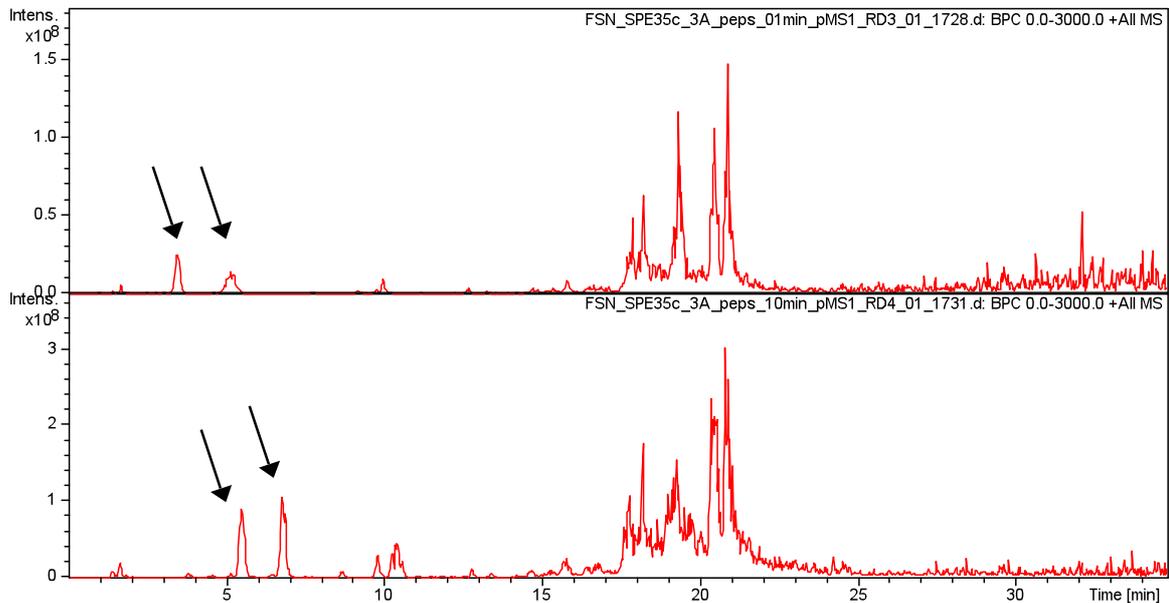


Abbildung 24: Vergleich der Chromatogramme der Fraktion 35% C von Fructus Sambuci nigrae (aus *Sambucus nigra* SPE laut Tab. 7, S. 28) nach Pepsinverdau mit einer Inkubationszeit von einer Minute (oben) und 10 Minuten (unten); deutlich sind die beiden Peaks der Isomere mit einem m/z-Wert von 675,3 zu erkennen (Pfeil). HPLC Parameter laut Tab. 15 S. 42.

Ein Vergleich der Massenspektren der beiden Peaks in Abbildung 25 (nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten) zeigt, dass beide Peaks peptische Spaltpeptide mit einem Molekulargewicht von 674,3 Da entsprechen (PPSNF¹³ 52 und PPSNF 53).

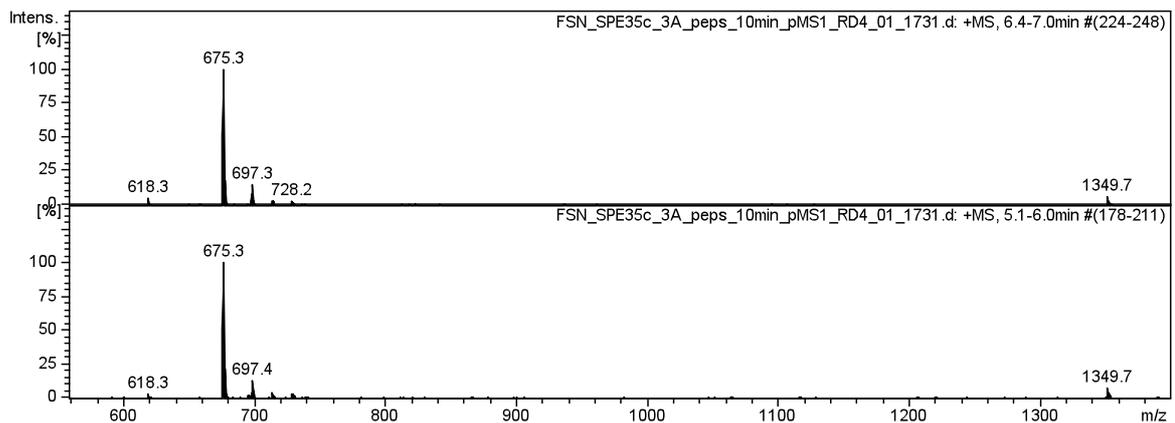


Abbildung 25: Vergleich der Massenspektren der Peaks mit den Retentionszeiten von ungefähr 6,5 Minuten (oben) und 5,5 Minuten (unten) der Fraktion 35% C nach Verdau mit Pepsin und einer Inkubationszeit von 10 Minuten. (MS-Parameter laut Tab. 16, S. 43).

¹³ Die Nomenklatur der Spaltpeptide bezeichnet mit PPSNF alle peptischen Peptide aus Fructus Sambuci nigrae und mit TPSNF alle tryptischen Peptide. Die Nummerierung erfolgte nach aufsteigendem m/z.

Aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten der beiden peptischen Peptide kann davon ausgegangen werden, dass sich Sambucellin 17 und Sambucellin 18 durch ihren Aufbau unterscheiden. Vermutlich liegt der Unterschied den beiden isomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin zu Grunde, die sich aufgrund des gleichen Molekulargewichts im Massenspektrometer nicht unterscheiden lassen, die aber trotzdem, aufgrund der unterschiedlichen Struktur, andere Retentionszeiten aufweisen.

Das Spaltpeptid mit dem m/z-Wert von 675,3 ist also jener Teil des Peptids in dem sich die beiden Peptide Sambucellin 17 und Sambucellin 18 unterscheiden. Das komplementäre Spaltpeptid PPSNF46 das als $[M+3H]^{3+}$ -Ion bei m/z von 960,7, detektiert wurde, entspricht jenem Teil des Peptids, der bei beiden Isomeren identisch ist. Diese Information ist essentiell, um in weiterer Folge bei der Strukturaufklärung dieser Peptide erfolgreich zu sein.

Die jedoch wichtigste Erkenntnis, die aus dem Pepsinverdau gezogen werden konnte, war jene, dass es sich bei den in *Sambucus nigra* gefundenen Peptiden um lineare Peptide handelt. Dies konnte festgestellt werden, da das Peptid lediglich an einer Stelle im Aminosäurerückgrad gespalten wurde und zwei Peptidteile entstanden sind. Hätte es sich um ein Cyclotid oder ein anderes cyclisches Peptid gehandelt, wäre es bei einer Spaltung an nur einer Stelle nur zu einer Ringöffnung gekommen, nicht aber zu einer Bildung von zwei Spaltpeptiden. Mit diesem neuen Wissen vereinfachte sich die Berechnung schlagartig, und es konnten einige Spaltpeptide, die zuvor durch den Verdau mit Trypsin entstanden waren, zusammengesetzt werden, wie in Kapitel 3.3.5. noch beschrieben wird.

Trotz der Linearität der Peptide, die eine Zugehörigkeit zur Gruppe der Cyclotide eigentlich ausschließen würde, geben neuere Forschungsergebnisse von Nguyen, et al. (2012) Anlass zur Hoffnung, dass es sich bei diesen neu entdeckten Peptiden um sogenannte lineare Cyclotide handeln könnte. Diese entsprechen strukturell jenen der „regulären“ Cyclotide, mit der Ausnahme, dass der Mangel zweier Aminosäuren, Glycin am N-Terminus und Asparagin am C-Terminus, dafür sorgt, dass es zu keiner Ringbildung kommt. Das Fehlen dieser Aminosäuren kommt laut Nguyen, et al. (2011) aufgrund einer Punktmutation im Genom zustande. Da diese Forschungsergebnisse sehr neu sind, müssen allerdings noch weitere Untersuchungen folgen, um eine Zugehörigkeit der hier beschriebenen Sambucelline zur Gruppe der linearen Cyclotide zu bestätigen.

3.3.5 Sequenzierung

Nach erfolgreichem Verdau konnte nun mit der Fragmentierung fortgesetzt werden. Zunächst wurden entweder manuell oder automatisch (mit Hilfe der DDA - Data Dependent Acquisition) Spaltpeptide ausgewählt, die fragmentiert werden sollten. Die manuelle Auswahl hatte den Vorteil, dass wirklich nur jene Peptide fragmentiert wurden, die für die weiteren Arbeiten von Interesse waren, von diesen aber Spektren mit höherer Qualität gewonnen werden konnten. Da aber diese Variante sehr zeitaufwändig war, wurde beschlossen, die Auswahl spezialisierter Software zu überlassen. Die Eingabe der Auswahlkriterien für die zu fragmentierenden Peptide, wie zum Beispiel Mindestwerte für die absolute und relative Intensität, benötigte wenig Zeit, sodass die gewonnene Zeit genützt werden konnte, um alle nicht relevanten MSⁿ-Spektren auszusortieren.

Nun konnte man, anhand der Abstände der Peaks in den MSⁿ-Spektren, auf bestimmte Aminosäuresequenzen schließen, da jeweils die Differenz der m/z-Werte zweier Peaks einer Ionenserie der Masse einer abgespaltenen Aminosäure entsprach. Eine genauere Erklärung hierzu findet sich in Kapitel 1.3.2. Die MS²-Spektren jener tryptischen und peptischen Peptide, deren Aminosäuresequenzen zumindest teilweise entschlüsselt werden konnten, sind in den folgenden Abbildungen 26 - 35 zu sehen, wobei die Differenzen der Masse-zu-Ladungsverhältnisse, die jeweils dem Molekulargewicht einer Aminosäure entsprechen, im Einbuchstaben-Code gekennzeichnet sind (Kapitel 8, S. 91). Eine Ausnahme bildet das Cystein, das im Zuge der Alkylierung carbamidomethyliert wurde und daher nicht mit dem eigentlichen, ihm zugewiesenen Buchstaben „C“ benannt wurde. Stattdessen wird die sogenannte residue mass¹⁴ angezeigt, welche nur bei Cystein aufgrund der Addition von 57,1 Da durch die Alkylierung mit einer Acetamidgruppe auf 160,2 Da ansteigt und daher wird das Cystein mit „160,2“ bezeichnet. Zur Bezeichnung wird alternativ auch die Abkürzung „Y-3,0“ verwendet, da die residue mass des alkylierten Cysteins 3 Da geringer ist als die residue mass der Aminosäure Tyrosin.

Weiters gilt es zu beachten, dass sich die Sequenzen der Spaltpeptide nicht nur aus den eigentlichen ribosomalen Aminosäuren zusammensetzen, sondern auch aus deren chemischen Artefakten, wie beispielsweise Pyroglutaminsäure (Glp). Außerdem kam es häufig zu Peakabständen von 91 Da, die zunächst Fragen aufwarfen, sich aber dann auf den Neutralverlust von 2-Mercaptoacetamid aus dem alkylierten Cystein zurückführen ließen.

¹⁴ Residue mass: Entspricht jener Masse, die eine Aminosäure innerhalb eines Peptids einnimmt und ist aufgrund der Amidbindung der Aminosäuren untereinander um 18 Da geringer als das jeweilige Molekulargewicht der freien Aminosäure.

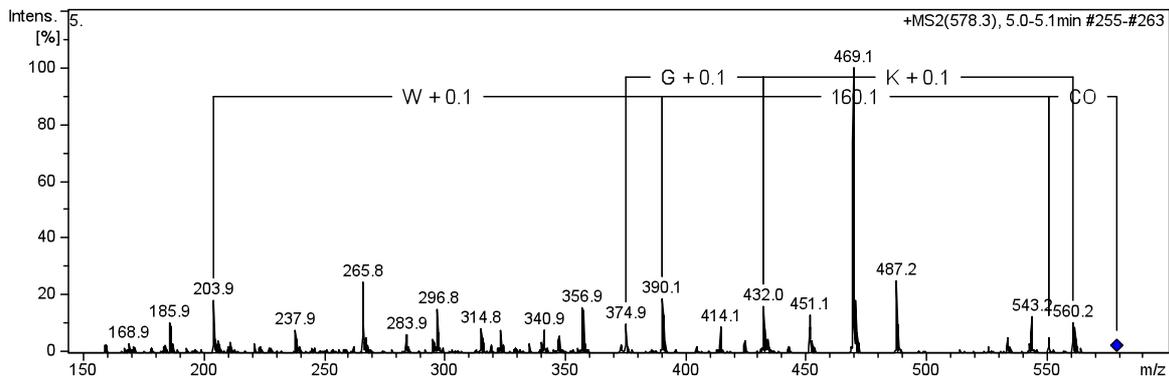


Abbildung 26: MS²-Spektrum des Peptids TPSNF31 mit der Aminosäuresequenz N-Formyl-CWGK¹⁵; die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

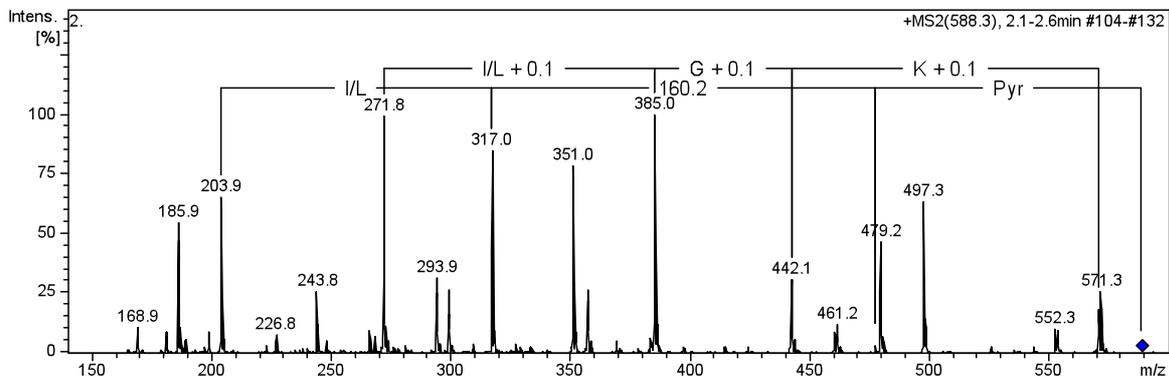


Abbildung 27: MS²-Spektrum des Peptids TPSNF32 mit der Aminosäuresequenz Glp-C[I/L]GK; die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

¹⁵ Da es mit den hierbei verwendeten Methoden, aufgrund ihrer (nahezu) identen Molekulargewichte, nicht möglich ist die Aminosäuren Leucin und Isoleucin bzw. Lysin und Glutamin eindeutig zu unterscheiden, werden immer beide Aminosäuren angeführt und mit der eckigen Klammer gekennzeichnet, da nicht klar ist, welche der beiden Aminosäuren nun wirklich im Peptid vorhanden ist. Es ist jedoch so, dass am C-Terminus eines mit Trypsin gespaltenen Spaltpeptids davon ausgegangen werden kann, dass es sich um ein Lysin und nicht um ein Arginin handelt, da Trypsin relativ spezifisch immer C-terminal von Lysin spaltet. Daher ist das Lysin in dieser Position im Peptid auch nicht in Klammer gesetzt. Eine Ausnahme bildet das in Abb. 35 auf Seite 81 gezeigte Spaltpeptid. Hierbei handelt es sich, wie man an der Nomenklatur "PPSNF" erkennen kann, um ein Peptid, das mit Pepsin gespalten wurde. Dieses ist weitaus weniger spezifisch als Trypsin, daher kann hier keine eindeutige Zuordnung am C-Terminus erfolgen.

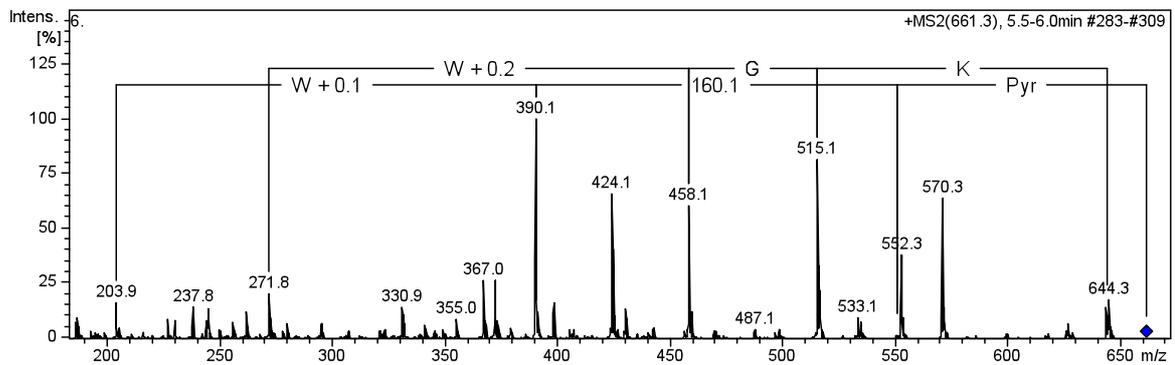


Abbildung 28: MS²-Spektrum des Peptids TPSNF3 mit der Aminosäuresequenz GlpCWGK; das Vorkommen von Tryptophan in diesem Peptid konnte durch das charakteristische UV-Spektrum dieser Aminosäure bestätigt werden. Die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

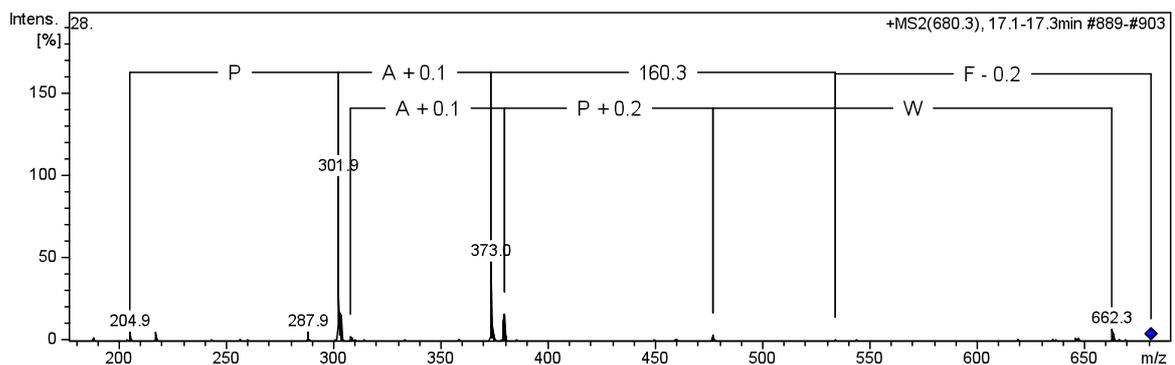


Abbildung 29: MS²-Spektrum des Peptids TPSNF25 mit der Aminosäuresequenz FCAPW; die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

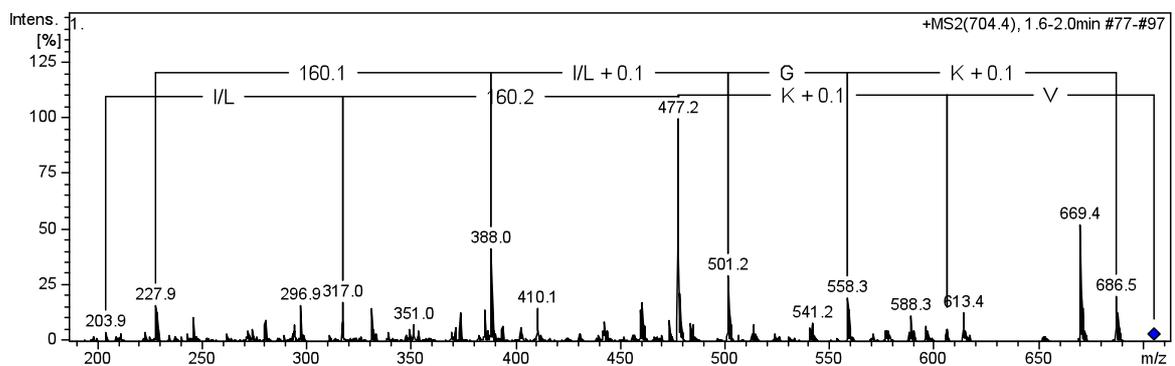


Abbildung 30: MS²-Spektrum des Peptids TPSNF1 mit der Aminosäuresequenz V[Q|K]C[|L]GK; die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

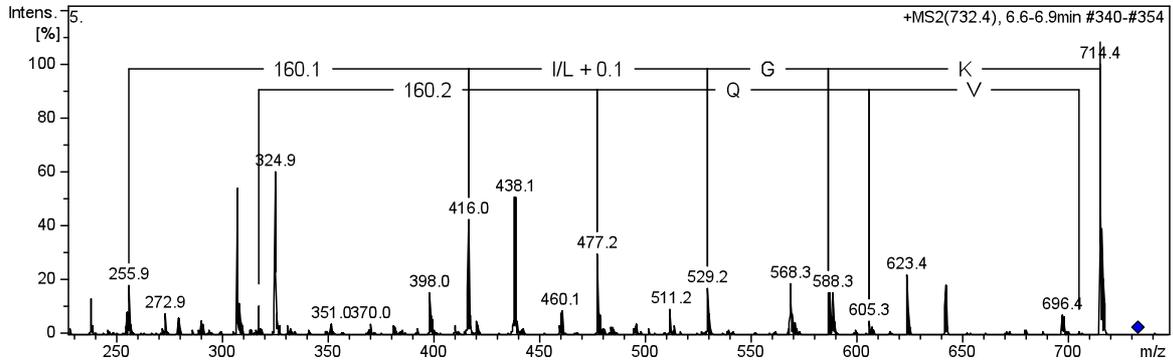


Abbildung 31: MS²-Spektrum des Peptids TPSNF5 mit der Aminosäuresequenz N-Formyl-V[Q|K]C[I|L]GK; die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

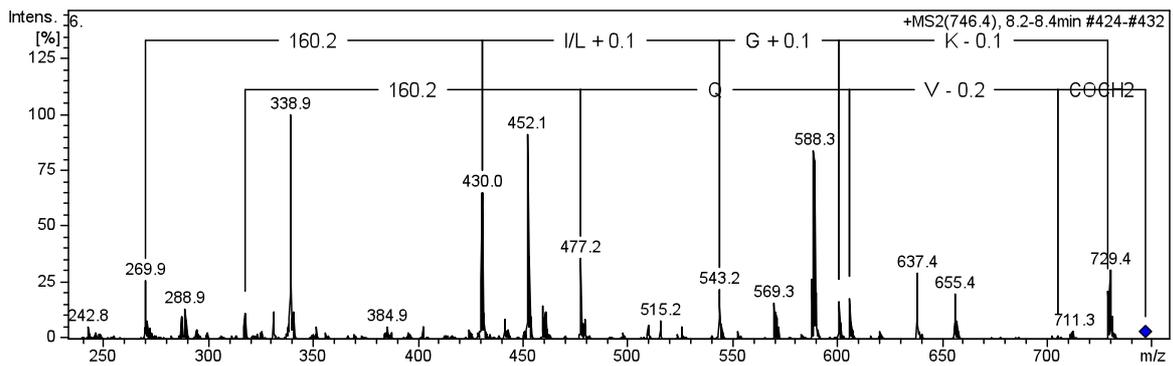


Abbildung 32: MS²-Spektrum des Peptids TPSNF6 mit der Aminosäuresequenz N-Acetyl-V[Q|K]C[I|L]GK; die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

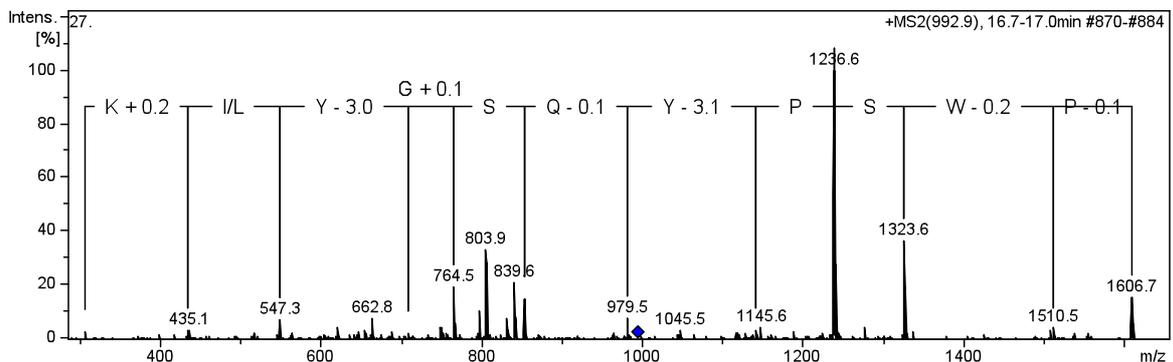


Abbildung 33:
MS²-Spektrum des Peptids TPSNF24 mit der Aminosäureteilsequenz FCAPWSPC[K|Q]SGC[I|L]K; die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

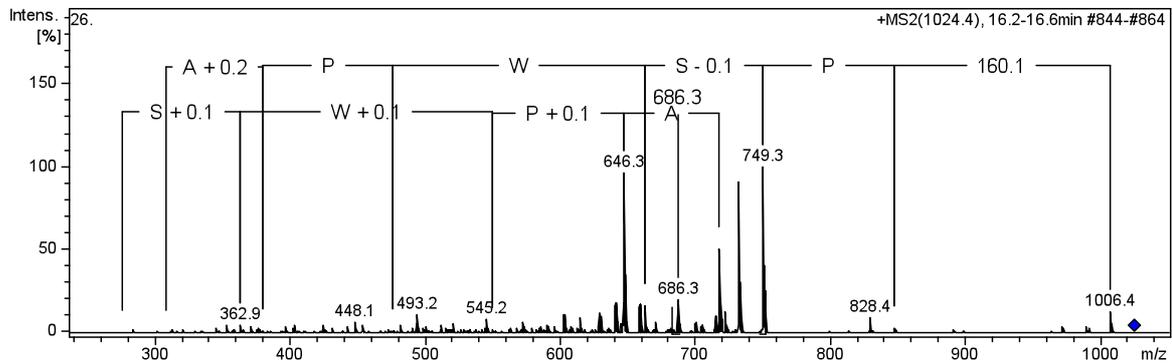


Abbildung 34: MS²-Spektrum des Peptids TPSNF23 mit der Aminosäuresequenz FCAPWSPC; die MS Parameter finden sich in Tab. 16 auf Seite 43.

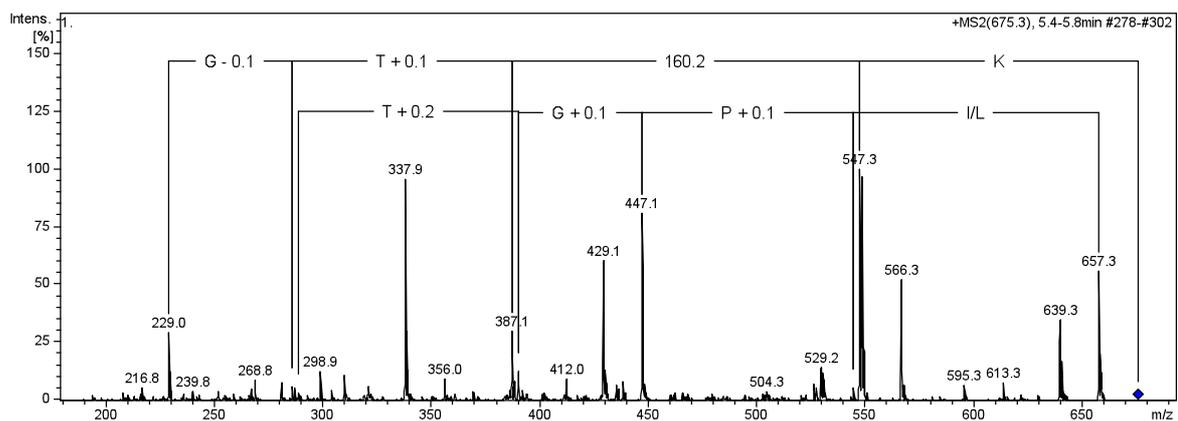


Abbildung 35: MS²-Spektrum des Peptids PPSNF52 mit der Aminosäuresequenz [I|L]PGTC[K|Q], welches dem MS²-Spektrum des Peptides PPSNF53 entspricht, wie auch im Vergleich beider MS²-Spektren in Abbildung 36 zu sehen ist.

Einen Sonderfall stellen die beiden isomeren Peptide Sambucellin 17 und 18 dar. Es konnte mit Hilfe einiger HPLC-MS-Untersuchungen, wie schon in Kapitel 3.3.4.3 (S. 75) zu lesen war, festgestellt werden, dass die peptischen Peptide mit dem m/z-Wert von 675,3 jenen Teil der Peptide enthielten, durch den sich die beiden Isomere unterscheiden. Nach der Aufnahme von MS²-Spektren dieser beiden Spaltpeptide, konnte, wie in Abbildung 35 ersichtlich ist, die Aminosäuresequenz des Peptids PPSNF52 entschlüsselt werden. Ein Vergleich der MS²-Spektren von PPSNF52 und PPSNF53 zeigt, dass PPSNF53 die gleiche Aminosäuresequenz aufweist. Das einzige Differenzierungsmerkmal, mit dem man die unterschiedlichen Retentionszeiten der Isomere begründen könnte, wären die enthaltenen Aminosäuren Leucin bzw. Isoleucin. Mit Hilfe der während dieses Projekts verwendeten Methoden kann aufgrund des gleichen Molekulargewichts der beiden Aminosäuren

ren keine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Aminosäuren erfolgen. Eine mögliche Lösung dieses Problems könnte eine Synthese der sich unterscheidenden Spaltpeptide PPSNF52 und PPSNF53 sein, wobei in dem einen ein Leucin und in dem jeweils anderen Spaltpeptid ein Isoleucin eingebaut werden müsste. Eine nachfolgende Analyse mittels LC-MS könnte eventuell Aufschluss über dieses Problem bringen.

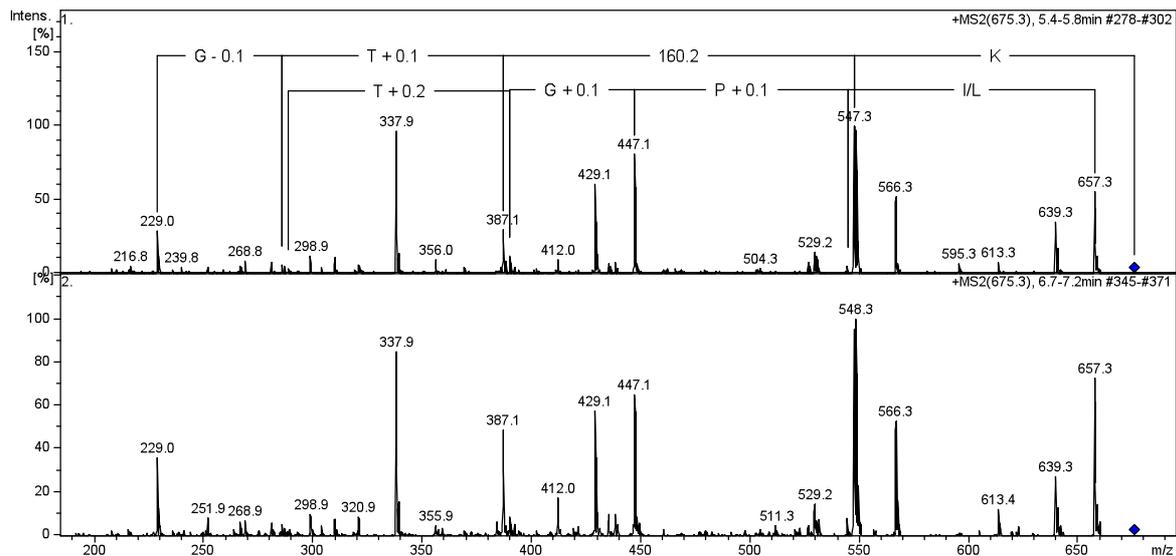


Abbildung 36: Vergleich der MS²-Spektren der Peptide PPSNF52 (oben) mit der Aminosäuresequenz [I|L]PGTCK und dem MS²-Spektrum des Peptides PPSNF53 (unten); MS Parameter laut Tab. 16, S. 43.

Eine Auflistung aller tryptischen und peptischen Peptide, sowie auch jener Peptide die aufgrund von nicht tryptischen Spaltungen entstanden sind, inklusive deren Aminosäuresequenzen, sofern diese entschlüsselt werden konnten, finden sich in den Tabellen 24 bzw. 25. Aufgrund von Berechnungen konnten einige Spaltpeptide als Paare bzw. wiederum als Teil eines größeren Peptidstücks identifiziert werden. Beispielsweise ergeben die Spaltpeptide TPSNF1 und TPSNF29 zusammen – unter Abzug von einem Molekül Wasser, also 18 Da – das „Mutterpeptid“ mit einem Molekulargewicht von 3684,6 Da (siehe auch Abb. 37). Die Spaltpeptide TPSNF8 und TPSNF23 sowie TPSNF10 und TPSNF25, ergeben zusammen, wiederum unter Abzug von einem Molekül Wasser, TPSNF29. (vgl. Schema in Abb. 37 auf S. 84) Jeweils zusammenpassende Spaltpeptide sind in den Tabellen 24 und 25 mit gleichen Zahlen im Feld „Paare“ benannt. Außerdem konnten einige alternative N-Termini entdeckt werden, die sich durch zusätzliche N-Formyl- oder auch Acetylgruppen von ihrem ursprünglichen Peptid unterscheiden und auch in den obengenannten Tabellen angeführt sind. Die N-Formylierung ist vermutlich auf die als Reagens verwendete Ameisensäure zurückzuführen. Die Acetylgruppen lassen sich auf Modifikationen biologischen Ursprungs, wie etwa posttranslationale Modifikationen, zurückführen, da keine Reagenzien zugesetzt wurden, die eine Acetylierung verursachen hätten können.

Um die Teilsequenzen korrekt zusammensetzen zu können, erfolgten weitere Berechnungen, bei denen berücksichtigt werden musste, dass nach jeder Spaltung eines Peptids durch ein Enzym eine Hydroxygruppe an dem einen bzw. ein Wasserstoffatom an dem jeweils anderen Spaltpeptid addiert wird, wodurch sich das Molekulargewicht dieses Spaltpeptids um 17 Da bzw. 1 Da erhöht. Wird jedoch ein Peptid im Massenspektrometer fragmentiert, dann bleibt das Molekulargewicht, trotz der Spaltung in 2 Teile, in Summe gleich hoch.

In den folgenden Abbildungen (37 und 38) sind nun die einzelnen tryptischen bzw. peptischen Peptide dargestellt. Außerdem kann man in diesen erkennen, welche Spaltpeptide zu einem ganzen Peptid zusammengesetzt werden konnten und von welchem ursprünglich isolierten Peptid diese Spaltpeptide stammen. In Abbildung 37 findet sich die Aufschlüsselung des Peptids Sambucellin 40 mit einem m/z-Wert von 1113,1 und dem berechneten Molekulargewicht von 3336,3 Da aus der Fraktion 31% C – 35% A (die Fraktionen stammen aus der *Sambucus nigra* SPE s. Tab. 7, S. 28).

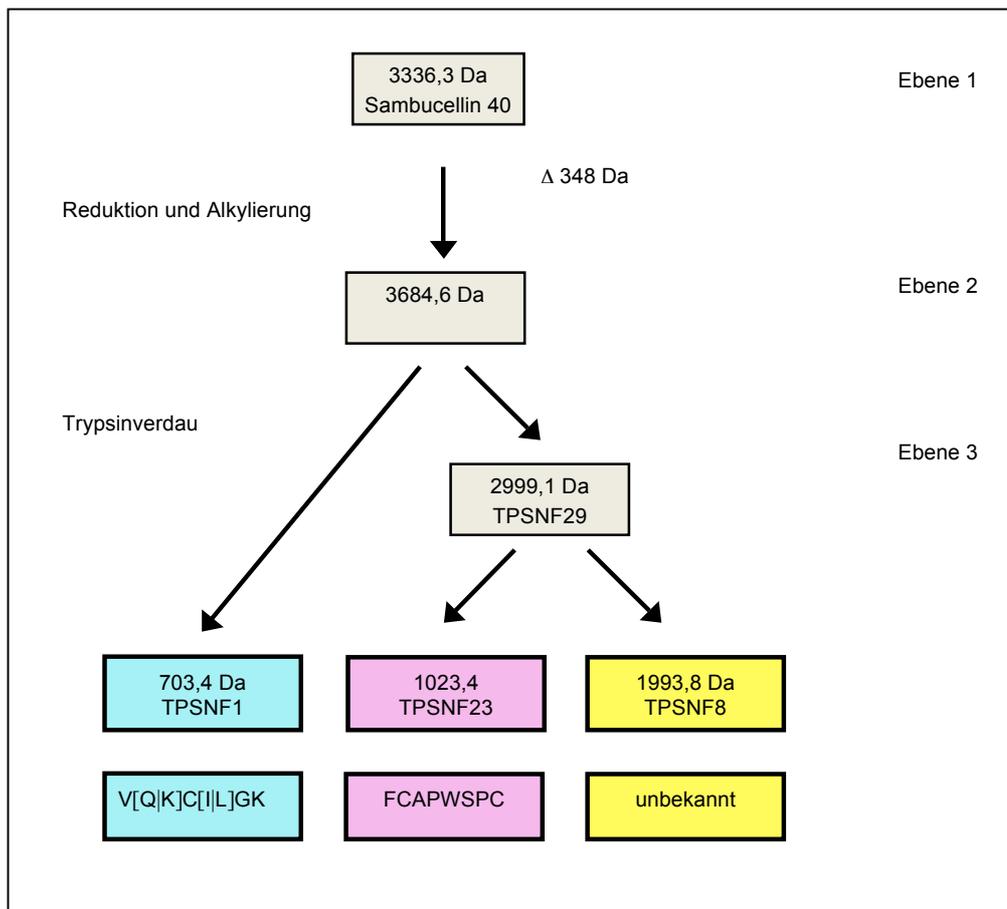


Abbildung 37: Molekulargewicht des Peptids Sambucellin 40 aus Fructus Sambuci nigrae, Molekulargewicht nach Reduktion und Carbamidomethylierung und Aminosäuresequenzen sowie Molekulargewichte der einzelnen tryptischen Spaltpeptide von Sambucellin 40; auf Darstellung von TPSNF 10 und TPSNF 25 wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

In der ersten Ebene sieht man das Molekulargewicht des Peptids Sambucellin 40 in der Form, wie es aus *Fructus Sambuci nigrae* extrahiert wurde. In der zweiten Ebene ist das Molekulargewicht nach Reduktion und Alkylierung dieses Peptids angeführt. Hier ist der Massenzuwachs von 348 Da aufgrund der Carbamidomethylierung von sechs in Disulfidbrücken gebundenen Cysteinen gut zu erkennen. Im nächsten Schritt wurde das Peptid nun mit Trypsin gespalten. Dadurch entstanden aus dem alkylierten Peptid mehrere verschieden große Fragmente, welche in Ebene 3 und der folgenden abgebildet sind. Mit Hilfe von einigen Berechnungen konnte festgestellt werden, dass die Spaltpeptide mit einem Molekulargewicht von 703,4 Da (TPSNF1) und 2999,1 Da (TPSNF29) zusammen das alkylierte Sambucellin 40 ergeben. Die Aminosäuresequenz von TPSNF1 ist in der letzten Zeile dieser Graphik ersichtlich. Während des enzymatischen Verdaus mit Trypsin wurde TPSNF29 allerdings weitergespalten. Von diesen beiden Spaltpeptiden konnte die Sequenz nur von TPSNF23¹⁶ mit einem Molekulargewicht von 1023,4 Da entschlüsselt werden. Zusammen mit dem Spaltpeptid TPSNF8, von dem noch keine eindeutige Sequenz entschlüsselt werden konnte, ergibt TPSNF23¹⁶ also TPSNF29. Schlussendlich lässt sich in der letzten Zeile der Graphik die Aminosäureteilsequenz des Peptids Sambucellin 40 ablesen.

Auch ein Teilstück der Peptide Sambucellin 17 und 18 mit dem m/z -Wert von 1063,5 und einem Molekulargewicht von 3187,5 Da aus der Fraktion 35%C (siehe Tab. 7, S. 28) konnte sequenziert werden (siehe Abb. 38). Hierbei handelt es sich um die beiden Isomere dieser Fraktion, die trotz des gleichen Molekulargewichts unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen. Nach Alkylierung und Reduktion, die Massenzunahme von 348 Da ist in Ebene zwei ersichtlich, wurden die Peptide mit Hilfe von Pepsin in je zwei Spaltpeptide (PPSNF52 bzw. PPSNF53 und PPSNF46) gespalten, von denen jenes mit einem Molekulargewicht von 674,3 Da als das Teilstück identifiziert werden konnte, das für die verschiedenen Retentionszeiten verantwortlich ist, da diese beiden Spaltpeptide trotz gleichen Molekulargewichts, wie bereits in Kapitel 3.3.4.3. (ab S. 74) beschrieben, abermals zu verschiedenen Zeiten eluierten. Die Sequenz des anderen Spaltpeptids PPSNF46 ist für beide Isomere die gleiche.

¹⁶ Hierbei handelt es sich allerdings um eine nichtspezifische Spaltung, da weder C-terminal von Lysin noch von Arginin gespalten wurde.

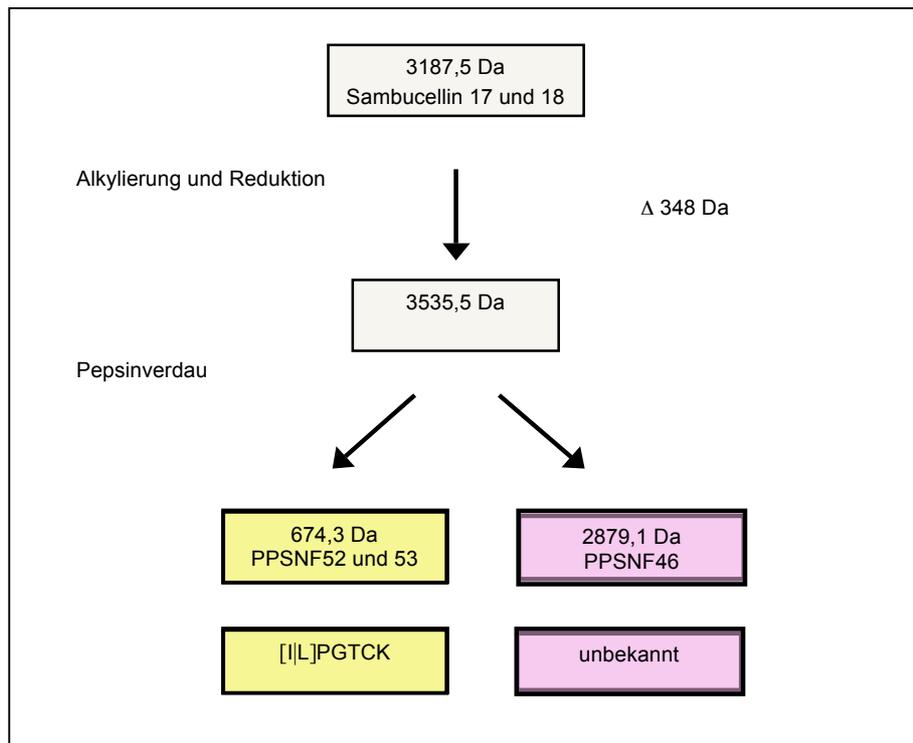


Abbildung 38: Molekulargewichte der isomeren Peptide Sambucellin 17 und 18 aus *Sambucus nigra* vor und nach Reduktion und Carbamidomethylierung und das Molekulargewicht der zwei peptischen Peptide. Außerdem ist die Aminosäuresequenz der isomeren Spaltpeptide PPSNF52 und PPSNF53 ersichtlich.

Die Aminosäuresequenz dieser Isomere konnte entschlüsselt werden und zeigt, dass dieses Peptidteilstück ein Isoleucin bzw. Leucin enthält. Da diese beiden Aminosäuren ein exakt gleiches Molekulargewicht haben, sind sie mit einem Massenspektrometer – zumindest mit der in diesem Projekt angewandten Methode – nicht unterscheidbar. Daher ist davon auszugehen, dass das eine Isomer ein Leucin und das andere ein Isoleucin enthält und aus diesem Grund ein Unterschied in den Retentionszeiten entstanden ist. Zukünftig sollten also noch weitere Experimente durchgeführt werden, um diese Theorie zu bestätigen. Hierzu könnte man beispielsweise die Spaltpeptide PPSNF52 und PPSNF53 synthetisieren lassen, das eine mit einem Leucin, das andere mit einem Isoleucin und anschließend die Retentionszeiten bzw. die MSⁿ-Spektren mit jenen die im Rahmen dieses Projekts aufgenommen wurden vergleichen. Somit könnte die „Leucin/Isoeucin-Hypothese“ relativ einfach bestätigt, oder auch widerlegt werden.

4. Diskussion

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Peptide als Sekundärmetaboliten zwar selten, aber dafür in den verschiedensten Pflanzenfamilien vorkommen und sich daher eine wie in diesem Falle einfache und schnelle Methode für das Screening einer Vielfalt an Pflanzen durchaus lohnt. Außerdem sind nur geringe Probenmengen nötig, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, was besonders bei der Analytik der Flechten von Vorteil war, da hier wenig Probenmaterial zur Verfügung stand.

Die Gruppe der Kryptogamen war auch jene, in der der höchste Anteil an peptidhaltigen Proben gefunden wurde. Um jedoch alle Messergebnisse vollständig auswerten zu können, müssten die verwendeten Methoden speziell auf diese Gruppe angepasst werden. Eine Optimierung der Methode könnte hier eine einfachere Auswertung der Daten ermöglichen. Da der Anteil der peptidhaltigen Individuen in dieser Gruppe sehr hoch zu sein scheint, sollte auf jeden Fall auf diesem Gebiet weitergearbeitet werden, auch, weil Flechten immer häufiger Ausgangspunkt für die pharmazeutische Forschung werden, da viele Aspekte dieser Gruppe von Symbionten noch nicht gut untersucht sind und sich dieser Bereich zur Entdeckung neuer Ausgangsverbindungen für Arzneistoffe geradezu anbietet.

Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurde während dieses Projekts nur mit getrocknetem Pflanzenmaterial gearbeitet. Für eine Fortsetzung der Arbeit wäre es eventuell von Vorteil, auch mit frischem Pflanzenmaterial zu arbeiten, da es, wie unter anderem bei Nguyen et al. (2011) gezeigt wurde, durch zu langes Trocknen und dem daraus resultierenden Einfluss der Exopeptidasen der Pflanze auf die Peptide durchaus zu einer Veränderung der Struktur der pflanzlichen Peptide kommen kann. Ein Vergleich der Peptidverteilung von frischem und getrocknetem Pflanzenmaterial könnte also neue und interessante Erkenntnisse bringen. Weiters können Zyklisierungen von Glutaminsäure zu Pyroglutaminsäure und die Oxidation verschiedener Teile des Peptids (Nguyen, et al. 2011) durch bestimmte Reaktionsbedingungen begünstigt werden. Dies könnte auch eine Erklärung für die vielen alternativen N-Termini sein, die in den untersuchten Proben gefunden wurden.

Ein Vergleich der einzelnen Pflanzenteile von *Sambucus nigra* brachte die Erkenntnis, dass sich in sämtlichen untersuchten Organen Peptide befinden, jedoch unterscheidet sich die Zusammensetzung der Peptide der Rinde von jener der anderen Pflanzenteile. Die nachfolgenden Untersuchungen ergaben, dass der Extrakt der Rinde relevante Mengen an Peptiden enthält, jedoch müsste der Lösungsmittelgradient der Festphasenextraktion, die zur Auftrennung des Extraktes verwendet wurde, an das neue Substanzgemisch angepasst und, um die Ausbeuten zu erhöhen, auch hochskaliert werden. Aufgrund der dadurch größeren zur Verfügung stehenden Probenmenge könnten dann verschiedene Enzymverdaue durchgeführt werden, um die ideale Enzymkonzentration und Inkubationsdauer zu ermitteln, die schlussendlich zu einer Vereinfachung der Sequenzierung der in der Rinde enthaltenen Peptide führen sollte.

Auch an der weiteren Sequenzierung der in Fructus Sambuci nigrae enthaltenen Peptide sollte gearbeitet werden, da eine Charakterisierung des Aufbaus dieser Peptide vorgenommen werden konnte. Zunächst wurde angenommen es könne sich bei den in der Frucht von *Sambucus nigra* enthaltenen Peptiden um Cyclotide handeln. Dies wurde allerdings widerlegt, da herausgefunden wurde, dass die enthaltenen Peptide linear sind. Weiters wurde bekannt, dass die Peptide ein Molekulargewicht von ungefähr 3000 Da haben und die sechs vorhandenen Cysteine über drei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Der grundsätzliche Aufbau dieser Peptide konnte also charakterisiert werden, sodass einer weiteren Sequenzierung dieser Peptide nichts im Wege stehen sollte.

In weiterer Zukunft müssten natürlich pharmakologische Untersuchungen über die möglichen Wirkungen der entdeckten Peptide angestellt werden, um festzustellen, ob die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur biologische, sondern auch pharmazeutische Relevanz haben.

5. Zusammenfassung

Pflanzliche Peptide sind als Ausgangssubstanzen für die Arzneistoffentwicklung von großer Bedeutung. In der Pflanze selbst sind sie wichtige Bestandteile der Abwehr gegen Mikroorganismen und Herbivore, in der pharmazeutischen Forschung sind sie aufgrund ihrer antiviralen, anti-HIV und antibakteriellen Wirkung Hoffnungsträger für die Entwicklung neuer antibiotischer Arzneistoffe. Daher wurden zunächst 32 verschiedene Pflanzen und Flechten einem Screening auf Peptide unterzogen, von denen *Citrus aurantium ssp. aurantium*, *Lobaria scrobiculata* und *Lasallia pustulata* zusätzlich zu dem in der Literatur als peptidhaltig bekannten *Sambucus nigra* als peptidhaltig identifiziert werden konnten. Durch genauere Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die in *Lobaria scrobiculata* enthaltenen Peptide nicht cysteinhaltig sind, und dass die in *Citrus aurantium ssp. aurantium* detektierten Peptide bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht näher beschrieben wurden.

Die Analytik von *Sambucus nigra*, einer Pflanze, die nicht nur in der Volksmedizin relevant, sondern auch von pharmazeutischem Interesse ist, baute auf den Ergebnissen der Arbeit von Birgit Semper (2012) auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Sambucus nigra* in Früchten, Blüten, Blättern und der Rinde cysteinhaltige, lineare Peptide enthält, welche teilweise mit Hilfe der LC-MS sequenziert werden konnten. Diese ermittelten Teilsequenzen und auch die Methodenoptimierung die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen wurde, bilden einen guten Ausgangspunkt für weiterführende Arbeiten zu diesem Thema.

Es wurden wertvolle Grundlagen für weitere Forschungen auf dem Gebiet der pflanzlichen Peptide, insbesondere in Bezug auf *Sambucus nigra*, geschaffen.

6. Abstract

Plant peptides are of significant importance to their producers. They are part of the plants' defence mechanisms against invading microorganisms and herbivores. Plant peptides are also of interest to pharmaceutical research. They are claimed to have antiviral, anti-HIV and antibacterial properties and might be one of the answers to the growing problem of antibiotic resistance.

During this project, 32 plants and lichen were screened for peptides. In *Citrus aurantium ssp. aurantium*, *Lobaria scrobiculata* and *Lasallia pustulata*, different kinds of peptides were discovered. The peptides found in *Lobaria scrobiculata* were characterised as peptides which do not contain cysteins and the peptides which were found in *Citrus aurantium ssp. aurantium* have not been described by any other research group before.

In *Sambucus nigra*, a very important plant in traditional European medicine, plant peptides have already been discovered by Birgit Semper (2012). These peptides were analysed by LC-MS and characterised as linear cystein-rich peptides. Also the methods used were further optimised to enable better LC-MS results.

All in all the results of this thesis give important information for the ongoing research in plant peptides, especially with regard to *Sambucus nigra*.

7. Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielles Protein
BPC.....	Base-Peak-Chromatogram
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
ESI	Electrosprayionisation
Glp.....	Pyroglutaminsäure
HCOOH	Ameisensäure
HIV.....	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSV.....	<i>Herpes simplex</i> Virus
LC	Liquid Chromatography
LDL	Low Density Lipoprotein
LCMS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LTP	Lipid-Transfer-Protein
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Mass Spectrometry
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natronlauge
P1	Plantpeptidomics 1 Methode
redest.	redestilliert
RP-Material	Reversed Phase Material
scr	Screening-Methode
sp.	Spezies
SPE	Solid Phase Extraction
ssp.	Subspezies
TPCK.....	N- <i>p</i> -Tosyl-L-Phenylalanin Chloromethyl-Keton
t _R	Retentionszeit

8. Verzeichnis des Einbuchstaben-Codes von Aminosäuren

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

9. Literaturverzeichnis

Atkinson, Mark D., und Atkinson, Elaine. „Biological Flora of the British Isles - *Sambucus nigra* L.“ *Journal of Ecology*, 90, 2002: 895–923.

Barak, Vivian; Halperin, Tal und Kalickman, Inna. „The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of human cytokines: I. Inflammatory cytokines.“ *European Cytokine Network*, 2001: 290-296.

Bruker Daltonik, . *Esquire HCT Series User Manual*. Bd. 1. Bremen: Bruker Daltonik GmbH, 2008.

Budzikiewicz, Herbert, und Schäfer, Mathias. *Massenspektrometrie - Eine Einführung*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2005.

Burman, Robert; Gruber, Christian; Rizzardi, Kristina; Herrmann, Anders; Craik, David; Gupta, Mahabir und Göransson, Ulf. „Cyclotide proteins and precursors from the genus *Gloeospermum*: Filling a blank spot in the cyclotide map of Violaceae.“ *Phytochemistry*, 71, 2009: 13-20.

Cannon, Paul F. und Kirk, Paul M. *Fungal Families of the World*. Egham: CAB International, 2007.

Colgrave, Michelle; Poth, Aaron; Kass, Quentin und Craik, David. „A New "Era" for Cyclotide Sequencing.“ *PeptideScience* 94, 5, 2010.

Craik, David J; Cemazar, Masa und Daly, Norelle L. „The chemistry and biology of cyclotides.“ *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2007: 176-184.

Craik, DJ. „Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins .“ *Toxicon*, 39, 12, 2001: 1809-1813.

Farrokhi, Naser; Whitelegge, Julian P.; Brusslan, Judy A. „Plant peptides and peptidomics.“ *Plant Biotechnology Journal*, 6, 2008: 105-134.

Fischer, Manfred A.; Oswald, Karl; Adler, Wolfgang. *Exkursionsflora für Österreich, Liechtenstein und Südtirol*. Linz: Land Oberösterreich, Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen, 2008.

Göransson, Ulf; Broussalis, Adriana und Claeson, Per. „Expression of Viola cyclotides by liquid chromatography-mass spectrometry and tandem mass spectrometry sequencing of intercysteine loops after introduction of charges and cleavage sites by aminomethylation.“ *Analytical Biochemistry*, 318, 2003: 107-117.

Gross, Jürgen H. *Mass Spectrometry - A Textbook*. Berlin: Springer-Verlag, 2004.

Gruber, Christian W. und O'Brien, Margaret. „Uterotonic Plants an their Bioactive Constituents.“ *Planta Medica*, 2010.

Hearst, Caroline, et al. „Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens.“ *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 17, 2010: 1805-1809.

Hemgesberg, Hanspeter. *Natürlich gesund mit Holunder*. Augsburg: Midena Verlag, 1998.

Hunnus. *Pharmazeutisches Wörterbuch*. Berlin: Hermann P.T. Ammon, 2004.

Lehmann, Wolf D. *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1996.

MLUHW: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Naturwissenschaftliche Fakultät I -
Biowissenschaften Institut für Pharmazie
<http://pharmtech.pharmazie.uni-halle.de/english/ag-biopharm/elastin-methoden.htm>
(Zugriff am 24. September 2012).

Masclef, A. *Atlas des plantes de France*. 1891.

Nash, Thomas H. *Lichen Biology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

Nguyen, Giang Kien Truc; Zhang, Sen; Wang, Wei; Wong, Clarence Tsun Ting, Nguyen, Nghan Thi Kim und Tam, James P. „Novel Cyclotides and Uncyclotides with Highly Shortened Precursors from *Chassalia chartacea* and Effects of Methionine Oxidation on Bioactivities.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 2012: 17598-17607.

Nguyen, Giang Kien Truc; Lim, Han Wei; Nguyen, Phuong Quoc Thuc und Tam, James P. „Discovery of a Linear Cyclotide from the Bracelet Subfamily and Its Disulfide Mapping by Top-down Mass Spectrometry.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 52, 2011: 44833-44844.

PhytAMP. *PhytAMP Database*. 2012. <http://phytamp.pfba-lab-tun.org/main.php>
(Zugriff am 13. September 2012)

PLANTS Database. United States Department of Agriculture - Natural Resources Conservation Service. <http://plants.usda.gov/java/>
(Zugriff am 11. September 2012).

Poth, Aaron; Colgrave, Michelle; Philip, Reynold; Kerenga, Bomai; Daly, Norelle; Anderson, Marilyn und Craik, David „Discovery of Cyclotides in the Fabaceae Plant Family Provides New Insights into the Cyclization, Evolution, and Distribution of Circular Proteins.“ *ACS Chemical Biology*, 6, 2011: 345-355.

Reichholf, Josef H.; Steinbach, Gunter; (Hrsg.) *Die große Bertelsmann Lexikothek - Naturenzyklopädie Europas*. Bd. 10. 12 Bde. München: Mosaik-Verlag GmbH, 1997.

Sambucol® Black Elderberry Extract. <http://www.sambucol.com/> (Zugriff am 26. September 2012).

Sauermost, Rolf (Hrsg.) *Herder - Lexikon der Biologie*. Bd. 3. 9 Bde. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1994.

Schröder, Ernst. *Massenspektrometrie - Begriffe und Definitionen*. Berlin: Springer-Verlag, 1991.

Semper, Birgit. *Phytochemisches Screening auf Pflanzenpeptide in ausgewählten Drogen*. Wien, 2012.

Stapper, Norbert J. und Kricke, Randolph. „Epiphytische Moose und Flechten als Bioindikatoren von städtischer Überwärmung, Standorteutrophierung und verkehrsbedingten Immissionen.“ *Limprichtia*, 24, 2004: 187-208.

Steen, Hanno und Mann, Matthias. „The ABC's (and XYZ's) of Peptide Sequencing.“ *Nature Reviews*, 5, 2004: 699-711.

Svangård, Erika; Göransson, Ulf; Hocaoglu, Zozan; Gullbo, Joachim; Larsson, Rolf; Claesson, Per und Bohlin, Lars. „Cytotoxic Cyclotides from *Viola tricolor*.“ *Journal of Natural Products*, 2004: 144-147.

Tan, Ning-Hua und Zhou, Jun. „Plant cyclopeptides.“ *Chemical Reviews*, 106, 2006: 840-895.

UniProt. 2012. <http://www.uniprot.org/> (Zugriff am 13. September 2012).

Universität Mainz. <http://www.ak-hoffmann.chemie.uni-mainz.de/Dateien/script5.pdf>
(Zugriff am 7. September 2012).

Universität Rostock. *Universität Rostock - Analytische Chemie*.
<http://www.zimmermann.chemie.uni-rostock.de/tech-ausstattung/analyseprinzipien/ionenfalle/>
(Zugriff am 7. September 2012).

Vlachojannis, J.E.; Cameron, M. und Chrubasik, S. „A Systematic Review on the Sambuci fructus Effect and Efficacy Profiles.“ *Phytotherapy Research*, 24, 2010: 1-8.

Wenigmann, Margret. *Phytotherapie: Arzneipflanzen, Wirkstoffe, Anwendung*. München: Verlag Urban & Schwarzenberg, 1999.

Wikipedia. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/5/51/Cyclotide_structure.jpg
(Zugriff am 24. September 2012).

Windisch, Ute. *Dissertationes Botanicae - Evaluierung der Bioindikationsverfahren mit Flechten zur Bestimmung der Luftgüte anhand landesweiter Erhebungen in Hessen und Bayern*. Bd. 314.
Berlin: Gebrüder Bornträger, 1999.

Zakay-Rones, Z.; Thom, E.; Wollan, T. und Wadstein, J.. „Randomized Study of the Efficacy and Safety of Oral Elderberry Extract in the Treatment of Influenza A and B Virus Infections.“ *The Journal of International Medical Research*, 32, 2004: 132-140.

Zasloff, Michael. „Antimicrobial peptides of multicellular organisms.“ *Nature*, 415, 2002: 389-395.

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

10. Anhang

Tabelle I: Hier findet sich eine Tabelle aller, in sämtlichen mittels LC-MS vermessenen Fraktionen von *Sambucus nigra*, gefundenen Peptide, gereiht nach ihrem m/z-Wert. Weiters finden sich hier das berechnete Molekulargewicht in Da, die HPLC-Methode, die Retentionszeit und, sofern vorhanden, die m/z-Werte und Molekulargewichte der reduzierten und alkylierten Peptide.

Name	nativ		reduziert und alkyliert		Retentionszeit	
	m/z	MG	m/z	MG	Methode scr ¹⁷	Methode P1 ¹⁸
Sambucellin 1	1009,7	3026,1	-	-	10,3-12,5	-
Sambucellin 2	1027,7	3080,1	-	-	-	36,0-37,0
Sambucellin 3	1033,8	3098,4	1149,8	3446,4	-	26,8-27,6
Sambucellin 4	1035,4	3104,4	1151,4	3451,2	-	47,7-48,3
Sambucellin 5	1035,8	3105,3	-	-	28,5-29,0	-
Sambucellin 6	1040,1	3117,3	-	-	30,4-31,0	-
Sambucellin 7	1040,1	3117,3	-	-	31,2-31,7	-
Sambucellin 8	1040,8	3119,4	1156,8	3467,4	-	47,7-48,5
Sambucellin 9	1045,4	3132,3	-	-	28,5-29,0	-
Sambucellin 10	1048,1	3141,3	-	-	-	38,1-39,2
Sambucellin 11	1049,1	3144,3	-	-	29,0-30,0	-
Sambucellin 12	1054,4	3160,2	1170,5	3508,5	30,8-31,5	32,7-33,6
Sambucellin 13	1054,4	3160,2	-	-	34,4-34,8	-
Sambucellin 14	1059,2	3174,6	1175,1	3522,3	29,0-30,0	13,8-15,4
Sambucellin 15	1061,4	3181,2	1177,5	-	35,0-35,5	35,1-37,0
Sambucellin 16	1062,8	3185,4	-	-	-	22,3-23,9
Sambucellin 17	1063,5	3187,5	1179,5	3535,5	30,5-31,5	16,0-17,2
Sambucellin 18	1063,5	3187,5	1179,5	3535,5	30,5-31,5	17,2-18,4
Sambucellin 19	1067,4	3199,2	1183,5	3547,5	-	28,6-30,5
Sambucellin 20	1068,1	3201,3	1184,2	3549,6	31,7-32,7	10,3-17,1
Sambucellin 21	1069,1	3204,3	-	-	28,0-30,0	-
Sambucellin 22	1070,8	3209,4	-	-	-	38,0-39,0

¹⁷ Methodenparameter siehe Tab. 14, S. 42

¹⁸ Methodenparameter siehe Tab. 15, S.43

Tabelle I: Fortsetzung

Name	nativ		reduziert und alkyliert		Retentionszeit	
	m/z	MG	m/z	MG	Methode scr ¹⁹	Methode P1 ²⁰
Sambucellin 23	1072,8	3215,4	-	-	-	14,3-15,3
Sambucellin 24	1072,8	3215,4	-	-	-	15,3-16,5
Sambucellin 25	1074,5	3220,5	-	-	29,0-30,0	-
Sambucellin 26	1076,8	3227,4	1192,5	3574,5	-	28,0-29,0
Sambucellin 27	1076,8	3227,4	-	-	-	31,6-32,5
Sambucellin 28	1077,5	3229,5	1193,5	3577,5	-	17,0-20,4
Sambucellin 29	1077,5	3229,5	-	-	-	26,0-27,0
Sambucellin 30	1080,5	3238,5	-	-	-	39,3-40,3
Sambucellin 31	1094,1	3279,3	-	-	30,5-31,0	-
Sambucellin 32	1102,1	3303,3	1218,1	3651,3	-	38,1-39,2
Sambucellin 33	1103,1	3306,3	-	-	28,5-29,0	-
Sambucellin 34	1103,4	3307,2	-	-	30,5-31,5	-
Sambucellin 35	1103,4	3307,2	-	-	33,4-34,2	-
Sambucellin 36	1104,8	3311,4	1220,8	3659,4	-	25,0-25,9
Sambucellin 37	1105,4	3313,2	-	-	-	39,2-40,1
Sambucellin 38	1109,5	3325,5	1225,4	3673,2	34,0-34,6	31,3-32,8
Sambucellin 39	1109,2	3324,6	-	-	23,0-24,0	-
Sambucellin 40	1113,1	3336,3	1229,2	3684,6	28,0-30,0	11,4-12,7
Sambucellin 41	1117,5	3349,5	-	-	-	13,8-14,7
Sambucellin 42	1117,5	3349,5	-	-	-	14,7-15,7
Sambucellin 43	1128,5	3382,5	-	-	28,0-30,0	12,2-13,2
Sambucellin 44	1158,1	3471,3	-	-	24,0-25,0	-
Sambucellin 45	1167,2	3498,6	1283,2	3846,6	28,0-30,0	11,3-12,5
Sambucellin 46	1182,5	3544,5	-	-	28,1-29,5	-
Sambucellin 47	1221,2	3660,6	-	-	-	9,0-12,0

¹⁹ Methodenparameter siehe Tab. 14, S. 42

²⁰ ²⁰ Methodenparameter siehe Tab. 15, S.43

Tabelle II: Massen und m/z-Werte der tryptischen Peptide von Fructus Sambuci nigrae sowie, sofern entschlüsselt, deren Aminosäuresequenzen; alle Fraktionen entstammen der *Sambucus nigra* SPE (s.S.28)

Fraktion	m/z	MG	Aminosäuresequenz	Paare	Peptid ²¹
31% C - 35% A	704,4	703,4	V[Q K]C[I L]GK	1	TPSNF1
31% C - 35% A	993,4	992,4			TPSNF2
31% C - 35% A	661,3	660,3	GlpCWGK		TPSNF3
31% C - 35% A	894,4	893,4			TPSNF4
31% C - 35% A	732,4	731,4	N-Formyl-V[Q K]C[I L]GK		TPSNF5
31% C - 35% A	746,4	745,4	N-Acetyl-V[Q K]C[I L]GK		TPSNF6
31% C - 35% A	774,8	1547,6			TPSNF7
31% C - 35% A	997,9	1993,8		2	TPSNF8
31% C - 35% A	892,5	891,5			TPSNF9
31% C - 35% A	1169,9	2337,8		3	TPSNF10
31% C - 35% A	892,8	1783,6			TPSNF11
31% C - 35% A	989,4	1976,8			TPSNF12
31% C - 35% A	1041,5	1040,5			TPSNF13
31% C - 35% A	892,3	1782,6			TPSNF14
31% C - 35% A	854,8	1707,6			TPSNF15
31% C - 35% A	906,8	1811,6			TPSNF16
31% C - 35% A	1116,4	1115,4			TPSNF17
31% C - 35% A	1280,6	1279,6			TPSNF18
31% C - 35% A	879,4	878,4			TPSNF19
31% C - 35% A	899,4	898,4			TPSNF20
31% C - 35% A	951,7	2852,1			TPSNF21
31% C - 35% A	735,8	1469,6			TPSNF22
31% C - 35% A	1024,4	1023,4	FCAPWSPC	2	TPSNF23
31% C - 35% A	992,9	1983,8	FCAPWSPC[K Q]SGC[I L]K ²²		TPSNF24
31% C - 35% A	680,3	679,3	FCAPW	3	TPSNF25
31% C - 35% A	1070,0	3207,0			TPSNF26
31% C - 35% A	1006,0	3015,0			TPSNF27
31% C - 35% A	1054,8	3161,4			TPSNF28

²¹ Die Nomenklatur der Spaltpeptide bezeichnet mit PPSNF alle peptischen Peptide aus Fructus Sambuci nigrae und mit TPSNF alle tryptischen Peptide.

²² Hierbei handelt es sich lediglich um eine Aminosäureteilsequenz und nicht um die komplette Aminosäuresequenz des Spaltpeptids.

Tabelle II: Fortsetzung

Fraktion	m/z	MG	Aminosäuresequenz	Paare	Peptid
31% C - 35% A	1000,7	2999,1		1	TPSNF29
31% C - 35% A	1058,0	3171,0			TPSNF30
31% C - 35% A	578,3	577,3	N-Formyl-CWVK		TPSNF31
31% C - 35% A	588,3	587,3	Glp-C[L]G[K Q]		TPSNF32
35% C und 35% D	211,1	210,1			TPSNF33
35% C und 35% D	261,1	260,1			TPSNF34
35% C und 35% D	349,1	348,1			TPSNF35
35% C und 35% D	393,1	392,1			TPSNF36
35% C und 35% D	525,3	524,3			TPSNF37
35% C und 35% D	547,3	546,3			TPSNF38
35% C und 35% D	591,4	590,4			TPSNF39
35% C und 35% D	640,8	1279,6			TPSNF40
35% C und 35% D	643,3	1284,6			TPSNF41
35% C und 35% D	775,3	2322,9			TPSNF42
35% C und 35% D	884,8	1767,6			TPSNF43
35% C und 35% D	892,8	1783,6			TPSNF44
35% C und 35% D	965,7	2894,1			TPSNF45
35% C und 35% D	966,1	2895,3			TPSNF46
35% C und 35% D	981,4	1960,8			TPSNF47
35% C und 35% D	1001,4	3001,2			TPSNF48
35% C und 35% D	1116,5	2231,0			TPSNF49
35% C und 35% D	1151,6	2301,2			TPSNF50
35% C und 35% D	1162,5	2323,0			TPSNF51
39% A – 39% D	689,9	688,3	[K Q]CEPR		TPSNF52
39% A – 39% D	707,3	706,3			TPSNF53
39% A – 39% D	851,3	850,3			TPSNF54
39% A – 39% D	575,3	1148,6			TPSNF55
39% A – 39% D	1149,6	1148,6			TPSNF56
39% A – 39% D	927,9	1853,8			TPSNF57
39% A – 39% D	1099,9	2197,8			TPSNF58
39% A – 39% D	877,4	1752,8			TPSNF59
39% A – 39% D	941,9	1881,8			TPSNF60
39% A – 39% D	1040,4	1039,4			TPSNF61

Tabelle II: Fortsetzung

Fraktion	m/z	MG	Aminosäuresequenz	Paare	Peptid
39% A – 39% D	1024,4	1023,4			TPSNF62
39% A – 39% D	680,3	679,3			TPSNF63
39% A – 39% D	965,4	2893,2			TPSNF64
39% A – 39% D	959,4	2875,2			TPSNF65
39% A – 39% D	954,1	2859,3			TPSNF66
39% A – 39% D	920,4	2758,2			TPSNF67
39% A – 39% D	925,1	2772,3			TPSNF68
39% A – 39% D	963,4	2887,2			TPSNF69

Tabelle III: Massen und m/z-Werte der peptischen Peptide von Fructus Sambuci nigrae sowie, sofern entschlüsselt, deren Aminosäuresequenzen (Fraktionen 31% C - 35% A und 35% C – die Fraktionen entstammen der *Sambucus nigra* SPE (s. Tab. 7, S. 28).

Fraktion	m/z in Da	MG	Aminosäuresequenz ²³	Paare	Peptid ²⁴
31%C-35%A	426,2	850,4			PPSNF1
31%C-35%A	498,2	994,4			PPSNF2
31%C-35%A	507,2	1012,4			PPSNF3
31%C-35%A	624,3	623,3			PPSNF4
31%C-35%A	752,4	751,4			PPSNF5
31%C-35%A	851,5	850,5			PPSNF6
31%C-35%A	1013,5	1012,5			PPSNF7
31%C-35%A	521,3	1040,6			PPSNF8
31%C-35%A	676,2	1350,4			PPSNF9
31%C-35%A	788,9	1575,8			PPSNF10
31%C-35%A	892,5	1783,0			PPSNF11
31%C-35%A	1041,5	1040,5			PPSNF12
31%C-35%A	1054,5	1053,5			PPSNF13
31%C-35%A	1125,5	1124,5			PPSNF14
31%C-35%A	1191,5	1190,5			PPSNF15
31%C-35%A	1214,5	1213,5			PPSNF16

²³ Sofern diese entschlüsselt werden konnte.

²⁴ Die Nomenklatur der Spaltpeptide bezeichnet mit PPSNF alle peptischen Peptide aus Fructus Sambuci nigrae und mit TPSNF alle tryptischen Peptide.

Tabelle III: Fortsetzung

Fraktion	m/z in Da	MG	Aminosäuresequenz ²⁵	Paare	Peptid
31%C-35%A	1351,5	1350,5			PPSNF17
31%C-35%A	526,2	1050,4			PPSNF18
31%C-35%A	787,0	2358,0			PPSNF19
31%C-35%A	796,0	2385,0			PPSNF20
31%C-35%A	805,3	2412,9			PPSNF21
31%C-35%A	811,0	2430,0			PPSNF22
31%C-35%A	879,5	878,5			PPSNF23
31%C-35%A	929,6	2785,8			PPSNF24
31%C-35%A	936,4	2806,2			PPSNF25
31%C-35%A	951,7	2852,1			PPSNF26
31%C-35%A	961,0	2880,0			PPSNF27
31%C-35%A	970,4	2908,2			PPSNF28
31%C-35%A	976,4	2926,2			PPSNF29
31%C-35%A	1015,4	3043,2			PPSNF30
31%C-35%A	1026,4	1025,4			PPSNF31
31%C-35%A	1069,5	1068,5			PPSNF32
31%C-35%A	1179,9	2357,8			PPSNF33
31%C-35%A	1194,0	2386,0			PPSNF34
31%C-35%A	1202,0	2402,0			PPSNF35
31%C-35%A	1215,5	2429,0			PPSNF36
31%C-35%A	1229,5	3685,5			PPSNF37
31%C-35%A	1238,5	3712,5			PPSNF38
31%C-35%A	1248,5	3742,5			PPSNF39
35%C	470,2	469,2			PPSNF40
35%C	541,3	540,3			PPSNF41
35%C	560,2	559,2			PPSNF42
35%C	881,7	3522,8			PPSNF43
35%C	885,1	2652,3			PPSNF44
35%C	922,2	3684,8			PPSNF45
35%C	960,7	2879,1		4+5	PPSNF46
35%C	1179,5	3535,5			PPSNF47
35%C	1769,2	3536,4			PPSNF48

²⁵ Sofern diese entschlüsselt werden konnte.

Tabelle III: Fortsetzung

Fraktion	m/z in Da	MG	Aminosäuresequenz ²⁶	Paare	Peptid
35%C	675,3	674,3			PPSNF49
35%C	697,4	696,4			PPSNF50
35%C	1349,7	1348,7			PPSNF51
35%C	675,3	674,3	[I L]PGTCK	4	PPSNF52
35%C	675,3	674,3	[I L]PGTCK	5	PPSNF53
35%C	697,4	696,4			PPSNF54
35%C	1349,7	1348,7			PPSNF55
35%C	426,2	850,4			PPSNF56
35%C	507,2	1012,4			PPSNF57
35%C	662,2	1322,4			PPSNF58
35%C	752,4	751,4			PPSNF59
35%C	789,4	788,4			PPSNF60
35%C	851,5	850,5			PPSNF61
35%C	890,5	889,5			PPSNF62
35%C	912,5	911,5			PPSNF63
35%C	1013,6	1012,6			PPSNF64
35%C	1026,5	1025,5			PPSNF65
35%C	1050,5	1049,5			PPSNF66
35%C	1072,5	1071,5			PPSNF67
35%C	1097,5	1096,5			PPSNF68

²⁶ Sofern diese entschlüsselt werden konnte.

11. Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name: Johanna Hellmayr
Geburtsdatum: 21.01.1988
Geburtsort: Wien
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildung

April 1993 - Juli 1995: George Palmer Infants School, Reading, England
September 1995 - Juni 1998: PVS Judenplatz, Wien 1
September 1998 - Juni 2006: Bundesgymnasium Wasagasse, Wien 9
Juni 2006: Matura am Bundesgymnasium Wasagasse, Wien 9
Oktober 2006 – Jänner 2013: Studium der Pharmazie an der Universität Wien
November 2011 - März 2012: Diplomarbeit am Department für Pharmakognosie

Berufliche Erfahrung

August 2007 - Oktober 2007: Angestellte der Armonia-Apotheke, 1170 Wien
Februar 2008: Bürokraft bei Langenscheidt-Verlag, 1080 Wien
September 2010 und 2011: Inskriptionsberatung als freier Mitarbeiter der Studienvertretung Pharmazie
März 2011 – Jänner 2012: Tutor der phytochemischen Übungen an der Universität Wien