



Hochschule Anhalt

Anhalt University of Applied Sciences

Fachbereich Angewandte Biowissenschaften
und Prozesstechnik

Thema

Assayentwicklung zur Analyse des proteolytischen
Abbaus von Abetafibrillen 1-40, 3-40 und pE3-40

Bachelorarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science
(B.Sc.)

von: Sophie Behrendt
geboren am 21. Juli 1990
Studiengang: Molekulare Biotechnologie
Gutachter: Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert
Dr. Leona Wagner
Köthen, 07. Juli 2014

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meines Studiums und bei meiner Bachelorarbeit unterstützt haben.

Meinen besonderen Dank möchte ich meinen Betreuern Prof. Dr. Hans-Jürgen Mägert und Dr. Leona Wagner aussprechen, die mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglicht haben. Die freundliche und engagierte Betreuung sowie die vielen hilfreichen Gespräche und Anregungen waren bei meinem Studium und bei meiner Bachelorarbeit sehr hilfreich.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, bei meinem Freund und allen meinen Freunden für die moralische Unterstützung und manchmal auch die Kritik. Sie haben stets hinter mir gestanden und gaben mir den nötigen Halt

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Einleitung	5
2.1	Das Amyloid beta Peptid	5
2.2	Die Neurofibrillen	6
2.3	Verwendete Peptidasen	9
2.3.1	Metalloproteasen	9
2.3.2	Serinproteasen	12
2.4	MALDI-TOF MS	12
2.5	Zielsetzung der Arbeit	14
3	Material und Methoden	15
3.1	Materialien	15
3.1.1	Geräte	15
3.1.2	Chemikalien	15
3.2	Methoden	16
3.2.1	Aktivierung von Meprin A durch Plasma- und Tissue Kallikrein	16
3.2.2	Vorbereitung der Abetafibrillen	17
3.2.3	Reinigung des Überstands mittels ZipTip	17
3.2.4	Transmissionselektronenmikroskopie der Abetafibrillen	18
3.2.5	Untersuchungen verschiedener Enzyme mit den Substraten Abetafibrillen 1-40, Abetafibrillen 3-40 und Abetafibrillen pE3-40 mittels MALDI- TOF- Massenspektrometrie	18
4	Ergebnisse	21
4.1	Vorversuche zum Proteolytischen Abbau der Abetafibrillen	21
4.2	Darstellung der Fibrillen im Elektromikroskop	22
4.3	Physio-chemische Stabilitätsuntersuchungen der Abeta-Fibrillen.	23
4.4	Vergleich der Degradomics-Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen nach 16 h	25
4.5	Darstellung des zeitabhängigen proteolytischen Degradomics der Abetafibrillen mittels MALDI-TOF-MS	38
5	Diskussion	41
5.1	Auswertung der Vorversuche und Stabilitätsuntersuchungen	41
5.2	Auswertung der hydrolytischen Protolysesergebnisse der Fragmente	41
6	Literaturverzeichnis	47
7	Anhang	50
8	Eidesstattliche Erklärung	74

1 Abkürzungsverzeichnis

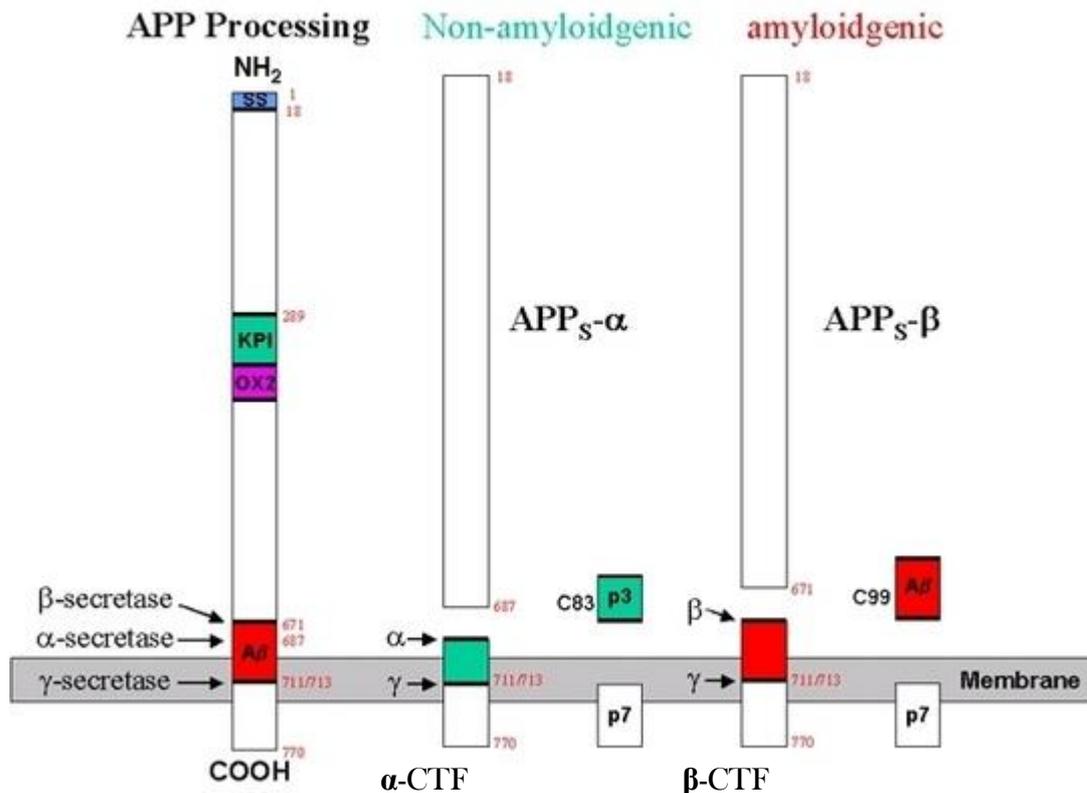
Abb.	Abbildung
APP (Amp P)	Aminopeptidase-P
AS	Aminosäure
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
dd H ₂ O	Dreifach- destilliertes Wasser
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
m	Milli
M	Molar
μ	Mikro
MALDI-TOF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry (matrixassistierte Laserdesorption/Ionisations-Massenspektrometrie – Flugzeit – Massenspektrometrie)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min.	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse pro Ladung
MW	Molecular weight (Molekulargewicht)
nm	Nanometer
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V/mm	Volt pro Millimeter
W/cm ²	Watt pro Quadratcentimeter

2 Einleitung

2.1 Das Amyloid beta Peptid

Die Alzheimersche Erkrankung (lateinisch Morbus Alzheimer) ist eine neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Ursache für eine Altersdemenzerkrankung in der westlichen Welt. Alzheimersche Demenz wurde erst 1907 von dem deutschen Pathologen Alois Alzheimer beschrieben. Nach dem Tod der von ihm betreuten Patientin Auguste Deter beschrieb Alzheimer anormale Ablagerungen im Gehirn der Patientin (Benkert, et al., 2011). Diese charakteristischen Eiweißablagerungen in der grauen Hirnsubstanz sind eines der Hauptmerkmale der Alzheimer-Krankheit. Die Hauptbestandteile dieser Plaques sind die sogenannten beta-Amyloid-Peptide, die sich zwischen den Neuronen im Gehirn anhäufen. Das beta-Amyloid besteht aus 36-43 Aminosäuren (Zettl, et al., 2005) und entsteht bei der Spaltung des Vorläuferproteins Amyloid-Precursor-Protein (APP) (Kang, et al., 1987). Dabei handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einer zytoplasmatischen C-terminalen und einer extrazellulären N-terminalen Domäne. Bei der Spaltung kann zwischen zwei Wegen unterschieden werden, wie in Abb.2 dargestellt: der amyloidogene Weg, der zur Entstehung der A β -Peptide führt, sowie der nicht-amyloidogene Weg, bei dem P₃-Peptide entstehen. An diesen proteolytischen Prozessen sind drei Proteasen, nämlich α -, β -, γ -Secretasen involviert. Im nicht-amyloidogenen Weg erfolgt die hydrolytische Proteolyse durch die α -Sekretase, was zur Freisetzung von sAPP α sowie dem membranständigen α -CTF führt. Das α -CTF wird durch die γ -Sekretase in weiteren Schritten gespalten. Da die Prozessierung der α -Sekretase innerhalb der A β -Sequenz erfolgt, wird ein kleines, 3 kDa Peptid (p3) generiert (Haass, et al., 1993).

Der amyloidogene Weg wird durch die proteolytische Spaltung des APP durch die β -Sekretase eingeleitet. Zunächst wird bei der Bildung des A β die Ektodomäne, die als sAPP β bezeichnet wird, abgespalten und in den Extrazellularraum bzw. das Zellkulturmedium entlassen. Gleichzeitig bleibt das β -C-terminale Fragment, β -CTF, in der Membran verankert. Das β -CTF wird durch die γ -Sekretase weiter gespalten, wobei die hydrolytische Proteolyse innerhalb der Transmembransequenz erfolgt. Dabei entstehen Peptide mit einer Größe von etwa 4 kDa (Annaert, et al., 2002). Die Peptide variieren bei der Spaltung in ihrer Länge. So wird zwar zum großen Teil (90 %) das A β 1-40 (mit 40 Aminosäuren) gebildet, aber zu einem kleinen Anteil, etwa 10 %, auch das längere A β 1-42 (Jarrett, et al., 1993). Dies ist von pathologischer Bedeutung, da das längere A β pE3-42 Peptid aufgrund der zusätzlichen hydrophoben Aminosäuren Isoleucin und Alanin vermehrt zur Aggregation und somit zur Bildung von Abetafibrillen neigt, als das kürzere Peptid A β 1-40 (Clark, et al., 2003).



α-Secretase: ADAM-10 > ADAM17 >> ADAM8 ≈ ADAM9
β-Secretase: BACE1 > Mep-B ≈ Caspase3 ≈ Caspase 6 >> CTSS >> CTSB ≠ CTSD
γ-Secretase: hetero-tetrameric protein complex composed of presenilin (PS), nicastrin (NCT), APH-1 und PEN-2

Abb. 2.2.1: Hydrolytische Proteolyse des APP durch die α-, β-, und γ-Sekretases. Die proteolytische Spaltung von APP erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Einer davon führt zur Bildung des pathogenen Aβ-Peptids, der andere unterbindet die Aβ-Bildung. Die Protease, α-Sekretase, schneidet APP, beim „Non-amyloidgenic-Weg“, innerhalb der Aβ-Domäne und verhindert damit die Aβ-Bildung. Gleichzeitig wird die lösliche APP-Ektodomäne (APP_s-α) sekretiert. Die Protease β-Sekretase schneidet am oberen Ende der Aβ-Domäne und führt zur Sekretion der APP-Ektodomäne (APP_s-β). Anschließend schneidet die γ-Sekretase am unteren Ende von Aβ, wodurch Aβ freigesetzt wird. [Entnommen von <http://www.biopro.de/magazin/thema/00166/index.html?lang=de&artikelid=/artikel/02586/index.html> und Cynis, H., Lichtenthaler, S., Wagner, L. and Demuth, H.-U. (2014) *Chapter 10: Proteases in the nervous system*. in: *Proteases: Structure and Function*, Brix, K. and Stöcker, W. eds. Springer-Verlag, Wien.]

2.2 Die Neurofibrillen

Neben den charakteristischen β-Amyloid Plaques finden sich bei Alzheimer-Patienten zusätzlich noch pathologische Neurofibrillenbündel innerhalb der Nervenzellen. Diese bestehen aus intrazellulären Bündeln gepaarter, in helikaler Form angeordneter Filamente, die aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen gebildet werden. Tau ist in der Lage, an die Mikrotubulli der Zellen zu binden und trägt damit zur Stabilisierung bei. Die Beziehung zwischen beiden Formen der Proteinablagerungen besteht darin, dass das Amyloid β-Peptid toxisch auf das Neuron einwirken kann. Dabei kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung des Tau-Proteins. Durch diese Inaktivierung kann es sich nicht mehr an die Transportstrukturen anheften und verliert damit seine Stützfunktion. Es verklebt zu den

sogenannten Neurofibrillenbündeln, die die Nervenzelle zunehmend ausfüllen und ihren Stoffwechsel hemmen (Walter, 2004) (Abb.3).

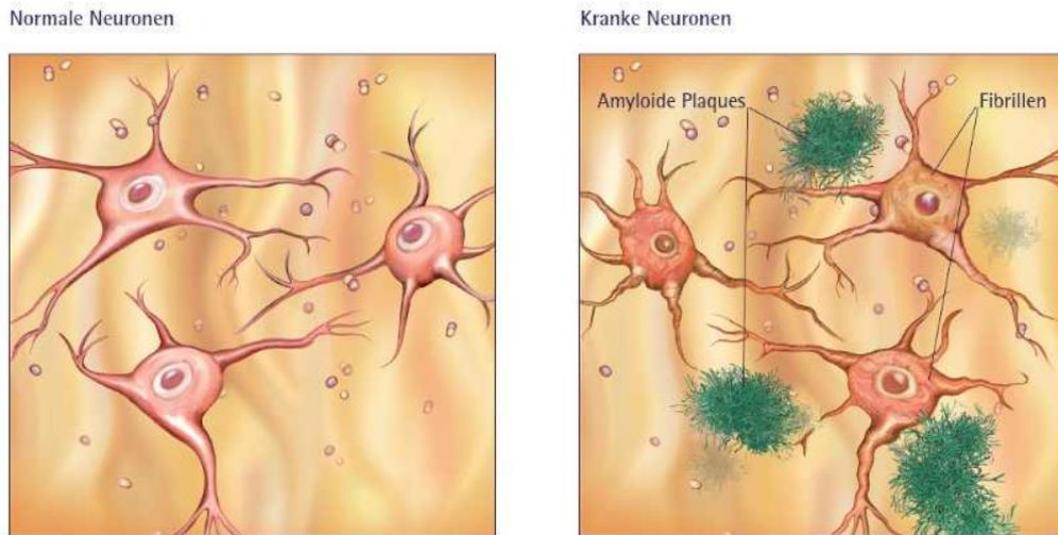


Abb. 2.3.1: Veränderungen im Gehirn bei Alzheimer-Erkrankten. Bei Alzheimer-Patienten finden sich Beta-Amyloid-Plaques (faserförmige Eiweiß-Ablagerungen) zwischen den Neuronen sowie Neurofibrillenbündel in den Neuronen, was zum Absterben der Neuronen führt. [Entnommen von http://www.alzheimerforschung.de/alzheimer-krankheit/illustrationen_plaquesfibrillen.htm]

Es wird vermutet, dass diese Hyperphosphorylierung durch eine vermehrte Ansammlung von β -Amyloid Plaques im Gehirn bedingt ist (Goedert, et al., 2005). Somit wird das Auftreten von Tau-Proteinen nach der Bildung von Amyloid-Plaques erfolgen und wäre ein Anzeichen für das Fortschreiten der Erkrankung (Schnabel, 2011). Außerdem ist noch nicht bekannt, ob die im nächsten Kapitel beschriebenen Enzyme auch die aggregierten A β -Peptide abbauen können. Diese entstehen, wenn die Konzentration von A β im Gehirn zu hoch ansteigt (vgl. Abb. 2.3.2)

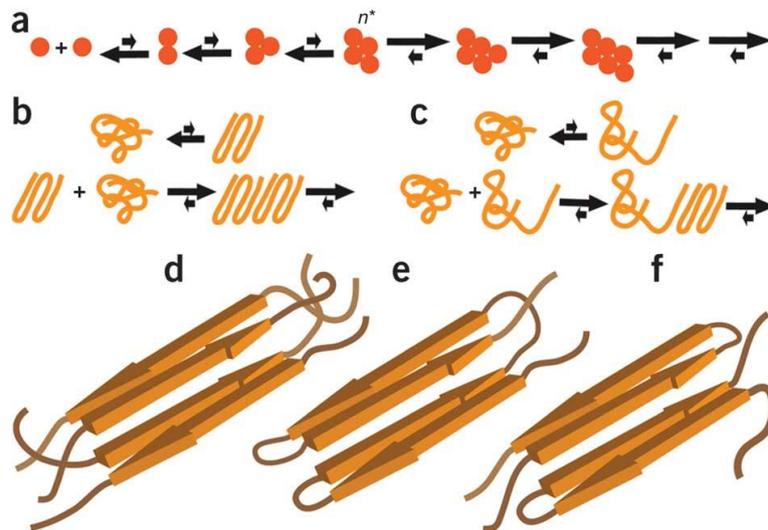


Abb. 2.3.2: Darstellung der Fibrillenbildung. Die Pfeile stellen das Gleichgewichtsverhältnis zwischen den einzelnen Aggregatzuständen dar. a): Klassisches thermodynamisches Modell der Keimbildung, wobei n^* der kritische Kern ist. b), c): Zwei Modelle für monomere Keimbildungaggregation, in dem der Kern entweder stark organisiert (b) oder verlängert ist (c). d)- f): Hypothetisches β -Faltblatt-Strukturen-Modell für die Aggregation kritischen Keime, die entweder Tetramere (d), Monomere (e) oder Dimere (f) bilden. (Kar, et al., 1992)

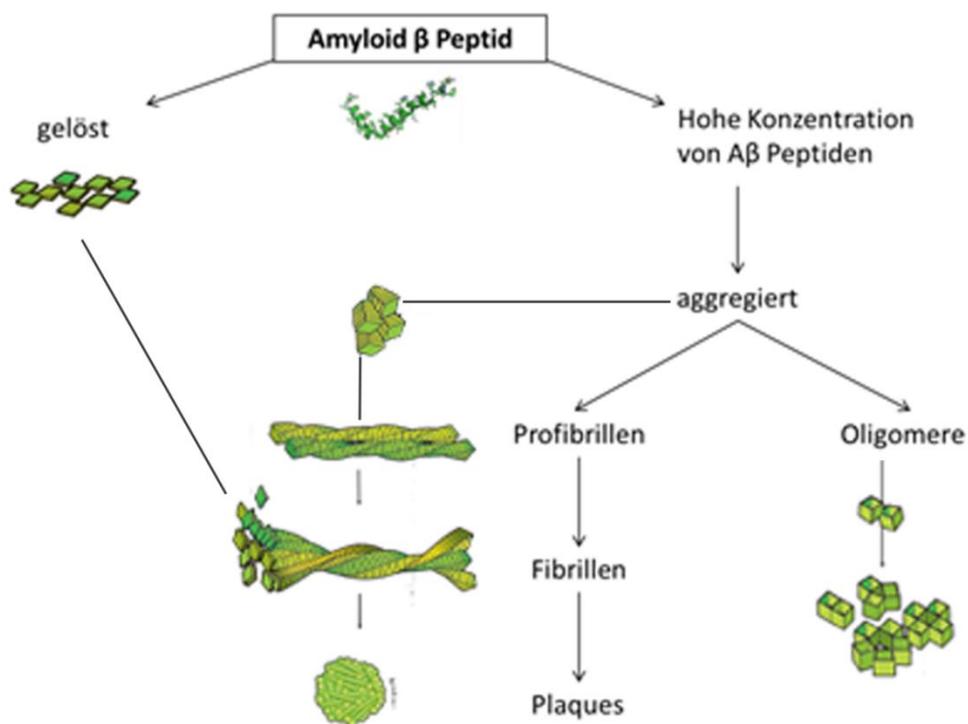


Abb. 2.3.3: Wege des Amyloid β Peptids. Das Peptid Abeta liegt entweder in gelöster oder in aggregierter Form im menschlichen Körper vor. Die Aggregation erfolgt jedoch erst wenn die Konzentration zu hoch ist. Dann lagert es sich entweder zu Oligomeren zusammen oder zu Profibrillen, die sich dann zu Plaque zusammensetzen. (Schnabel, 2011)

Das Amyloid β kann, wenn es in gelöster Form vorliegt, durch mehrere Peptidasen (zum Beispiel: Neprilysin und Plasmin) im Gehirn abgebaut werden.

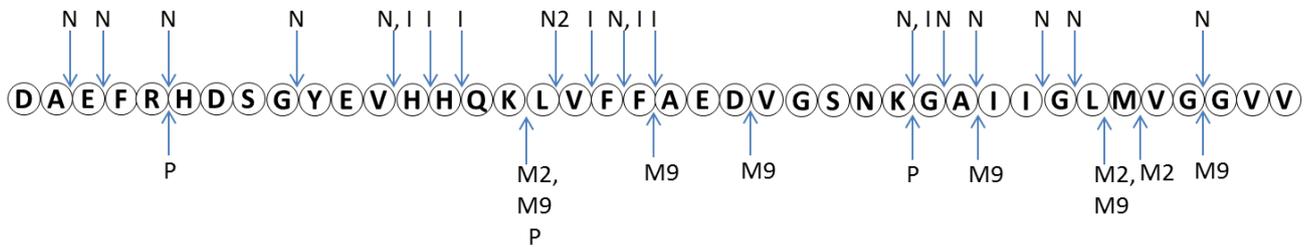


Abb. 2.3.4: Darstellung der Spaltstellen verschiedener bekannter Enzyme an der Primärstruktur des Peptids Amyloid β 1-40. N: Neprilysin; N2: Neprilysin 2; I: Insulysin; P: Plasmin; M2: Matrix- Metalloprotease 2; M9: Matrix- Metalloprotease 9 [wie beschrieben in Nalivaeva, et al., 2012; Carson, et al., 2002 und Portelius, 2009]

Des Weiteren werden N-terminale truncierte A β Peptide durch das Enzym Glutaminylzyklase posttranslational zu A β pE3-40 und A β pE3-42 modifiziert. Diese N-terminale pyroglutamisierte A β -Peptide sind hydrophober und neigen deswegen vermehrt zur Aggregation.

Im Verlauf der Arbeit soll untersucht werden, ob es Unterschiede bezüglich des proteolytischen Abbaus zwischen Abetafibrillen 1-40, 3-40 und pE3-40 gibt und ob außerdem von den im nächsten Kapitel beschriebenen Enzymen weitere in der Lage sind, Amyloid β abzubauen.

2.3 Verwendete Peptidasen

Peptidasen sind abbauende Enzyme, die die gesamte Hydrolyse von Proteinen katalysieren. Sie werden, je nach ihrem Wirkungsort, grob in zwei große Gruppen, d. h. Exopeptidasen (EC 3.4.11-3.4.19) und Endopeptidasen (EC 3.4.21-3.4.25; 3.4.99) unterteilt. Die Exopeptidasen spalten die Peptidbindung nahe der Amino- oder Carboxy-Termini des Substrates, während Endopeptidasen die Peptidbindungen weiter entfernt spalten. Basierend auf der funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum, werden Peptidasen außerdem in Serin-Proteasen, Aspartatproteasen, Cystein-Proteasen und Metalloproteasen gegliedert. In der Merops-Datenbank werden die Proteasen basierend auf ihre katalytischen Mechanismen, ihrer Struktur und Aminosäuresequenzen zunächst in verschiedene Clans und anschließend weiter in Familien unterteilt. Da in der Arbeit „Untersuchungen des proteolytischen Abbaus von Abeta 1-40 und Abeta pE3-40“ (2013) meinerseits bereits intensiv auf die einzelnen Enzyme eingegangen wurde, erfolgt hier nur ein kurzer Überblick.

2.3.1 Metalloproteasen

Bei Metalloproteasen handelt es sich um Enzyme, die Proteine/Peptide hydrolytisch nur unter Bindung an einen Co-Faktor, ein zweiwertiges Metallkation (häufig Zink), spalten können. Alle die im Verlauf der Arbeit verwendeten Metalloproteasen werden anhand der MEROPS-Datenbank dem Clan MA zugeordnet. Kennzeichnend für diesen Clan ist das Vorhandensein eines His-Glu-Xaa-Xaa-His

(HEXXH) Motives in dem Enzym. Bei den beiden His-Resten handelt es sich um die Zink-Liganden, während das Glu die katalytische Funktion unterstützt.

Tab. 2.3.1.1: Darstellung der verwendeten Metalloproteasen und ihren Eigenschaften

Name	Neprilysin	Neprilysin 2	Insulysin	MMP 2	MMP 3	MMP 9	MMP 13	Meprin A
Klasse	EC 3.4.24.11	EC 3.4.24.B14	EC 3.4.24.56	EC 3.4.24.24	EC 3.4.24.17	EC 3.4.24.35	EC 3.4.24.22	EC 3.4.24.18
Merops-Nr.	M13.001	M13.012	M16.002	M10.003	M10.005	M10.004	M10.013	M12.002
Länge	749 AS	779 AS	1019 AS	660 AS	477 AS	707 AS	471 AS	746 AS
Molekulargewicht Nativ (Untereinheit)	85,514 kDa	89,367 kDa	117,968 kDa	73,882 kDa	53,977 kDa	78,458 kDa	53,820 kDa	84,419 kDa
Genlocus im Mensch	3q21-q27	1p36	10q23-q25	16q13	11q23	20q11.3-q13.1	11q22.3	6p21
Lokalisierung in der Zelle	Membranständig	Membranständig	Cytosolisch	Extrazellulär	Extrazellulär	Extrazellulär	Extrazellulär	Extrazellulär
Zymogen	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja
Aktivierung durch	/	/	/	MT-MMPs	Plasmin	MMP 2 und 3	MMP 2 und 3, MT1-MMP, Plasmin	Serinproteasen wie z.B. Trypsin
Substratspezifität	kurze Oligopeptide	kurze Oligopeptide	Insulin, kurze bioaktive Peptide	Kollagene Typ IV, Elastin, Fibronectin	Kollagene der Typen II, III, IV, IX und X, Proeoglykane, Fibronectin, Laminin, Elastin	Kollagene Typ IV, Elastin, Fibronectin	Kollagen Typ II	Proteine/Peptide an der Carboxylseite mit hydrophoben Rest
Quatärstruktur	Monomer	Monomer	Dimer	Dimer	Dimer	Dimer	Dimer	Dimer

2.3.2 Serinproteasen

Serinproteasen werden auf Grund der Gegenwart einer Serin-Gruppe in ihrem aktiven Zentrum benannt. Nach MEROPS werden die Serinproteasen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, in den Clan PA unterteilt. Typisch für diesen Clan ist eine katalytische Triade aus His, Asp/ Glu, Cys/ Ser, die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Die verwendeten Peptidasen der Familie S01 enthalten die katalytische Triade His, Asp, Ser.

Tab. 2.3.2.1: Darstellung der drei verwendeten Serinproteasen und ihren Eigenschaften

Name	Plasmin	Plasma Kallikrein	Tissue Kallikrein
Klasse	EC 3.4.24.7	EC 3.4.21.34	EC 3.4.21.35
Merops-Nr.	S01.233	S01.212	S01.160
Länge	810 AS	638 AS	262 AS
Molekulargewicht Nativ (Untereinheit)	90,569 kDa	71,370 kDa	28,890 kDa
Genlokus im Mensch	6q26	4q35	19q13
Lokalisierung in der Zelle	Membranständig	sekretorische Vesikel (Leber)	Sekretorische Vesikel (Speicheldrüse, Niere)
Zymogen	ja	ja	ja
Aktivierung durch	Gewebeplasminogen-aktivator, Urokinaseplasmin-aktivator	Faktor 12	Plasma Kallikrein
Substratspezifität	Fibrin	Lys-Arg und Arg-Ser Peptidbindungen in bioaktiven Peptiden	Met-Lys und Arg-Ser Peptidbindungen in bioaktiven Peptiden
Quartärstruktur	Monomer	Monomer	Monomer

2.4 MALDI-TOF MS

Die Abkürzung MALDI-TOF MS steht für die Kombination aus einer Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-(MALDI)-Ionenquelle und einem „Time-of-Flight mass spectrometer“ (TOF MS) Flugzeit-Massenspektrometer. Das Verfahren der (MALDI)-Ionenquelle wurde 1987 an der Universität Münster von Michael Karas und Franz Hillenkamp entdeckt. Von Ronald C. Beavis und Brian T. Chait stammt die Idee zur Kopplung zum MALDI-TOF MS. Bei dieser Methode wird ein Biomolekül mit einem ca. 1000fachen molaren Überschuss einer Matrix gemischt, so dass nach Verdunstung des Lösungsmittels eine Co-Kristallisation von Matrix und Biomolekül erfolgt (Lottspeich, et al., 1998). Als Matrix kommen niedermolekulare organische Komponenten zum Einsatz, die einerseits die Fähigkeit zur UV-Absorption besitzen und andererseits auch über eine Säurefunktion verfügen. Beim Beschuss im Hochvakuumsystem mit einem kurzwelligen Laser (z.B. ein Stickstoff-Laser mit einer Wellenlänge von 337nm) wird Strahlung von der Matrix absorbiert. Dabei wird angenommen, dass die Matrixmoleküle angeregt, das Gitter im Festkörper zerstört und die

Matrixmoleküle desorbiert werden. Vor dem Erreichen des thermischen Gleichgewichts kommt es zu einem explosionsartigen Phasenübergang, währenddessen neben den Matrixmolekülen auch die Biomoleküle in die Gasphase freigesetzt werden. Wenn die eingestrahlte Energie in einem Bereich zwischen 10^6 und 10^7 W/cm² liegt, lässt sich ein thermischer Zerfall der labilen Biomakromoleküle wie Proteine oder DNA nahezu verhindern, da die Matrix einen weiteren Energietransfer zum Biomolekül unterbindet (Hesse, et al., 2005). Photoionisierte, radikalische Matrixmoleküle bewirken danach noch durch Protonentransfer eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Biomolekülen (Lottspeich, et al., 1998).

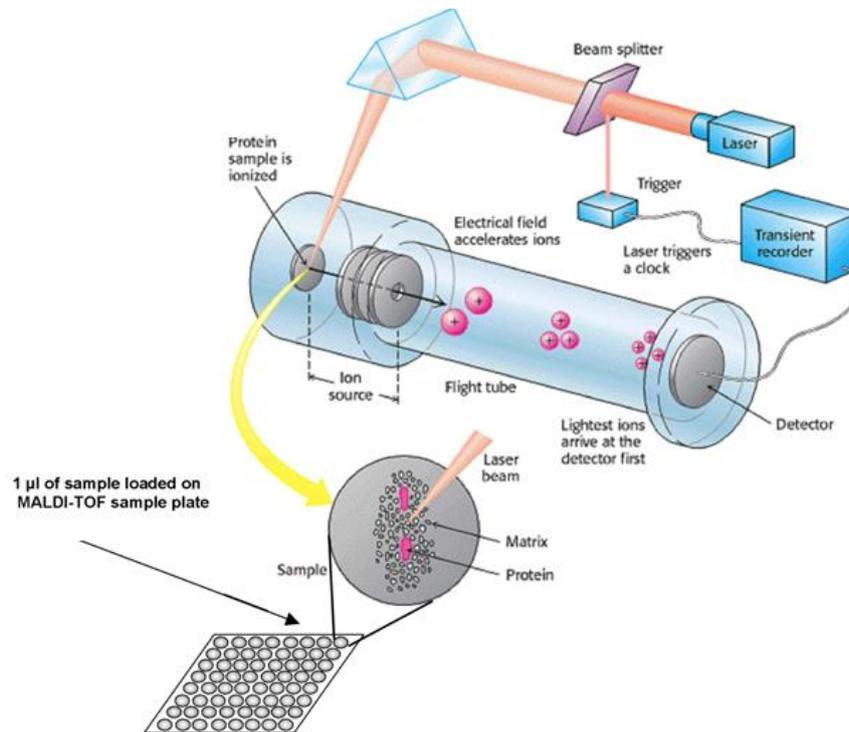


Abb. 2.5.1: Schema eines MALDI-TOF [Entnommen von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22410/figure/A481/>, Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. (2002) *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman.]

Als Folge des MALDI-Prozesses liegen also in der Regel einfach geladene, intakte Biomoleküle in der Gasphase des Hochvakuumsystems vor. Diese Ionen werden anschließend in einem elektrostatischen Feld von 100 bis einigen 1000 V/mm beschleunigt. Durch die Polarität des angelegten Feldes können entweder positive oder negative Ionen selektiert werden. Beim Flugzeitanalysator wird dann durch die genaue Messung der Zeitspanne, die ein Ion benötigt, um eine feldfreie, definierte Strecke zwischen der Beschleunigungselektrode und dem Detektor zu durchfliegen, eine exakte Bestimmung der molekularen Masse des Biomolekülmoleküls möglich. Die Moleküle werden durch ihre Masse- und Ladungsverhältnisse aufgetrennt, weil sie auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht werden. Berechnen kann man dies durch die eingesetzte Feldspannung und deren daraus folgende kinetische Energie.

$$E_{kin} = z * V = \frac{m*v^2}{2} = \frac{m*L^2}{2*t^2}$$

$$m = \frac{2*t^2*V*z}{L^2}$$

m	Masse des Teilchens
v	Geschwindigkeit des Teilchens
V	Feldspannung
z	Ladung des Teilchens
t	Flugzeit
L	Länge der Flugbahn

Durch die MALDI-Analyse ist es möglich, Molekulargewichte von natürlichen und synthetischen Polymeren, Nukleotiden, Proteinen, Lipiden und Sacchariden zu bestimmen.

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist mit Hilfe des MALDI-TOF MS-Verfahrens festzustellen, ob es Unterschiede beim Abbau der Abetafibrillen 1-40, 3-40 und des pE3-40, mittels der oben genannten Enzyme, gibt. Zudem sollen die Spaltprodukte, die bei diesem Abbau entstehen, miteinander verglichen und analysiert werden. Es soll also untersucht werden, ob die Enzyme eine abbauende Wirkung auf aggregierte Aβ-Peptide haben und wie sich diese im Vergleich zu den gelösten Aβ-Peptiden verhalten, die bereits in der Arbeit „Untersuchungen des proteolytischen Abbaus von Abeta 1-40 und Abeta pE3-40“ (2013) analysiert wurden.

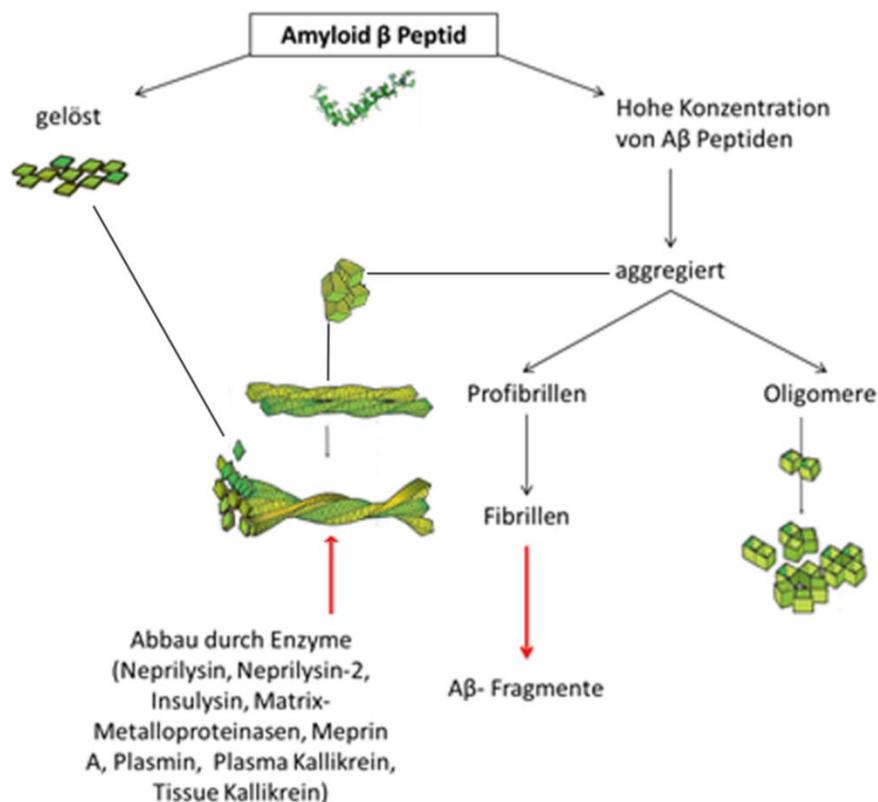


Abb. 2.6.1 : Graphische Darstellung der Zielstellung der Arbeit. Rot dargestellt sind die Wege der durchgeführten Untersuchungen.

3 *Material und Methoden*

3.1 *Materialien*

3.1.1 *Geräte*

Gerät

Analysewaagen
MALDI-TOF Massenspektrometer
(Voyager- De Pro)
Reinstwasseranlage PURELAB Plus UV
Thermomixer compact
Tischzentrifuge 5415 D
Vortex-Genie2
ZBE 30-10 Eismaschine

Hersteller

Sartorius (Göttingen)

Applied Biosystems (Stafford, Texas)
USF SERAL (Ransbach-Baumbach)
Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf (Hamburg)
Scientific Industries (Bohemia)
ZIEGRA Eismaschinen GmbH (Isernhagen)

3.1.2 *Chemikalien*

Chemikalien

Actinonin
Galardin
HCl-Lösung
Nafamostat
Phosphoramidon
1,10-Phenanthrolin Monohydrat
PKSI-527
Sinapinsäure
TFA
Tris

Hersteller

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Merck, Calbiochem (Darmstadt)
Roth (Karlsruhe)
Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Roth (Karlsruhe)
Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Roth (Karlsruhe)

Enzyme

Insulysin
Matrix-Metalloproteinase 2
Matrix-Metalloproteinase 3
Matrix-Metalloproteinase 9
Matrix-Metalloproteinase 13
Meprin A
Nepriylisin
Nepriylisin 2

R&D Systems (Wiesbaden)
Merck, Calbiochem (Darmstadt)
Merck, Calbiochem (Darmstadt)
Merck, Calbiochem (Darmstadt)
Enzo Life Sciences GmbH (Lörrach)
R&D Systems (Wiesbaden)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
R&D Systems (Wiesbaden)

Plasma Kallikrein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Plasmin	Merck, Calbiochem (Darmstadt)
Tissue Kallikrein	Hölzel Diagnostika GmbH (Köln)

Lösungen

A-Puffer

B-Puffer

C-Puffer

D-Puffer

Zusammensetzung

50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0,15 M NaCl,
0,05 % Brij, pH 7,5

20 mM Tris-HCl, pH 7,6 + 1 % β-
Octylglucopyranosid

20 mM Tris-HCl, pH 7,6

100 mM Tris-HCl, pH 7,6

3.2 Methoden

3.2.1 Aktivierung von Meprin A durch Plasma- und Tissue Kallikrein

3.2.1.1 Aktivierung mit Tissue Kallikrein

Zu Beginn wurde die 100 µg/ml Tissue Kallikrein Stammlösung 20-fach verdünnt. Dazu wurden 3 µl der Stammlösung mit 57 µl C-Puffer versetzt, so dass eine Lösung mit einer Konzentration von 5 µl/ml entsteht. Durch Zugabe von 4 µl A-Puffer auf 1 µl der 5 µg/ml Lösung entstand eine Tissue Kallikrein Lösung mit einer Konzentration von 1 µg/ml. 3 µl des Meprin A wurden ebenfalls mit 7 µl des A-Puffers versehen und anschließend wurde 1 µl der Tissue Kallikrein Lösung dazugegeben. Für 3 h wurde die Lösung bei 37 °C inkubiert und danach wurde die Reaktion mit der Zugabe von 4 µl Nafamostat abgestoppt.

3.2.1.2 Aktivierung mit Plasma Kallikrein

Zu Beginn wurde die Plasma Kallikrein Stammlösung, welche eine Konzentration von 340 µg/ml hat, 68-fach verdünnt. Dazu wurde 1 µl der Stammlösung mit 339 µl C-Puffer versetzt, so dass eine Lösung mit einer Konzentration von 1µg/ml entsteht. 3 µl des Meprin A wurden ebenfalls mit 7 µl des A-Puffers versehen und anschließend wurde 1µl der Plasma Kallikrein Lösung dazugegeben. Bei 37 °C wurde die Lösung für 3 h inkubiert und danach die Reaktion mit der Zugabe von 4 µl PKSI-527 abgestoppt.

3.2.2 Vorbereitung der Abetafibrillen

Es wurden 100 µM Fibrillen in 1 ml Lösung (MES/ Tris/ Acetat Puffer [25mM/50mM/ 25mM, pH 7,0]) von Frau Dr. Dagmar Schlenzig angezüchtet. Sie wurden bei 2000 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur späteren Aufbereitung bereitgestellt. Der Niederschlag wurde mit 250 µl 20 mM Tris - HCl mit pH 7,6 resuspendiert. Um heraus zu finden, bei welcher Konzentration die Fibrillen am besten durch die Enzyme abgebaut werden, wurden Vorversuche mit unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt, die wie in der Tabelle 1 zusammengefasst, angesetzt wurden.

Tab. 3.2.2.1: Übersicht über die Zusammensetzung der Vorversuchsproben

Zentrifugiertes Fibrillen Pellet mit 250 µl 20 mM Tris suspendieren	Verdünnung	Probenvorbereitung
1 µl	5-fach	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µl Fibrillen • 1 µl 20 mM Tris, pH 7,6 • 2 µl H₂O • 1 µl 100 mM Tris • 5 µl 0,1 % TFA + 0,1 % β-Oktylglukopyranosid
1 µl	10-fach	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µl Fibrillen • 3 µl 20 mM Tris, pH 7,6 • 4 µl H₂O • 2 µl 100 mM Tris • 10 µl 0,1 % TFA + 0,1 % β-Oktylglukopyranosid
1 µl F + 4 µl 20 mM Tris	20-fach	<ul style="list-style-type: none"> • 1 µl Fibrillen • 1 µl 20 mM Tris, pH 7,6 • 2 µl H₂O • 1 µl 100 mM Tris • 5 µl 0,1 % TFA + 0,1 % β-Oktylglukopyranosid

3.2.3 Reinigung des Überstands mittels ZipTip

Zum Konzentrieren und Reinigen des Überstands wurden mit C18-Material gefüllte 10 µl ZipTip-Pipettenspitzen verwendet. Die ZipTip-Spitzen wurden durch Aufziehen von dreimal 10 µl 50 % Acetonitril äquilibriert und anschließend mit dreimal 10 µl 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) gewaschen. Durch zehnmaliges Aufziehen von der 10 µl Peptidlösung wurde die Spitze beladen. Die Elution der Peptide erfolgte mit 0,5 µl Elutionslösung direkt auf den Probenhalter des Massenspektrometers. Die Probe wurde durch mehrmaliges Abgeben und Einsaugen mit dem gleichen Volumen an Matrixlösung auf dem Target vermischt und vor der Messung mindestens 10 min bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie der Abetafibrillen

Die Proben wurden aus den Reaktionsgefäßen für die Aggregationsreaktionen der Fibrillen entnommen und von Dr. Gerd Hause (Biozentrum Halle Bioservice der Martin-Luther-Universität Halle) auf ein mit Formvar beschichtetes Kupfer-Grids (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) aufgetragen. Danach wurden sie für 60 Sekunden inkubiert, dreimal mit Wasser gewaschen und mit 1 % Uranylacetat negativ gefärbt. Die Bilder wurden durch das Transmissionselektronenmikroskop (EM 900, Carl Zeiss SMT, Oberkochen), bei 80 kV mit einer Kamera (Variospeed SSCCD SM-1k-120, TRS, Moorenweis) aufgenommen (Schlenzig et. al., 2009)

3.2.5 Untersuchungen verschiedener Enzyme mit den Substraten Abetafibrillen 1-40, Abetafibrillen 3-40 und Abetafibrillen pE3-40 mittels MALDI- TOF-Massenspektrometrie

Vor dem Start wurden die Reaktionsgefäße vorbereitet und mit 5 µl 0,1 % β-Oktylglukopyranosid in 0,1 % TFA gefüllt, womit die Reaktionen gestoppt werden. Es wurde jeweils ein doppelter Ansatz hergestellt, wobei einmal Inhibitor dazu gegeben wurde und einmal Wasser als Vergleich. Für die Ansätze wurde nach folgendem Schema verfahren:

Probenansätze MALDI-TOF-Massenspektrometrie:

15 µl Inhibitor/H₂O

15 µl H₂O

15 µl D-Puffer

15 µl Enzym (5 µg/ml)

15 µl Aβ- Fibrillen (80 µM bei 3-40 / pE3-40 bzw. 160 µM bei 1-40)

Tab. 3.2.5.1: Übersicht über die Enzymverdünnungen

Enzym	Konz.	Verdünnung	Volumen	Final Konz./ Ansatz
NEP	100 µg/ml	20-fach	2 µl Probe zu 38 µl C-Puffer	5 µg/ml
NEP2	100 µg/ml	20-fach	2 µl Probe zu 38 µl C-Puffer	5 µg/ml
IDE	500 µg/ml	100-fach	1 µl Probe zu 99 µl C-Puffer	5 µg/ml
Plasmin	1000 µg/ml	200-fach	1 µl Probe zu 199 µl C-Puffer	5 µg/ml
MMP2/MMP3/MMP9/MMP13	100 µg/ml	20-fach	3 µl Probe zu 57 µl C-Puffer	5 µg/ml
MepA Kal	66,67 µg/ml	13,33-fach	3 µl Probe zu 37 µl C-Puffer	5 µg/ml
MepA hK1	66,67 µg/ml	13,33-fach	3 µl Probe zu 37 µl C-Puffer	5 µg/ml
Kal	340 µg/ml	68-fach	2 µl Probe zu 134 µl C-Puffer	5 µg/ml
hK1	100 µg/ml	20-fach	3 µl Probe zu 57 µl C-Puffer	5 µg/ml

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 μl Abetafibrillen bei 37°C gestartet. Die einzelnen Reaktionen wurden im Zeitabstand von 20 Sekunden begonnen. Zu den aus Tabelle 2.3 aufgeführten Zeiten wurden 5 μl Aliquot in die mit bereits 5 μl 0,1 % β -Oktylglukopyranosid in 0,1 % TFA befüllten Reaktionsgefäße überführt.

Tab. 3.2.5.2: Pipettierschema bei Probenentnahme während der Substrathydrolysestudie

Inhibitor	Zeit										
	K	t_0	5min	30min	60min	2 h	3 h	6 h	16 h	24 h	
Phosphoramidon											
1,10-Phenanthroline											
α -antiplasmin											
Garladin											
Actinonin											
PKSI-527											
Nafamostat											

↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑

5 μl Probenentnahme aus den Ansätzen

Die Kontrolle (K) und die t_0 Probe wurde wie in Tab. 2.4 zusammengesetzt.

Tab. 3.2.5.3: Pipettierschema für K und t_0

	K	t_0
0,1 % TFA	5 μl	5 μl
Enzym	-	1 μl
C-Puffer	1 μl	-
D-Puffer	1 μl	1 μl
H ₂ O	1 μl	1 μl
H ₂ O / Inhibitor (Tab. 2.5)	1 μl	1 μl
	(10 min warten, bis Enzym denaturiert)	
Substrat	1 μl 80 μM Fibrillen (A β 3-40, A β pE3-40) bzw. 160 μM (A β 1-40)	

Tab. 3.2.5.4: Zusammenfassung der Inhibitoren der Substrathydrolyse, die in den Untersuchungen zur Hydrolyse A β - Fibrillen durch unterschiedliche Enzyme eingesetzt wurden

Inhibitor	Funktion	Konzentration im Ansatz
Phosphoramidon	NEP/NEP2-Inhibitor	20 μ M
1,10 Phenanthroline	IDE-Inhibitor	2 mM
α -antiplasmin	Plasmin-Inhibitor	0,2 μ g/ml
Garladin	MMP2/MMP3/MMP9/MMP13-Inhibitor	200 μ M
Actionin	Mepri A-Inhibitor	200 μ M
PKSI-527	Plasma Kallikrein-Inhibitor	200 μ M
Nafamostat	Tissue Kallikrein-Inhibitor	200 μ M

Alle genommenen Proben wurden, nach Abstoppen der Reaktion durch 0,1 % β -Oktylglukopyranosid in 0,1 % TFA, intensiv geschüttelt (Vortex-Gerät) und abzentrifugiert. Anschließend konnten sie für die MALDI-TOF-Massenspektrometrie präpariert werden. Durch die Verwendung der Proben mit Tris-Puffer sank die Salzkonzentration. Somit war keine weitere Aufbereitung, wie z.B. mit Zip-Tip-C18, nötig. Die Matrixauswahl erfolgte aufgrund der Größe der zu untersuchenden Substratmoleküle.

Tab. 3.2.5.5: Matrix für MALDI-TOF- Massenspektrometrie

Substrat	Matrix	Matrix geeignet für MW
Fibrillen A β 1-40, A β 3-40 bzw. A β pE3-40	Sinapinsäure	ab 4000 kDa

Für die Messung wurden die Proben mit 10 μ l der Matrix gemischt und je 2 μ l auf die Probenplatte aufgetragen. Bei Verdunstung des Lösungsmittels aus dem Proben-Matrix-Gemisch kommt es zur Co-Kristallisation zwischen Probe und Matrix.

Da die Matrix aus sauren aromatischen Verbindungen besteht, ist sie in der Lage, die Energie von Laserimpulsen kurzzeitig aufzunehmen. Anschließend wird die Energie explosionsartig freigesetzt und es wird neben Matrixmolekülen auch eingelagertes Probenmaterial desorbiert. Dabei wird ein Proton der Matrix an das Biomolekül abgegeben. Somit sind die Biomoleküle alle positiv geladen und können in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Gemessen werden die freigesetzten Teilchen im sogenannten „Time of Flight“ - Detektor (TOF). Durch angeschlossene EDV werden die Daten ausgewertet. Da der MALDI-TOF keine quantitative, sondern nur qualitative Daten liefern kann, wurden zwei bzw. drei unabhängige Experimente durchgeführt und jede Probe eines Experimentes zweimal gemessen, um eine große Datenmenge zur statistischen Auswertung (Anhang) zu erhalten.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche zum Proteolytischen Abbau der Abetafibrillen

Bevor mit den eigentlichen Versuchen der Fibrillen begonnen werden konnte, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Bei diesem wurde untersucht, ob nach dem Abzentrifugieren der Fibrillen noch Reste der Fibrillen im abgenommenen Überstand vorhanden sind und welche Konzentration der Fibrillen sich am besten mittels MALDI-TOF messen lassen.

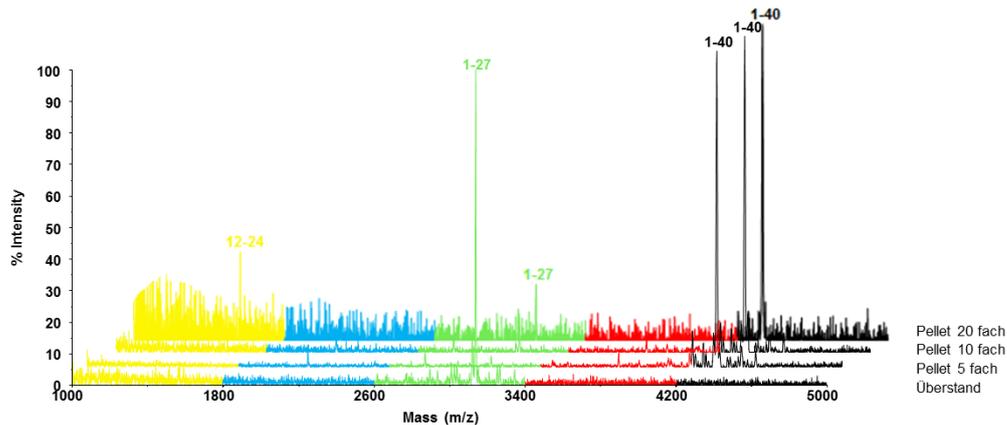


Abb. 4.1.1: Degradomics-Massenspektren vom Substrat Abetafibrillen 1-40. Es wurde jeweils eine Messung des Überstandes, der 5fachen Verdünnung des Pellets sowie dessen 10- und 20fachen Verdünnung vorgenommen.

In Abbildung sind die Spaltdiagramme der Abetafibrillen 1-40 abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Fibrillen vollständig in dem Pellet angereichert haben, da sie im Überstand nicht mehr detektiert werden konnten. Bei der 20fachen Verdünnung ist allerdings zu sehen, dass ein sehr starkes Grundrauschen (Signal/Noise) im Bereich der kleineren Fragmente auftritt, was später zu Problemen bei den Messungen führte.

Auch in der folgenden Abbildung 4.1.2 wurde bei der Messung des Überstandes kein Substratpek detektiert. Außerdem weisen alle drei Messungen des Pellets eindeutige und klar strukturierte Massenspektren des intakten A- β_{3-40} auf.

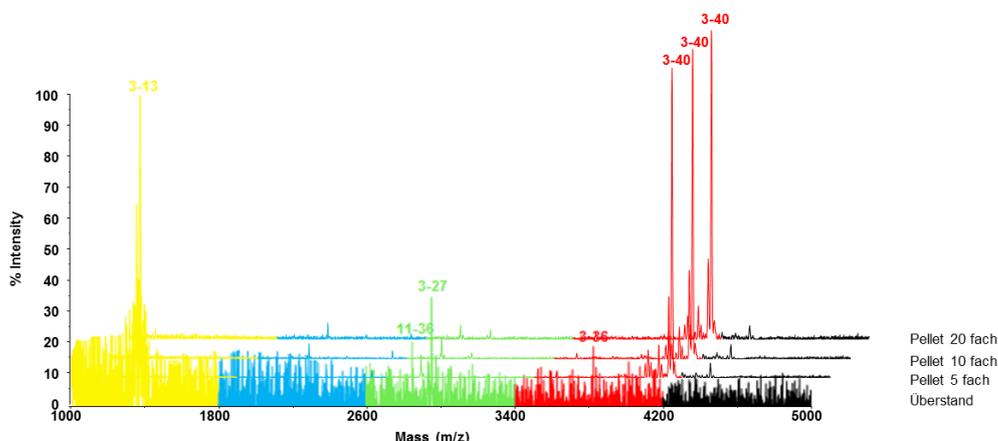


Abb. 4.1.2: Degradomics-Massenspektren vom Substrat Abetafibrillen 3-40. Es wurde jeweils eine Messung des Überstandes, der 5fachen Verdünnung des Pellets sowie dessen 10 und 20fachen Verdünnung vorgenommen.

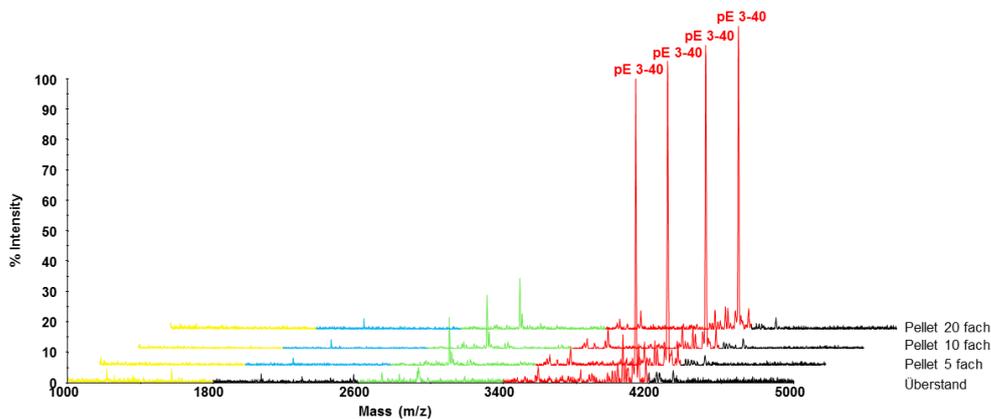


Abb. 4.1.3: Degradomics-Massenspektren vom Substrat Abetafibrillen pE3-40. Es wurde jeweils eine Messung des Überstandes, der 5fachen Verdünnung des Pellets sowie dessen 10 und 20fachen Verdünnung vorgenommen.

Die letzte Abbildung der Vorversuche zeigt die Spaltdiagramme der Abetafibrillen pE3-40. Die Diagramme sind alle klar strukturiert und weisen keine Auffälligkeiten auf. Allerdings wurde auch bei der Messung des Überstandes ein Piek für die Fibrillen detektiert, was darauf schließen lässt, dass die Fibrillen aus der Lösung nicht vollständig abzentrifugiert werden konnten.

4.2 Darstellung der Fibrillen im Elektromikroskop

Um zu untermauern, dass es sich bei den verwendeten Substraten wirklich um Abetafibrillen handelt und nicht nur um lose Fragmente, wurden von Frau Dagmar Schlenzig und Dr. Gerd Hause vom Bioservice der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Untersuchungen mittels Elektromikroskop vorgenommen und die Bilder zur Verfügung gestellt.

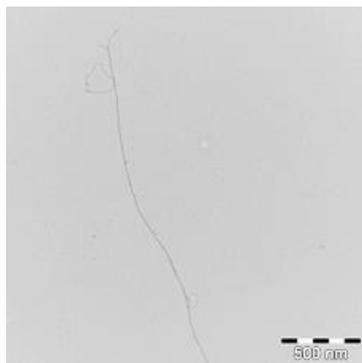


Abb. 4.2.1: Elektromikroskopaufnahme von Aβ 1-40 Fibrillen. Die Fibrillen wurden in MES/ Tris/ Acetat Puffer (25mM, 50mM, 25mM, pH 7,0) gebildet und bei Vergrößerung 20 000 x fotografiert.

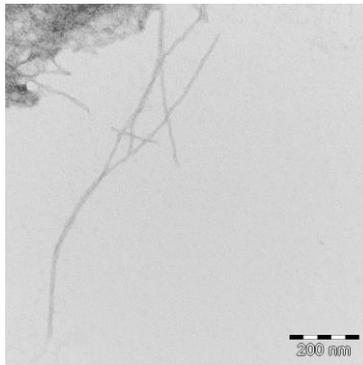


Abb. 4.2.2: Elektromikroskopaufnahme von Aβ 3-40 Fibrillen. Die Fibrillen wurden in MES/ Tris/ Acetat Puffer (25mM, 50mM, 25mM, pH 7,0) gebildet und bei Vergrößerung 50 000 x fotografiert.

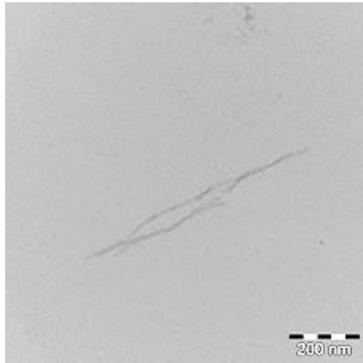


Abb. 4.2.3: Elektromikroskopaufnahme von Aβ pE3-40 Fibrillen. Die Fibrillen wurden in MES/ Tris/ Acetat Puffer (25mM, 50mM, 25mM, pH 7,0) gebildet und bei Vergrößerung 50 000 x fotografiert.

Bei Aβ 1-40 und Aβ 3-40 waren auf allen Bildern ordentliche Fibrillen zu sehen. Bei pEAβ waren hingegen nur partiell richtige Fibrillen zu erkennen. Ansonsten traten dort vermehrt große Aggregate auf. Dies liegt entweder daran, dass das Peptid aggregiert war, oder die Fibrillen sehr dicht gepackt waren. Aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit ist die Aggregation des Peptids für die Aβ pE3-40 Fibrillen typisch. Dies wird daher als Ursache angenommen.

4.3 Physio-chemische Stabilitätsuntersuchungen der Aβ-Fibrillen.

Zur Kontrolle der Substrate und als Vergleichsprobe zu den eigentlichen Degradomics-Massenspektren mit den Proteolyse-Abbaudiagramme der Fibrillen wurden Kontrolldurchläufe durchgeführt, bei denen in den Ansätzen keine Enzyme mit hinzugeben wurden (siehe Methoden). Diese Proben wurden während des normalen Versuchsablaufs mitgeführt und gemessen.

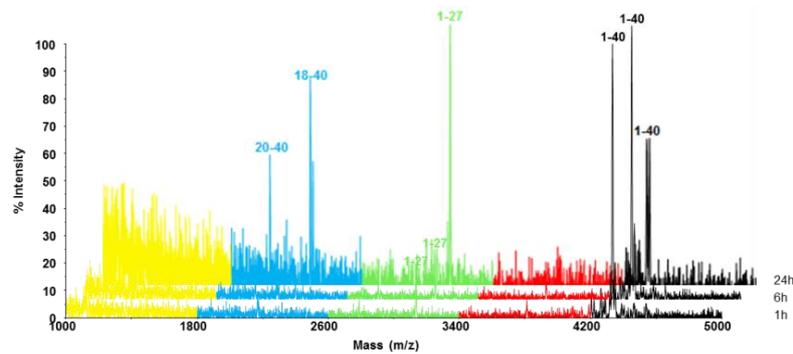


Abb. 4.3.1: Degradomics-Massenspektren Stabilitätsdiagramme vom Substrat Abetafibrillen 1-40 ohne die Zugabe von Enzymen nach 1 h, 6 h, und 24 h.

Bei den Abetafibrillen 1-40 ist nach einer Stunde in Abbildung 4.3.1 noch kein Abbau bzw. eine Schädigung des Substrates zu erkennen. Auch nach 6 h ist noch keine deutliche Wirkung der Wärme auf die Fibrillen zu erkennen. Erst bei der 24 h-Aufnahme ist deutlich zu sehen, dass die Intensität des 1-40 deutlich abgenommen hat und sich mehrere Fragmente gebildet haben, die durch den MALDI-TOF-MS detektiert wurden.

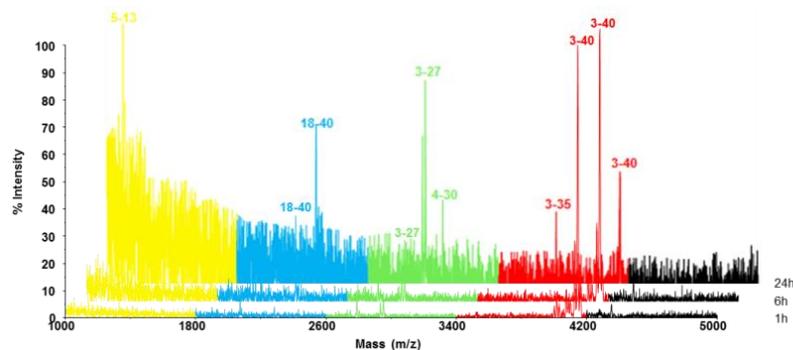


Abb. 4.3.2: Degradomics-Massenspektren Stabilitätsdiagramme vom Substrat Abetafibrillen 3-40 ohne die Zugabe von Enzymen nach 1 h, 6 h und 24 h.

Auch bei den 3-40 Abetafibrillen ist anfangs nach 1 h und 6 h, im Bild 4.3.2, noch kein Anzeichen für einen Abbau auszumachen. Aber auch bei 24 h ist hier, stärker noch als bei 1-40, ein sehr großer Intensitätsverlust des Substratpeaks zu erkennen sowie ein starkes Grundrauschen (Signal/Noise) im Bereich der kleineren Fragmente, was auf einen nicht-enzymatischen Abbau schließen lässt.

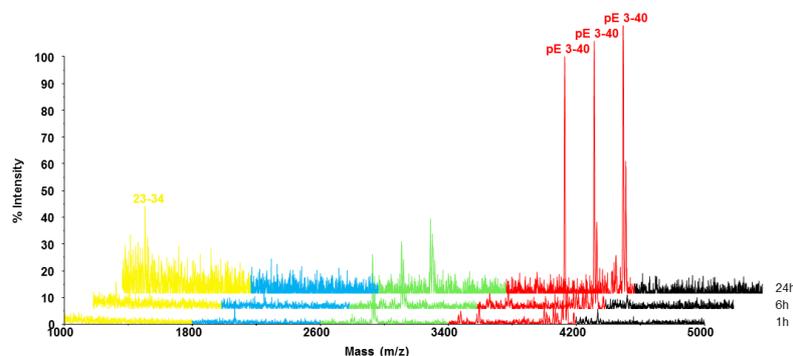


Abb. 4.3.3: Degradomics-Massenspektren Stabilitätsdiagramme vom Substrat Abetafibrillen pE3-40 ohne die Zugabe von Enzymen nach 1 h, 6 h und 24 h.

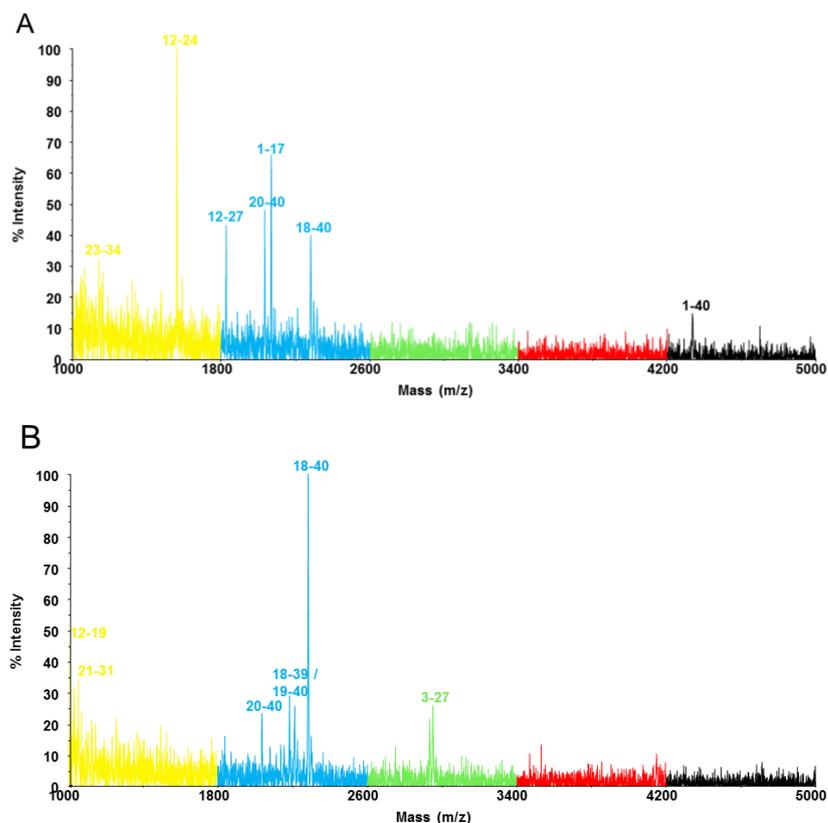
In Abbildung 4.3.3 hingegen, wo die Stabilitätsdiagramme des Substrates pE3-40 dargestellt sind, wurden auch nach 24 h noch die vollen 100 % Intensität des Peaks für die Abetafibrillen detektiert.

Auch treten hier wesentlich weniger und geringere Fragmente auf, als in den beiden Bildern zuvor, so dass hier schlussgefolgert werden kann, dass die pE3-40 Abetafibrillen physio-chemisch am stabilsten sind.

4.4 Vergleich der Degradomics-Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen nach 16 h

Der wichtigste Teil der Arbeit bestand darin, heraus zu finden, ob es Unterschiede in dem Abbau der Fibrillen Abeta 1-40, Abeta 3-40 und Abeta pE3-40 mit den in der Einleitung beschriebenen Enzymen gibt. Hierfür wurden jeweils ein Spaltdiagramm von Abetafibrillen 1-40, Abetafibrillen 3-40 sowie jeweils eins von Abetafibrillen pE3-40 nach einer Reaktionszeit von 16 h ausgewählt, um sicher zu gehen, dass auch genug Zeit vergangen ist, um eine mögliche Reaktion sehen zu können. In den meisten pE3-40 Spektren ist ein Peak mit der Masse von ca. 2925 m/z detektiert, welcher für Fragmente der Größe 12-23 bzw. 13-24 steht. Dies ist jedoch ein nicht-enzymatisches Spaltprodukt, welches in der Auswertung außer Beachtung gelassen wird, da es auch in den Kontrollen (siehe Abb. 4.3.3) und den t_0 - Proben detektiert wurde.

In der Abbildung 4.4.1 sind als erstes die Degradomics-Massenspektren von den Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und den Abetafibrillen pE3-40 (C) nach der Proteolyse mit NEP bei 16 h dargestellt.



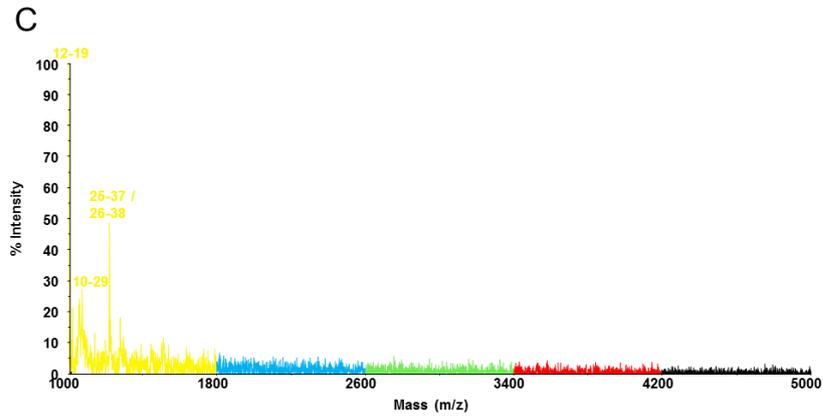
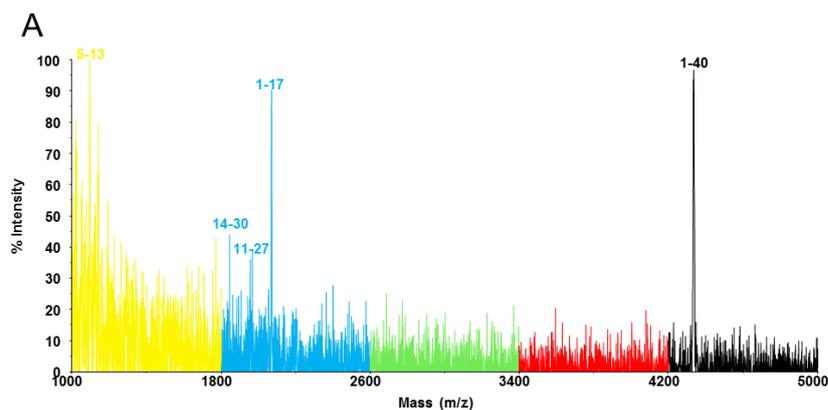


Abb. 4.4.1: Degradomics-Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der Hydrolytischen Proteolyse mit Neprilysin bei 16 h.

Es ist zu sehen, dass alle drei Fibrillenarten für Neprilysin sehr gute Substrate sind. Alle drei Diagramme zeigen einen sehr deutlichen Abbau der Fibrillen, so dass lediglich bei 1-40 noch ein kleiner Piek des Substrates detektiert werden konnte, der aber kaum die 10 % überschreitet. Allerdings ist deutlich zu erkennen, dass in den Diagrammen A und B mehr und auch größere Fragmente entstanden sind als bei C. Während bei C die kleineren Fragmente 12-19 mit 100 % sowie 25-37/ 26-38 und 10-29 mit ca. 50 % bzw. 30 % detektiert wurden, treten bei Abetafibrillen 1-40 und 3-40 hauptsächlich Fragmente mit über 1500 m/z auf. Bei A ist das Fragment 12-24 mit einer Intensität von 100 % am stärksten detektiert, gefolgt von 1-17 bei über 60 % und den zwischen 40 % und 50 % erscheinenden Fragmenten 20-40, 12-27 und 18-40. Abeta 18-40 ist hingegen bei den Fibrillen 3-40 mit einer Intensität von 100 % am stärksten detektiert, gefolgt von 12-19 bei ca. 50 % und mehreren kleineren Fragmenten zwischen 20 % und 40 %.



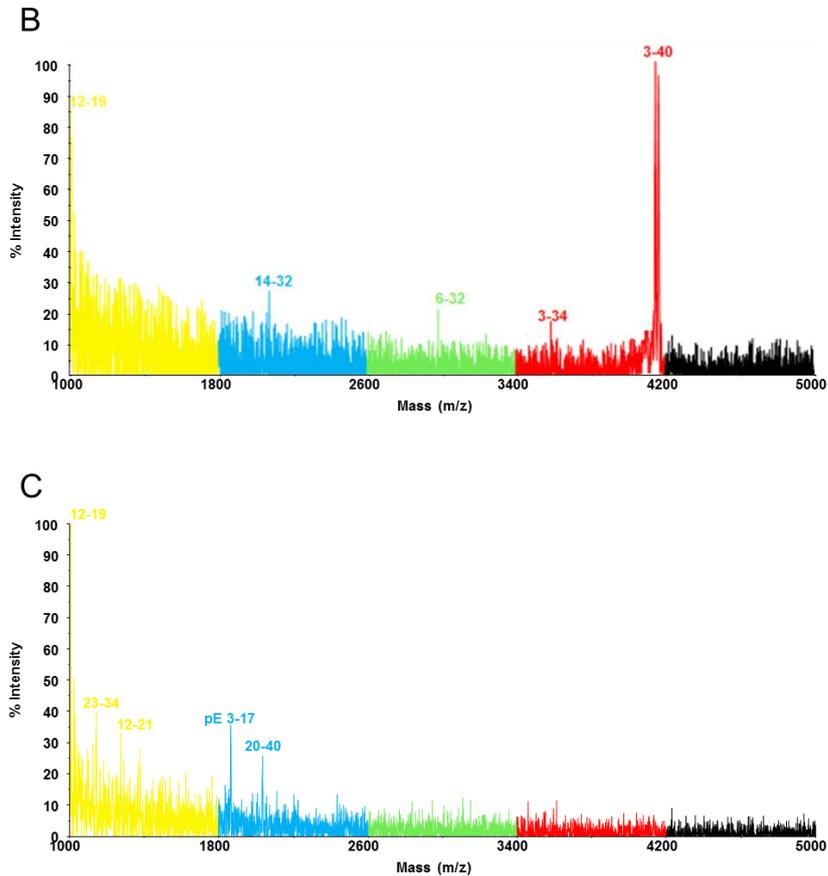


Abb. 4.4.2 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der Hydrolytische Proteolyse mit Nephilysin 2 bei 16 h.

In der Abbildung 4.4.2 ist der proteolytische Abbau von Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und Abetafibrillen pE3-40 (C) nach 16 h mit dem Enzym Nephilysin 2 dargestellt. Es ist zu sehen, dass sowohl bei den Fibrillen Abeta 1-40 (A), wie auch bei 3-40 (B) noch die Substratpeaks mit voller Stärke detektiert wurden. Bei beiden wurden jedoch ebenfalls Fragmente detektiert, was auf eine sehr langsame, aber doch vorhandene Reaktion hindeutet, wobei die Fragmente 5-13 und 1-17 bei A und 12-19 bei B in ihrer Intensität schon sehr ausgeprägt sind. Dahingegen wurde bei den pE3-40 Fibrillen das gesamte Substrat versetzt und es entstand ein kleineres Fragment, 12-19, welches mit der ganzen Intensität auftritt, und weitere weniger stark vertretene, wie 23-34, pE3-17, 12-21 und 20-40, welche allerdings alle unter 40 % liegen.

Die nächsten beiden Darstellungen sind sich sehr ähnlich. In Abbildung 4.4.3 sind die Degradomics-Massenspektren von den Fibrillen Abeta 1-40 (A), Abeta 3-40 (B) und Abeta pE3-40 (C) nach 16 h mit Insulysin zu sehen und in Abbildung 4.4.4 die Degradomics-Massenspektren von den Fibrillen Abeta 1-40 (A), Abeta 3-40 (B) und Abeta pE3-40 (C) mit dem Enzym Plasmin nach 16 h. Sowohl Insulysin, als auch Plasmin haben die Substrate vollständig abgebaut und in kleinere Fragmente zerlegt. Einzig bei der Abbildung 4.4.4 B der Proteolyse von den Abetafibrillen 3-40 mit Plasmin, wurde noch ein Substratpeak detektiert, der aber nur eine Intensität von unter 20 % aufweist.

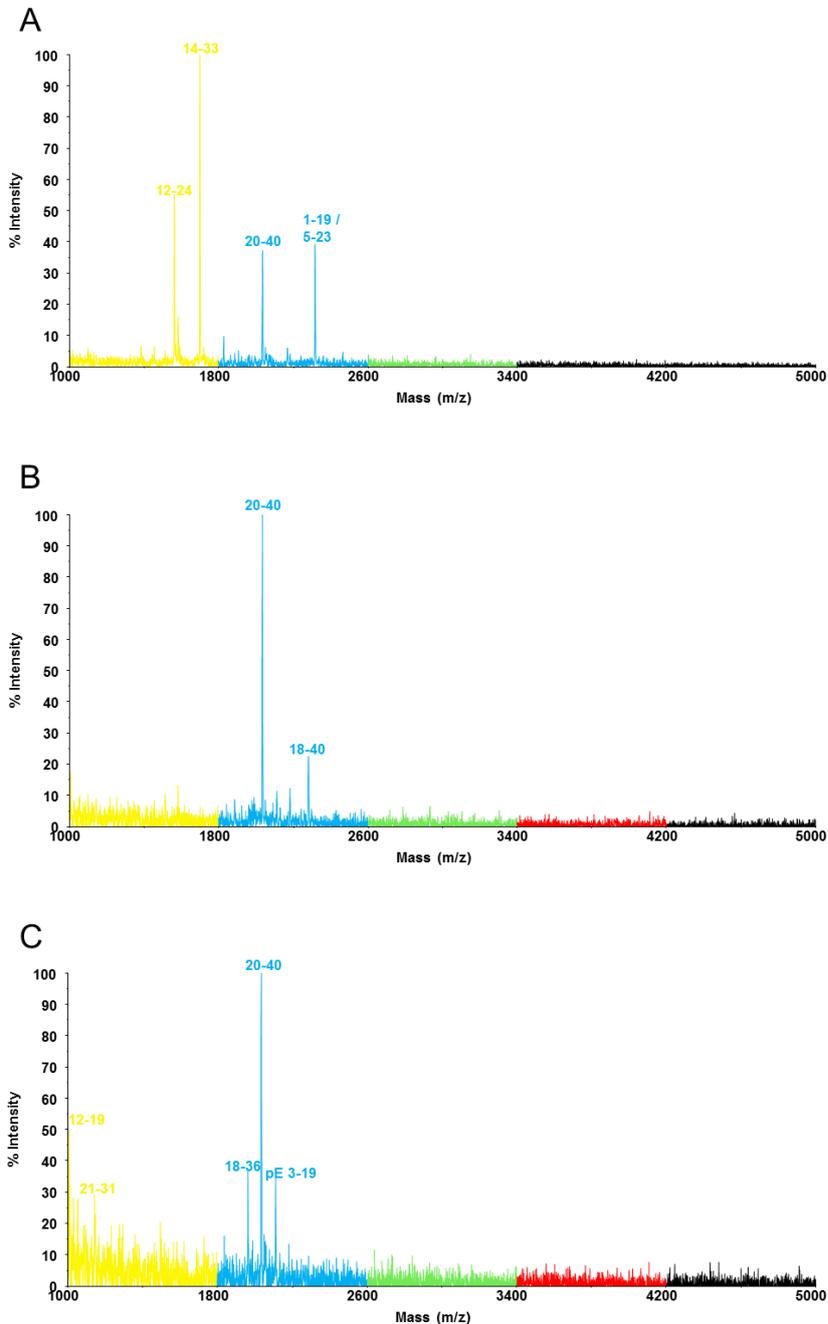


Abb. 4.4.3 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Insulysin bei 16 h.

Die 1-40 Fibrillen in der Abbildung 4.4.3 wurden vollständig in die Teile 14-33, 12-24, 1-19/ 5-23 sowie in 20-40 gespalten. Wobei 14-33 mit 100 % Intensität am stärksten auftritt, gefolgt von 12-24 mit ca. 55 %. Auf die beiden Fragmente 1-19/ 5-23 und 20-40 entfallen knapp 40 % der Intensität. Bei den Teilen B und C der Abbildung 4.4.3 wurde das Fragment 20-40 mit 100 % Intensität detektiert. Jedoch wurde bei B nur ein weiterer Peak mit 18-40 sichtbar, während im Gegensatz dazu bei C noch 4 andere Bruchstücke (12-19, 21-31, 18-36 und pE3-19) aufgezeigt wurden.

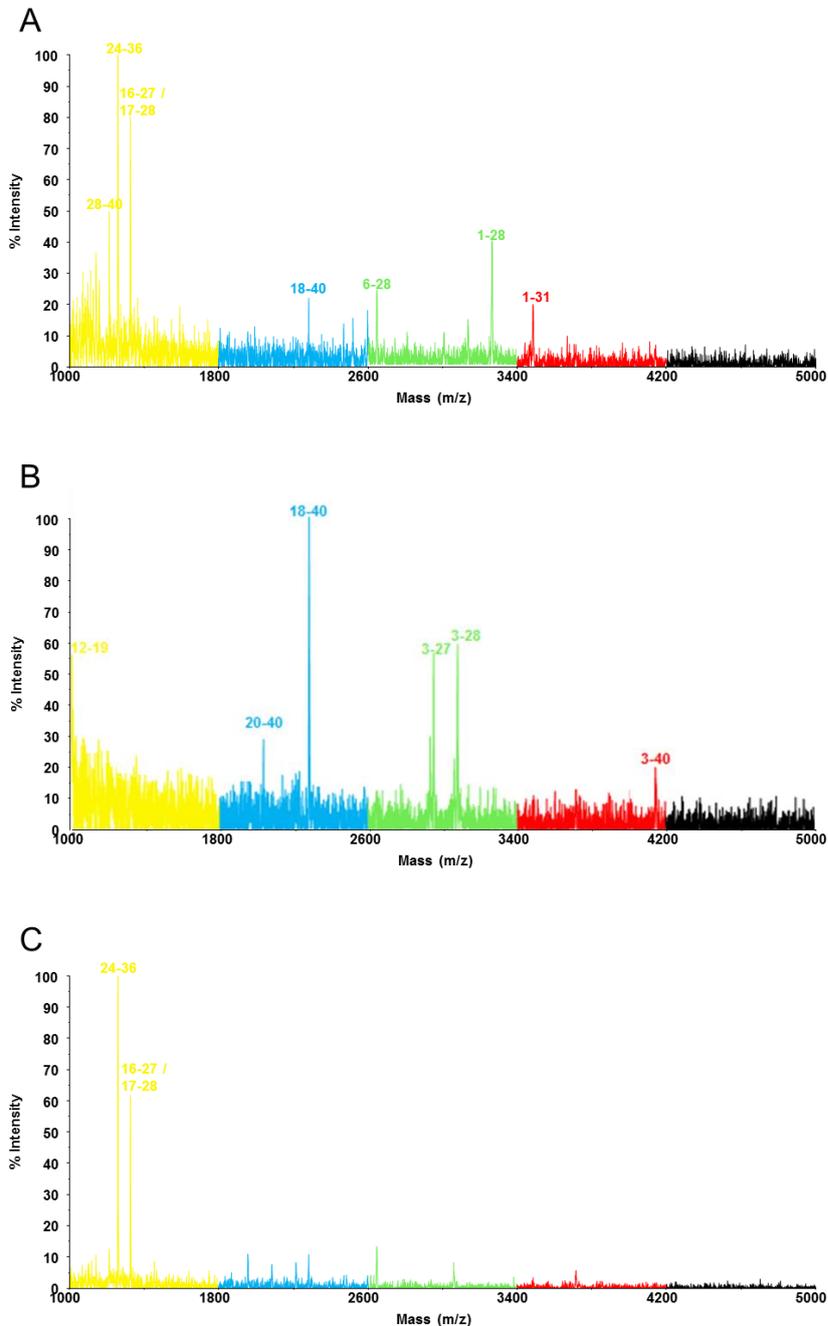


Abb. 4.4.4 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Plasmin bei 16 h.

Bei 1-40 und pE3-40 in Abbildung 4.4.4 treten besonders kleinere Fragmente mit über 50 % Intensität auf, wie zum Beispiel 24-36, 16-27/ 17-28 und 28-40 bei A oder 24-36 und 16-27/ 17-28 bei C. Dahingegen wurden bei B vor allem mittel große Fragmente zwischen m/z 1800-3400, wie 18-40, 3-27, 3-28 und 20-40 stark detektiert. In diesem Bereich sind bei C überhaupt keine und bei A nur Peaks mit geringeren Intensitäten unter 40 % zu sehen.

In der Abbildung 4.4.5 sind die Degradomics-Massenspektren vom Substrat der Fibrillen Abeta 1-40 (A), Abeta 3-40 (B) und Abeta pE3-40 (C) nach der Proteolyse mit Matrix-Metalloproteasen 2 nach 16 h dargestellt. Anders als bei der Proteolyse mit Plasmin wurde hier nur das Substrat der 3-40 Abetafibrillen vollständig abgebaut, während bei 1-40 und pE3-40 noch ein kleiner Piek von unter 20 % detektiert wurde.

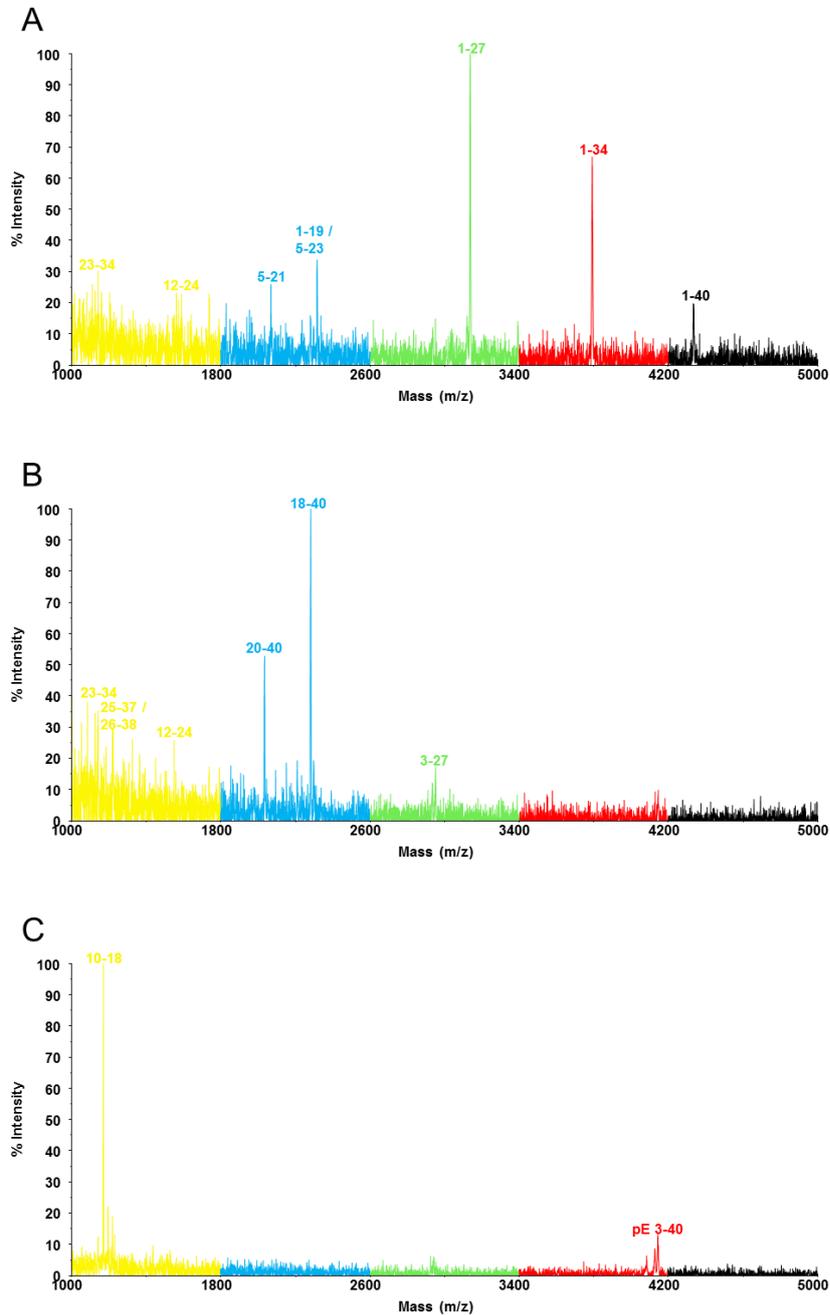


Abb. 4.4.5 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Matrix- Metalloproteinase 2 bei 16 h.

In C der Abbildung 4.4.5. sieht man, dass pE3-40 nur in ein einziges Fragment zerlegt wurde, nämlich 10-18, welches mit einer Intensität von 100 % vorkommt. Bei A und B entstanden mehrere Fragmente in unterschiedlichen Bereichen. So sind bei B die Fragmente 18-40 mit 100 % und 20-40 mit über 50 % vertreten, sowie einer große Anzahl an kleineren Fragmenten mit Intensitäten unter 40 %. Im hydrolytischen Protolysendiagramm A sind in allen Fragmentabschnitten Piek detektiert worden.

Herausstechend mit 100 % ist das Fragment 1-27 gefolgt von 1-34 mit über 65 %. Im Bereich der kleineren Fragmente bis 2600 m/z sind weitere Pieks zu finden, allerdings mit Intensitäten unter 40 %.

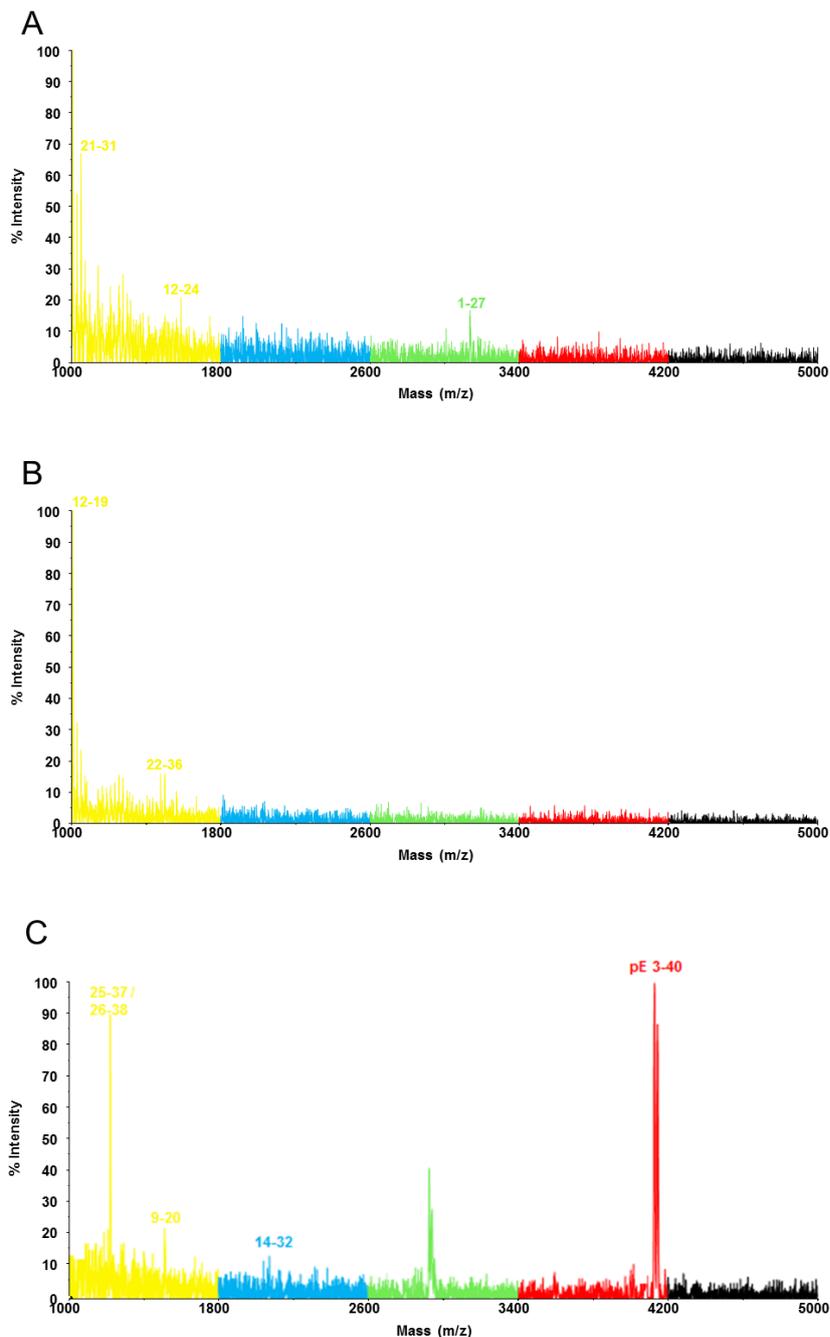


Abb. 4.4.6 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Matrix- Metalloproteinase 3 bei 16 h.

In der Abbildung 4.4.6 sind die Degradomics-Massenspektren der hydrolytischen Proteolyse mit der Matrix- Metalloproteinase 3 nach 16 h dargestellt. Wie anhand der Diagramme zu sehen ist, hat diesmal die hydrolytische Proteolyse bei den Abetafibrillen 1-40 und 3-40 sehr gut funktioniert, wo hingegen bei den Abetafibrillen pE3-40 nur eine langsame Reaktion zu erkennen ist. Während die Fibrillen in Abbildung C noch immer als komplettes Substrat vorliegen, wurden diese bei A und B vollständig abgebaut. Allerdings weist Abbildung C, auf Grund der Pieks für die Fragmente 25-37/ 26-38 mit fast 90 % und 9-20 und 14-32 von unter 20 % auf eine langsame proteolytische Reaktion bei

den pE3-40 Fibrillen hin. Bei A und B wurden beide Substrate in sehr kleine Fragmente gespalten, so dass bei A ein Piek von 21-31 bei über 65 % und bei B von 12-19 bei 100 % detektiert wurden.

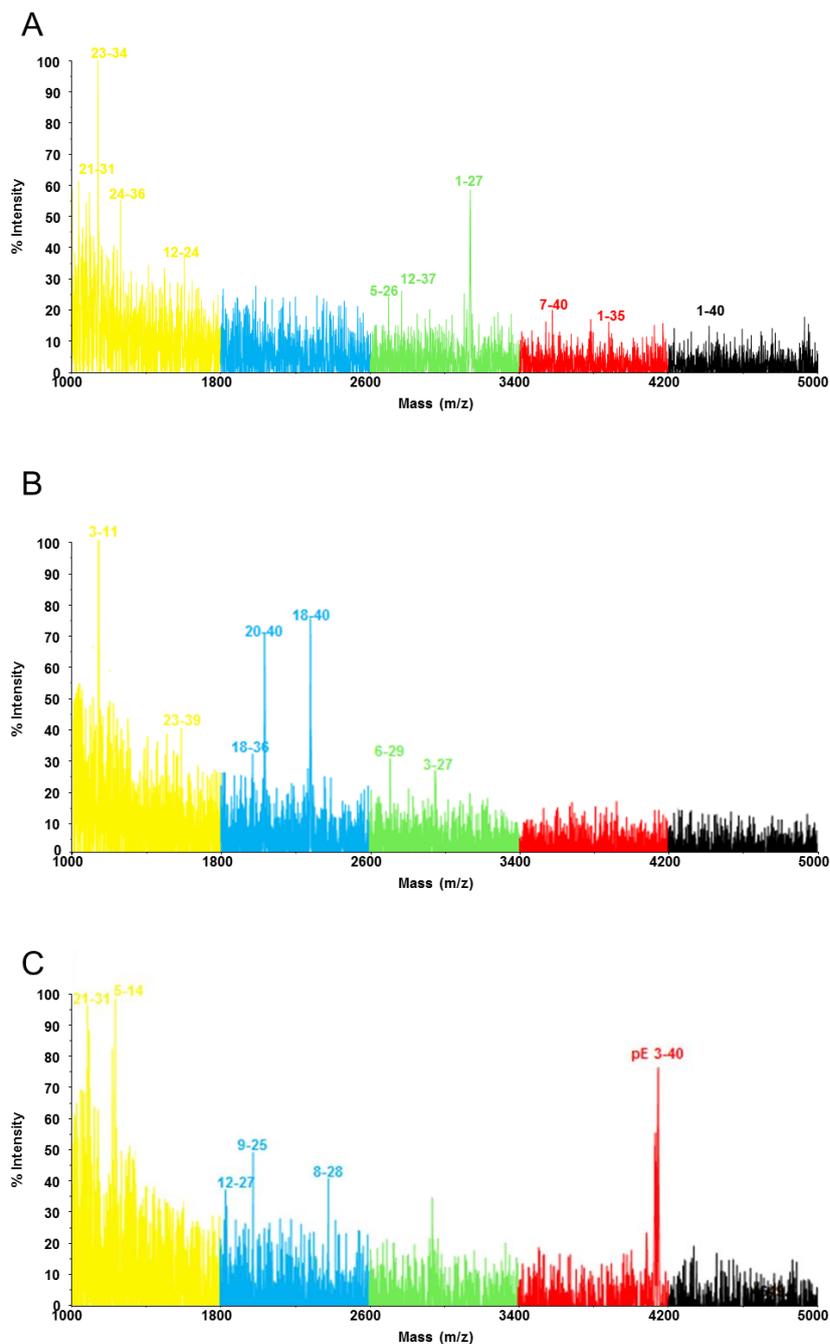


Abb. 4.4.7 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Matrix- Metalloproteinase 9 bei 16 h.

Die Abbildung 4.4.7 zeigt die Degradomics-Massenspektren der hydrolytischen Proteolyse mit der Matrix- Metalloproteinase 9 nach 16 h. Wie anhand der Darstellung festzustellen ist, hat hier die hydrolytische Proteolyse der Fibrillen Abeta 1-40 und Abeta 3-40 ebenfalls sehr gut funktioniert, wo hingegen bei Abeta pE3-40 wieder nur eine langsame Reaktion stattfand. So wurden in den Abbildungen A und B jeweils das gesamte Fibrillen-Substrat umgesetzt. Bei A entstand mit 100 % das Fragment 23-34, mit knapp 60 % 1-27 und mehrere detektierte Fragmente mit geringeren Intensitäten. Das Fragment 3-11 wurde mit 100 % bei B am deutlichsten detektiert. Des Weiteren folgen Piekts zwischen 70 % und 80 % für 20-40 und 18-40 sowie mehrere kleinere Piekts für

Fragmente mit Intensitäten unter 40 %. Bei den pE3-40 Fibrillen allerdings ist zwar nach 16 h ein Abbau zu erkennen, aber nicht so stark wie bei 1-40 und 3-40. Hier entstanden die Fragmente 21-31 und 5-14 mit einer Intensität von über 90 %, während das komplette Substrat nur zu einem Drittel umgesetzt wurde. Starkes Grundrauschen (Signal/Noise) bei allen Massenspektren in Abbildung 4.4.7 weist jedoch auf einen Umsatz aller Abbauprodukte hin.

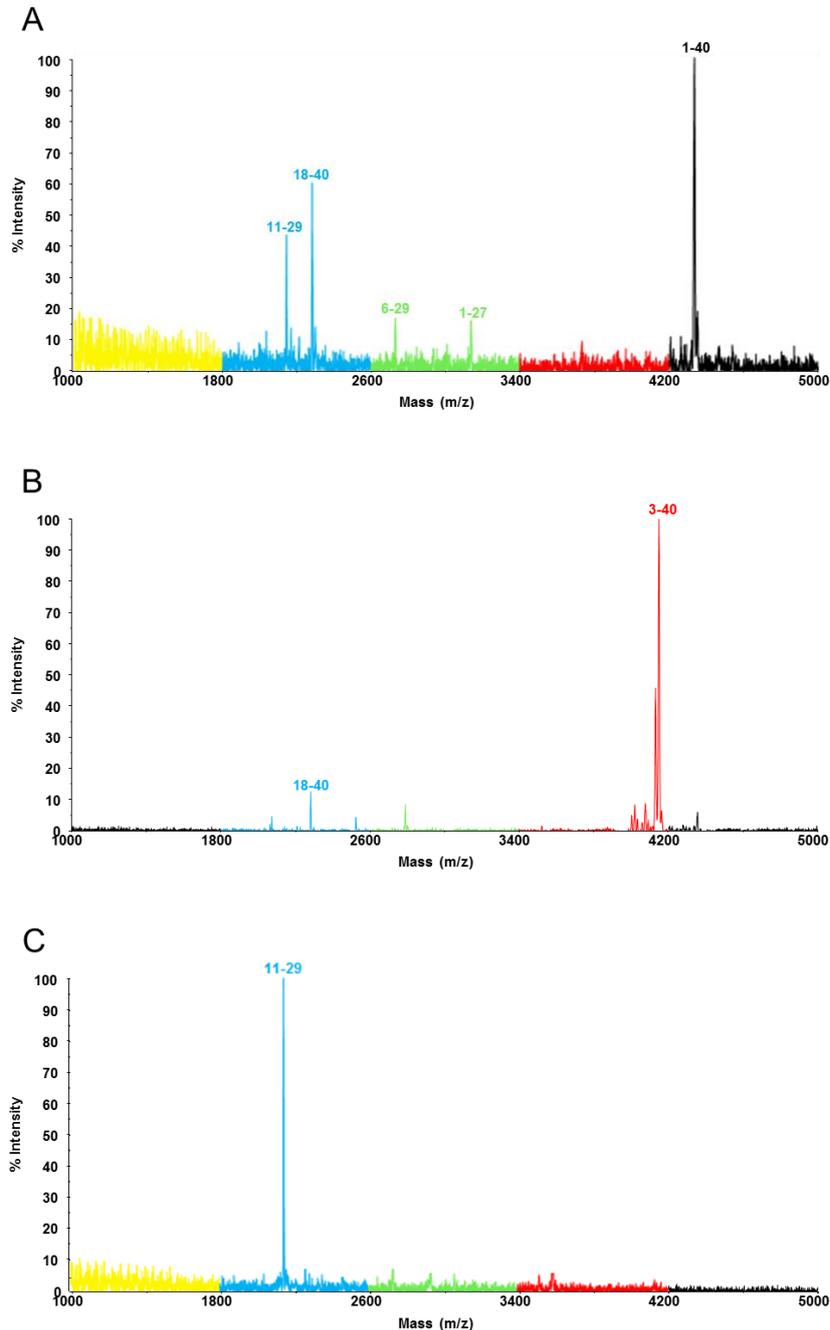


Abb. 4.4.8 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Matrix- Metalloproteinase 13 bei 16 h.

Abbildung 4.4.8 zeigt die Degradomics-Massenspektren von den Abeta 1-40- (A), Abeta 3-40- (B) und Abeta pE3-40-Fibrillen (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit der Matrix- Metalloproteinase 13 (MMP13) bei 16 h. Entgegen der beiden letzten Abbildungen 4.4.6 und 4.4.7, werden die Abetafibrillen pE3-40 schneller durch MMP13 abgebaut als bei den Abetafibrillen 1-40 und 3-40. So liegt diesmal bei den Abetafibrillen 1-40 und 3-40 noch immer das komplette Substrat vor. Dies ist

anhand der Peaks mit der Intensität von 100 % zu erkennen, die für die jeweiligen Fragmente 1-40 bei A und 3-40 bei B detektiert wurden, während die Abeta pE3-40 Fibrillen vollständig zu 11-29 abgebaut sind. Lediglich bei den Abetafibrillen 1-40 in A wurden Fragmentpeaks bei 60 % für 18-40, bei 45 % für das Fragment 11-29 sowie für 6-29 und 1-27 bei unter 20 % gebildet, was auf eine sehr langsame enzymatische Reaktion hindeutet.

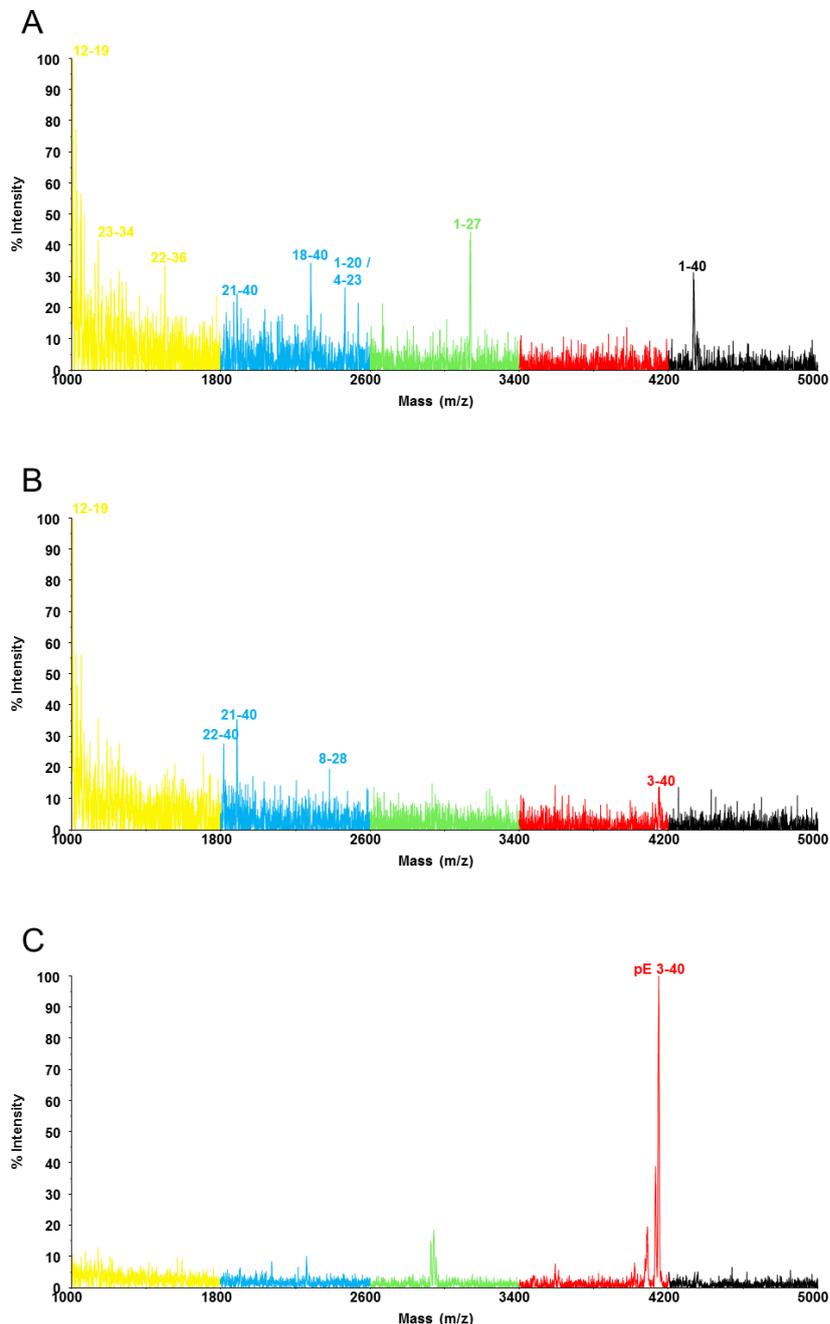


Abb. 4.4.9 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Plasma Kallikrein aktiviertem Meprin A bei 16 h.

Die Abbildung 4.4.9 zeigt die Degradomics-Massenspektren von Abetafibrillen 1-40 (A), Abetafibrillen 3-40 (B) und Abetafibrillen pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Plasma Kallikrein aktiviertem Meprin A bei 16 h. Bei A ist zu sehen, dass die Fibrillen 1-40 sehr gut abgebaut werden, da der Peak nur noch mit einer Intensität von weniger als 30 % gemessen wurde. Die Fibrillen wurden überwiegend in die Fragmente 12-19 und 1-27 zerlegt. Weitere Fragmente wurden nur mit geringen

Intensitäten detektiert. Das Substrat Abetafibrillen 3-40 wurde, wie in B zu erkennen, fast vollständig abgebaut und in kleinere Fragmente zerteilt. Mit 100 % konnte das Fragment 12-19 hier am stärksten detektiert werden, aber auch die Fragmente 21-40, 22-40 und 8-28 sind deutlich an hervortretenden Pieks zu erkennen. Bei C hingegen sind keine nennenswerten Spaltprodukte zu sehen, so dass nach 16 h das Substrat Abetafibrillen pE3-40 noch vollständig erhalten ist.

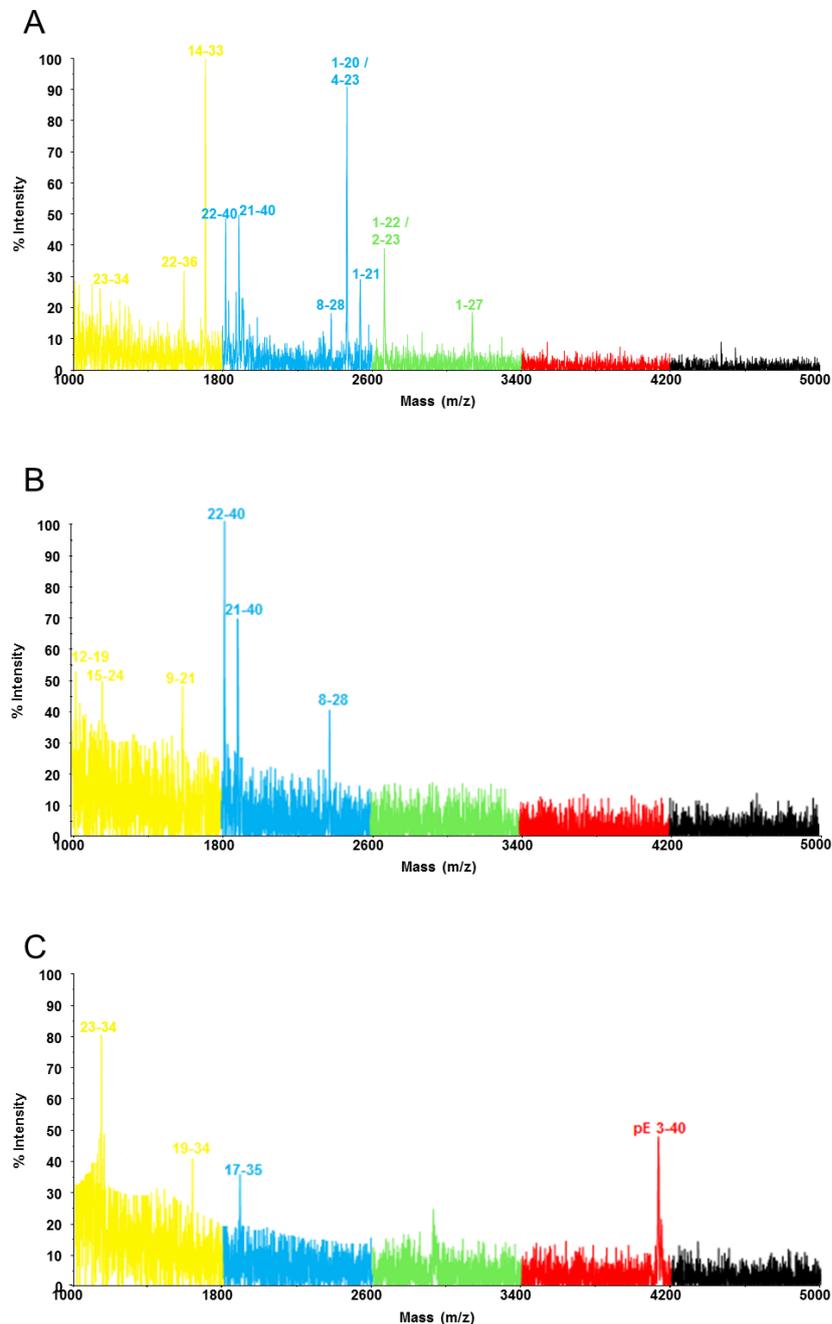


Abb. 4.4.10 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Tissue Kallikrein aktiviertem Meprin A bei 16 h.

In dem Bild 4.4.10 sind die Spaltdiagramme mit dem Enzym Meprin A, welches mit Tissue Kallikrein aktiviert wurde, dargestellt. Im Abschnitt A steht das Spaltpattern für das Substrat Abetafibrillen 1-40. Das Substrat wurde vollständig gespalten und in kleinere Fragmente zerlegt. 14-33 ist das Fragment, welches mit einer Intensität von 100 % auftritt, gefolgt von 1-20/ 4-23 mit ca. 91 %. Weitere Fragmente sind 22-40, 21-40, 1-22/ 2-23 und einige mehr, die im Intensitätsbereich unter 50 %

liegen. Auch bei B wurde das Substrat vollständig abgebaut. Hier entstanden weniger Bruchstücke als bei A. Mit 100 % Intensität wurde 22-40 am stärksten detektiert. Dagegen konnte das Substrat der pE3-40 Abetafibrillen, wie in Bildabschnitt C zu sehen ist, nicht vollständig aufgespalten werden, so dass der Substratpik noch mit einer Intensität von über 40 % detektiert werden konnte. Als Spaltprodukte treten die Fragmente 23-34 mit 80 % sowie 19-34 und 17-35 mit ca. 40 % bzw. 37 % Intensität auf.

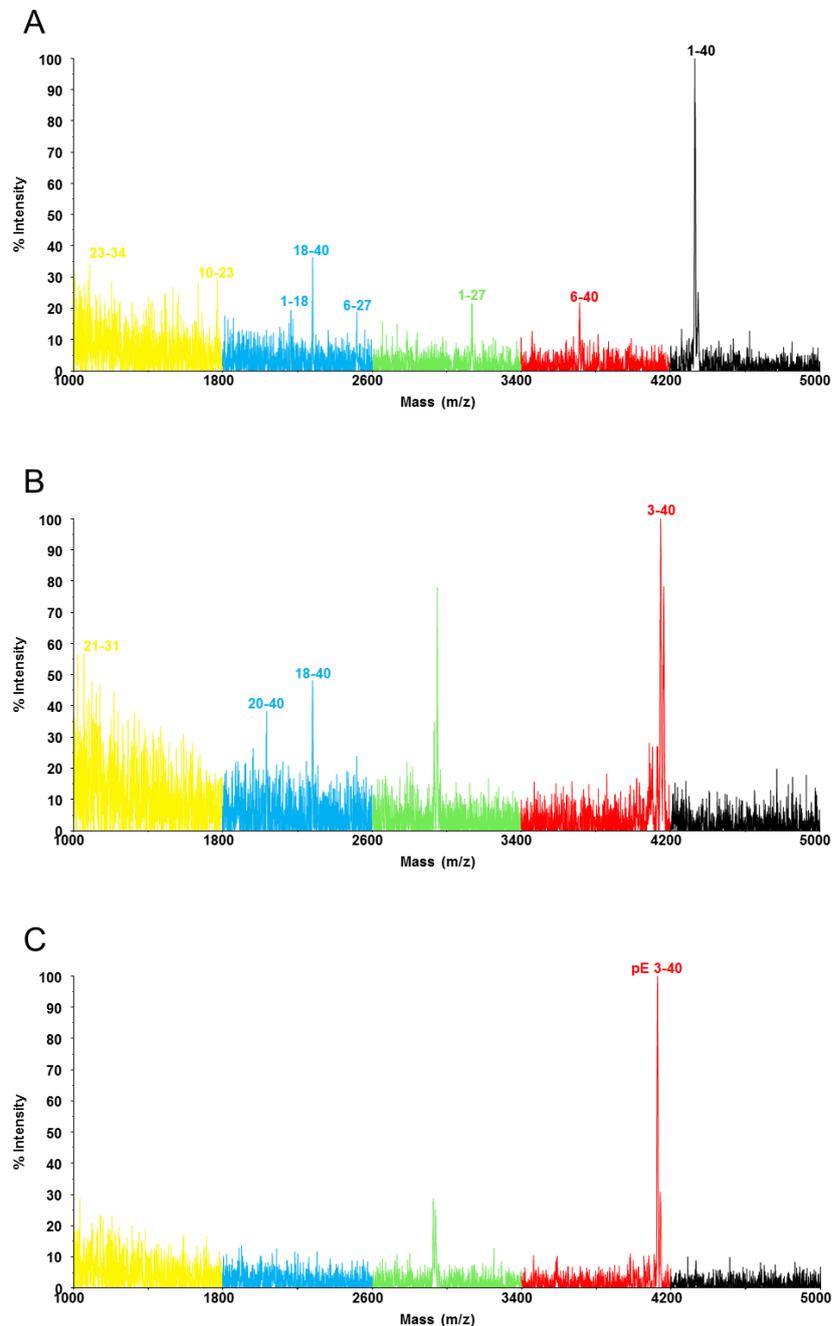


Abb. 4.4.11 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Plasma Kallikrein bei 16 h.

In der Abbildung 4.4.11 ist die hydrolytische Proteolyse von den Fibrillen Abeta 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) mit dem Enzym Plasma Kallikrein nach 16 h abgebildet. In allen drei Diagrammen ist kein deutlicher Abbau der Fibrillen zu erkennen. Allerdings ist im Gegensatz zu C bei A und B auf Grund der detektierten Peaks eine doch vorhandene Reaktion des Substrates zu erkennen. Bei A kann man

davon ausgehen, dass keine Reaktion mit dem Enzym erfolgte. Im ersten Diagramm bei den Fibrillen 1-40 wurden mehrere Fragmente aufgezeigt, deren Piekss jedoch alle unter 40 % liegen, während bei B nur drei große Fragmente hervortreten. So wurden in B die Piekss für 3-27 mit ca. 80 % und die Piekss für 18-40 und 20-40 mit jeweils 50 % bzw. 40 % detektiert.

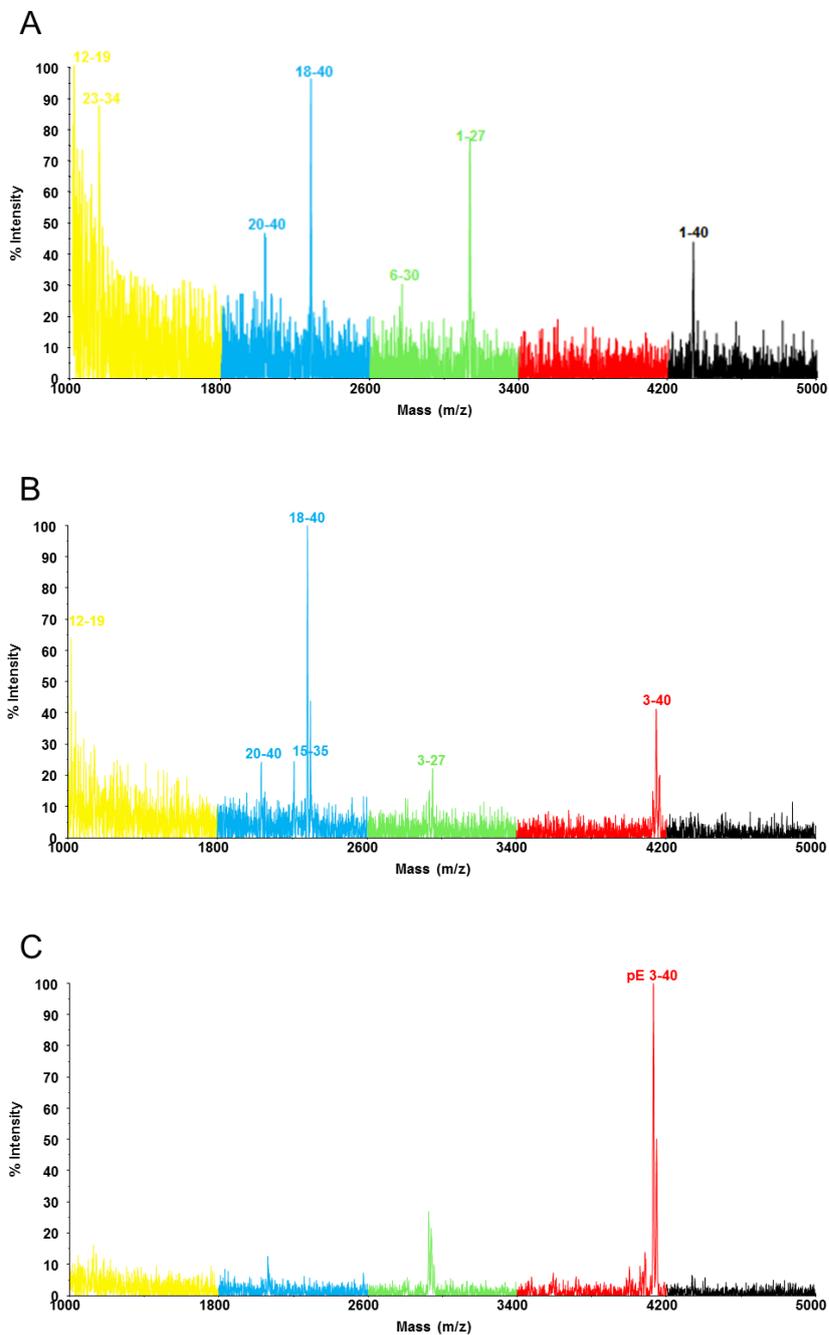


Abb. 4.4.12 : Massenspektren vom proteolytischen Abbau der Degradomics-Massenspektren Abetafibrillen 1-40 (A), 3-40 (B) und pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Tissue Kallikrein bei 16 h.

In der Abbildung 4.4.12 sind die Degradomics-Massenspektren von den Fibrillen-Substrat Abeta 1-40 (A), Abeta 3-40 (B) und Abeta pE3-40 (C) nach der hydrolytischen Proteolyse mit Tissue Kallikrein bei 16 h dargestellt. Ähnlich wie in 4.4.11 verhält es sich auch in der Abbildung 4.4.12. Auch hier ist bei dem Substrat Abeta pE3-40 keine Reaktion zu erkennen und der Substratpikss noch vollständig mit 100 % vorhanden. Allerdings ist hier im Gegensatz zu der vorherigen Abbildung ein deutlicher Abbau

bei den Fibrillen 1-40 und 3-40 verzeichnet. So ist bei beiden Diagrammen A und B von den Substratpeaks nur noch knapp mehr als 40 % an Intensität detektiert und es sind deutliche Abbaufragmente vorhanden. Bei den Abetafibrillen 1-40 liegen mehr Fragmente mit höheren Intensitäten vor als bei 3-40. Mit 100 % Intensität ist das Fragment 12-19 bei 1-40 am stärksten vertreten, dicht gefolgt von den Fragmenten 18-40 mit 95 % und 23-40 mit ca. 90 % Intensität. Weitere Fragmente sind 1-27 mit 80 % sowie 20-40 mit über 45 % und 6-30 mit 30 %. Bei den Fibrillen 3-40 ist das Fragment 18-40 mit 100 % am stärksten detektiert. Des Weiteren wurden noch die Fragmente 12-19 mit 65 % und 20-40, 15-35 sowie 3-27 mit weniger als 30 % detektiert.

4.5 Darstellung des zeitabhängigen proteolytischen Degradomics der Abetafibrillen mittels MALDI-TOF-MS

Die Effizienz des proteolytischen Abbaus der Abetafibrillen lässt sich am besten anhand einer zeitabhängigen Substrathydrolyse darstellen. Sowohl für das Substrat Abetafibrillen 1-40, 3-40 wie auch für Abetafibrillen pE3-40 wurden zeitabhängige Degradomics-Massenspektren für einige auserwählte Peptidasen erstellt und als Kontrollvergleich dazu von der letzten Zeit das dazugehörige Massenspektra mit Inhibitor. Um es möglichst übersichtlich zu gestalten, wurden wie auch bei den anderen Darstellungen, die Bereiche mit den Peaks unterschiedlich bunt eingefärbt.

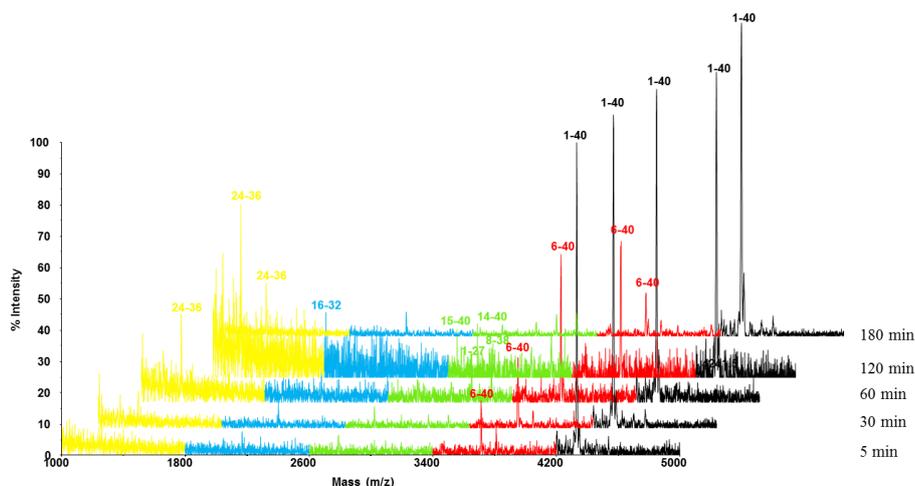


Abb. 4.5.1 : Massenspektrum des zeitabhängigen proteolytischen Abbaus der Abetafibrillen 1-40 durch Plasmin ohne Inhibitor. Dargestellt wurde die Proteolyse bei 5 min, 30 min, 1 h, 2 h und 3 h.

In der Abbildung 4.5.1 ist das Zeitabhängigkeitsdiagramm der Abetafibrillen 1-40 während der hydrolytischen Proteolyse mit Plasmin dargestellt. Ausgewählt wurden die Degradomics-Massenspektren nach einer Reaktionszeit von 5 min, 30 min, 1 h, 2 h und 3 h. Wie in der Abbildung zu sehen ist, wird 5 min nach Reaktionsbeginn bereits schon ein kleiner Peak für das Fragment 6-40 detektiert. Dies ist als ein deutliches Anzeichen für eine hydrolytische Proteolyse des Substrates zu sehen. Im Verlauf der nächsten 3 h ist allerdings zu erkennen, dass zwar weiterhin Fragmente durch die hydrolytische Proteolyse entstehen und im MALDI-TOF detektiert wurden. Allerdings ist beim Substratpeak keine Abnahme der Intensität zu sehen. Dies deutet auf einen sehr langsam verlaufenden Abbau des Substrates Abetafibrillen 1-40 hin.

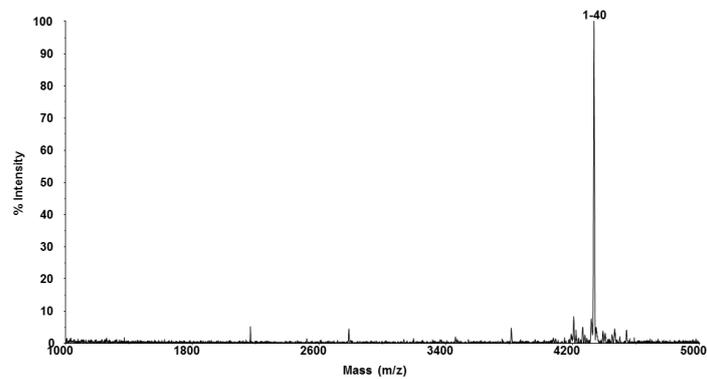


Abb. 4.5.2 : Massenspektren des proteolytischen Abbaus der Abetafibrillen 1-40 durch Plasmin mit Inhibitor α -Antiplasmin nach 3 h.

Bei der Kontrolle wurde durch Einsetzen des Inhibitors α -Antiplasmin die Proteolyse der Abetafibrillen 1-40 durch Plasmin komplett verhindert, wie im Bild 4.5.2 zu erkennen ist.

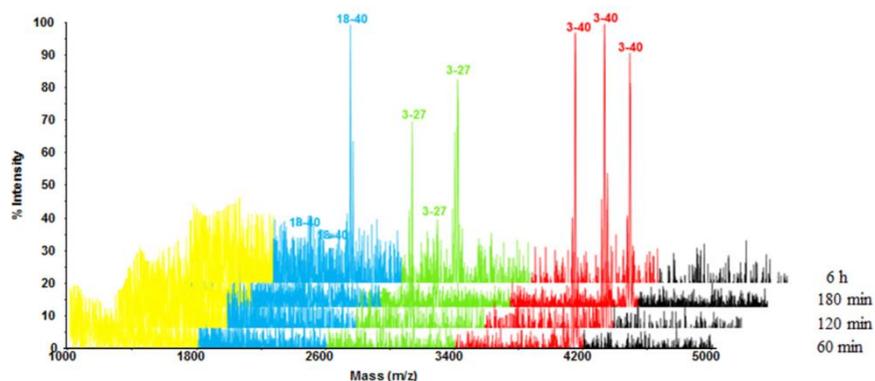


Abb. 4.5.3 : Massenspektren des zeitabhängigen proteolytischen Abbaus der Abetafibrillen 3-40 durch MMP 9 ohne Inhibitor. Dargestellt wurde die Proteolyse bei 1 h, 2 h, 3 h und 6 h.

Wie in der Abbildung 4.5.3 zu sehen ist, sind 1 h nach Reaktionsbeginn noch keine deutlichen Anzeichen für eine hydrolytische Proteolyse des Substrates zu erkennen. Lediglich das starke Grundrauschen (Signal/Noise) im Bereich der kleineren Fragmente deutet auf eine Reaktion des Substrates hin. Nach 2 h allerdings konnten schon 2 Peaks identifiziert werden, nämlich für die Fragmente 18-40 und 3-27. Beim Substrat ist nach 3 h auch ein Abbau anhand der sinkenden Intensität zu erkennen und nach 24 h wurde kein Substratpeak mehr detektiert. Auch die Intensität der beiden hervortretenden Fragmente steigt mit Verlauf der Reaktion.

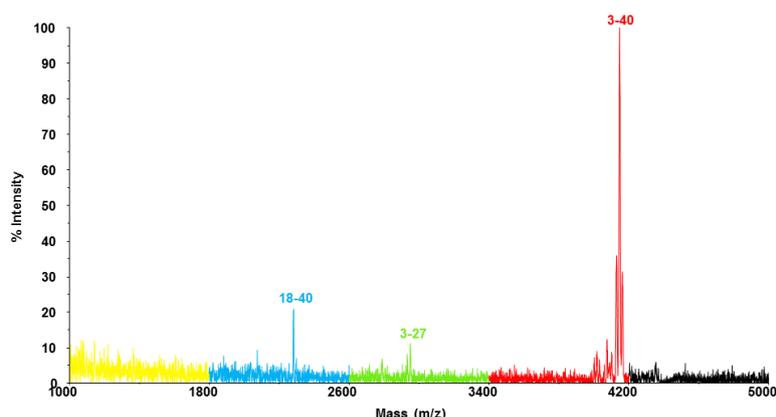


Abb. 4.5.4 : Massenspektren des proteolytischen Abbaus der Abetafibrillen 3-40 durch MMP 9 mit Inhibitor Garladin nach 6 h.

In der Abbildung 4.5.4 ist das hydrolytische Protolysesdiagramm der Abetafibrillen 3-40 mit MMP 9, unter Verwendung des Inhibitors Garladin, bei 16 h dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nur Fragmente mit geringen Intensitäten detektiert wurden und das Substrat noch in seiner Ursprungsform vorliegt, was auf die Wirkung des Inhibitors zurück zu führen ist.

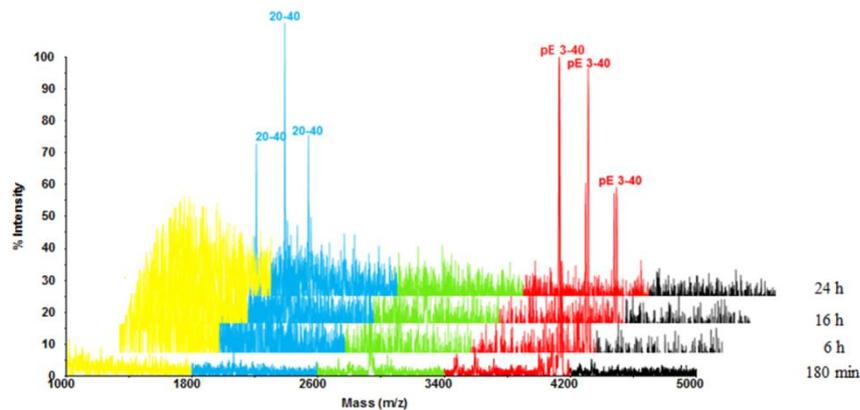


Abb. 4.5.5 : Massenspektren des zeitabhängigen proteolytischen Abbaus der Abetafibrillen pE3-40 durch IDE ohne Inhibitor. Dargestellt wurde die Proteolyse bei 3 h, 6 h, 16 h und 24 h.

Die vorletzte Abbildung zeigt die Zeitabhängigkeit der hydrolytischen Proteolyse des Substrates Abeta pE3-40 mit dem Enzym Insulysin. Es wurden die Zeitpunkte 3h, 6 h, 16 h und 24 h nach Beginn der Reaktion ausgewählt, um den zeitlichen Verlauf zu verdeutlichen. Diese Abbildung zeigt, dass die Abetafibrillen pE3-40 ein sehr gutes Substrat sind. So sind beim Abbau mit IDE nach 16 h fast die ganzen pE3-40 Fibrillen abgebaut. Während in dem Massenspektra von 24 h der Peak des Substrates völlig verschwunden ist. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass vor allem das Fragment 20-40 entsteht. Aber es ist auch ein sehr starkes Grundrauschen (Signal/Noise) im Bereich der kleineren Fragmente vorhanden.

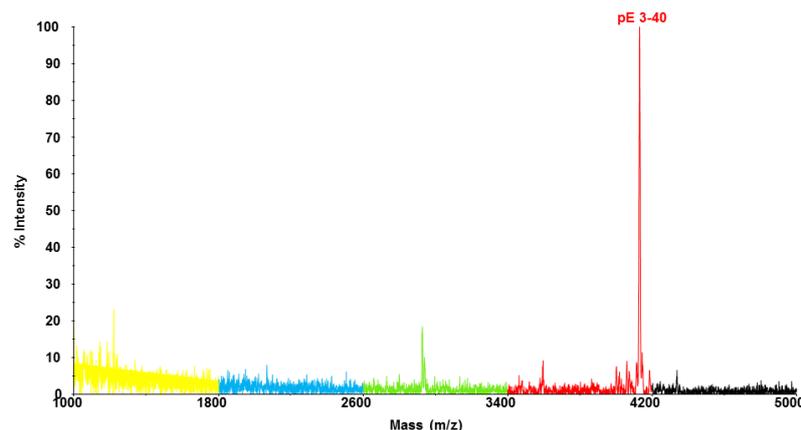


Abb. 4.5.6 : Massenspektren des proteolytischen Abbaus der Abetafibrillen pE3-40 mit IDE mit Inhibitor 1,10-Phenanthrolin nach 24 h.

Das Diagramm in Abbildung 4.5.6 zeigt die hydrolytische Proteolyse der pE3-40 Fibrillen mit IDE unter der Wirkung des Inhibitors 1,10-Phenanthrolin. Durch den Inhibitor wurde die hydrolytische Proteolyse vollständig gehemmt, so dass keine Fragmente detektiert werden konnten.

Weitere Spaltprofile des proteolytischen Abbaus der Abetafibrillen sind in Tabelle 5.2.1 sowie im Anhang zusammengefasst.

5 Diskussion

Die Alzheimersche Erkrankung ist die häufigste Ursache für eine Altersdemenzerkrankung in der westlichen Welt. Die Prävalenz erhöht sich im Alter. Auf Grund der steigenden Lebenserwartung ist in den nächsten Jahrzehnten mit einer Zunahme der Erkrankten zu rechnen, so dass für das Jahr 2030 ca. 2,3 Millionen Erkrankte in Deutschland prognostiziert werden (www.alzheimer-forschung.de). Dabei konnten durch die jahrzehntelange Erforschung dieser Krankheit bereits viele Erkenntnisse über sie gewonnen werden. Im Gegensatz dazu sind über die Ursachen der Krankheit und das Abeta sowie die Abetafibrillen, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, nur sehr wenig bekannt. Mit Hilfe verschiedener bioanalytischer Methoden sollen neue Erkenntnisse über den durch bestimmte Peptidasen proteolytischen Abbau der Abetafibrillen mittels MALDI-TOF-MS gewonnen werden.

5.1 Auswertung der Vorversuche und Stabilitätsuntersuchungen

Zu Anfang wurden die Versuche mit den gleichen Methoden durchgeführt, wie auch bei den Untersuchungen des gelösten Abeta-Peptids (Behrendt, 2013) beschrieben. Jedoch führte eine 20fache Verdünnung der Abetafibrillen 1-40 zu nicht auswertbaren Massenspektren (Abbildung 4.1.1) mit hohem Grundrauschen (Signal/Noise), so dass eine 10fache Verdünnung mit einer besseren Qualität der Massenspektren letztendlich angewendet wurde. Des Weiteren wurden Untersuchungen des Überstandes der abzentrifugierten Fibrillen vorgenommen. Dies diente der Kontrolle, ob Fibrillen während des Abnehmens des Überstandes verloren gegangen waren (ebenfalls in den Abbildungen von 4.1). Auf Grund ihrer schlechten Löslichkeit konnten so noch im Überstand Teile der pE3-40 Abetafibrillen (Abbildung 4.1.3) gemessen werden.

Bei den Stabilitätsuntersuchungen wurden die Abetafibrillen ohne die Zugabe von Enzymen über 24 h den Versuchsbedingungen ausgesetzt. Dies diente dazu, um die nicht enzymatische Stabilität der Fibrillen zu testen. Dabei kam heraus, wie in den Abbildung im Kapitel 4.3 zu sehen ist, dass nur die Fibrillen pE3-40 nach 24 h noch stabil waren. Die beiden anderen waren nach 24 h in kleinere Fragmente zerfallen. Aus diesem Grund wurden zur Auswertung der Ergebnisse auch die Degradomics-Massenspektren von 16 h nach Beginn der Reaktion ausgewählt, da bei diesen die Stabilität der Substrate noch gewährleistet werden konnte.

5.2 Auswertung der hydrolytischen Protolysesergebnisse der Fragmente

Das Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob es Abweichungen der Proteolyse von den verschiedenen Fibrillen gibt und wie sie sich im Vergleich zu der hydrolytischen Protolysen der Abetapeptide 1-40 und pE3-40 aus der Arbeit „Untersuchungen des proteolytischen Abbaus von

Abeta 1-40 und Abeta pE3-40“ von 2013 verhalten. Die Zusammenfassung des *in vitro* metabolischen Abbaus ist in der Tabelle 5.2.1 zu sehen.

Enzyme	Substrat		Abetafibrillen 1-40	Abetafibrillen 3-40	Abetafibrillen pE3-40
	Zeit				
NEP	1 h		1-40, 1-27, 1-18	3-40, 3-27	pE3-40
	6 h		1-40, 1-27	3-40, 18-40, 11-38, 3-27	pE3-40, 11-36
	16 h		1-40, 1-27	3-40, 18-40, 11-38	pE3-40
NEP2	1 h		1-40, 1-27	3-40, 3-27	pE3-40
	6 h		1-40, 1-18, 23-34,	3-40	pE3-40, 20-40, 23-34, 13-28
	24 h		1-40, 1-18, 1-27, 5-16	3-40, 18-40, 11-38, 20-33, 12-25	pE3-40, 20-40
IDE	1 h		1-40	3-40, 20-40, 15-28, 16-30, 14-40, 15-40, 18-40	pE3-40
	6 h		1-40, 1-18	3-40, 20-40, 15-28, 16-30, 16-28, 18-40, 14-27	pE3-40, 20-40, 10-37, 25-37, 26-38, 23-34, pE 3-35
	16 h		1-40, 1-27, 20-40	3-40, 14-27, 18-40, 20-40, 14-40	pE3-40, 20-40
Plasmin	1 h		1-40, 1-27, 6-40, 24-36, 8-38, 4-29, 3-33, 1-28, 1-35, 12-29	3-40, 3-27	pE3-40, pE 3-35, 10-37, 24-36, 4-38
	6 h		1-40, 1-27, 1-28, 6-40, 24-36, 1-23, 11-22	3-40, 24-36, 11-38, 18-40, 18-33, 3-27	pE3-40, pE 3-35, 10-37, 24-36, 6-28, 4-29, 5-32, 17-28, 27-40, 4-38
	16 h		24-36, 27-40, 23-34, 18-40, 16-32, 28-40	24-36, 27-40, 18-40, 3-40, 14-38, 6-40, 4-29, 14-40, 3-27	pE 3-35, 10-37, 24-36, 6-28, 17-28, 27-40
MMP2	1 h		1-40	3-40, 3-27	pE3-40, 14-22
	6 h		1-40, 1-27	3-40, 3-27, 18-40	pE3-40, 14-22
	16 h		1-40, 1-27, 14-34, 23-34, 24-36	3-40, 3-27, 18-40, 14-40	pE3-40, 25-37, 26-38, 28-39, 11-36, 9-23
MMP3	1 h		1-40	3-40, 3-27	pE3-40* (100/ 0)
	6 h		1-40	3-40, 3-27, 4-35, 18-40	pE3-40* (56,17/ 35,86)
	16 h		1-40, 1-27	3-40, 18-40, 14-40	pE3-40* (36,67/ 45,79)
MMP9	1 h		1-40, 1-27	3-40, 3-27, 18-40	pE3-40* (100/ 0)
	6 h		1-40	3-40, 3-27, 18-40	pE3-40* (87/ 24,84)
	16 h		1-40, 1-27	3-40, 3-27, 18-40, 14-40	pE3-40* (40,83/ 45,43)
MMP13	1 h		1-40	3-40	pE3-40
	6 h		1-40	3-40, 18-40, 14-40, 3-27, 11-29	pE3-40
	16 h		1-40, 18-40	3-40, 18-40, 11-29, 3-27	pE3-40, 11-29, 23-34
Mep A Kal	1 h		1-40	3-40*	pE3-40
	6 h		1-40	3-40*	pE3-40, pE 3-22, pE 3-21, pE 3-20, 21-40, 22-40
	16 h		1-40, 1-27, 7-20, 1-20, 4-23, 21-40, 22-40, 1-22, 2-23, 9-21	3-40*	pE3-40, 21-40, 22-40, 23-34
Mep A hK1	1 h		1-40, 1-27	3-40, 3-27	pE3-40* (100/ 0)
	6 h		1-40, 1-20, 4-23	3-40	pE3-40* (100/ 0)
	16 h		1-40, 1-27, 21-40, 1-20, 4-23, 22-40, 23-34, 5-24	3-40, 9-23, 21-40, 15-38	pE3-40* (40,17/ 38,87)
Kal	1 h		1-40, 1-27, 1-18	3-40	pE3-40* (100/ 0)
	6 h		1-40	3-40, 3-27, 18-40	pE3-40* (97,67/ 5,72)
	16 h		1-40	3-40, 3-27, 18-40	pE3-40* (66,83/ 29,61)
hK1	1 h		1-40	3-40	pE3-40* (100/ 0)
	6 h		1-40	3-40, 3-27, 18-40, 14-40	pE3-40* (91/ 22,05)
	16 h		1-40, 1-27	3-40, 18-40, 14-40	pE3-40* (61,5/ 45,78)

Tab. 5.2.1: Zusammenfassung der durch den proteolytischen Abbau erhaltenen Peptidfragmente der Abetafibrillen. Bei den mit * versehenen Werten kam es zum Abbau ohne die Bildung von massenspektrometrisch detektierbaren Peptidfragmenten (Mittelwert/ Standardabweichung).

Zu Anfang stand die Hypothese, dass die Abeta Fibrillen proteolytisch durch die Enzyme abgebaut werden. Anhand der Tabelle 5.2.1 und der Abbildung 5.2.1 a-c ist dies auch deutlich zu erkennen. Überraschenderweise wurden sie sogar besser abgebaut als das Peptid, wie im Vergleich zwischen der Abbildung 5.2.1 a-c und der Abbildung 5.2.2 a-b zu sehen ist. Zusätzlich unterscheidet sich das Spaltprofil der einzelnen Enzyme zwischen den Fibrillen A β 1-40, 3-40 und pE3-40. Dies lässt auf eine unterschiedliche Konformation der Fibrillen bzw. des A β -Peptides innerhalb der Fibrillen schließen.

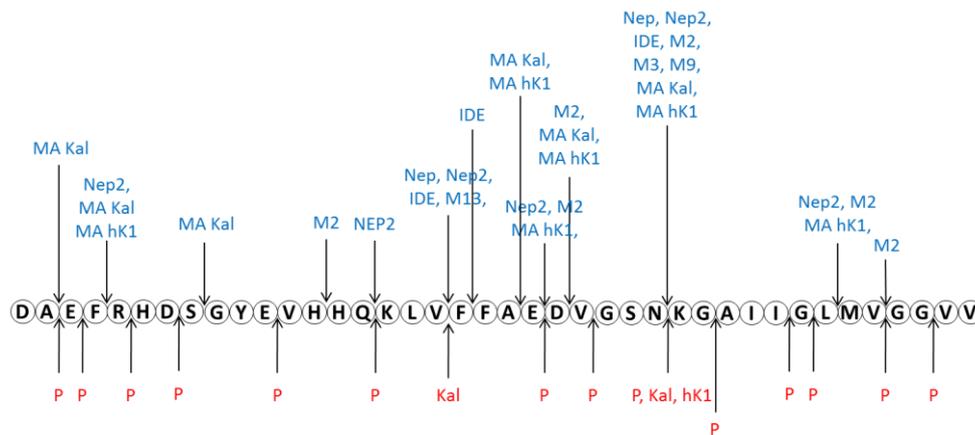


Abb. 5.2.1 a: Darstellung der Fibrillenspaltstellen mit den untersuchten Peptidasen an der Aminosäuresequenz des Peptides Amyloid β 1-40. Blau wurden die Metalloproteasen eingefärbt und rot die Serinproteasen. Nep: Neprilysin; Nep2: Neprilysin 2; IDE: Insulysin; P: Plasmin; M2: Matrix- Metalloprotease 2; M3: Matrix- Metalloprotease 3; M9: Matrix- Metalloprotease 9; M13: Matrix- Metalloprotease 13; MA Kal: Plasma Kallikrein aktiviertes Meprin A; MA hK1: Tissue Kallikrein aktiviertes Meprin A; Kal: Plasma Kallikrein; hK1: Tissue Kallikrein.

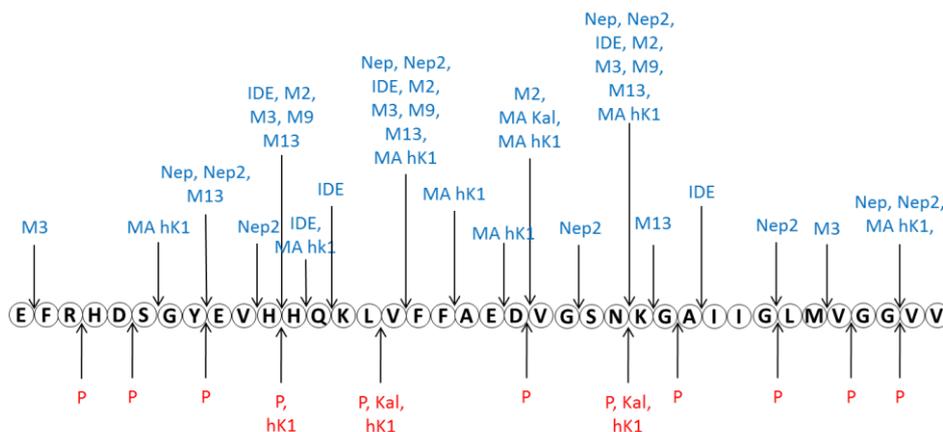


Abb. 5.2.1 b: Darstellung der Fibrillenspaltstellen mit den untersuchten Peptidasen an der Aminosäuresequenz des Peptides Amyloid β 3-40. Blau wurden die Metalloproteasen eingefärbt und rot die Serinproteasen. Nep: Neprilysin; Nep2: Neprilysin 2; IDE: Insulysin; P: Plasmin; M2: Matrix- Metalloprotease 2; M3: Matrix- Metalloprotease 3; M9: Matrix- Metalloprotease 9; M13: Matrix- Metalloprotease 13; MA hK1: Tissue Kallikrein aktiviertes Meprin A; Kal: Plasma Kallikrein; hK1: Tissue Kallikrein.

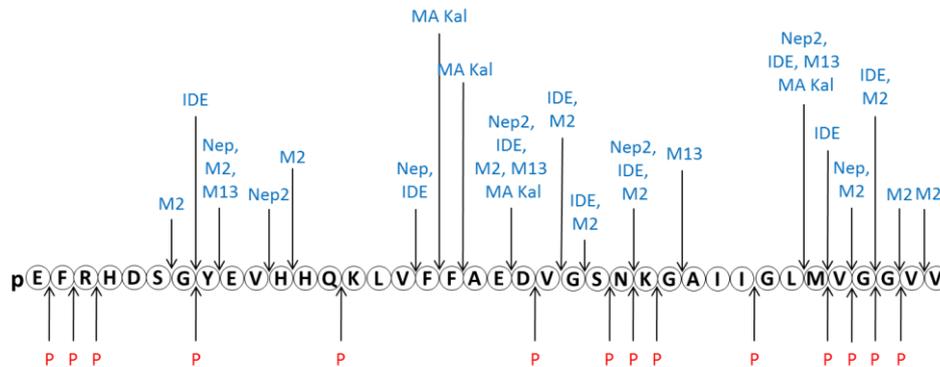


Abb. 5.2.1 c: Darstellung der Fibrillenspaltstellen mit den untersuchten Peptidasen an der Aminosäuresequenz des Peptides Amyloid β pE3-40. Blau wurden die Metalloproteasen eingefärbt und rot die Serinproteasen. Nep: Neprilysin; Nep2: Neprilysin; IDE: Insulysin; P: Plasmin; M2: Matrix- Metalloprotease 2; M13: Matrix- Metalloprotease 13; MA Kal: Plasma Kallikrein aktiviertes Meprin A.

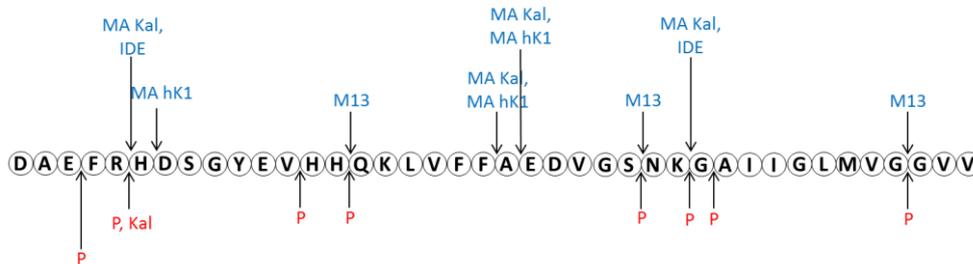


Abb. 5.2.2 a: Darstellung der Spaltstellen der untersuchten Peptidasen an der Aminosäuresequenz des gelösten Peptides Amyloid β 1-40. Blau wurden die Metalloproteasen eingefärbt und rot sie Serinproteasen. IDE: Insulysin; P: Plasmin; M13: Matrix- Metalloprotease 13; MA Kal: Plasma Kallikrein aktiviertes Meprin A; MA hK1: Tissue Kallikrein aktiviertes Meprin A; Kal: Plasma Kallikrein

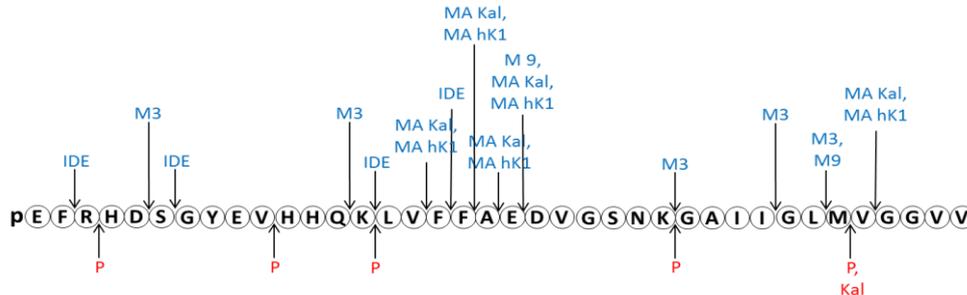


Abb. 5.2.2 b: Darstellung der Spaltstellen der untersuchten Peptidasen an der Aminosäuresequenz des gelösten Peptides Amyloid β pE3-40. Blau wurden die Metalloproteasen eingefärbt und rot sie Serinproteasen. IDE: Insulysin; P: Plasmin; M3: Matrix- Metalloprotease 3; M9: Matrix- Metalloprotease 9; MA Kal: Plasma Kallikrein aktiviertes Meprin A; MA hK1: Tissue Kallikrein aktiviertes Meprin A; Kal: Plasma Kallikrein

Anhand der Abbildung 5.2.1 und 5.2.2 sind die deutlichen Unterschiede in dem Spaltverhalten von den A β -Fibrillen und der A β -Peptide zu sehen. So ist bei den Serinproteasen eine deutlich höhere Anzahl an Spaltstellen bei den Fibrillen (A β 1-40 = 17 Spaltstellen, A β 3-40 = 16 Spaltstellen und A β pE3-40 = 14 Spaltstellen) als bei den Peptiden (A β 1-40 = 9 Spaltstellen und A β pE3-40 = 6 Spaltstellen) zu erkennen. Plasmin ist das am besten abbauende Enzym im ganzen Versuch mit den meisten Spaltstellen bei den Fibrillen (A β 1-40 = 14 Spaltstellen, A β 3-40 = 11 Spaltstellen und A β pE3-40 = 14 Spaltstellen) und den Peptiden (A β 1-40 = 8 Spaltstellen und A β pE3-40 = 5 Spaltstellen). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass Plasmin häufig große Polymerisations-Produkte, wie Makromoleküle spaltet, da diese besonders gut von ihrer Konformation und Orientierung zu der Enzymstruktur passen. Die beiden anderen Serinproteasen Plasma Kallikrein und Tissue Kallikrein

sind die am schlechtesten abbauenden Peptidasen. So gab es bezüglich Plasma Kallikrein bei den Fibrillen lediglich 4 Spaltstellen (A β 1-40 = 2 Spaltstellen, A β 3-40 = 2 Spaltstellen und A β pE3-40 = keine Spaltstellen) und bei den Peptiden nur jeweils eine Spaltstelle (A β 1-40 = 1 Spaltstelle und A β pE3-40 = 1 Spaltstelle). Ähnlich schlecht sieht es auch bei Tissue Kallikrien aus, wo bei den Fibrillen bei A β 1-40 = 1 Spaltstelle, A β 3-40 = 3 Spaltstellen und bei A β pE3-40 = keine Spaltstelle auftraten. Man muss jedoch dabei beachten, dass es trotz der geringen Anzahl an Aminosäurespaltstelle zu einem Abbau der Fibrillen durch die beiden Peptidasen kam. Dies ist aus der Tabelle 5.1.1 zu entnehmen, wo auch ohne die Bildung von massenspektrometrisch detektierbaren Peptidfragmenten ein Abbau der pE3-40 Fibrillen aufgrund starken Grundrauschen (Signal/Noise) vor allem bei niedrigeren Massen stattfand.

Wie bei den Serinproteasen sind auch bei den Metalloproteasen Unterschiede im Abbau zwischen den Abetafibrillen und dem Peptid zu erkennen. Bei den ersten beiden Peptidasen Neprilysin und Neprilysin 2 ist nur ein Abbau bei den Fibrillen zu sehen. Bei Neprilysin traten bei den Fibrillen bei A β 1-40 = 2 Spaltstelle, A β 3-40 = 4 Spaltstellen und bei A β pE3-40 = 3 Spaltstellen auf und bei Neprilysin 2 bei A β 1-40 = 5 Spaltstelle, A β 3-40 = 6 Spaltstellen und bei A β pE3-40 = 4 Spaltstellen. Weshalb bei A β -Peptiden keine Reaktion stattfand, lässt sich nur durch Vermutungen erklären. So wird angenommen, dass aufgrund eines methodischen Fehlers und der Größe der Spaltprodukte keine Ergebnisse dargestellt werden konnten. Ähnlich sieht es bei der nächsten Peptidase aus. Bei Insulysin sind die Fibrillen (A β 1-40 = 3 Spaltstellen, A β 3-40 = 6 Spaltstellen und A β pE3-40 = 9 Spaltstellen) ebenfalls besser gespalten worden, als die A β -Peptide (A β 1-40 = 2 Spaltstellen und A β pE3-40 = 4 Spaltstellen). Eigentlich spalten die drei Peptidasen Neprilysin, Neprilysin 2 und Insulysin nur Peptide mit einer Länge bis zu 30 Aminosäuren. Das A β -Peptid ist jedoch 40 Aminosäuren lang, was zu der Annahme führt, dass die A β -Fibrillen eine besondere Struktur aufweisen, die gut in den enzymatischen Spalt der drei Peptidasen passt und es so zu den dargestellten Spaltungen der Fibrillen kam (Nalivaeva, et al., 2012). Bei den Matrix-Metalloproteasen zeigte sich auch deutlich, dass die Substratspezifität bei den A β -Fibrillen wesentlich höher ausfiel als bei den Peptiden. So gab es bei der Matrix-Metalloprotease 2 gar keine Spaltstellen, bei den A β -Peptiden allerdings recht viele bei den Fibrillen (A β 1-40 = 4 Spaltstellen, A β 3-40 = 4 Spaltstellen und A β pE3-40 = 10 Spaltstellen). Bei den folgenden Matrix-Metalloproteasen verhielt es sich folgendermaßen: MMP3 hatte bei den Fibrillen A β 1-40 = 1 Spaltstellen, A β 3-40 = 5 Spaltstellen und A β pE3-40 = keine Spaltstelle, sowie bei den A β -Peptiden: 1-40 = keine Spaltstelle und A β pE3-40 = 5 Spaltstellen; MMP9 hatte bei A β -Fibrillen 1-40 = 1 Spaltstelle, A β -Fibrillen 3-40 = 3 Spaltstellen und bei den A β -Fibrillen pE3-40 = keine Spaltstelle, sowie keine Spaltstelle bei A β -Peptid 1-40 und 2 Spaltstellen bei A β -Peptid pE3-40; MMP13 hatte bei den Fibrillen A β 1-40 = 1 Spaltstellen, A β 3-40 = 5 Spaltstellen und A β pE3-40 = 4 Spaltstellen, sowie A β 1-40 = 3 Spaltstellen und A β pE3-40 = keine Spaltstelle bei den Peptiden. Die A β pE3-40 Fibrillen wiesen alle einen Abbau auf nur kam es bei manchen zum Abbau ohne die Bildung von massenspektrometrisch detektierbaren Peptidfragmente.

Die größte Überraschung stellten die beiden bisher unbekanntenen Peptidasen Tissue Kallikrein aktiviertes Meprin A und Plasma Kallikrein aktiviertes Meprin A dar. Sowohl Tissue Kallikrein aktiviertes Meprin A hatte sehr gute Spaltungsergebnisse bei den Fibrillen (A β 1-40= 6 Spaltstellen, A β 3-40= 1 Spaltstelle und A β pE3-40= 4 Spaltstellen) und den Peptiden (A β 1-40= 4 Spaltstellen und A β pE3-40= 5 Spaltstellen) sowie auch Plasma Kallikrein aktiviertes Meprin A bei den Fibrillen (A β 1-40= 6 Spaltstellen, A β 3-40= 8 Spaltstelle und A β pE3-40= keine Spaltstelle) und den Peptiden (A β 1-40= 3 Spaltstellen und A β pE3-40= 5 Spaltstellen). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass es sich bei Meprin A um ein neues A β -spaltendes Enzym handelt, welches so vorher noch nicht untersucht wurde. Außerdem konnten Tissue Kallikrein und Plasma Kallikrein als neue Meprin A aktivierende Enzyme identifiziert werden.

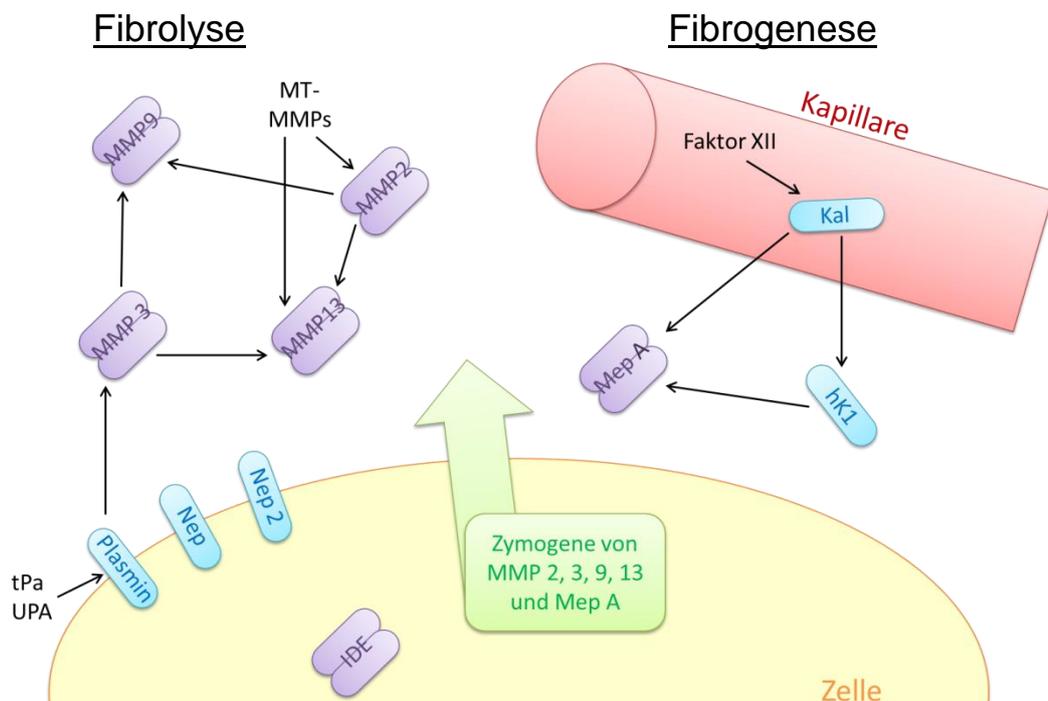


Abb. 2.2.3: Darstellung der Fibrolyse und der Fibrogenese der verwendeten Peptidasen. Die schwarzen Pfeile zeigen die Aktivierungen der Peptidasen. Die Monomere wurden blau und die Dimere lila dargestellt.

Zusätzlich soll erwähnt werden, dass alle oben genannten Peptidasen mit der Fibrogenese und Fibrolyse Zusammenhang stehen und sich gegenseitig aktivieren, wie in Abbildung 5.2.3 dargestellt. Daraus lässt sich schließen, dass der Fibrillenabbau einen vaskulären Hintergrund hat, welcher bei zukünftigen Untersuchungen weiter verfolgt werden sollte.

6 Literaturverzeichnis

Paper, Bücher usw.:

- Annaert, W.; De Stropper, B.: A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18 (2002): 25-50.
- Behrendt, Sophie: Untersuchungen des proteolytischen Abbaus von Abeta 1-40 und Abeta pE3-40, 2013.
- Benkert, Otto; Gründer, Gerhard: Handbuch der Psychopharmkotherapie. Berlin: Springer Verlag, 2011.
- Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L.: Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman, 2002.
- Brodera, C.; Arnold, P.; Vadon-Le Goff, S.; Konecny, M.; Bahrd, K.; Müller, S.; Overall, C.; Bond, J.; Koudelka, T.; Tholey, A.; Hulmes, D.; Moalic, C. and Becker-Paulya C.: Metalloproteases meprin α and meprin β are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2013); 110(35): 14219-24.
- Carson, Julie A.; Turner, Anthony J.: β - Amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metalloproteinases? *Journal of Neurochemistry* 81 (2002): 1-8.
- Clark, CM.; Karlawish, JH.: Alzheimer disease: current concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies. *Ann Intern Med* (2003): 400-410.
- Crescenzi, O.; Tomaselli, S.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; D'Ursi, A-M.; Temussi, P-A.; Picone, D.: Solution structure of the Alzheimer amyloid b-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. *Eur J Biochem.* (2002); 269(22): 5642-8.
- Cynis, H.; Lichtenthaler, S.; Wagner, L. and Demuth, H.-U.: Chapter 10: Proteases in the nervous system. in: *Proteases: Structure and Function*, Brix, K. and Stöcker, W. eds. Wien: Springer-Verlag, 2014.
- Fernández-Gamba, A.; Leal, MC.; Morelli, L.; Castaño, EM.: Insulin-degrading enzyme: structure-function relationship and its possible roles in health and disease. *Curr Pharm* (2009); 15(31): 3644-55.
- Goedert, Michel; Jakes, Ross: Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* Volume 1739 (2005): 240-250.
- Haass, C.; Hung, A.Y.; Schlossmacher, M.G.; Teplow, D.B.; Selkoe, D.J.: beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268 (1993): 3021-3024.
- Hardy, J.; Allsop, D.: Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 12 (1991): 383-388.
- Jarrett, Joseph T.; Berger, Elizabeth P.; Lansbury, Jr. Peter T.: The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* (1993): 4693-4697.
- Kang, J.; Lemaire, H.; Unterbeck, A.; Salbaum, J.; Masters, C.; Grzeschik, K.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Muller-Hill, B.: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325 (1987): 733-736.

- Kar, K.; Jayaraman, M.; Sahoo, B.; Kodali, R.; Wetzel, R.: Critical nucleus size for disease-related polyglutamine aggregation is repeat-length dependent. *Nat Struct Mol Biol.* (2011): 328-36.
- LaFerla, F-M.; Green, K.; Oddo, S.: Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* (2007); 8(7): 499-509.
- Lottspeich, Friedrich; Zorbas, Haralabos: *Bioanalytik*. Berlin: Spektrum Verlag, 1998.
- Malito, E.; Hulse, R.; Tang, W.: Amyloid beta-degrading cryptidases: insulin degrading enzyme, presequence peptidase, and neprilysin. *Cell Mol Life Sci.* (2008); 65(16): 2574-85.
- Miners, J.; Baig, S.; Palmer, J.; Palmer, L.; Kehoe, P.; Love, S.: Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* (2008): 240-52.
- Nalivaeva, Natalia N.; Beckett, Caroline; Belay, Nikolay D.; Turner, Anthony J.: Are Amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets Alzheimer's disease? *Journal of Neurochemistry* 120 (2012): 167-185.
- Portelius, Erik: Targeted A β proteomics- A tool to study the pathogenesis of Alzheimer's disease. University of Gothenburg (2009).
- Schlenzig, D.; Manhart, S.; Cinar, Y.; Kleinschmidt, M.; Hause, G.; Willbold, D.; Funke, S.; Schilling, S.; Demuth, H-U.: Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry.* (2009); 48(29): 7072-8.
- Schlenzig, D.; Röncke, R.; Cynis, H.; Ludwig, H.; Scheel, E.; Reymann, K.; Saido, T.; Hause, G.; Schilling, S.; Demuth, H-U.: N-Terminal pyroglutamate formation of A β 38 and A β 40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation. *J Neurochem.* (2012): 774-84.
- Schnabel, Jim: Amyloid: Little proteins, big clues. *Nature* 475 (2011): 12-14.
- Tanzi, R.; Moir, R.; Wagner, S.: Clearance of Alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron.* (2004); 43(5): 605-8.
- Tennent, G.; Lovat, L.; Pepys, M.: Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1995); 92(10): 4299-303.
- Walter, Henrik: *Funktionelle Bildgebung in Psychiatrie und Psychotherapie. Methodische Grundlagen und klinische Anwendung*. Stuttgart: Schattauer (2004).
- Wang, Y.; Luo, W.; Reiser, G.: Trypsin and trypsinlike proteases in the brain: Proteolysis and cellular functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008): 237 – 252.
- Zetl, Uwe K.; Mix, Eilhard; Lehmitz, Reinhard: *Klinische Liquordiagnostik*. Berlin: Walter de Gruyter (2005).

Internetadressen:

- <http://merops.sanger.ac.uk>
- <http://tang.bsd.uchicago.edu/research.html>
- <http://www.biopro.de/magazin/thema/00166/index.html?lang=de&artikelid=/artikel/02586/index.html>

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22410/figure/A481/>
- www.alzheimer-forschung.de
- www.brenda-enzymes.org
- www.uniprot.org

7 Anhang

Abetafibrillen 1-40 1. Durchgang 1. Durchlauf:

	70-100%		40-70%		40-10%		Daten fehlen		Abbau		schöner Verlauf
Enzyme	Inhibitor	T0	t0	5min	30min	60min	120min	180min	6h	18h	24h
NEP	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	alles abgebaut
	Phosphoramidon	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 38%
NEP 2	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 51%
	Phosphoramidon	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 38%
IDE	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%
	1,10-Phenanthroline	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 88%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%
Plasmin	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	24-36 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	24-36 100%
	α-antiplasmin	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	24-36 62%
MMP-2	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	14-34 36%
	Garladin	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 100%

MMP-3	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%		1-40 88%
				1-27 19%	1-18 11%	1-27 10%			1-27 31%	1-18 11%			1-27 65%
	Garladin	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%		1-40 82%
					1-27 20%	1-27 25%	1-27 31%		1-27 15%				
MMP-9	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 34%	1-40 51%
												1-40 13%	1-27 26%
	Garladin	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 100%	1-40 100%
			1-27 10%	1-34 71%	1-27 19%		1-27 20%					1-40 35%	1-27 53%
				1-27 13%								18-40 23%	
MNP-13	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	alles abgebaut	18-40 100%
													1-40 40%
	Garladin	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 37%	1-40 100%
							11-29 13%			11-29 26%			18-40 33%
							1-27 12%			1-27 16%			19-36 26%
													1-27 20%
													1-35 11%
Mep-A+Kal	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-20/ 4-23 62%	1-40 100%	1-20/ 4-23 20%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut
				1-27 15%	1-27 54%	1-21 44%		21-40 12%					
					19-36 34%								
					22-40 29%								
					1-22/ 2-23 28%								
	Actinonin	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 57%
					1-27 14%			1-27 13%		1-27 22%	1-27 14%		1-27 22%
Mep-A+hK1	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	24-36 100%	1-40 100%
				1-27 44%	1-27 14%		1-27 14%		1-20/ 4-23 18%	1-27 22%	1-20/ 4-23 18%	1-27 22%	1-20/ 4-23 48%
				1-18 14%							1-28 16%		21-40 36%
													1-27 15%
	Actinonin	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	24-36 92%	1-40 100%
				1-27 13%		1-27 14%	1-27 22%		1-27 12%		11-34 43%		1-27 35%
											1-27 35%		
											9-40 27%		
											1-40 16%		
Kal	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 100%	1-40 24%
		3-40 22%	3-40 15%	3-40 15%		1-18 10%						1-34 15%	
	PKSI-527	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 40%	1-40 36%
		3-40 13%	3-40 13%	1-27 11%							1-40 16%		1-27 30%
hK1	ohne	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 22%	1-40 38%
										1-18 14%			
										1-20/4-23 11%			
										1-27 10%			
	Nafamostat	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-40 100%	1-27 42%	1-27 59%
			3-40 15%	1-18 10%	3-40 14%		3-40 34%					1-40 12%	3-40 21%
													1-40 21%

Abetafibrillen 1-40 1. Durchgang 2. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0		t0		5min		30min		60min		120min		180min		6h		16h		24h			
NEP	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-40	26%		
	Phosphoramidon	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	31%			1-27	18%
NEP 2	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	18%	1-27	28%		
	Phosphoramidon	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	16%	23-34	24%	5-16	66%
IDE	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-27	22%
	1,10-Phenanthroline	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	16%			12-32	36%
Plasmin	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-27	33%
	α-antiplasmin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-40	16%
MMP-2	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			4-37	14%
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-40	42%
MMP-3	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-27	23%
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-27	20%
MMP-9	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-27	20%
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-27	20%

MNP-13	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	alles abgebaut	18-40	100%		
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	34%	1-40	45%	
								1-27	15%	1-27	14%						18-40	25%		
Mep-A+Kal	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	alles abgebaut	7-20	100%		
						1-27	28%	1-20/ 4-23	20%								1-20/ 4-23	97%		
								1-27	13%			21-40	54%				21-40	60%		
												10-23	29%				1-40	54%		
												1-21	25%				22-40	50%		
												1-20/ 4-23	23%				1-22/ 2-23	36%		
												1-22/ 2-23	16%				9-21	30%		
	Actinonin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	59%	
								1-27	15%	1-27	59%					1-27	17%	1-27	30%	
Mep-A+hK1	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	24-36	100%	1-40	100%	
						1-27	18%	1-27	34%	1-27	21%	1-27	14%			1-20/ 4-23	14%	1-28	30%	
																	1-27	24%	5-24	55%
																		21-40	52%	
																	22-40	38%	1-27	21%
	Actinonin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	24-36	69%	1-40	100%	
						1-27	13%					1-27	23%			1-27	15%	11-34	35%	
																		1-40	25%	
																		9-40	22%	
																		1-27	22%	
Kal	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	100%	1-40	39%	
	PKSI-527	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	90%	1-40	100%	
																		1-27	84%	
						1-18	10%											1-40	25%	
hK1	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	24%	1-40	48%	
																		1-27	34%	
	Nafamostat	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	36%	1-27	51%	
				3-40	15%			1-27	14%			3-40	33%			1-40	18%			
								3-40	13%			2-23	28%							

Abetafibrillen 1-40 2. Durchgang 1. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0		t0		5min		30min		60min		120min		180min		6h		16h		24h			
NEP	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	12-24	100%	23-34	100%		
		1-27	16%	1-27	16%	1-27	36%	1-27	18%	1-27	27%	12-19	92%	1-17	64%	1-17	94%						
															23-34	83%	20-40	45%	6-25	54%			
															12-24	62%	12-27	40%	1-40	33%			
NEP	Phosphoramidon	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-17	100%	1-17	100%
		12-24	30%	12-24	30%							1-27	15%	1-27	20%	18-40	50%	12-24	74%				
															1-40	42%	12-27	38%	1-40	33%			
															12-24	31%	1-40	33%	1-27	12%			
NEP 2	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	73%	5-13	100%	5-21	100%		
												5-21	32%			1-40	85%						
															5-21	79%							
	Phosphoramidon	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	12-24	84%	12-24	100%		
							1-27	16%	1-27	21%	1-27	15%	12-24	24%	5-21	73%	18-40	65%					
IDE	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	20-40	100%	6-25	100%	6-25	100%	6-25	100%	10-22	100%	20-40	100%	20-40	100%		
		1-27	15%			1-19/ 5-23	62%	6-25	85%	20-40	35%	20-40	32%	20-40	75%	20-40	74%	10-22	51%	1-18	57%		
					1-27	32%	10-22	74%	10-22	28%	1-20/ 4-23	19%	10-22	24%	6-25	58%	1-18	50%	10-22	56%			
					20-40	31%	12-24	62%	1-40	27%	1-40	16%	2-14	23%	12-24	53%	12-24	44%	12-24	42%			
IDE	1,10-Phenanthroline	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%		
		1-27	47%					1-27	13%	1-27	37%			1-27	19%	1-27	24%	1-27	15%				
Plasmin	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	24-36	100%	8-38	100%	24-36	100%	8-38	100%	24-36	100%	16-27/ 17-28	100%	24-36	100%		
				24-36	24%	6-40	73%	8-38	44%	6-40	92%	16-27/ 17-28	40%	6-28	63%	16-27/ 17-28	65%	24-36	72%	16-27/ 17-28	73%		
							6-28	29%	24-36	48%	8-38	34%	24-36	37%	8-38	50%	8-38	66%	28-40	38%			
							16-27/ 17-28	29%	1-40	46%	11-27	22%	1-27	22%	6-28	49%	18-40	53%					
Plasmin	α-antiplasmin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	24-36	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%		
		1-27	36%	24-36	18%	24-36	65%			24-36	35%	24-36	21%	1-40	82%	24-36	40%	18-40	52%	24-36	100%		
																	1-27	22%	18-40	50%			
																	9-40	20%	1-40	48%			
MMP-2	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	100%	1-17	100%
												12-24	82%	1-27	32%	1-34	16%	1-34	65%	12-24	82%		
													1-27	73%	1-34	20%	1-40	17%	14-33	54%			
													12-27	56%					12-27	39%			
MMP-2	Garladin	1-40	100%	1-40	100%			1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%		
								1-27	55%	1-27	70%	1-27	96%	1-27	19%	1-27	96%	1-27	100%				
													12-24	65%									
													1-27	57%	12-24	65%							
MMP-3	ohne	1-34	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	34%	1-27	24%	1-27	13%		
		1-40	65%									1-27	28%	1-40	13%	1-40	12%						
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	80%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	100%	alles abgebaut		alles abgebaut			
1-27		13%					1-27	45%	1-27	21%	1-27	33%	1-40	60%									

MMP-9	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	70%	1-27	54%	alles abgebaut							
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-27	22%	1-27	31%	1-27	62%	1-27	68%	1-27	60%	1-27	35%		1-27	43%	1-27	60%			
MNP-13	ohne	1-40	100%			1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	11-29	100%		
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	11-29	62%	1-40	32%
Mep-A+Kal	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	96%	1-40	100%	1-20/ 4-23	100%	1-27	34%	21-40	67%	alles abgebaut	
	Actinonin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	65%	1-27	100%	1-40	55%		17-39
Mep-A+hK1	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-20/ 4-23	18%	1-27	22%	1-28	16%	1-20/ 4-23	48%
	Actinonin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	98%	1-27	35%
Kal	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	48%	1-27	28%	1-27	100%	1-27	59%
	PKSI-527	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	54%	1-27	45%	1-27	100%	1-27	100%	1-27	59%
hK1	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	100%	1-27	73%	1-27	85%	1-27	50%
	Nafamostat	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-40	44%	1-27	100%	1-27	52%	alles abgebaut		1-40	30%	alles abgebaut		1-40	37%
		1-27	16%			1-27	13%					1-27	38%	3-40	30%	1-40	39%								

Abetafibrillen 1-40 2. Durchgang 2. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0		t0		5min		30min		60min		120min		180min		6h		16h		24h			
NEP	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-17	100%	23-34	100%		
		1-27	16%	1-27	14%	1-27	12%	1-27	31%	1-27	56%	1-27	25%	12-24	54%	12-24	97%	1-17	55%				
																	18-40	73%	6-25	52%			
																	12-27	60%	1-40	48%			
NEP	Phosphoramidon	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-17	100%	1-17	100%
		1-27	20%	1-27	26%													12-24	64%	12-24	49%		
																	12-27	34%	18-40	24%			
																	18-40	33%					
NEP 2	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-17	100%	1-17	52%
		1-27	15%															1-17	57%	1-27	66%	1-40	16%
																	1-40	65%					
	Phosphoramidon	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-24	100%	1-17	100%
										1-27	15%	1-27	14%	1-27	17%	1-27	20%	12-24	47%	1-40	74%		
																		12-27	44%	18-40	57%		
																				12-24	56%		
																				12-27	34%		
																				1-27	17%		
IDE	ohne	1-40	100%	1-40	100%	6-25	100%	20-40	100%	6-25	100%	6-25	100%	6-25	100%	6-25	100%	20-40	100%	14-33	100%	14-33	100%
		1-27	17%			1-40	72%	6-25	62%	20-40	48%	20-40	54%	20-40	36%	6-25	73%	12-24	55%	20-40	78%		
					20-40	65%	14-33	31%	14-33	34%	1-40	21%	12-24	14%	14-33	71%	6-25	37%	1-18	67%			
					14-33	59%	12-24	24%	12-24	25%	12-24	18%			12-24	42%	20-40	36%	12-24	62%			
				12-24	47%	1-40	23%	1-40	18%											6-25	21%		
				1-27	32%																		
				12-27	19%																		
	1,10-Phenanthroline	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%
		1-27	34%					1-27	18%	1-27	33%					1-27	24%	1-27	16%	1-27	55%		
Plasmin	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	24-36	100%	6-40	100%	8-38	100%	8-38	100%	24-36	100%	24-36	100%	24-36	100%	16-27/ 17-28	100%
		1-27	25%	24-36	42%	6-40	70%	8-38	27%	8-38	65%	6-28	70%	24-36	65%	8-38	62%	16-27/ 17-28	79%	24-36	75%		
							11-27	26%	1-40	56%	24-36	64%	6-28	55%	6-28	55%	8-38	40%	28-40	44%			
							13-26	26%	6-28	31%	16-27/ 17-28	46%	23-34	47%	16-27/ 17-28	40%	6-28	22%	16-28	21%			
						23-34	24%			6-40	32%	6-40	36%	3-33	17%	18-40	19%						
										1-40	21%	1-40	19%										
	α-antiplasmin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	24-36	100%
		1-27	20%	24-36	24%	24-36	35%			24-36	74%	1-27	26%					18-40	55%	5-21	67%		
																		24-36	33%	18-40	63%		
MMP-2	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	100%	1-17	100%
						1-27	12%	1-27	23%	1-27	11%	1-27	50%	1-27	25%	1-27	37%	1-34	58%	12-24	70%		
													1-34	27%	1-34	23%	1-34	17%	14-33	28%	14-33	53%	
																			6-25	25%	12-27	40%	
																		1-17	24%	16-38	29%		
																		1-40	15%				
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%			1-40	100%	1-40	100%	12-24	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	55%	1-27	100%
								1-27	11%	1-27	63%	12-27	46%	1-27	94%	1-27	32%	1-40	46%				
												1-40	27%										
												1-27	22%										

MMP-3	ohne	1-34	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	31%	alles abgebaut	alles abgebaut								
		1-40	66%					1-27	12%	1-27	29%			1-40	13%										
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	79%	1-40	100%	1-27	100%	alles abgebaut	alles abgebaut								
		1-27	13%					1-27	45%	1-27	20%	1-27	30%	1-40	60%										
MMP-9	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	72%	alles abgebaut	alles abgebaut								
						1-27	21%	1-27	30%	1-27	63%	1-27	68%	1-27	60%			1-27	37%						
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	45%	1-27	64%						
								1-27	22%	1-27	34%	1-27	58%	1-27	25%										
MNP-13	ohne	1-40	100%			1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	18-40	100%						
										1-27	25%			18-40	58%					11-29	42%	1-27	15%		
																						1-40	14%	1-27	15%
																						18-40	100%	18-40	100%
	Garladin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	18-40	100%	18-40	100%						
												11-29	20%	1-27	23%					1-27	73%	11-29	52%		
												1-27	15%	11-29	20%					11-29	72%	20-40	46%		
																				1-40	25%	1-27	43%		
Mep-A+Kal	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	63%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	40%	1-40	70%						
		1-27	16%	1-27	45%	1-27	24%	1-27	38%	1-27	12%	1-27	32%	1-27	25%					1-27	18%	18-40	31%	18-40	44%
	Actinonin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	96%	1-27	77%	18-40	34%						
				1-27	35%	1-27	14%			1-27	21%	1-27	21%	1-27	28%					1-27	49%	1-40	17%		
Mep-A+hK1	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-20/ 4-23	100%	1-20/ 4-23	100%	1-20/ 4-23	100%	14-33	100%	alles abgebaut							
								1-27	13%	1-20/ 4-23	34%	1-40	61%	22-40	87%					22-40	48%	1-20/ 4-23	93%		
												1-21	55%	21-40	79%					14-33	44%	22-40	46%		
												1-27	42%	21-40	39%					21-40	46%	21-40	46%		
	Actinonin	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	95%	1-40	100%	alles abgebaut	alles abgebaut						
												1-22/ 2-23	35%	1-22/ 2-23	47%					1-21	34%	1-22/ 2-23	35%		
															1-27					38%	1-40	34%	1-21	28%	
															1-40					35%	1-22/ 2-23	35%	1-27	16%	
Kal	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	67%	1-40	100%						
		1-27	14%	1-27	39%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	27%					1-27	98%	1-27	29%		
	PKSI-527	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	100%	1-27	100%	18-40	32%						
						1-27	18%	1-27	10%	1-27	27%	1-27	15%	1-40	51%					1-27	76%	1-27	100%		
hK1	ohne	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-27	100%	1-40	100%	1-27	100%	1-27	100%	1-27	100%						
								1-27	16%	1-27	39%	1-40	75%							1-40	80%	18-40	86%		
	Nafamostat	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%	1-40	100%			1-40	87%	4-20	100%	1-27	70%	1-27	70%						
		1-27	31%					1-27	25%					14-33	85%					1-40	55%	1-40	38%		
												3-40	55%	1-27	64%										

Abetafibrillen 3-40 1. Durchgang 1. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0		t0		5min		30min		60min		120min		180min		6h		18h		24h			
NEP	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	93%	13-28	94%	18-40	100%		
						11-38	14%	18-40	11%			18-40	10%	11-38	11%	18-40	86%	18-40	65%	3-40	34%		
					18-40	13%									11-38	57%	11-38	41%	11-38	26%			
	Phosphoramidon	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	18-40	100%		
								11-38	13%	11-38	25%	11-38	12%	18-40	32%	18-40	30%	11-38	67%	11-38	57%		
								18-40	20%	18-40	20%			11-38	19%	11-38	17%	3-40	14%	3-40	42%		
NEP 2	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	13-28	56%	3-40	100%
																		18-40	38%	20-33	55%		
																	11-38	21%	11-38	21%	18-40	42%	
	Phosphoramidon	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	87%	18-40	100%		
										11-38	54%					11-38	27%	11-38	49%	11-38	21%		
										18-40	21%					18-40	25%	3-40	14%	3-40	19%		
										14-40	16%												
										16-40	15%												
IDE	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	20-40	50%	3-40	100%	14-27	80%		
						14-40	12%	20-40	26%	20-40	26%	14-40	13%	14-40	14%	15-28/16-30	42%	15-28/16-30	72%	18-40	32%		
							18-40	17%	15-28/16-30	22%	18-40	10%			3-40	38%	20-40	49%					
															16-28	31%	18-40	26%					
	1,10-Phenanthroline	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%		
																		11-38	24%				
Plasmin	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-11	100%	24-36	100%		
																24-36	69%	18-40	97%	27-40	36%		
															11-38	54%	24-36	81%	18-40	33%			
															18-40	49%	3-28	65%	15-38	22%			
														18-33	28%	11-38	52%	3-40	15%				
																3-40	19%						
	α-antiplasmin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%						
						6-40	96%	3-40	58%	3-40	55%	24-36	28%	27-40	41%	3-40	87%						
				24-36	20%	24-36	22%	24-36	18%	4-29	22%	15-40	39%	4-29	17%								
				14-40	15%	14-40	14%	4-29	15%	3-40	22%	24-36	38%	15-40	13%								
						15-40	11%	14-40	13%	15-40	18%	3-28	24%	14-40	12%								
						3-28	11%	16-32	10%	27-40	14%	4-29	23%										
										16-32	14%	3-40	17%										
										3-28	12%	3-33	17%										
										3-33	11%	14-40	10%										
MMP-2	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	97%	18-40	100%		
								14-40	13%			3-27	12%	3-27	19%	3-27	27%	3-27	39%	3-40	23%		
													14-40	13%	18-40	21%	3-40	14%					
													18-40	11%									
	Garladin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	35%	18-40	65%		
				14-40	10%	14-40	15%											18-40	31%	3-40	36%		
				14-32	11%													3-40	22%	3-27	24%		
				18-40	10%																		
				3-27	10%																		

Abetafibrillen 3-40 1. Durchgang 2. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0		t0		5min		30min		60min		120min		180min		6h		16h		24h			
NEP	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	alles abgebaut		18-40	100%		
												3-27	18%	3-27	15%	18-40	74%			3-40	38%		
	Phosphoramidon	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	18-40	67%
								18-40	11%			3-27	42%	18-40	26%	18-40	24%	3-27	33%	3-40	37%		
								3-27	10%			18-40	20%	3-27	14%	3-27	17%	3-40	17%	3-27	27%		
NEP 2	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	55%	3-40	100%
														3-27	10%			3-27	52%				
	Phosphoramidon	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	100%	18-40	94%
										3-27	26%					3-27	15%	18-40	80%	3-40	40%		
																18-40	14%	3-17	61%	3-27	31%		
																3-40	13%	3-40	13%				
IDE	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	38%	3-40	100%	20-40	45%
										20-40	14%	15-28/16-30	13%	15-28/16-30	38%			15-28/16-30	46%	18-40	36%		
														14-40	24%					20-40	34%		
														18-40	22%					18-40	26%		
														15-40	18%								
	1,10-Phenanthroline	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%
																		3-27	23%	3-40	100%		
Plasmin	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	24-36	100%	18-40	100%	24-36	100%
																		3-40	92%	3-28	57%	18-40	30%
																		18-40	48%	3-27	52%	15-38	24%
																		3-27	18%	6-22	19%	14-38	24%
																				6-40	14%	6-40	21%
																		3-40	14%				
	α-antiplasmin	3-40	100%	3-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%				
						3-40	100%	3-40	52%	3-40	57%	3-40	23%	24-36	55%	3-40	88%						
				14-40	22%	14-40	14%	4-29	16%	24-36	20%	4-29	42%	4-29	13%	4-29	13%						
						24-36	11%	24-36	15%	4-26	20%	15-40	28%	14-40	12%	14-40	12%						
						3-28	11%	14-40	12%	15-40	14%	3-33	28%										
										3-28	11%	3-28	27%										
												27-40	26%										
												8-30	19%										
												3-40	19%										
												16-32	16%										
MMP-2	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	18-40	100%
														3-27	19%	18-40	35%	3-27	16%	3-40	21%		
																3-27	35%			3-27	21%		
	Garladin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	79%	18-40	100%
						14-40	11%	14-40	13%					3-27	21%			3-40	66%	3-27	38%		
														18-40	11%			18-40	43%	20-40	31%		
														14-40	11%					3-40	24%		
MMP-3	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	66%	3-40	100%	3-40	68%	3-40	68%	alles abgebaut		3-40	22%
												3-27	13%	3-27	19%	3-27	23%	4-35	19%				
	Garladin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	85%	3-40	85%	alles abgebaut		3-40	13%
						14-40	13%	3-27	11%			3-27	19%	14-40	14%	3-27	15%						
														3-27	13%								

Abetafibrillen 3-40 2. Durchgang 1. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0		t0		5min		30min		60min		120min		180min		6h		18h		24h		
NEP	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	3-40	41%	
								3-27	10%	3-27	12%							18-40	28%	3-27	28%	
	Phosphoramidon	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	3-40	100%	
										18-40	15%							18-39/19-40	24%	18-40	32%	
																		3-27	16%	3-27	23%	
																		3-40	16%		3-27	46%
NEP 2	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	
												3-27	12%									
	Phosphoramidon	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	23%	18-40	48%	
						3-27	19%	3-27	15%	3-27	10%	3-27	16%	3-27	25%					3-27	36%	
																				3-40	17%	
																					3-27	17%
																					18-40	16%
IDE	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	14-27	40%	14-27	52%	
																				18-40	47%	
		14-40	13%							14-40	24%									20-40	39%	
										18-40	17%									18-40	19%	
										15-40	14%									20-40	21%	
	1,10-Phenanthroline	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	
																				3-27	40%	
																				14-40	21%	
																				5-26	13%	
Plasmin	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	100%	alles abgebaut	3-40	100%		
						24-36	20%									18-40	26%			24-36	90%	
																3-28	25%		4-29	30%		
																			15-38	25%		
																			6-40	24%		
																			14-40	16%		
	α-antiplasmin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-28	100%	alles abgebaut	6-40	100%		
						6-40	59%	3-40	81%	3-40	90%	3-28	59%	3-40	39%	3-28	58%			27-40	25%	
						20-38	17%			24-36	40%	3-40	55%			3-34	32%		20-38	20%		
						18-40	15%			15-40	22%	18-40	35%			4-29	25%		18-40	15%		
						14-40	14%			20-38	17%	24-36	29%			8-30	23%		4-29	15%		
										18-40	16%	20-38	28%			18-40	13%					
										14-40	13%	6-28	18%			3-40	11%					
MMP-2	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	100%	alles abgebaut	18-40	100%		
																18-40	87%			3-27	57%	
																3-40	80%		14-40	23%		
																			18-40	24%		
																			3-27	18%		
	Garladin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	72%	alles abgebaut	3-27	69%		
																3-27	67%			3-40	44%	
																3-40	40%					
MMP-3	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	41%	alles abgebaut	3-40	100%		
																18-40	25%			18-40	16%	
																3-40	23%		14-40	14%		
	Garladin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	31%	alles abgebaut	3-40	30%		
						3-27	14%									18-40	17%					
																3-40	10%					

MMP-9	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	42%	3-40	100%	3-40	88%	3-40	100%	18-40	88%	18-40	40%	3-40	100%		
						3-27	12%			3-27	12%	3-27	25%	3-27	67%	3-27	67%	3-40	29%	18-40	19%		
						14-40	10%			18-40	17%	18-40	35%					3-27	25%		14-40	10%	
Garladin		3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	84%	3-40	100%		
												3-27	15%	18-40	19%	3-27	70%	18-40	56%	3-27	16%		
																			3-40	54%	3-27	16%	
MNP-13	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	3-40	100%	18-40	100%		
														11-29	13%	3-40	95%	18-40	92%	3-40	81%		
																3-27	18%	11-29	69%				
Garladin		3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	11-29	100%	3-40	100%		
																		18-40	79%	18-40	62%	14-40	11%
																				3-27	25%		
Mep-A+Kal	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	67%	3-40	25%	3-40	77%		
Actinonin		3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	17%	3-40	84%	3-27	44%	3-27	52%	3-40	35%		
Mep-A+hK1	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	96%	3-40	88%	9-23	100%	9-23	72%		
																				21-40	67%	21-40	55%
																					3-40	42%	
Actinonin		3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	47%	3-40	100%		
																				3-27	33%	18-40	45%
																					3-40	100%	
Kal	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%		
PKSI-527		3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	51%		
																				3-27	19%	3-40	49%
																					18-40	16%	3-27
hK1	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	98%	3-40	100%		
Nafamostat		3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	29%		

Abetafibrillen 3-40 2. Durchgang 2. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0		t0		5min		30min		60min		120min		180min		6h		16h		24h			
NEP	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	60%	18-40	100%	3-40	100%		
								3-27	13%			3-27	13%			18-40	30%	3-27	22%	18-40	46%		
	Phosphoramidon	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	3-40	100%	18-40	74%		
										18-40	15%	18-40	12%	18-40	19%	3-40	19%	18-40	47%	3-40	52%		
NEP 2	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	88%	3-40	100%
								3-27	10%	3-27	14%	3-27	13%										
	Phosphoramidon	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	44%	18-40	40%	3-40	100%		
						3-27	18%	3-27	18%	3-27	16%	3-27	10%	3-27	24%	3-27	21%	3-27	27%	3-27	21%		
IDE	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	20-40	51%	20-40	34%	3-40	100%		
								14-40	19%	20-40	24%			14-27	38%	18-40	21%	14-40	19%				
	1,10-Phenanthroline	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%		
				14-40	19%									3-27	12%			3-27	21%	3-27	16%		
Plasmin	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	85%	alles abgebaut	24-36	100%	3-40	100%	
						24-36	16%	3-27	12%	3-27	20%	3-27	10%	3-27	14%	15-38	37%		3-40	97%			
	α-antiplasmin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-40	100%	6-28	100%	alles abgebaut	6-40	100%	27-40	21%	
						6-40	61%	3-40	77%	3-40	65%	3-40	44%	3-40	32%	3-28	33%		4-29	16%	18-40	15%	
MMP-2	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	87%	18-40	100%	3-40	100%		
								3-27	10%					18-40	86%	3-27	97%	18-40	15%				
	Gartadin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	3-27	100%	3-40	71%		
														3-27	75%	14-32	28%						
MMP-3	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	86%	alles abgebaut	18-40	41%	3-40	100%	
														3-40	38%	18-40	15%						
	Gartadin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	29%	alles abgebaut	18-40	18%	3-40	54%	
						3-27	17%							18-40	18%	3-40	10%						
MMP-9	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	64%	3-27	45%	3-40	100%		
										18-40	14%	18-40	33%	3-27	58%	18-40	42%	18-40	45%				
	Gartadin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	26%	3-40	34%	3-27	26%		
														18-40	18%	3-40	75%	18-40	60%				

MNP-13	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	
													11-29	17%	3-40	39%	18-40	85%	3-40	91%
															11-29	24%	11-29	39%	11-29	15%
														3-27	12%			3-27	10%	
	Garladin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	11-29	58%	3-40	100%	
														18-40	45%	18-40	41%			
																3-40	35%			
																3-27	12%			
Mep-A+Kal	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	alles abgebaut		3-40	40%	3-40	35%	
	Actinonin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	76%	3-27	23%	3-27	42%	
														alles abgebaut	3-27	30%	3-40	16%		
Mep-A+hK1	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	69%	3-40	66%	alles abgebaut		3-40	70%	
																		15-38	20%	
	Actinonin	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-27	100%	3-40	100%	18-40	26%	
														3-40	82%	18-40	71%	3-27	23%	
																		3-27	55%	
Kal	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	75%	
																		3-27	72%	
																		18-40	46%	
	PKSI-527	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	18-40	100%	3-40	100%	
																3-27	82%	18-40	52%	
																3-40	35%	14-40	24%	
																		3-27	19%	
hK1	ohne	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	
																		3-27	72%	
	Nafamostat	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	100%	3-40	63%	3-40	100%	
																		3-27	25%	
																		18-40	20%	

Abetafibrillen pE3-40 1. Durchgang 1. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0	t0	5min	30min	60min	120min	180min	6h	18h	24h
NEP	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 48% 11-36 19%	pE3-40 98% 11-36 45%	alles abgebaut
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 59%	pE3-40 58%	alles abgebaut
NEP 2	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100% 20-40 24%	pE3-40 100% 1-32 34%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100% 20-40 35%	pE3-40 43%	pE3-17 90%	20-40 34%
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100% 11-36 22%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 65%	pE3-40 98%	pE3-40 63%
IDE	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100% 20-40 69%	20-40 100% pE3-40 47%	20-40 49%
	1,10-Phenanthroline	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%
Plasmin	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100% pE3-35 54%	pE3-35 100% pE3-40 89%	pE3-35 100% pE3-40 72%	pE3-35 100% pE3-40 56%	pE3-40 100%	24-36 100% pE3-35 77%	24-36 100% pE3-35 65%	24-36 100% 10-37 61%
		pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100% 24-36 21%	pE3-40 100% 24-36 13%	pE3-40 100%	pE3-40 100% 24-36 30%		10-37 69% 6-28 36%	10-37 54% pE3-40 19%	27-40 41% 6-28 35%
	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100% 24-36 59%	pE3-40 100% 24-36 16%	pE3-40 100% 24-36 19%		24-36 34% 24-36 26%	24-36 52% pE3-30 56%	24-36 55% pE3-30 100%
MMP-2	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 35%	pE3-40 40%	pE3-40 53%
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100% pE3-34 38% pE3-30 28%	pE3-30 56% pE3-40 35%	pE3-30 100% pE3-40 34%
MMP-3	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 22%	pE3-40 100%	alles abgebaut
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 30%	pE3-40 81%	alles abgebaut
MMP-9	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 35%	alles abgebaut
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut
MNP-13	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	11-29 52%
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 29%	11-36 47% pE3-40 19%
Mep-A+Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 35%
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 73%	pE3-40 100%	pE3-40 25%
Mep-A+hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 26%	pE3-40 21%
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 86%	pE3-40 27%	pE3-40 18%
Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 29%
	PKSI-527	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut
hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 46%	pE3-40 100%	alles abgebaut
	Nafamostat	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 48%	alles abgebaut

Abetafibrillen pE3-40 1. Durchgang 2. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0	t0	5min	30min	60min	120min	180min	6h	16h	24h	
NEP	ohne	pE3-40 100%	11-36 28%	alles abgebaut								
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	11-36 31%	alles abgebaut								
NEP 2	ohne	pE3-40 100%	20-40 54%	pE3-17 73%	alles abgebaut							
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	20-40 35%	pE3-40 38%	alles abgebaut							
IDE	ohne	pE3-40 100%	20-40 75%	alles abgebaut	alles abgebaut							
	1,10-Phenanthroline	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 72%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut	
Plasmin	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	24-36 100%	24-36 100%	
		pE3-35 53%	pE3-35 75%	pE3-40 99%	pE3-40 61%	pE3-40 55%	10-37 87%	10-37 37%	pE3-35 64%			
							24-36 80%	24-36 35%	10-37 31%			
							6-28 34%	6-28 23%				
							pE3-40 30%	5-32 18%				
						4-29 26%						
								5-32 23%				
									16-27/17-28 16%			
	α-antiplasmin	pE3-40 100%	pE3-40 58%	pE3-40 88%								
									7-38 13%	7-38 31%	7-38 18%	
MMP-2	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 72%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 53%	
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	7-35/8-36 80%	7-35/8-36 71%							
										17-33 31%	pE3-40 39%	
										7-35/8-36 29%		
										pE3-34 27%		
MMP-3	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 55%	pE3-40 100%	alles abgebaut							
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 60%	pE3-40 100%	alles abgebaut							
MMP-9	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 63%	alles abgebaut							
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut							
MNP-13	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut							
	Garladin		pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	11-29 33%						
												11-36 27%
												pE3-40 25%
Mep-A+Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut							
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut							
Mep-A+hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 19%							
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut							
Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 33%	pE3-40 100%	alles abgebaut							
	PKSI-527	pE3-40 100%	pE3-40 86%	alles abgebaut	pE3-40 57%							
hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 77%	pE3-40 22%	alles abgebaut							
	Nafamostat	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 44%	alles abgebaut							

Abetafibrillen pE3-40 2. Durchgang 1. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0	t0	5min	30min	60min	120min	180min	6h	18h	24h	
NEP	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut	
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	14-32 11%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 26%	alles abgebaut	
NEP 2	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut	
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 78%	pE3-40 100%	alles abgebaut	
IDE	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	10-27 65%	alles abgebaut	alles abgebaut	
	1,10-Phenanthroline	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	25-37/26-38 60%	13-26 100%	12-21 100%	
Plasmin	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	24-36 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	24-36 100%	16-27/17-28 100%	
			24-36 30%	pE3-35 56%	16-27/17-28 63%	pE3-40 78%	pE3-40 57%	pE3-40 43%	10-37 80%	10-37 56%	24-36 73%	
				24-36 15%	6-28 36%	24-36 25%	10-37 46%	24-36 24%	24-36 64%	16-27/17-28 52%	10-37 20%	
			10-37 13%	11-27 35%	10-37 17%	24-36 32%	10-37 20%	pE3-40 37%	pE3-35 51%	6-28 17%		
			9-28 32%			6-28 16%	25-37/26-38 18%	6-28 33%	6-28 22%			
			11-28 24%					27-40 21%	pE3-40 20%			
								13-28 13%				
	α-antiplasmin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	24-36 100%	24-36 100%	
										pE3-40 72%	pE3-40 62%	
										23-34 54%	9-32 59%	
										20-38 26%	20-38 36%	
MMP-2	ohne	pE3-40 100%	25-37/26-38 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 30%	17-27 100%	25-37/26-38 100%	
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 54%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	25-37/26-38 100%	alles abgebaut	25-37/26-38 100%	
									pE3-40 56%	pE3-40 22%	pE3-40 22%	
									11-36 41%			
MMP-3	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 25%	pE3-40 22%	alles abgebaut	
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 58%	alles abgebaut	alles abgebaut	
			8-25/9-26 12%									
MMP-9	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 56%	pE3-40 38%	pE3-40 21%	alles abgebaut	
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 45%	
									23-34 31%			
MNP-13	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 59%	11-29 74%	
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 25%	
											pE3-40 100%	
											11-29 26%	
											18-40 18%	
Mep-A+Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 82%	21-40 100%	
				5-38 42%						pE3-20 40%	21-40 38%	23-34 73%
				11-36 19%						pE3-21 35%		22-40 52%
									21-40 33%			
									22-40 27%			
									pE3-22 25%			
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	
										23-34 52%		
Mep-A+hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 43%	alles abgebaut	
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 70%	pE3-40 100%	pE3-40 20%	pE3-40 16%	

Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 73%									
	PKSI-527	pE3-40 100%	pE3-40 100%									
hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%									
											8-25/9-26 25%	
	Nafamostat	pE3-40 100%	pE3-40 89%									

Abetafibrillen pE3-40 2. Durchgang 2. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0	t0	5min	30min	60min	120min	180min	6h	16h	24h
NEP	ohne	pE3-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut							
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut							
NEP 2	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 86%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 51%	alles abgebaut				
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	alles abgebaut								
IDE	ohne	pE3-40 100%	alles abgebaut								
	1,10-Phenanthroline	pE3-40 100%	alles abgebaut								
Plasmin	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
	α-antiplasmin	pE3-40 100%	pE3-40 28%								
MMP-2	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 68%	pE3-40 100%	pE3-40 100%						
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
MMP-3	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
MMP-9	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
MNP-13	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
Mep-A+Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
Mep-A+hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
	PKSI-527	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
	Nafamostat	pE3-40 100%	pE3-40 100%								

Abetafibrillen pE3-40 3. Durchgang 1. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0	t0	5min	30min	60min	120min	180min	6h	18h	24h
NEP	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 54%	alles abgebaut	pE3-40 100%						
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	18-40 74%	pE3-40 100%							
											22-37/23-38 72%
										20-40 43%	16-38 47%
										11-36 38%	
										pE3-40 27%	
NEP 2	ohne	pE3-40 100%	pE3-17 31%	pE3-40 100%							
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	20-40 43%	20-33 65%							
											pE3-17 57%
										9-21 55%	pE3-40 63%
										pE3-40 54%	
										8-26 39%	
IDE	ohne	pE3-40 100%	20-40 43%	pE3-40 84%							
	1,10-Phenanthroline	pE3-40 100%	12-29 35%	20-40 32%							
											pE3-19 34%
										pE3-40 100%	pE3-40 100%
Plasmin	ohne	pE3-40 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	24-36 100%	24-36 100%				
				pE3-35 51%	pE3-35 80%	pE3-35 99%	pE3-40 65%	15-25 61%	15-25 64%	16-27/17-28 96%	16-27/17-28 88%
				23-34 28%	23-34 15%	23-34 16%	15-25 29%	pE3-40 55%	20-32 35%	6-28 22%	6-28 19%
				5-38 13%	5-38 13%	5-38 11%	10-37 15%	10-37 27%	10-37 35%	14-31 18%	pE3-40 16%
								6-28 15%	23-34 31%	10-37 13%	5-37 12%
									pE3-40 28%	pE3-40 13%	
								11-38 23%			
								6-28 22%			
								13-28 18%			
								5-37 14%			
	α-antiplasmin	pE3-40 100%	24-36 100%	24-36 100%							
										pE3-40 17%	18-40 26%
											pE3-40 16%
											pE3-35 13%
MMP-2	ohne	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%							
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%								
											28-39 59%
										14-32 18%	9-23 25%
										11-36 16%	11-36 18%
MMP-3	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 28%	pE3-40 100%							
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 13%	pE3-40 100%							
MMP-9	ohne	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 95%							
	Garladin	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%							
MNP-13	ohne	pE3-40 100%	11-29 100%	11-29 100%							
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-22 20%	pE3-40 36%							
										pE3-34 17%	pE3-22 18%
											11-29 46%
											18-40 20%
Mep-A+Kal	ohne	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%							
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 37%	pE3-40 100%							
Mep-A+hK1	ohne	pE3-40 100%	21-40 100%	pE3-40 78%							
	Actinonin	pE3-40 100%	alles abgebaut	alles abgebaut							

Kal	ohne	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%								
	PKSI-527	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 25%								
hK1	ohne	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 64%								
	Nafamostat	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 34%								

Abetafibrillen pE3-40 3. Durchgang 2. Durchlauf:

Enzyme	Inhibitor	T0	t0	5min	30min	60min	120min	180min	6h	16h	24h
NEP	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
NEP 2	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-17 76%	pE3-17 100%
	Phosphoramidon	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%
IDE	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
	1,10-Phenanthroline	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%
Plasmin	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-35 100%	pE3-35 100%	24-36 100%	24-36 100%	16-27/17-28 100%
		pE3-35 40%	pE3-35 95%	pE3-35 95%	pE3-40 69%	pE3-40 58%	pE3-35 91%	16-27/17-28 62%	24-36 77%		
		24-36 27%	24-36 14%	10-37 19%	24-36 37%	16-27/17-28 74%	6-28 13%	pE3-35 23%			
		24-36 15%	10-37 10%	24-36 29%	6-28 38%	10-37 58%	23-34 10%				
				10-37 10%	6-28 38%	10-37 58%	23-34 24%				
					13-28 18%	10-37 10%	23-34 24%				
					pE3-40 15%		13-28 18%				
							pE3-40 15%				
		α-antiplasmin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%
MMP-2	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%
MMP-3	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 91%
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 92%
MMP-9	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
MNP-13	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	11-29 100%
											pE3-22 17%
	Garladin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	11-29 100%
Mep-A+Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
											pE3-20 35%
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
Mep-A+hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	23-34 71%	pE3-40 100%
	Actinonin	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 50%	alles abgebaut
Kal	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 100%
	PKSI-527	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 35%
hK1	ohne	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 95%
	Nafamostat	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	pE3-40 100%	alles abgebaut	pE3-40 42%

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

.....

Sophie Behrendt