

**Untersuchungen zur Wirkung von Saponinen
als Verstärker der Penetration von Proteinen im Zellmodell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

eingereicht im

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alexander Weng

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: PD Dr. Hendrik Fuchs

Disputation am: 09.09.2009

Für Maria

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Saponinum album	1
1.1.1 Eigenschaften und Verwendung von Saponinen	2
1.2 Begriffsbestimmung der Endozytose	4
1.3 Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs).....	6
1.4 Zielsetzung	7
2. Material und Methoden.....	8
2.1 Geräte	8
2.1.1 Zellkultur	8
2.1.1.2 Elektrophorese	8
2.1.1.3 Zentrifugen.....	8
2.1.1.4 Chromatographie.....	8
2.1.1.5 Sonstige Geräte	8
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	9
2.1.2.1 Zellkultur.....	9
2.1.2.2 Elektrophorese	9
2.1.2.3 Chromatographie.....	9
2.1.2.4 Dialyse	9
2.1.2.5 Flüssigkeitsszintillation.....	9
2.1.2.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien	10
2.1.2.7 Zelllinien	10
2.1.3 Chemikalien.....	10
2.1.3.1 Verbrauchskemikalien.....	10
2.1.3.2 Hemmstoffe.....	11
2.1.3.3 Radiochemikalien.....	11
2.1.3.4 Proteine	11
2.1.3.5 Saponine.....	11
2.1.3.6 Kits	11
2.2 Zellbiologische Methoden.....	12
2.2.1 Kultivierung der Zellen.....	12
2.2.1.1 Untersuchungen zur Zytotoxizität.....	12
2.2.1.2 Vitalitäts-Assays auf der Basis von Tetrazoliumsalzen.....	12
2.2.1.3 Durchführung des XTT-Assay.....	13
2.2.1.4 Zytotoxizitätsversuche mit U-937-Zellen	13
2.2.1.5 LDH-Assay mit U-937-Zellen	14
2.2.1.6 Zytotoxizitätsversuche mit hIFN- γ und PMA differenzierten U-937-Zellen	14
2.2.1.7 Zytotoxizitätsversuche mit ECV-304-, SK-N-SH-, HEP-G2-, MOLT-3-, HL-60-, H-2171-Zellen	15
2.2.1.8 Zytotoxizitätsvergleich von rViscumin und Saporin/Saponinum album.....	15
2.2.1.9 Auswaschversuche von Saponinum album aus ECV-304-Zellen.....	15
2.2.2 Versuche mit Endozytosehemmstoffen	16
2.2.2.1 Optimierung der Saporin/Saponinum album Inkubationszeit.....	16
2.2.2.2 Hemmung der Saporin/Saponinum album Zytotoxizität	16
2.2.3 Phagozytose-Assay	17
2.2.3.1 Markierung von 1 μ m-Amino-Latex-Partikeln.....	17
2.2.3.2 Opsonierung der Alexa-Fluor 488 markierten 1 μ m-Amino-Latex Partikel mit IgG.....	17
2.2.3.3 Vorbereitung FITC markierter <i>Escherichia coli</i> -Partikel	17

2.2.3.4 Phagozytose-Assay mit U-937-Zellen	18
2.2.3.5 Durchflusszytometrie	18
2.2.3.6 Fluoreszenzmikroskopie	19
2.2.4 Endozytose von Alexa- ^{his} Saporin	19
2.3 Proteinchemische Methoden	20
2.3.1 Bradford-Assay	20
2.3.2 BCA-Protein-Assay	20
2.3.3 Proteinchemische Markierungsmethoden.....	21
2.3.3.1 Reduktive Methylierung von ^{his} Saporin	21
2.3.3.2 Reduktive Methylierung von ^{his} Saporin (Methyl- ^{his} Saporin).....	21
2.3.3.3 Markierung von ^{his} Saporin mit Tritium.....	22
2.3.3.4 Markierung von ^{his} Saporin mit Alexa-Fluor 488 5-TFP	22
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.4.1 SDS-Gelelektrophorese von ^{his} Saporin und Methyl- ^{his} Saporin	23
2.4.2 NanoLC-ESI-MS/MS	24
2.5 Organisch-chemische Methoden	25
2.5.1 Acetylierung von Saponinum album	25
2.5.2 Acetylierung von Saponinum album mit ^{3[H]} Acetanhydrid (^{3[H]} Saponinum album).....	27
2.6 Radioanalytische Untersuchungen in der Zellkultur	27
2.6.1 Flüssigkeitsszintillation	27
2.6.2 Aufnahme von ^{3[H]} Saponinum album in ECV-304-Zellen	27
2.6.3 Liberation von ^{3[H]} Saponinum album aus ECV-304-Zellen	28
2.6.4 Auswaschung von ^{3[H]} Saponinum album aus ECV-304-Zellen	28
2.6.5 Kompetitive Verdrängung von ^{3[H]} Saponinum album mit Saponinum album.....	28
2.6.6 Versuche mit N-Ethylmaleimid und ^{3[H]} Saponinum album.....	29
2.6.7 Versuche mit ^{3[H]his} Saporin in der Zellkultur	29
2.6.7.1 Optimierung der einzusetzenden Konzentration an ^{3[H]his} Saporin	29
2.6.7.2 Endozytose-Assay mit ^{3[H]his} Saporin	30
2.6.7.3 Exozytose von intaktem und degradiertem ^{3[H]his} Saporin	30
2.6.7.4 Zelluläre Halbwertszeit (t _{1/2} ^{3[H]his} Saporin).....	30
2.6.7.5 Bestimmung von intaktem und degradiertem intrazellulärem ^{3[H]his} Saporin	31
2.6.7.6 Hemmung der Internalisierung von ^{3[H]his} Saporin bei 4°C.....	31
2.6.7.7 Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die Internalisierung von ^{3[H]his} Saporin	31
2.6.7.7.1 Einfluss von Anti-α2M-R/LRP auf die Internalisierung von ^{3[H]his} Saporin.....	32
2.6.7.7.2 Einfluss von Chlorpromazin, Bafilomycin A1, Amilorid, Filipin III, Phenylarsenoxid und Heparin auf die Interna- lisierung von ^{3[H]his} Saporin	32
2.6.8 Charakterisierung der Saponin bedingten endosomalen Destabilisierung	32
2.6.8.1 Ultrazentrifugation des post-nuklearen Überstandes	32
2.6.8.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Endosomenintegrität.....	33
2.7 Charakterisierung des Saponinum album.....	33
2.7.1 Hydrolyse und HPLC	33
2.8 ESI-TOF-MS	34
2.9 ¹ H/ ¹³ C-NMR.....	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Untersuchungen in U-937-Zellen.....	35
3.1.1 Vorbemerkung	35

3.1.2 Festlegung der Differenzierungszeit mit IFN- γ	35
3.1.2.1 LDH-Freisetzung aus nicht differenzierten U-937-Zellen.....	37
3.1.3 Festlegung der Differenzierungszeit mit PMA.....	38
3.1.4 Adhärenz differenzierter U-937-Zellen.....	39
3.1.5 Phagozytose-Assay.....	40
3.1.5.1 Charakterisierung von Alexa-Latex-Partikeln.....	40
3.1.5.2 Charakterisierung FITC markierter <i>Escherichia coli</i> -Partikel.....	41
3.2 Untersuchungen zu Phagozytose induzierenden Eigenschaften des Saponinum album.....	41
3.2.1 Allgemeines zum Auswertungsverfahren.....	41
3.2.2 Optimierung des Zell/Partikel-Verhältnisses für Phagozytoseuntersuchungen mit IFN- γ differenzierten U-937-Zellen.....	43
3.2.2.1 Phagozytose von Alexa-Latex-Partikeln (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen).....	44
3.2.2.2 Phagozytose von IgG-Alexa-Latex-Partikeln (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen).....	45
3.2.3 Phagozytose von <i>E.coli</i> Bakterien (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen).....	46
3.2.3.1 Phagozytose FITC markierter <i>E.coli</i> (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen).....	47
3.2.3.2 Phagozytose IgG opsonierter FITC markierter <i>E.coli</i> (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen).....	48
3.2.4 Phagozytoseuntersuchungen in PMA differenzierten U-937-Zellen.....	49
3.2.4.1 Phagozytose von Alexa-Latex-Partikeln und IgG-Alexa-Latex-Partikeln.....	49
3.2.4.2 Phagozytose von FITC- <i>E.coli</i> und IgG-FITC- <i>E.coli</i> in PMA differenzierten U-937-Zellen.....	50
3.3 Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizität.....	51
3.3.1 Vorbemerkungen.....	51
3.3.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen in H-2171-, SK-N-SH-, ECV-304-, THP-1-, HL-60-, MOLT-3- und HEP-G2-Zellen.....	51
3.3.3 Derivatisierung von <i>Histidin tagged</i> Saporin (^{his} Saporin).....	53
3.3.3.1 Markierung von ^{his} Saporin mit Alexa-Fluor 488 5-TFP.....	53
3.3.3.2 Reduktive Methylierung von ^{his} Saporin mit Natriumborhydrid/Formaldehyd.....	53
3.3.3.2.1 NanoLC-ESI-MS/MS von Methyl- ^{his} Saporin.....	55
3.3.3.3 Charakterisierung von ^{3[H]his} Saporin.....	56
3.3.4 Vergleichende Toxizitätsuntersuchungen in ECV-304-Zellen.....	58
3.3.5 Hemmung der Saponinum album/Saporin Zytotoxizität.....	60
3.3.5.1 Vorbemerkung.....	60
3.3.5.2 Hemmung der Saporin/Saponinum album Zytotoxizität.....	62
3.3.6 Untersuchungen mit ^{3[H]his} Saporin.....	65
3.3.6.1 Vorbemerkung.....	65
3.3.6.2 Optimierung der ^{3[H]his} Saporinkonzentration.....	65
3.3.6.3 ^{3[H]his} Saporinendozytose.....	66
3.3.6.4 Exozytose von unmodifiziertem und degradiertem ^{3[H]his} Saporin.....	67
3.3.6.5 Zelluläre Halbwertszeit ($t_{1/2}$ (^{3[H]his} Saporin)).....	69
3.3.6.6 Bestimmung von intaktem und degradiertem intrazellulärem ^{3[H]his} Saporin.....	70
3.3.6.7 Hemmung der Internalisierung von ^{3[H]his} Saporin bei 4°C.....	71

3.3.6.8 Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die Internalisierung von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin	72
3.3.7 Ultrazentrifugation.....	74
3.3.8 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Endosomenintegrität	75
3.4 ^3H Saponinum album	76
3.4.1 Partialsynthese und Testung markierter Saponinum album Derivate.....	76
3.4.2 Spezifische Aktivität von ^3H Saponinum album	79
3.4.3 In vitro Untersuchungen mit ^3H Saponinum album.....	80
3.4.3.1 Zeitabhängige Aufnahme von ^3H Saponinum album.....	80
3.4.3.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^3H Saponinum album.....	81
3.4.3.3 Konkurrenz von ^3H Saponinum album	82
3.4.3.4 Liberation von ^3H Saponinum album aus ECV-304-Zellen.....	83
3.4.3.5 Erschöpfende Liberation von ^3H Saponinum album aus ECV-304-Zellen	84
3.4.3.6 Einfluss von N-Ethylmaleimid auf die Aufnahme von ^3H Saponinum album.....	86
3.4.3.7 Prüfung auf lineare Zusammenhänge	88
3.5 Liberations – und Zytotoxizitätsversuche mit Saponinum album.....	89
3.6 Saponinum album.....	90
3.6.1 ESI-TOF-MS	90
3.7 Isolation eines Saponins aus Saponinum album	91
3.7.1 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR	93
3.7.2 Biologische Testung des Saponin-1641.....	96
4. Diskussion	98
4.1 Hintergrund	98
4.2 Phagozytose.....	98
4.3 Charakterisierung der synergistischen Zytotoxizität.....	99
4.4 Bedeutung des α 2-Makroglobulin-Rezeptors für die Saporinendozytose.....	106
4.5 Saponinum album.....	106
4.6 Signifikanz der synergistischen Zytotoxizität	108
5. Zusammenfassung.....	110
6. Summary	112
7. Literaturverzeichnis	113
8. Publikationsverzeichnis	122
9. Lebenslauf	125
10. Eidesstattliche Erklärung	127

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
AO	Acridinorange
α 2M-R/LRP	α 2-Makroglobulin-Rezeptor
BCA	Bicinchoninsäure
Cpm	Counts per minute
DAB	Deutsches Arzneibuch
DMSO	Dimethylsulfoxid
SSC	Side scatter
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermaler-Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor
ESI-TOF-MS	Electrospray-ionization time-of-flight Mass Spectrometry
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMP	Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie
FSC	Forward side scatter
FU	Freie Universität
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GI ₅₀	drug concentration achieving 50 % growth inhibition relative to untreated cells
hIFN- γ	humanes Gamma-Interferon
IgG	Immunglobulin G
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatographie
LDL	Low density lipoprotein
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MWCO	Molecular weight cut off
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
NanoLC	Nano Liquid Chromatography

RIP	Ribosomen-inaktivierende Proteine
RT	Raumtemperatur
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PBS	Phosphate buffered saline
R	Retentionszeit
SA	Saponinum album, ein Saponingemisch aus <i>Gypsophila paniculata</i> L.
Sap-EGF	Saporin-Epidermaler-Wachstumsfaktor
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
XTT	Natrium 3,3'Phenylamino)carbonyl]-3,4-Tetrazolium}-Bis(4-methoxy-6-nitro)benzen sulfonat

1. Einleitung

1.1 Saponinum album

Saponinum album stellt ein außerordentlich komplexes Gemisch mono- und bisdesmosidischer Triterpensaponine mit Gypsogenin als Aglycon dar. Es war im DAB 7 monographiert und wurde früher als Expektorans verwendet. In jüngeren Ausgaben des DAB fand Saponinum album keine Berücksichtigung mehr und gilt seitdem als obsolet. Allerdings könnte die Saponinum album bedingte massive Zytotoxizitätserhöhung eines in der Tumortherapie verwendeten chimären Toxins (Bachran et al., 2009) zu einer therapeutischen Renaissance des Saponinum album führen.

Saponinum album lässt sich durch Wasser/Methanol-Extraktion, anschließende Etherfällung und Anreicherung in Butanol als weißes Pulver gewinnen. Als Ausgangsdroge dienen die als Saponariae radix alba (weiße Seifenwurzel) bezeichneten getrockneten Wurzeln von *Gypsophila paniculata* L. (siehe Abb. 1), gemeinhin als Schleier- oder Gipskraut bezeichnet. *Gypsophila paniculata* L. ist eine ausdauernde, ursprünglich aus Osteuropa stammende Pflanze, die der Familie der Nelkengewächse (Caryophyllaceae) angehört. Heutzutage wird *Gypsophila paniculata* L. hauptsächlich floristisch verwendet und besitzt keine therapeutische Bedeutung. Der Begriff Gypsophilasaponine wird in dieser Arbeit als Synonym für Saponinum album verwendet.



Abb.1 *Gypsophila paniculata* L. Illustration von Otto Wilhelm Tomé (1840-1928)

1.1.1 Eigenschaften und Verwendung von Saponinen

Viele Arzneidrogen kommen wegen der in ihnen enthaltenen Saponine therapeutisch zum Einsatz. So werden beispielsweise Efeublätter (*Hederae helix folium*) und Primelwurzel (*Primulae radix*) als Expektorantien, die Samen der Rosskastanie (*Hippocastani semen*) als Antiexsudativa und die Ginsengwurzel (*Ginseng radix*) als Tonikum genutzt. Neben dieser „klassischen“ Verwendung der Saponindrogen als Phytopharmaka werden einzelne Saponine auch anderweitig eingesetzt. So wurde schon um 1920 festgestellt, dass die Saponine der Seifenrinde (*Quillaja saponaria* M.) die Immunantwort verstärken (Ramon, 1926). Quillajasaponine werden heute als Adjuvantien bei der Herstellung von ISCOMs (*Immun Stimulating Complex*) verwendet (Cox et al., 1998). Daneben sind entzündungshemmende,

antileishmanielle, antitrichomoniale, antifungale, antivirale und antiallergische Effekte für Saponine beschrieben (Fuchs et al., 2009).

Aus der Beobachtung heraus, dass Saponine die Zellmembranpassage anderer Substanzen erheblich verbessern, wurden Versuche unternommen, gezielt Stoffe in der Zelle anzureichern. So wurde eine Saponin vermittelte Akkumulation des Zytostatikums Cisplatin in humanen Kolonkarzinomzellen festgestellt (Gaidi et al., 2002). Auch die Aufnahme von Heparin ließ sich in vitro durch Zugabe entsprechender Saponine steigern (Cho et al., 2003). Daneben sind ähnliche Effekte für Insulin, Aminoglycoside, 4'-O-Tetrahydropyranyldoxorubicin (THP) und beta-Laktoglobulin festgestellt worden (Chao et al., 1998, Sasaki et al., 1994, Gee et al., 1997).

Bedingt durch den amphiphilen Charakter, der auf das Vorhandensein einer polaren Zuckerkette und eines unpolaren Steroid- oder Triterpenteils zurückzuführen ist, verhalten sich Saponine als ausgesprochene Hämolysegifte, die die Zellmembranen schädigen, indem sie die Oberflächenspannung herabsetzen und auf Membranlipide emulgierend wirken. In der Folge entstehen Membranlücken, durch die der zelluläre Inhalt nach außen und Elektrolyte und Wasser nach innen gelangen können. Letztlich wird die Zellmembran zerstört und es kommt zum Austritt zellulärer Bestandteile (Francis et al., 2002).

Die hämolytische Wirkung insbesondere der Quillajasaponine und der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gypsophilasaponine konnte in verschiedenen Arbeiten immer wieder gezeigt werden und wird gewöhnlich auf die Bildung von unspezifischen Poren zurückgeführt, die durch Wechselwirkung des Geninteils mit Zellmembranbestandteilen (Cholesterol) entstehen (Francis et al., 2002, Fuchs et al., 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Membranperforation ein lang andauernder Effekt ist, wodurch die Zellmembran für große Moleküle wie Ferritin durchlässig wird (Francis et al., 2002). Ob sich die durch Gypsophilasaponine bedingte Toxizitätssteigerung spezieller *N*-Glycosidasen (siehe 1.3.1) (Hebestreit, 2005) auf eine Saponin induzierte Membranperforation zurückführen lässt, ist fraglich, da die für die Auslösung dieser Toxizitätserhöhung notwendige Saponinkonzentration mit 4 µg/ml weder zytotoxische (Weng et al., 2008) noch membranolytische Effekte (Störmer, 2008) zeigt.

Insbesondere deutet die durch Saponinum album (1,5 µg/ml) vermittelte, um Faktor 385 000 zugenommene Zytotoxizität eines gegen den Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichteten, *N*-Glycosidase basierten, chimären Toxins wenig auf eine unspezifische Perforation der Zellmembran hin (Heisler et al., 2005). Chimäre Toxine sind häufig Ligand-Enzym-Komplexe, die über ihre Liganden (z.B. EGF) spezifisch an zelluläre Rezeptoren (z.B.

EGFR) binden und nach Internalisierung auf Grund einer toxischen Enzymaktivität (*N*-Glycosidase) zytotoxisch wirken.

Darüber hinaus sind Phagozytose stimulierende Eigenschaften für Saponine im Allgemeinen und Gypsophilasaponine im Besonderen beschrieben. So führen Gypsophilasaponine zu einer verstärkten phagozytischen Aktivität von Granulozyten (Luo et al., 2006). Diosgenylsaponine aus *Paris polyphylla* SM. stimulieren die Phagozytose von RAW-264.7-Zellen (Zhang et al., 2007) und triterpenoide Ginsengsaponine aus *Panax ginseng* C. erhöhen die Clearance von β -Amyloid durch Mikrogliazellen (Joo & Lee, 2008).

1.2 Begriffsbestimmung der Endozytose

Im Allgemeinen nutzen Zellen die Endozytose zur Nährstoffaufnahme und zur Verteidigung gegen Pathogene. In Abhängigkeit vom zugrunde liegenden Mechanismus der Aufnahme extrazellulären Materials unterscheidet man folgende endozytotische Prozesse:

- Phagozytose
- Makropinozytose
- Clathrin vermittelte und Caveolae vermittelte Endozytose.

Spezialisierte Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder neutrophile Granulozyten nutzen die Phagozytose für die Aufnahme von Bakterien und Partikeln (0,1–10 μ m) und tragen so zur Elimination in den Körper eingedrungener Antigene bei. Mittels Makropinozytose nehmen Zellen extrazelluläre Flüssigkeit in Makropinosomen (50–1000 nm) auf, die entlang der Mikrotubuli in tiefere Zellkompartimente transportiert werden. Dagegen bestehen Caveolae aus kolbenförmigen, cholesterolreichen Membraneinstülpungen, die besonders häufig in endothelialen Zellen anzutreffen sind und hier dem transzellulären Transport von Serumproteinen und Nährstoffen dienen. Das Protein Caveolin ist integraler Bestandteil der Membran und für die Stabilität der Caveolae essentiell. Die Expression dieses Proteins in der Zelle kann die Caveolaebildung induzieren (Pelkmans & Helenius, 2002). Die Internalisierung durch Caveolae ist ein getriggert Vorgang, in den auch komplexe Signalkaskaden eingebunden sind. Über Caveolae können Toxine wie Cholera toxin, Tetanustoxin sowie Pathogene wie der Simian-Virus (SV 40) aufgenommen werden (Pelkmans & Helenius, 2002). Die Endozytose durch Caveolae verläuft im Gegensatz zur Clathrin vermittelten Endozytose wesentlich langsamer (10–20 Stunden) (Fittipladi et al., 2003).

Bei der Clathrin vermittelten Endozytose werden über spezielle Membranvertiefungen (*coated pits*) Nährstoffe wie Eisen oder Cholesterol, aber auch aktivierte Rezeptoren internalisiert. Zytoplasmatisch zeichnen sich diese Vertiefungen durch das Protein Clathrin aus. Im zeitlichen Verlauf der Clathrin vermittelten Endozytose werden Rezeptor-Ligand-Komplexe in den *coated pits* konzentriert und anschließend als *coated vesicles* von der Zellmembran abgeschnürt. Die Abschnürung der Vesikel erfolgt unter Verbrauch von ATP. Das in den *clathrin coated vesicles* transportierte Material wird in leicht saure (pH 6,5), tubulovesikuläre, frühe Endosomen abgegeben. Membranfragmente und Rezeptoren werden von hier aus entweder über *Recycling*-Endosomen zurück zur Zelloberfläche transportiert oder im Zuge der endosomalen Reifung vakuolarer Teile früher Endosomen in multivesikuläre Körperchen und folgend in späte Endosomen (pH 4,5) abgegeben. Nach Fusion später Endosomen mit Lysosomen erfolgt der Abbau des endozytierten Materials durch lysosomale Enzyme. Mittels Clathrin vermittelter Endozytose werden beispielsweise LDL (Allayee et al., 2000), Transferrin und EGF aufgenommen. Allerdings können auch Pathogene wie der Papilloma-Virus und Toxine wie Shigatoxin, Diphtherietoxin, Ricin aus *Ricinus communis* L., Nigrin B und Ribosomen-inaktivierende Proteine Typ I wie Tichosanthin über diesen Weg internalisiert werden (Chan et al., 2002 & 2003).

Die durch Saponinum album um Faktor 100 000 gesteigerte Toxizität des Ribosomen-inaktivierenden Proteins Typ I Saporin wurde in bisherigen Arbeiten auf die Saponin induzierte Internalisierung des Saporins zurückgeführt. Die Tatsache, dass sowohl der Endozytosehemmstoff Latrunculin (Hebestreit et al., 2006) als auch eine Temperaturreduktion auf 6°C (Hebestreit, 2005) eine signifikante Hemmung der Saponin/Saporin Toxizität verursacht, lässt diese Hypothese plausibel erscheinen.

Dies könnte auf der schon in Kolonkarzinomzellen beobachteten Saponinum album induzierten Induktion der Vesikelbildung beruhen (Sung et al., 1995). Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Saponin bedingten Effekte sind unbekannt. Allerdings haben elektronenmikroskopische Untersuchungen an mit Gypsophilasaponin behandelten Zellen Veränderungen in der Membranstruktur festgestellt (Sung et al., 1995), die als Endozytoseauslöser fungieren könnten. Andere Autoren, die die Wirkung von Gemischen aus Quillajasaponin und Gypsophilasaponin mit GnRH (Gonadorelin) an Zellen der Hirnanhangdrüse untersucht haben, postulieren eine Umstrukturierung der Zellmembran im Sinne einer Neuordnung (Levavi-Sivan et al., 2005).

1.3 Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs)

Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs) sind toxische Proteine mit Enzymaktivität, die pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs sein können und als *N*-Glycosidasen einen essentiellen Adeninrest (Adenin-4324) der 28 S-Untereinheit der ribosomalen RNA (rRNA) abspalten. Dadurch kommt die Proteinsynthese zum Erliegen (Nilson et al., 2001).

RIPs können aus einer Proteindomäne (A-Kette) oder aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Proteindomänen (A- und B-Kette) bestehen. Das enzymatisch aktive Zentrum liegt auf der A-Kette.

Demgemäß werden Ribosomen-inaktivierende Proteine Typ II (RIPs Typ II) mit einer A- und B-Domäne von den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen Typ I (RIPs Typ I) mit nur einer A-Domäne unterschieden.

Ricin (66 kDa) aus *Ricinus communis* L., das wohl prominenteste RIP Typ II, bindet mit seiner B-Domäne lektinartig an terminale Galaktosereste auf der Zelloberfläche und ermöglicht so den Transfer der toxischen *N*-Glycosidase in die Zelle (Nilson et al., 2001).

Zu den RIPs Typ II sind auch Abrin (63–67 kDa) aus *Abrus precatorius* L. und Viscumin (60 – 70 kDa) aus *Viscum album* L. zu zählen.

RIPs Typ II stellen gemäß Aufnahmemechanismus der A-Domäne außerordentlich toxische Proteine dar, die schon in geringster Konzentration letal wirken. Die LD₅₀ für Ricin wurde mit 12 µg/kg Körpergewicht (Maus, i.v.) bestimmt. Dagegen wird die geringe Toxizität der RIPs Typ I auf die fehlende, den Zellmembrantransfer vermittelnde B-Kette zurückgeführt (Peumans et al., 2001). Hierzu werden unter anderem das Agrostin (30 kDa) aus *Agrostemma githago* L. und das Saporin (30 kDa) aus *Saponaria officinalis* L. gerechnet.

1.4 Zielsetzung

Seit der ersten Beschreibung der synergistischen Zytotoxizität zwischen Saponinum album und Saporin durch Hebestreit (2005) sind keine weiteren Untersuchungen zur Zellspezifität des Effektes erfolgt und der zugrunde liegende Mechanismus der außerordentlichen Toxizitätssteigerung (Hebestreit et al., 2006) von Saporin durch Gypsophilasaponine war vollkommen ungeklärt.

Aufgabe der vorliegenden Dissertation war es deshalb, die Zellspezifität der Saponinum album bedingten Saporintoxizitätssteigerung in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen und nach Etablierung geeigneter In-vitro-Modelle mögliche Endozytose und Phagozytose stimulierende Eigenschaften des Saponinum album als potentiellen Mechanismus der Saporin abhängigen Saporinzytotoxizitätszunahme zu identifizieren. Darüber hinaus sollte das als Rohsaponingemisch vorliegende Saponinum album phytochemisch charakterisiert und dessen Insertion in die Zellmembran vitaler Zellen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Zellkultur

- Cellstar-Begasungsschrank, Nunc Intermed GmbH, Wiesbaden
- CASY-Cellcounter, Schärfe System GmbH, Reutlingen
- Laminar-Airflow-Box Herasafe, Heraeus-Christ, Hanau
- Membran-Vakuumpumpe, Vaccubrand GmbH, Wertheim
- Elvin-Potter-Homogenizer, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.1.2 Elektrophorese

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

2.1.1.3 Zentrifugen

- Tischzentrifuge, Biofuge pico, Heraeus-Christ, Hanau
- Mikro 200R, Hettich, Tuttlingen
- Optima L-90 K Ultrazentrifuge, Rotor Ti 70.1, Beckmann-Coulter

2.1.1.4 Chromatographie

- Wellchrom HPLC Pump K-1001, Knauer, Berlin
- Wellchrom DAD K-2700, Knauer, Berlin
- Wellchrom Solvent Organizer K-1500, Knauer, Berlin

2.1.1.5 Sonstige Geräte

- Mikroplattenphotometer Tecan-Spectra Fluor, Tecan, Berlin
- Lichtmikroskop TMS-F, Nikon, Japan
- Analysenwaage AC 210 D, Sartorius, Göttingen
- Durchflusszytometer, FACScalibur, BectonDickenson, USA
- Epi-Fluoreszenzmikroskop, BX 41, Olympus, Japan
- Wallac-MicroBeta-Trilux beta counter, Perkin Elmer, Wiesbaden
- Rotavapor R114, Büchi, Flawil, Schweiz

- pH-Einstabmesskette Typ Nr. N 62, Schott, Mainz
- Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage, Osterode

2.1.2 Verbrauchsmaterial

2.1.2.1 Zellkultur

- Easy Ton Lösung, Schärfe System GmbH, Reutlingen
- Easy Clean Lösung, Schärfe System GmbH, Reutlingen
- Fetales Kälberserum (FCS), Biochrom KG, Berlin
- Trypsin/EDTA, Biochrom KG, Berlin
- RPMI 1640 Zellkulturmedium ohne Phenolrot, Biochrom KG, Berlin
- MEM Zellkulturmedium ohne Phenolrot, Biochrom KG, Berlin
- Phosphat buffered saline (PBS), Biochrom KG, Berlin
- LAB-TEK chamber slides, NuncTM, New York, USA

2.1.2.2 Elektrophorese

- Coomassie Stain Solution, Bio-Rad, München
- Destain Solution Coomassie R-250, Bio-Rad, München
- Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad, München
- SDS Ready Gel Precast Gels, 10-20 % Tris-HCL, Bio-Rad, München

2.1.2.3 Chromatographie

- UltraSep ES PHARM RP18 (7 µm, 250 × 8 mm) Säule, SepServ, Berlin
- BioGel P-30, Bio-Rad, München

2.1.2.4 Dialyse

- QuixSep-Mikro-Dialysierkapseln, Roth, Karlsruhe
- ZelluTrans-V-Series Dialyse Membran (1000 MWCT), Roth, Karlsruhe

2.1.2.5 Flüssigkeitsszintillation

- Optiphase Supermix Szintillationcocktail, Perkin Elmer, Wiesbaden
- Soluene-350, Perkin Elmer, Wiesbaden

2.1.2.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

- *Escherichia coli* BioParticles, Molecular Probes, Karlsruhe
- *Escherichia coli* BioParticles Opsonizing Reagents, Molecular Probes, Karlsruhe
- Polybead Amino 1 µm Spheres, Polyscience, Eppelheim
- Complete midi™, Roche, Mannheim

2.1.2.7 Zelllinien

- U-937 (Humane akute monozytische Leukämie, ATCC, CRL-1593.2, DSMZ Braunschweig)
- SK-N-SH (Humanes Neuroblastom, ATCC, HTB-11, FMP Berlin)
- HEP-G2 (Humanes Leberkarzinom, ACC 180, DSMZ Braunschweig)
- THP-1 (Humane akute monozytische Leukämie, ACC 16, DSMZ Braunschweig)
- MOLT-3 (Humane T-Zell-Leukämie, ACC 84, DSMZ Braunschweig)
- H-2171 (Humanes kleinzelliges Lungenkarzinom, ACC 544, DSMZ Braunschweig)
- ECV-304 (Humanes Blasenkarzinom, ACC 310, DSMZ Braunschweig)
- HL-60 (Humane akute myeloische Leukämie, ACC 3, DSMZ Braunschweig)

2.1.3 Chemikalien

2.1.3.1 Verbrauchskemikalien

- Natrium 3,3'-{-(Phenylamino)carbonyl}-3,4-Tetrazolium}-Bis(4-methoxy-6-nitro)benzen sulfonat (XTT), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Phenazinmethosulfat (PMS), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Borsäure, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Alexa-Fluor 488 5-Tetrafluorphenylester (5-TFP), Molecular Probes, Karlsruhe
- Toluol (pro analysi), Merck, Darmstadt
- Pyridin (pro analysi), Merck, Darmstadt
- β-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt
- Formaldehyd A.C.S. Reagenz, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Acetanhydrid (pro analysi), Merck, Darmstadt
- Natriumborhydrid ReagentPlus 99 % , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.3.2 Hemmstoffe

- Cyclosporin A, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Filipin III, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Bafilomycin A1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Nokodazol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Cytochalasin B, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Okadiinsäure, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Heparin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Phenylarsenoxid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Amilorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.3.3 Radiochemikalien

- ^3H Acetanhydrid (500 mCi/mmol), 25 mCi, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
- Natrium ^3H Borhydrid, (15 Ci/mmol), 25 mCi, Biotrend, Köln

2.1.3.4 Proteine

- Saporin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- rViscumin, CYTAVIS BioPharma GmbH, Bergisch Gladbach
- IgG, human, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Interferon- γ , human, Roche, Mannheim
- Anti-alpha-2-Makroglobulin-Rezeptor (Anti- α 2M-R/LRP, CD 91) Antikörper, No 3402, American Diagnostica inc, Stamford, USA
- $^{\text{his}}$ Saporin, Institut für klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité - Universitätsmedizin Campus Benjamin Franklin, AG Fuchs, Berlin

2.1.3.5 Saponine

- Saponine aus *Gypsophila paniculata* L., Saponinum album, Merck, Darmstadt

2.1.3.6 Kits

- LDH-Detection-Kit, Roche, Mannheim
- BCA-Protein-Assay-Kit, Pierce, Rockford, USA

2.2 Zellbiologische Methoden

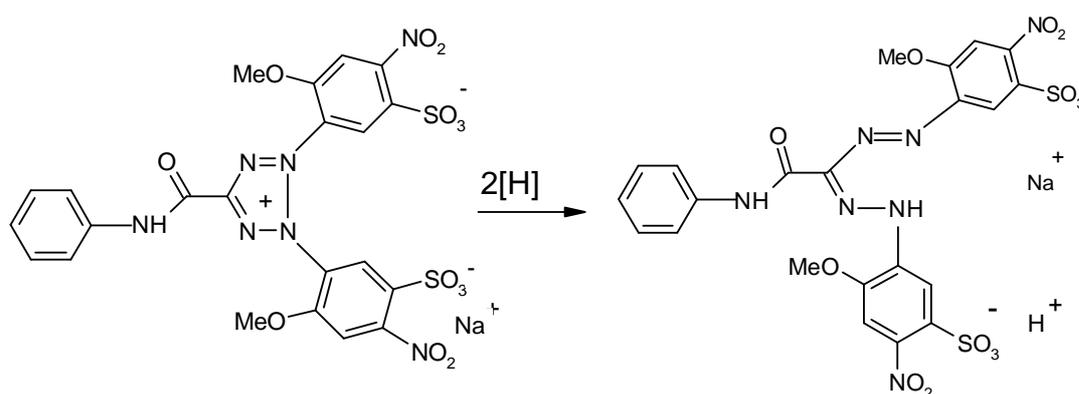
2.2.1 Kultivierung der Zellen

U-937-, THP-1-, MOLT-3- und HL-60-Zellen wurden in RPMI-1640 mit 15 % FCS ohne Phenolrot mit 5 % CO₂ bei 37 °C in sterilen 50 ml Kulturflaschen kultiviert. H-2171- (20 % FCS), ECV-304-, SK-N-SH- und HEP-G2-Zellen wurden in MEM-*Earle* mit 15 % FCS ohne Phenolrot mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Die Kultivierung und Handhabung der Zellen erfolgte stets entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig (<http://www.dsmz.de>).

2.2.1.1 Untersuchungen zur Zytotoxizität

2.2.1.2 Vitalitäts-Assays auf der Basis von Tetrazoliumsalzen

Tetrazoliumsalze finden in Zytotoxizitätstests und Enzym-Assays breite Anwendung. Diese Tests beruhen auf der Reduktion eines Tetrazoliumsalzes durch die Zellen zu dem intensiv gefärbten Formazan. Dieses Formazan wird anschließend bei 450 – 600 nm photometrisch bestimmt (Scudiero et al., 1987). Da zwischen der Anzahl der lebenden Zellen und der Reduktion des Tetrazoliumsalzes zum Formazan ein linearer Zusammenhang besteht, kann anhand einer Kalibriergeraden auf die Zellzahl geschlossen werden (Buttke et al., 1993).



Reduktion des XTT zum Formazan

Das gemeinsame Strukturmerkmal aller Tetrazoliumsalze ist der aus 4 N-Atomen bestehende, positiv geladene Tetrazoliumring, der durch Reduktion geöffnet und in das entsprechende Formazan überführt wird (siehe Abbildung). Es existieren unterschiedliche Tetrazoliumsalze (z.B. MTT od. XTT). Diese unterscheiden sich lediglich in der Art der Seitenketten, mit denen der Tetrazoliumring substituiert ist. Die Seitenketten bestimmen wesentliche Eigenschaften der

Formazane. So ist das Formazan des MTT auf Grund der hydrophoben Substituenten wasserunlöslich. Im Gegensatz dazu liefert das XTT auf Grund der negativ geladenen Sulfonatgruppen in den Seitenketten ein gut wasserlösliches Formazan. Da das hydrophobe Formazan des MTT im wässrigen Milieu ausfällt und in einem nächsten Schritt mit einem organischen Lösungsmittel (z.B. DMSO) extrahiert werden muss, eignet sich XTT wesentlich besser für Zytotoxizitätsuntersuchungen unter Zellkulturbedingungen (Goodwin et al., 1995). Der genaue Mechanismus der Reduktion zum entsprechenden Formazan ist trotz der langen Verwendung der Tetrazoliums Salze nicht vollständig verstanden. Im Falle des MTT soll diese Reduktion allerdings von mitochondrialen Enzymen abhängen. Insbesondere Dehydrogenasen scheinen bei der Reduktion des MTT eine besondere Rolle zu spielen (Mosmann et al., 1983). Unmittelbar nach dem Zelltod wird die Aktivität dieser mitochondrialen Enzyme eingestellt, so dass bei der Bestimmung tote Zellen nicht erfasst werden. Das Tetrazoliumsalz XTT wird im Gegensatz zu MTT nur bei Vorhandensein eines intermediären Elektronenüberträgers (Kupplungsreagenz) ausreichend von den Zellen umgesetzt. Als Kupplungsreagenz wird Phenazinmethosulfat (PMS) verwendet (Roehm et al., 1991). Nach Scudiero et al. (1987) haben sich 50 µg XTT und 0,15–0,4 µg PMS pro Well als optimal erwiesen.

2.2.1.3 Durchführung des XTT-Assays

Nach Inkubation mit den entsprechenden Substanzen erfolgte unabhängig von der Art der verwendeten Zelllinie die Zugabe von 50 µl einer Mischung von 1 mg/ml XTT und 8 µg/ml PMS zu 100 µl Medium pro well. Nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Absorptionsmessung bei 585 nm (Referenzwellenlänge: 450 nm). Zur Auswertung der einzelnen Zytotoxizitäts-Assays wurde grundsätzlich der Mittelwert aus acht Einzelmessungen gebildet und auf den Wert der mitgeführten Kontrolle bezogen (ausgedrückt in Prozent).

2.2.1.4 Zytotoxizitätsversuche mit U-937-Zellen

10000 U-937-Zellen pro well (100 µl RPMI-1640) wurden in 96-well Platten eingesät und 24 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl einer Mischung von Saponinum album (0–5 µg/ml) und Saporin (6 nM) wurden die Zellen weitere 48 Stunden inkubiert. Eine mögliche Eigentoxizität der Einzelsubstanzen wurde ebenfalls untersucht. Die Vitalität wurde mittels XTT-Assay bestimmt (2.2.1.3).

2.2.1.5 LDH-Assay mit U-937-Zellen

Für die Bestimmung der LDH-Freisetzung aus U-937-Zellen wurde der *Cytotoxicity-Detection-Kit* (Roche) verwendet. U-937-Zellen (10000) wurden in 200 µl RPMI-1640 in 1,5 ml Eppendorf-Tubes ausgesät und mit verschiedenen Saponinum album Konzentrationen (4, 8, 16, 20, 28 µg/ml) für 5, 10, 20, 40 und 80 min im Brutschrank inkubiert. Entsprechende Kontrollen wurden nur mit Medium behandelt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend für 10 min bei 250g zentrifugiert. Es wurden jeweils 100 µl aus dem Überstand entnommen und in eine 96-well Platte pipettiert. Nach Zugabe von 100 µl Reaktionsmischung (Katalysator, Tetrazoliumsalz) aus dem *Cytotoxicity-Detection-Kit* wurde nochmals für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei 490 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 590 nm.

2.2.1.6 Zytotoxizitätsversuche mit hIFN- γ und PMA differenzierten U-937-Zellen

Im Zuge der monozytären Differenzierung zu Makrophagen werden verstärkt Rezeptoren zu extrazellulären Adhäsionsfaktoren wie Fibronectin auf der Zelloberfläche exprimiert. Um eine optimale Adhärenz der Zellen an die Kunststoffoberfläche der Gewebekulturplatten zu gewährleisten, wurden 96-well Platten mit folgenden Adhäsionsfaktoren für 30 min bei RT bedeckt: Poly-L-lysin (0,1 mg/ml), Gelatine (10 mg/ml), Collagen A (1 mg/ml) und Fibronectin (75 µg/ml). Anschließend wurde zweimal mit PBS (100 µl/well) gewaschen. Für die Zytotoxizitätsversuche wurden 96-well Platten mit Fibronectin (75 µl/well) für 30 min bei RT beschichtet, zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen, 50000 Zellen pro well in 100 µl RPMI-1640 eingesät und 20 µl hIFN- γ (Endkonzentration: 1000 U) oder 20 µl PMA (Endkonzentration: 20 nM) zugegeben. Die Zellen wurden entweder 24, 48 (hIFN- γ) oder 24, 48, 72 (PMA) Stunden differenziert, vorsichtig mit 100 µl PBS gewaschen und mit 100 µl RPMI-1640, 10 µl Saponinum album (0–5 µg/ml) in Kombination mit Saporin (6 nM) für weitere 48 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Vitalität (2.2.1.3). Eine mögliche Eigentoxizität der Substanzen wurde ebenfalls geprüft.

2.2.1.7 Zytotoxizitätsversuche mit ECV-304-, SK-N-SH-, HEP-G2-, MOLT-3-, HL-60, H-2171-Zellen

ECV-304-, SK-N-SH- und HEP-G2-Zellen wurden in 100 µl MEM (15 % FCS) in 96-well Platten mit einer Zelldichte von 2000 Zellen pro well ausgesät. THP-1- (7000/well), MOLT-3- (40000/well), H-2171- (10000/well) und HL-60-Zellen (10000/well) wurden ebenfalls in 96-well Platten in 100 µl RPMI-1640 mit 15 % (20 %, H-2171-Zellen) FCS eingesät. Nach 24 Stunden wurde Saporin (6 nM)/Saponinum album (4 µg/ml) zu ECV-304-, SK-N-SH-, H-2171-, HL-60- und HEP-G2-Zellen gegeben. MOLT-3- und THP-1-Zellen wurden mit Saporin (6 nM bzw. 0.6 nM) und mit 3 bzw. 2 µg/ml Saponinum album inkubiert. Um eine Eigentoxizität der Monosubstanzen auszuschließen, wurden die Zellen alternativ nur mit Saporin ohne Saponinum album oder nur mit Saponinum album inkubiert. Entsprechende Negativkontrollen wurden mit Medium oder PBS behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden erfolgte die Vitalitätsbestimmung (2.2.1.3).

2.2.1.8 Zytotoxizitätsvergleich von rViscumin und Saporin/Saponinum album

ECV-304-Zellen wurden in 96-well Platten in 100 µl MEM (15 % FCS) mit einer Zelldichte von 2000 Zellen pro well eingesät, 24 Stunden kultiviert, das Medium entfernt und die Zellen mit 100 µl PBS pro well gewaschen. Nach Zugabe von 83.5 µl MEM pro well ohne FCS wurden 10 µl rViscumin ($1,7 \times 10^{-10}$ M – $1,0 \times 10^{-14}$ M) zupipettiert. Für die rViscumin Verdünnungsreihe wurde PBS mit 0.01 % Tween 80 verwendet. Da rViscumin an Serumbestandteile bindet, wurde FCS (16.5 µl) erst nach 15 min zugegeben.

Alternativ wurden die Zellen mit Saporin ($6,6 \times 10^{-9}$ M – 4×10^{-13} M) und Saponinum album (4 µg/ml) inkubiert. Entsprechende Negativkontrollen wurden nur mit Medium oder Lösemittel (PBS mit 0,01 % Tween 80) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden erfolgte die Vitalitätsbestimmung (2.2.1.3).

2.2.1.9 Auswaschversuche von Saponinum album aus ECV-304-Zellen

Nach Einsaat der ECV-304-Zellen in 96-well Platten (2000/well) und Inkubation für 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Saponinum album (Endkonzentration: 4 µg/ml). Nach einstündiger Inkubation und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit je 100 µl MEM (15 % FCS) für 80 min überschichtet. Danach erfolgte alle 10 min ein Wechsel gegen frischen PBS (10 % FCS). Dies erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 60 min. Danach folgte eine weiterer Waschschrift mit PBS und ein Überschichten mit 100 µl MEM (15 %

FCS). Nach Zugabe von 10 µl Saporin (Endkonzentration: 6 nM) wurde für weitere 72 Stunden inkubiert und anschließend die Vitalität bestimmt (2.2.1.3). Entsprechende Positivkontrollen wurden mit Saporin/Saponinum album und Negativkontrollen mit Saporin oder nur mit Saponinum album inkubiert.

2.2.2 Versuche mit Endozytosehemmstoffen

2.2.2.1 Optimierung der Saporin/Saponinum album Inkubationszeit

Um die Inkubationszeit der Zellen mit den Hemmstoffen möglichst gering zu halten, wurde im Vorfeld der Versuche eine Mindestinkubationszeit mit Saporin/Saponinum album ermittelt bei der eine zur Kontrolle signifikante Zytotoxizität auftrat. Zu diesem Zweck wurden 2000 ECV-304-Zellen, wie unter 2.2.1.7 beschrieben in 96-well Platten eingesät und 24 Stunden kultiviert. Über einen Zeitraum von 6 Stunden wurden alle 20 min 10 µl einer Mischung von Saporin (6 nM) mit Saponinum album (4 µg/ml) pro well zugegeben. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 100 µl PBS pro well gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl frischem Medium wurden die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert und die Vitalität bestimmt (2.2.1.3).

2.2.2.2 Hemmung der Saporin/Saponinum album Zytotoxizität

2000 ECV-304-Zellen wurden in 100 µl MEM (15 % FCS) pro well in 96-well Platten ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit je 10 µl der folgenden Substanzen für 30 min inkubiert: Chlorpromazin (60 µM), Imipramin (60 µM), Bafilomycin A1 (20 nM), Cyclosporin A (2,5 µM), Filipin III (3 µM) Okadiinsäure (75 nM) und Cytochalasin B (20 µM). Nach Zugabe von 10 µl einer Mischung von Saponinum album (4 µg/ml) und Saporin (6 nM) wurden die Zellen für weitere 4 Stunden inkubiert und das Medium anschließend entfernt. Nach Waschen mit 100 µl PBS pro well wurden 100 µl Medium/well zugegeben. Nach 72 Stunden erfolgte Vitalitätsbestimmung (2.2.1.3). Um eine Eigentoxizität der Hemmstoffe auszuschließen, wurden die Zellen alternativ 4,5 Stunden mit den Hemmstoffen inkubiert. Entsprechende Kontrollen wurden mit den jeweiligen Lösungsmitteln (Mischungen von PBS mit Ethanol, Methanol oder DMSO) behandelt.

2.2.3 Phagozytose-Assay

2.2.3.1 Markierung von 1- μ m-Amino-Latex-Partikeln

160 μ l ($7,3 \times 10^9$ Partikel) einer Suspension von 1- μ m-Amino-Latex-Partikel wurden mit Aqua dest. zu 450 μ l verdünnt und mit 100 μ l einer Lösung von NaHCO_3 (1 M, pH 9) versetzt. Nach Zugabe von 200 μ g Alexa-Fluor 488 5-TFP (DMSO) wurde die Suspension gemischt und 3 Stunden bei Dunkelheit intensiv gerührt. Nach Zentrifugation (13000g, 2 min) wurde das Partikelpellet mit 1 ml Aqua dest. gewaschen und erneut zentrifugiert (13000g, 2 min). Insgesamt wurde dreimal zentrifugiert und gewaschen. Schließlich wurden die Alexa-Latex-Partikel in 1 ml Aqua dest. suspendiert. Ein Aliquot von 10 μ l wurde für die Fluoreszenzmikroskopie entnommen (2.2.3.6). Die Prüfung der Fluoreszenzhomogenität erfolgte mittels FACS (2.2.3.5).

2.2.3.2 Opsonierung der Alexa-Fluor 488 markierten 1 μ m-Amino-Latex-Partikel mit IgG

Alexa-Latex-Partikel (0,5 ml) (2.2.3.1) wurden mit 0,5 ml einer IgG-Lösung (5 mg/ml; PBS) (Baranji et al., 1994) versetzt, 1 Stunde bei Dunkelheit gerührt und anschließend zentrifugiert (13000g, 2 min). Das Partikelpellet wurde in 1 ml Aqua dest. suspendiert, erneut zentrifugiert (13000g, 2 min) (insgesamt dreimal) and schließlich in 1 ml Aqua dest. suspendiert. Vor dem Phagozytose-Assay wurden die Partikelsuspensionen (Alexa-Latex-Partikel und IgG-Alexa-Latex-Partikel) bei 50 kHz im Ultraschallbad resuspendiert.

2.2.3.3 Vorbereitung FITC markierter *Escherichia coli*-Partikel

FITC markierte *E.coli* (10 mg) wurden in 0,5 ml PBS suspendiert und vor Gebrauch entsprechend den Herstellerangaben weiter aufgearbeitet. Die Bakterienkonzentration wurde mittels Haemocytometer bei 488 nm zu 4×10^9 /ml bestimmt.

0,25 ml der *E.coli*-Suspension wurden mit Biopartikelopsonierungsreagenz (Molecular Probes) gemäß der Gebrauchsanweisung zu IgG-FITC-*E.coli* opsoniert. Nach Verdünnung eines Aliquots (1 μ l) auf 500 μ l PBS erfolgte die durchflusszytometrische Charakterisierung (2.2.3.5).

2.2.3.4 Phagozytose-Assay mit U-937-Zellen

24-well Platten wurden mit einer Fibronectin-Lösung (75 µg/ml) bedeckt und 30 min bei RT stehen gelassen. Jedes well wurde zweimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Nach der Einsaat von 10^6 U-937-Zellen pro well in 450 µl RPMI-1640 wurden 50 µl hIFN- γ (1000 U) zupipettiert und für 48 Stunden differenziert. Alternativ wurden 50 µl einer PMA-Lösung (20 nM) zugegeben und für 72 Stunden inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen vorsichtig mit vorgewärmtem PBS (500 µl) gewaschen. Anschließend wurden 450 µl RPMI-1640 mit Saponinum album (4 µg/ml) pro well zugegeben. Nach Zugabe von 50 µl einer entsprechend verdünnten Partikelsuspension wurden die Zellen unterschiedliche Zeiten (1, 2, 3 und 6 Stunden) inkubiert. Das Partikel und Saponinum album enthaltende Medium wurde entfernt und 200 µl Trypsin pro well zupipettiert. Nach Ablösen der Zellen wurden 200 µl PBS (10 % FCS) pro well zugegeben, das gesamte Volumen (400 µl) in ein FACS-Tube überführt und mit 200 µl PBS/well nachgespült. Der Spülpuffer (200 µl) wurde ebenfalls in das entsprechende FACS-Tube pipettiert, so dass sich ein Messvolumen von 600 µl ergab. Jeweils drei Ansätze mit je 600 µl wurden zu 1,8 ml gemischt und durchflusszytometrisch analysiert (2.2.3.5).

In Vorversuchen wurde der Phagozytose-Assay mit verschiedenen Zell/Partikel-Verhältnissen für Alexa-Latex-Partikel und FITC-*E.coli* optimiert : 1/100, 1/50, 1/25, 1/12, 1/6. Nach dreistündiger Inkubation konnte ein optimales Zell/Partikel-Verhältnis von 1/12 für FITC-*E.coli* und 1/100 für Alexa-Latex-Partikel ermittelt werden. Aus den nach der FACS-Analyse zurückbleibenden FACS-Röhrchen wurden 10 µl Aliquote entnommen und direkt auf einen Objektträger aufgetragen. Die phagozytierten Alexa-Latex-Partikel und FITC-*E.coli* wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert (2.2.3.6).

2.2.3.5 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurde ein FACScalibur (Becton Dickenson) verwendet. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 488 nm mit einem 15-mW-Argon-Laser. Die Separierung der Fluoreszenz von FITC und Alexa-Fluor 488 erfolgte mit einem 530/30 Bandpassfilter. Die Fluoreszenz von Acridinorange wurde mit einem 670 nm Langpassfilter separiert. Jeweils 10000 Zellen wurden mit Hilfe der CellQuestTM Software analysiert. Die Auswertung erfolgte mit WinMDI 2.8 Software.

2.2.3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Epi-Fluoreszenzmikroskop (BX 41, Olympus, Japan) durchgeführt. Die Hauptanregungswellenlänge betrug 488 nm und die Separierung der emittierten Fluoreszenz erfolgte mit einem 515 nm Breitband-Emissionsfilter bei 200-, 400- oder 600-facher (Öl-Immersion) Vergrößerung. Entsprechende Bilder konnten mit einer Digitalkamera (DXM1200; Nikon, Japan) mit Hilfe der ACT-1 (Nikon) Software aufgenommen werden.

2.2.4 Endozytose von Alexa^{his}Saporin

Jeweils 4000 ECV-304-Zellen wurden in 400 µl Medium in 8-well LAB-TEK chamber slides (NuncTM) eingesät und 24 Stunden kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 400 µl vorgewärmtem PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 200 µl Medium pro well zugegeben. Nach Zugabe von 20 µl Alexa^{his}Saporin (6.5×10^{-7} M) mit Saponinum album (4 µg/ml) wurden die Zellen für weitere 6 Stunden inkubiert. Alternativ erfolgte eine Vorinkubation mit 20 µl Nokodazol (5 µM) für 30 min und anschließender Inkubation mit Alexa^{his}Saporin (6.5×10^{-7} M)/Saponinum album (4 µg/ml) für 6 Stunden. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (400 µl) gewaschen und nach Entfernung der Inkubationskammer mit je 10 µl PBS befeuchtet und mit einem Deckglas bedeckt. Die Visualisierung intrazellulären Alexa^{his}Saporins erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.2.3.6), bei 600×, Öl-Immersion.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Bradford-Assay

Die Quantifizierung von Proteinlösungen mittels Bradford-Assay beruht auf der Bindung der Proteine an den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 und führt zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 490 nm auf 595 nm. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Bradford-Assay zur Quantifizierung von Methyl-^{his}Saporin und ^{3[H]}^{his}Saporin verwendet. Parallel dazu erfolgte eine Kalibrierung mit nicht markiertem ^{his}Saporin (0–1 mg/ml).

Zur Reagenzherstellung wurden 25 mg Coomassie Brilliantblau G-250 in 12,5 ml Ethanol (96 %) gelöst, mit 25 ml Phosphorsäure versetzt und mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend filtriert (Bradford, 1976).

Jeweils 20 µl Proteinlösung wurden mit 80 µl Coomassie Brilliantblau G-25 Lösung versetzt und 5 min stehen gelassen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm. Die Absorption entsprechender Leerkontrollen ohne Protein wurde ebenfalls bestimmt und rechnerisch bei der Auswertung berücksichtigt.

2.3.2 BCA-Protein-Assay

Der BCA (Bicinchoninsäure)-Assay basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Peptidbindungen mit anschließender Chelatisierung durch Bicinchoninsäure im Verhältnis 2:1. Die Extinktion des gebildeten, violetten Chelatkomplexes wird anschließend bei 562 nm gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der BCA-Protein-Assay-Reagent-Kit verwendet. Quantifiziert wurde Alexa-^{his}Saporin. Eine Kalibrierung wurde parallel mit nicht markiertem ^{his}Saporin (0–2 mg/ml) durchgeführt. Entsprechende Kontrollen ohne Protein wurden mitgeführt und rechnerisch bei der Auswertung berücksichtigt.

2.3.3 Proteinchemische Markierungsmethoden

2.3.3.1 Reduktive Methylierung von ^{his}Saporin

Zielsetzung der im Folgenden beschriebenen Versuche war die Herstellung eines Tritium markierten ^{his}Saporins. Die reduktive Methylierung beruht auf der Tatsache, dass sich primäre Aminogruppen mit Formaldehyd zu den entsprechenden Iminen umsetzen lassen.

Das Imin läßt sich in einem weiteren Schritt mit Natriumborhydrid reduzieren, so dass die entsprechenden Mono- und Dimethylderivate des Amins entstehen. Bei der Reaktion muss in alkalisch gepufferter Lösung gearbeitet werden, so dass die Aminkomponente möglichst deprotoniert vorliegt.

Als Methylierungsstellen kommen bei Proteinen die ε-Aminogruppen von Lysinresten in Frage. Geht man davon aus, dass die ε-Aminogruppe des Lysins einen pKs von ~ 10 aufweist, sollte nach

$$\text{pH} = \text{pKs} + \lg \left[\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right]$$

der pH der Pufferlösung theoretisch bei 12 liegen, um ein Base/Säure-Verhältnis von 100:1 zu erhalten. Da die meisten Proteine bei diesem pH denaturiert werden, sollte als pH-Obergrenze der isoelektrische Punkt (IP) des entsprechenden Proteins herangezogen werden. Im Falle des basischen ^{his}Saporins mit 25 Lysinresten beträgt der IP ≤ 9 (Korennykh et al., 2007). Als Puffer wurde ein schon in früheren Arbeiten verwendeter Borsäurepuffer (pH 8,9) verwendet (Means & Feeney, 1995).

2.3.3.2 Reduktive Methylierung von ^{his}Saporin (Methyl-^{his}Saporin)

Da die Produktion von ^{his}Saporin kosten- und zeitintensiv ist, wurde das Verfahren mit der Aminosäure Lysin optimiert. Anschließend erfolgte die Verwendung des ^{his}Saporins. 500 µl (2 mg/ml) ^{his}Saporin wurden 24 Stunden gegen Borsäurepuffer 0,2 M, pH 8,9 (Means & Feeney, 1995) in einer 500µl-QuixSep-Mikrodialysierkapsel dialysiert. Als Dialysemembran wurde eine Membran aus regenerierter Zellulose (ZelluTrans-ROTH-V-Series) mit einem MWCO von 1000 verwendet. Nach Beendigung der Dialyse wurde die Membran mit einer Kanüle durchstoßen und in ein 2 ml Reaktionsvial überführt. Die Proteinlösung wurde für 10 min auf Eis gerührt. Anschließend wurden über 30 min (alle 10 min) jeweils 46 µl

Formaldehyd (37 %) (0°C) und 46 µl NaBH₄-Lösung (1 mg/ml in 0,01 M NaOH) (0°C) zugegeben.

Die Lösung wurde entnommen und auf eine BioGel P-30 (fine) 4,5 × 0,7 cm Säule gegeben. Das Säulenmaterial wurde zuvor entsprechend den Empfehlungen des Herstellers in PBS hydratisiert und anschließend in die Säule überführt.

Als Elutionsmittel diente PBS. Insgesamt wurden 19 Fraktionen à 200 µl aufgefangen. Alle Fraktionen wurden mit pH Papier (ab Fraktion 13 alkalisch) auf ihren pH Wert überprüft und die Proteinkonzentration (Fraktion 5–9) mittels Bradford-Assay (2.3.1) bestimmt. Die biologische Aktivität des Methyl-^{his}Saporins wurde in Kombination mit Saponinum album (4 µg/ml) in absteigenden Konzentrationen von $6,0 \times 10^{-8}$ M – $7,5 \times 10^{-9}$ M in ECV-304-Zellen (2.2.2.1) mittels XTT-Assay (2.2.1.3) überprüft.

2.3.3.3 Markierung von ^{his}Saporin mit Tritium

^{his}Saporin (1,1 mg, 500 µl) wurde wie unter 2.3.3.2 beschrieben 24 Stunden dialysiert. Die Lösung wurde entnommen, auf Eis gestellt (0°C) und gerührt. 62,8 µg ³[H]NaBH₄ (25 mCi, 15 Ci/mmol) wurden in 144 µl NaBH₄ Lösung (1 mg/ml in 0,01 N NaOH, pH 8,9) gelöst und auf Eis gestellt.

Nach 10 min wurden 50,6 µl (37 %) Formaldehyd und 48 µl der NaBH₄-Lösung zugegeben. Insgesamt wurden drei Volumina Formaldehyd und NaBH₄ Lösung (3 × 8,3 mCi) über einen Zeitraum von 30 min zugegeben. Die Reinigung und Proteinquantifizierung erfolgte wie unter 2.3.3.2 beschrieben. Gleichzeitig wurde eine Radioaktivitätsbestimmung der einzelnen Fraktionen (je 1 µl) mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) durchgeführt.

2.3.3.4 Markierung von ^{his}Saporin mit Alexa-Fluor 488 5-TFP

Hinsichtlich des pH-Optimums, bei dem eine effiziente Kopplung vorhandener ε-Lysin Aminogruppen mit Alexa-Fluor 488 5-TFP (siehe Abb. 1) stattfinden kann, gelten dieselben wie unter 2.3.3.1 angestellten Überlegungen. Da aus ökonomischer Sicht eine Optimierung des Protein/Farbstoff-Verhältnis nicht zu vertreten war, wurde das molare Verhältnis von ^{his}Saporin zu Alexa-Fluor 5-TFP mit 1:5 so gewählt, dass die Gefahr einer Unter- oder Übermarkierung möglichst gering gehalten wurde.

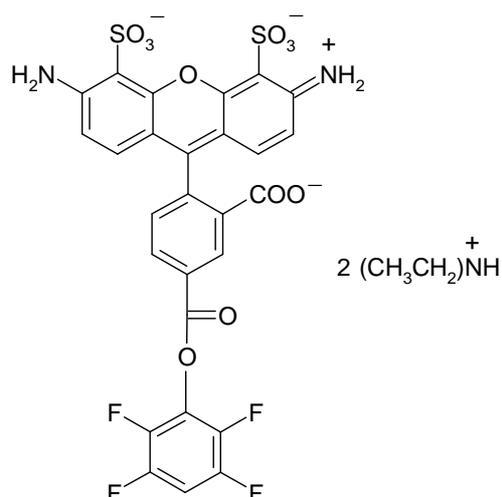


Abb. 1 Alexa-Fluor 5-TFP

Durchführung: 50 μl HCO₃⁻-Lösung (0,1 M; pH 9) und 30 μl einer Alexa-Fluor 488 5-TFP-Lösung (5 mg/ml in DMSO) wurden zu 500 μl ^{his}Saporin (2 mg/ml in PBS) gegeben und anschließend für 1 Stunde bei Dunkelheit gerührt. Die Reinigung erfolgte in einer transparenten Polypropylensäule (16×0,7 cm) mit einem in PBS hydratisierten Polyacrylamidgel (Bio-Gel P-30 Gel). PBS diente als Elutionsmittel. Die Säule wurde in regelmäßigen Abständen mit einer UV-Lampe (366 nm) bestrahlt. Dabei konnte Alexa-Fluor 488 markiertes ^{his}Saporin (Alexa-^{his}Saporin) als grün fluoreszierende Bande sichtbar gemacht und die dem Alexa-^{his}Saporin entsprechende Bande ohne Fraktionierung aufgefangen werden. Die Quantifizierung erfolgte mittels BCA-Assay (siehe 2.3.2). Eine Kalibrierung wurde mit nicht markiertem ^{his}Saporin (0–2 mg/ml) durchgeführt. Die Bestimmung der biologischen Aktivität des markierten Toxins erfolgte in Kombination mit Saponinum album (4 $\mu\text{g/ml}$) in ECV-304-Zellen (2.2.2.1) mittels XTT-Assay (2.2.1.3).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 SDS-Gelelektrophorese von ^{his}Saporin und Methyl^{his}Saporin

14 μl (4 μg) Methyl-^{his}Saporin und 10 μl (2 μg) ^{his}Saporin wurden im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Proben Puffer (ergänzt um 710 mM β -Mercaptoethanol) gemischt und 5 min bei 90°C erhitzt. Die Elektrophoreseapparatur wurde zusammengesteckt, die Gelkämme der SDS-Fertiggele entfernt und die Proben anschließend aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte bei 200 V für 35 min. Nach Entnahme der Gele erfolgte die Färbung mit einer verdünnten

(1:1 mit Methanol 98 %) Commassie Färbelösung (Bio Rad). Anschließend wurde das Gel in Commassie-Entfärbelösung (Bio Rad) für 24 Stunden eingelegt und entfärbt.

Die leicht gefärbten Banden von Methyl-^{his}Saporin und ^{his}Saporin wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und für die NanoLC-ESI-MS/MS (2.4.2) in 1,5 Eppendorf-Tubes überführt.

2.4.2 NanoLC-ESI-MS/MS

Nach tryptischer Verdauung der dem Methyl-^{his}Saporin und ^{his}Saporin entsprechenden Gelbanden (2.4.1) erfolgte eine MS-Protein-Identifikation mit anschließender Suche nach Methylierungsstellen am Lysin. Bei der enzymatischen Spaltung mit Trypsin oder anderen Enzymen entsteht ein für das Protein charakteristisches Peptidmuster. Nach einer Trennung über NanoLC werden die Peptidfragmente ionisiert (ESI) und nach ihrem Massen/Ladungsverhältnis analysiert. Über eine Ionenfalle werden die einzelnen Peptidfragmente selektiert und über Kollision mit Neutralteilchen (Argon) erneut fragmentiert (*collision induced dissociation*). Dadurch wird ein Tandemmassenspektrum (MS/MS Spektrum) der Aminosäuresequenz der einzelnen Peptidfragmente erzeugt. Da das MS/MS Spektrum charakteristisch für die Peptidbruchstücke ist, wurde über Abgleich mit einer Datenbank (SwissProt) auf das entsprechende Protein geschlossen. Methylierungen lassen sich über definierte Massendifferenzen identifizieren.

Alle bis auf die SDS-Gelelektrophorese in diesem Zusammenhang durchgeführten Untersuchungen, wurden vom FMP Berlin, Abteilung Massenspektrometrie (Dr. E. Krause) durchgeführt.

Proben:

2 Gelbanden: - Bande 1 (Hauptbande, Methyl-^{his}Saporin)

- Bande 2 (Kontrolle, ^{his}Saporin)

Methode: Tryptische Spaltung im Gel ohne Reduktion/Alkylierung, NanoLC-ESI-MS/MS (1 Verdau der Gelbande 1 wurde nach 1.5 Stunden abgestoppt, um mehr Fehlsplaltungen zu erhalten), NanoLC-ESI-MS/MS (data dependent MS to MS/MS switch, Q-TOF Ultima)

- Datenbank:**
- SwissProt 210906 (234112 Sequenzen; 85963701 Reste)
 - Spezialdatenbank, erstellt aus der mitgelieferten Sequenz^{his}Sap-3 sowie den Proteinsequenzen RIP2_SAPOF, RIP3_SAPOF sowie RIP5_SAPOF

Datenbankabgleich mit MASCOT auf einem lokalen Server:

Type of search : MS/MS Ion Search
Enzyme : Trypsin/P
Variable modifications : Acetyl (K),di-Methylation (K),di-Methylation (R),Me-ester (DE),Methyl (K), Methyl (R),Oxidation (M),Propionamide (C),tri-Methylation
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 100 ppm
Fragment Mass Tolerance : ± 0.05 Da
Max Missed Cleavages : 3
Instrument type : ESI-QUAD-TOF

2.5 Organisch-chemische Methoden

2.5.1 Acetylierung von Saponinum album

Um den zytotoxizitätssteigernden Effekt von Saponinum album auf Ribosomen-inaktivierende Proteine Typ I in der Zellkultur näher zu charakterisieren, sollte ein Tritium markiertes Saponinum album hergestellt werden. Von einer Markierung mit Fluorochromen wurde wegen der hohen Wahrscheinlichkeit eines Wirksamkeitsverlustes der Saponine abgesehen. Bei Saponinum album handelt es sich um Kohlenhydratreiche mono- und bisdesmosidische Triterpensaponine.

Als Markierungsziel bieten sich deshalb die Hydroxylgruppen der Zuckerketten an. Es kamen zwei Methoden zum Einsatz:

1. Methode A (Organikum, 13. Auflage, 1974):

100 mg Saponinum album wurde mit 2 ml Acetanhydrid und 2 ml Pyridin versetzt und 1, 3, 6, 12 oder 24 Stunden gerührt. Anschließend wurde Eis zugegeben, die Lösung filtriert und der Rückstand getrocknet. Die Bestimmung der biologischen Aktivität der acetylierten

Saponine (alle 10 µg/ml in Methanol 98 %) erfolgte mittels XTT-Assay (2.2.1.3) in Kombination mit Saporin (6 nM) in ECV-304-Zellen (2.2.1.7).

2. Methode B

Da die nach Methode A hergestellten Saponinderivate in Kombination mit Saporin alle biologisch unwirksam waren, wurde die Acetylierungszeit noch weiter verkürzt (von 60 min bis 3,5 min). Die zunehmende Wasserlöslichkeit der dabei entstehenden Saponinderivate machte eine Abtrennung in Eiswasser unmöglich. In Umkehrung zu Methode A sollten die acetylierten Saponine nun in ein unpolares Lösungsmittel gefällt werden. Es wurden verschiedene Lösungsmittel getestet. Als optimal erwies sich hierbei Chloroform. Da die Filtration des in die organische Phase gefällten Niederschlags nur unter großem Massenverlust durchgeführt werden konnte, wurde die trübe Chloroformphase mit Methanol wieder geklärt.

Das Vorgehen wird im Folgenden detailliert beschrieben:

100 mg Saponinum album wurden mit 4 ml Acetylierungsgemisch (2 ml Acetanhydrid und 2 ml Pyridin) versetzt und verschiedene Zeiten (60, 30, 15, 7 und 3,5 min) intensiv gerührt. Nach Zugabe von 5 ml Aqua dest. und Abkühlen auf RT wurde dreimal mit 5 ml Chloroform extrahiert. Die Lösung wurde tropfenweise mit Methanol geklärt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Chloroform und Methanol bei 100 mbar, 40°C abdestilliert. Nach azeotroper Destillation (50 mbar, 40°C) des Pyridins mit Toluol (100 ml) blieben zwischen 8 und 15 mg Acetyl-Saponin zurück. Anschließend erfolgte die biologische Testung der Acetyl-Saponinderivate (5–10 µg/ml) in Kombination mit Saporin (6 nM) in ECV-304-Zellen (2.2.1.7) mittels XTT-Assay (2.2.1.3). Eine Eigentoxizität der Acetyl-Saponine wurde ebenfalls bestimmt.

Die Acetyl-Saponinderivate wurden in Methanol/Wasser (1:1) gelöst und mit Saponinum album als Kontrolle auf Kieselgel-60 HPTLC-Platten aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte in einer HPTLC-Kammer mit der Oberphase einer Mischung aus Essigsäure (99 %)/Aqua dest./Butanol (10:40:50). Die Platte wurde getrocknet (100°C), mit Detektionsreagenz (10 ml Anisaldehyd, 90 ml Ethanol (96 %), 10 ml konz. Schwefelsäure) besprüht (Pharm. Eur. 5. Ausgabe, 2005) und abermals getrocknet (100°C).

2.5.2 Acetylierung von Saponinum album mit ^3H Acetanhydrid (^3H Saponinum album)

Die Markierung mit ^3H Acetanhydrid wurde wie unter 2.5.1, Methode B beschrieben durchgeführt mit dem Unterschied, dass das Acetylierungsgemisch aus 0,25 ml ^3H Acetanhydrid (25 mCi), 1,75 ml Acetanhydrid und 2 ml Pyridin bestand. Nach Aliquotierung (je 1 mg) und Lösen in 1 ml Methanol/Aqua dest. 1:1. wurden 6,7; 12; 25 und 50 μg entnommen und die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) nach Mischen mit 2 ml Optiphase Supermix Szintillationscocktail gemessen. Die spezifische, trägerfreie Aktivität des ^3H Saponinum album wurde zu 36 Mcpm/mg bestimmt. Alle Tritium-Messungen wurden mittels Flüssigkeitsszintillation durchgeführt (2.6.1).

2.6 Radioanalytische Untersuchungen in der Zellkultur

2.6.1 Flüssigkeitsszintillation

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Radioaktivitätsmessungen wurden mit einem Wallac-MicroBeta-Trilux beta counter mit Optiphase Supermix Szintillationscocktail durchgeführt. Vor der eigentlichen Messung wurden die einzelnen Proben grundsätzlich in 2-ml-Eppendorf-Tubes überführt, mit Szintillationscocktail auf 2 ml ergänzt und bis zur Klärung homogenisiert.

2.6.2 Aufnahme von ^3H Saponinum album in ECV-304-Zellen

10 000 ECV-304-Zellen wurden in 400 μl MEM (10 % FCS) pro well (24-well Platten) eingesät und bis zur nahezu vollständigen (48 Stunden) Konfluenz kultiviert. Nach anschließendem Waschen (PBS, 300 μl) wurden die Zellen in 300 μl MEM (10 % FCS) mit unterschiedlichen Konzentrationen an ^3H Saponinum album (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 oder 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurde mit PBS gewaschen (300 $\mu\text{l}/\text{well}$) und für 15 min trypsinisiert (200 μl). Die Zellsuspension wurde in ein 2ml-Eppendorf-Tube überführt, mit 200 μl Soluene-350 versetzt, homogenisiert und die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) bestimmt.

In weiteren Experimenten wurden die Zellen mit ^3H Saponinum album (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2,5–360 min inkubiert und wie oben beschrieben für die Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) aufgearbeitet.

2.6.3 Liberation von ³[H]Saponinum album aus ECV-304-Zellen

Nach Einsaat von 10^5 ECV-304-Zellen in 6-well Platten wurden die Zellen in je 1 ml Medium/well bis zur nahezu vollständigen Konfluenz (48 Stunden) kultiviert. Nach Zugabe von ³[H]Saponinum album (Endkonzentration: 10 µg/ml) und einstündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS pro well gewaschen und mit 1 ml PBS (10 % FCS) für 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 oder 160 min überschichtet. Anschließend erfolgte die Aktivitätsbestimmung der Überstände mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1).

Die Zellmonolayer wurden gewaschen (2 ml PBS pro well), mit einem Zellschaber abgekratzt, mit 200 µl Soluene-350 solubilisiert und die zellassozierte Aktivität mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) bestimmt.

In weiteren Experimenten wurde die Liberation von ³[H]Saponinum album (60minütige Inkubation mit 1, 3, 5, 8, 10, 15 oder 20 µg/ml) aus ECV-304-Zellen untersucht. Nach Waschen mit PBS (2 ml) wurde jedes well für jeweils 80 min mit 1 ml PBS (10 % FCS) überschichtet und die Überstände und Zellen für die Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) vorbereitet.

2.6.4 Auswaschung von ³[H]Saponinum album aus ECV-304-Zellen

ECV-304-Zellen wurden, wie unter 2.6.3 beschrieben, in 6-well Platten kultiviert, gewaschen (2 ml PBS pro well) und mit verschiedenen Konzentrationen an ³[H]Saponinum album (4–20 µg/ml) für 1 Stunde inkubiert. Nach Überschichten mit je 1 ml PBS (10 % FCS) für 80 min erfolgte alle 10 min ein Wechsel gegen frischen PBS (10 % FCS). Dies erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 60 min (6×1 ml Überstände). Die Radioaktivität sämtlicher Überstände wurde mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) bestimmt. Die Zellmonolayer wurden gewaschen (2 ml PBS), abgekratzt und mit 200 µl Soluene-350 solubilisiert. Die Aktivitätsmessung erfolgte wie unter 2.6.1 beschrieben.

2.6.5 Kompetitive Verdrängung von ³[H]Saponinum album mit Saponinum album

ECV-304-Zellen wurden in 6-well Platten in MEM wie unter 2.6.3 beschrieben kultiviert, gewaschen (PBS) und 1 Stunde mit 10 µg/ml ³[H]Saponinum album inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde jedes well mit 1 ml Saponinum album nacheinander in absteigenden Konzentrationen (40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, und 0 µg/ml in PBS, 10 % FCS) für jeweils 10

min überschichtet (insgesamt 100 min). In einem weiteren Versuch wurden die Zellen nacheinander mit aufsteigenden Konzentrationen Saponinum album (0–40 µg/ml in PBS, 10 % FCS) überschichtet. Die Messung der Strahlungsintensität der einzelnen 1-ml-Fractionen erfolgte mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1). Nach Beendigung der Auswaschphase wurden die Zellmonolayer erneut gewaschen (PBS), mit einem Zellschaber abgekratzt und nach Solubilisierung mit 200 µl Soluene-350 die Radioaktivität gemessen (2.6.1).

2.6.6 Versuche mit N-Ethylmaleimid und ^3H Saponinum album

ECV-304-Zellen wurden in 6-well Kulturplatten wie unter 2.6.3 beschrieben kultiviert. Um den Einfluss der Transbilayer-Lipid-Asymmetrie auf die zelluläre Aufnahme von ^3H Saponinum album zu untersuchen, wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS mit einer Lösung von N-Ethylmaleimid (0,85; 1,7 oder 3,7 µM pro well) für 30 min inkubiert. Eine mögliche Toxizität des N-Ethylmaleimids wurde im Vorfeld mittels LDH-Assay ausgeschlossen.

Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS pro well gewaschen, mit 10 µg/ml ^3H Saponinum album für 1 Stunde inkubiert, erneut gewaschen und schließlich mit 1 ml PBS (10 % FCS) für 80 min überschichtet oder wie unter 2.6.4 beschrieben 60 min mit PBS überschichtet. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS wurden die Zellen wie unter 2.6.4 beschrieben für die Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) vorbereitet.×

2.6.7 Versuche mit ^3H hisSaporin in der Zellkultur

2.6.7.1 Optimierung der einzusetzenden Konzentration an ^3H hisSaporin

Nach Einsaat von ECV-304-Zellen (10 000/well) in 24-well Kulturplatten und Kultivierung der Zellen bis zur nahezu vollständigen (48 Stunden) Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Saponinum album (Endkonzentration: 4 µg/ml) 15 min inkubiert. Nach Zugabe von ^3H hisSaporin (Endkonzentration: 12 nM, 24 nM oder 48 nM,) wurde für eine und zwei Stunden bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 320 µL MEM inkubiert. Als Assay-Medium diente mit 20-mM-Hepes-gepuffertes-MEM. Danach wurde folgender Waschzyklus durchgeführt: 1 × PBS (4°C); 1 × 0,2 M Glycinpuffer, pH 2 mit 0,15 M NaCl (4°C); 2 × PBS (4°C). Nach Solubilisation mit 0,1 M NaOH-Lösung (150 µl/well) erfolgte die Radioaktivitätsbestimmung mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1).

2.6.7.2 Endozytose-Assay mit $^3\text{[H]his}$ Saporin

ECV-304-Zellen wurden wie unter 2.6.7.1 beschrieben in 24-well Platten kultiviert, gewaschen (PBS) und mit oder ohne (Kontrolle) Saponinum album (Endkonzentration: 4 $\mu\text{g/ml}$) 15 min inkubiert. Nach Zugabe des $^3\text{[H]his}$ Saporins (Endkonzentration: 48 nM) wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 320 μl 20mM Hepes gepuffertem MEM 2, 4, 7, 15, 30, 60, 120 oder 240 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend wie unter 2.6.7.1 beschrieben gewaschen und für die Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) vorbereitet.

2.6.7.3 Exozytose von intaktem und degradiertem $^3\text{[H]his}$ Saporin

ECV-304-Zellen ($10^5/\text{well}$) wurden in 6-well Platten eingesät, bis zur nahezu vollständigen Konfluenz kultiviert (48 Stunden), mit PBS gewaschen und weiter mit oder ohne Saponinum album (Endkonzentration: 4 $\mu\text{g/ml}$) 15 min inkubiert. Nach Zugabe von $^3\text{[H]his}$ Saporin (Endkonzentration: 48 nM) wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 900 μl Hepes gepuffertem MEM 4 Stunden inkubiert und nach Entfernen des Assay-Mediums zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Überschichten mit 1 ml Hepes gepuffertem MEM erfolgte nach 15, 30, 60, 120, 180 oder 240 min ein Mediumwechsel gegen frisches Zellkulturmedium. Die entfernten 1-ml-Überstände wurden auf 10 % TCA eingestellt (Batelli et al., 2004), in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 20 min gelagert und schließlich 2 min bei 10000g zentrifugiert. Nach Solubilisation des Proteinpellets mit 200 μl Soluene-350 erfolgte die Tritiumbestimmung (2.6.1). Nach Mischen der nach der Zentrifugation anfallenden Überstände mit Optiphase Supermix (1 ml) erfolgte die Aktivitätsbestimmung mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1).

2.6.7.4 Zelluläre Halbwertszeit ($t_{1/2}$ $^3\text{[H]his}$ Saporin)

Zur Bestimmung der zellulären Halbwertszeit von $^3\text{[H]his}$ Saporin wurden ECV-304-Zellen in 24-well Platten wie unter 2.6.7.1 beschrieben kultiviert, 15 min mit Saponinum album und schließlich 4 Stunden mit 48 nM $^3\text{[H]his}$ Saporin inkubiert. Das Assay-Medium wurde entfernt und die Zellen für 0, 60, 120 oder 240 min mit 500 μl frischem Assay-Medium überschichtet. Die Überstände wurden entfernt und die verbliebenen Zellmonolayer wie folgt gewaschen: 1 \times PBS (4 °C); 1 \times 0,2 M Glycinpuffer, pH 2 mit 0,15 M NaCl (4 °C); 2 \times PBS (4 °C). Nach

Solubilisation mit 0,1 M NaOH-Lösung (150 µl/well) erfolgte die Radioaktivitätsbestimmung mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1).

2.6.7.5 Bestimmung von intaktem und abgebautem intrazellulärem $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin

Nach Einsaat von ECV-304-Zellen in 6-well Platten (2.6.7.3) wurden die Zellen 15 min mit Saponinum album vorinkubiert und mit 48 nM $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin für 30, 60, 120 oder 240 min inkubiert. Das Assay-Medium wurde entfernt und die Zellen gewaschen (1 × PBS (4°C); 1 × 0,2 M Glycinpuffer, pH 2 mit 0,15 M NaCl (4°C); 2 × PBS (4°C)). Nach Lyse der Zellen mit 0,5 ml/well Triton-X (0,05 %) wurde der Überstand (0,5 ml) entfernt, auf 10 % TCA eingestellt und anschließend 20 min in einer Kühlzentrifuge bei 4°C gekühlt und 2 min bei 10000g zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt, mit Optiphase Supermix (1,5 ml) gemischt und die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) bestimmt. Die Solubilisation des Proteinpellets erfolgte mit Soluene-350 (2.6.7.3) und die Radioaktivitätsbestimmung nach Mischen mit Optiphase Supermix (2.6.1).

2.6.7.6 Hemmung der Internalisierung von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin bei 4°C

ECV-304-Zellen wurden in 24-well Platten eingesät (2.6.7.1), gewaschen (PBS) und mit oder ohne Saponinum album 15 min bei 4°C inkubiert. In einem Parallelansatz erfolgte eine Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin (Endkonzentration: 48 nM) wurden die Zellen entweder bei 4°C oder 37°C für 7,5; 15; 30 oder 60 min inkubiert. Das Waschen und die Aufarbeitung für die Flüssigkeitsszintillation erfolgten wie unter 2.6.7.1 beschrieben.

2.6.7.7 Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die Internalisierung von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin

Alle im nachfolgenden beschriebenen Endozytose-Assays wurden nach Einsaat von ECV-304-Zellen in 24-well Platten (2.6.7.1) durchgeführt. Nach Inkubation mit den entsprechenden Substanzen in der Reihenfolge: Hemmstoff, Saponinum album, $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin wurden die Zellen prinzipiell wie folgt gewaschen: 1 × PBS (4 °C); 1 × 0,2 M Glycinpuffer, pH 2 mit 0,15 M NaCl (4 °C); 2 × PBS (4 °C), solubilisiert (150 µl 0,1M NaOH) und im beta counter vermessen (2.6.1)

2.6.7.7.1 Einfluss von Anti- α 2M-R/LRP auf die Internalisierung von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin

ECV-304-Zellen wurden 60 min mit 1, 2 oder 4 μg Anti- α 2M-R/LRP in 300 μl Medium (1,5 % FCS) pro well inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen 15 min mit Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 300 μl Hepes (20 mM) gepuffertem MEM pro well und anschließend 30 min mit $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin (48 nM) inkubiert.

Die Aufarbeitung für die Flüssigkeitsszintillation erfolgte wie unter 2.6.7.7 beschrieben.

2.6.7.7.2 Einfluss von Chlorpromazin, Bafilomycin A1, Amilorid, Filipin III, Phenylarsenoxid und Heparin auf die Internalisierung von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin

ECV-304-Zellen wurden 30 min mit Chlorpromazin (30, 60 μM), Bafilomycin A1 (2, 20, 200 nM), Phenylarsenoxid (2,5; 5; 10 μM), Filipin III (0,37; 0,75; 1,5; 3 μM), oder Amilorid (0,75; 1,5; 3; 6 mM) inkubiert. Nach 15 min der 30minütigen Vorinkubation mit den Hemmstoffen erfolgte die Zugabe von Saponinum album (Endkonzentration: 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Nach Inkubation mit $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin (Endkonzentration: 48 nM) für 30 min wurden die Zellen für die Flüssigkeitsszintillation aufgearbeitet (2.6.7.7).

Um den Effekt von Heparin auf die Endozytose von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin zu untersuchen, wurden zuvor hergestellte Lösungen von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin (48 nM) mit Heparin in verschiedenen Konzentrationen (15, 29, 58, 234 468 und 937 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gemischt und in Eppendorf-Tubes 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der „heparinisierten“ $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin-Lösungen zu den Zellen mit nachfolgender Inkubation für 30 min. Kontrolllösungen wurden entsprechend ohne Heparin nur mit PBS inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte gemäß 2.6.7.7

2.6.8 Charakterisierung der Saponin bedingten endosomalen Destabilisierung

2.6.8.1 Ultrazentrifugation des post-nuklearen Überstandes

10×10^6 ECV-304-Zellen wurden in 75 cm^2 Gewebekulturflaschen in MEM bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert, gewaschen (PBS), 15 min mit oder ohne Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und schließlich 4 Stunden mit $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin (96 nM) inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen (PBS, 4°C) mit 10 ml MEM (mit oder Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) überschichtet und für weitere 30 min inkubiert. Das Medium wurde nach 30 min (mit

oder ohne Saponinum album) gewechselt. Nach weiteren 30 min wurde das Medium entfernt und die Zellen von jeweils 4 Gewebekulturflaschen in 5 ml PBS (4°C, mit *Complete midi*TM) abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in einen Elvin-Potter-Homogenizer (4°C) überführt und durch 20 Zyklen homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 4°C, 500g, 15 min zentrifugiert, die nukleare Fraktion entfernt und der post-nukleare Überstand bei 100 000g (4°C) 1 Stunde zentrifugiert (Optima L-90 K, Rotor Ti 70.1, Beckmann-Coulter). Nach Huber et al. (2003) und Pasquali et al. (1997) lässt sich auf diese Weise die Abtrennung des Zytoplasmas erreichen. Die Aktivität von jeweils 200 µl der zytoplasmatischen Fraktion wurde mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) bestimmt. Das Endosomen und Lysosomen enthaltende 100 000g Pellet wurde mit 200 µl Triton X (0,05 %) solubilisiert und ebenfalls gemäß 2.6.1 analysiert.

2.6.8.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Endosomenintegrität

ECV-304-Zellen (10^4) wurden in 24-well Platten eingesät, 24 Stunden kultiviert und 1 Stunde mit Saponinum album (5, 10 oder 20 µg/ml) inkubiert. Nach Zugabe von Acridinorange (4 µg/ml) wurden die Zellen weitere 30 min inkubiert, das Medium entfernt und anschließend 15 min trypsinisiert (200 µl). Schließlich wurden 300 µl MEM (10 % FCS) pro well zugegeben und die Zellen (500 µl) durch vorsichtiges auf- und abpipettieren weiter vereinzelt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte wie in 2.2.3.5 beschrieben. Nach Definition einer Region im FSC/SSC *dot plot* wurde die Hauptpopulationen nach FL-3 *gated* und die Medianfluoreszenz ermittelt.

2.7 Charakterisierung des Saponinum album

2.7.1 Hydrolyse und HPLC

Saponinum album stellt ein außerordentlich komplexes Gemisch aus strukturell eng verwandten Triterpensaponinen mit identischem Aglycon vom Oleanantyp dar. Die strukturelle Vielfalt der einzelnen Saponine lässt sich vor allem auf die unterschiedlichen Verknüpfungsmuster der Zuckerbausteine des Zuckeresters am C₂₈ des Aglycons zurückführen, was die chromatographische Reinigung und Isolierung einer Reinkomponente extrem erschwert und darüber hinaus zeit- und kostenintensiv erscheint. Da die Hydrolyseempfindlichkeit eines Esters von sterischen Faktoren des entsprechenden

Alkoholrestes abhängt, sollten nicht alle Saponine in gleichem Maße hydrolysierbar sein. Insbesondere die Komplexität der Zuckerverzweigungen am C₂₈ des Zuckeresteres muss deshalb einen entscheidenden Einfluss auf die Hydrolyseempfindlichkeit des jeweiligen Saponins ausüben.

Durch eine Hydrolyse entsprechender hydrolyseempfindlicher Saponine sollte die Komplexität des Rohsaponingemisches reduziert und eine chromatographische Aufreinigung und Isolierung eines Reinsaponins ermöglicht werden. Zu diesem Zweck wurde 1 g Saponinum album eingewogen, in 100 ml NaOH-Lösung (30 mM) aufgelöst und 24 Stunden bei 40°C gerührt. Alternativ wurde für 1 oder 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung wurde bis zur sauren Reaktion mit Essigsäure (99 %) angesäuert und dreimal mit 40 ml 1-Butanol ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ und Destillation im Vakuum (30 mbar, 40°C) konnte eine Rohsaponinfraktion gewonnen werden (621 mg). Nach dem Lösen in Methanol/Aqua dest. (1:5) und der Filtration wurde das Saponingemisch auf eine RP 18 Säule (UltraSep ES Pharm RP 18E, 250 × 8 mm, 7 µm) aufgegeben (je 0,5 ml mit 50 mg/ml). Die Elution erfolgte mit einem Methanol (20 %–70 %)/Aqua dest. (0,01 % TFA) Gradient, über 60 min bei einer Durchflussrate von 1,5 ml/min (Detektion bei 210 nm).

Die entsprechenden *Peaks* wurden aufgefangen und Aliquote wurden für die ESI-TOF-MS-Analyse entnommen (2.8). Das Methanol wurde evaporiert und das restliche Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität des Reinsaponins in Kombination mit Saporin erfolgte in ECV-304-Zellen (2.2.1.7) mittels XTT-Assay (2.2.1.3)

2.8 ESI-TOF-MS

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ESI-TOF-MS-Messungen wurden an einem Agilent 6210 ESI-TOF (Santa Clara, USA) von der Serviceabteilung Massenspektrometrie, FU-Berlin Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie durchgeführt.

2.9 ¹H/¹³C-NMR

Die Strukturanalytische Charakterisierung des isolierten Saponins wurde freundlicherweise von Dr. Peter Schmieder, FMP Berlin, und PD Dr. Kristina Jenett-Siems (FU-Berlin, Institut für Pharmazie) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen in U-937-Zellen

3.1.1 Vorbemerkung

Im zeitlichen Verlauf der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizität wurde anfänglich vermutet, dass die in Monozyten beobachtete, Saponinum album abhängige Zytotoxizitätssteigerung Ribosomen-inaktivierender Proteine vom Typ I auf eine Induktion der Phagozytose zurückzuführen sein könnte (Weng, 2005).

Für die Bearbeitung dieser Fragestellung, sollte ein Phagozytosemodell etabliert und die immunmodulatorischen Eigenschaften der Gypsophilasaponine untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden monozytäre U-937-Zellen mit IFN- γ (1000 U) oder PMA (20 nM) zu Makrophagen differenziert. Um eine Toxizität des Saponinum album mit oder ohne Saporin zu untersuchen, wurden die Zellen nach unterschiedlichen Differenzierungszeiten mit Saponinum album +/- Saporin oder nur Saporin für weitere 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Phagozytose modulierenden Eigenschaften des Saponinum album im Zellmodell.

3.1.2 Festlegung der Differenzierungszeit mit IFN- γ

U-937-Zellen lassen sich durch IFN- γ (1000 U) zu Makrophagen differenzieren (Yamamoto et al., 2002). Um eine Zytotoxizität von Saponinum album beim Phagozytose-Assay auszuschließen und das Vorhandensein der synergistischen Zytotoxizität mit Saporin zu gewährleisten, wurden U-937-Zellen mit IFN- γ (1000 U) differenziert und anschließend mit Saponinum album (2–5 μ g/ml) +/- Saporin (6 nM) oder nur Saporin (6 nM) inkubiert. Wie Abb. 1b zu entnehmen ist, zeichneten sich die Mischungen von Saponinum album (3–5 μ g/ml) mit Saporin (6 nM) durch eine signifikante Zytotoxizität in U-937-Zellen aus, die 0, 24 oder 48 Stunden mit 1000 U IFN- γ differenziert wurden.

Eine Eigentoxizität von Saporin (6 nM) konnte für alle Zellen unabhängig vom Differenzierungsstatus ausgeschlossen werden (Abb. 1a). Für alle weiteren Experimente, insbesondere für die Untersuchung der Phagozytose stimulierenden Eigenschaften des Saponinum album wurden U-937-Zellen 48 Stunden mit 1000 U IFN- γ differenziert. Unter diesen Bedingungen konnte eine durch Saponinum album verursachte Zytotoxizität

ausgeschlossen (Abb. 1c, schwarze Balken) und der zytotoxische Synergismus zwischen Saponinum album und Saporin beobachtet werden (siehe Abb. 1b). Da Saponinum album gegenüber nicht differenzierten U-937-Zellen eine starke Zytotoxizität (Abb. 1c) aufwies, konnten dort keine eindeutigen Schlussfolgerungen über das Vorhandensein des zytotoxischen Synergismus gezogen werden.

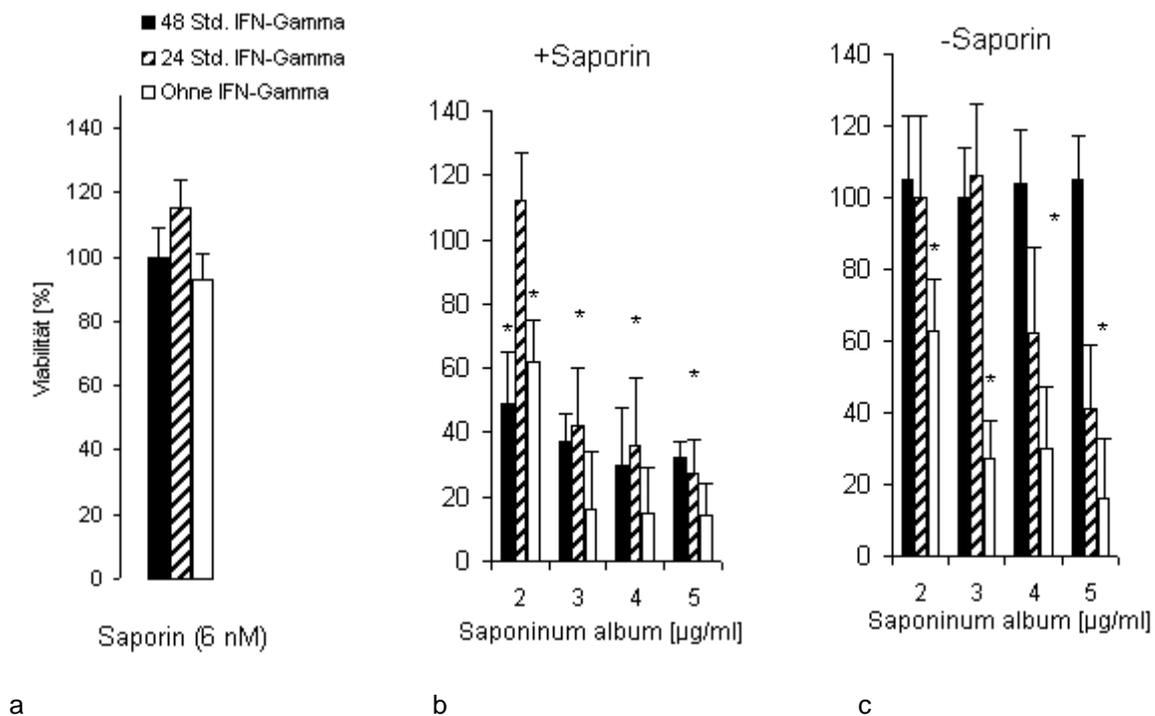


Abb. 1 Zytotoxizität von Saponinum album (2–5 µg/ml) +/-Saporin (6 nM) und Saporin.

U-937-Zellen wurden mit IFN- γ 0, 24 oder 48 Stunden differenziert und anschließend mit Saponinum album (2–5 µg/ml)/Saporin (6 nM) (b), nur Saporin (a) oder nur Saponinum album (c) inkubiert. Saponinum album zeichnete sich durch eine von der Differenzierungszeit abhängige Zytotoxizität mit einem Toxizitätsminimum bei 48 Stunden (c) aus. Mischungen von Saponinum album (2 µg/ml) mit Saporin (6 nM) waren gegenüber U-937-Zellen, die 24 Stunden mit 1000 U IFN- γ differenziert wurden, nicht zytotoxisch (b). Hingegen waren die Mischungen von Saponinum album (3–5 µg/ml) mit Saporin (6 nM) gegenüber allen Zellen signifikant zytotoxisch (b). Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (nur IFN- γ differenzierte Zellen) bezogen, n=2.

*signifikant, p=0,05, U-Test

3.1.2.1 LDH-Freisetzung aus nicht differenzierten U-937-Zellen

Die Toxizität von Saponinen wird häufig auf die membranolytischen Eigenschaften der Saponine zurückgeführt (Francis et al., 2002).

Ob die gegenüber U-937-Zellen durch Saponinum album verursachte Toxizität (3.1.2) auf eine Lyse der Zellmembran zurückzuführen war, sollte mittels LDH-Freisetzungs-Assay bestimmt werden. LDH ist ein intrazellulär lokalisiertes Enzym, das bei einer Membranschädigung aus der Zelle austritt. Aus diesem Grund eignet sich die Detektion der LDH-Freisetzung zur Feststellung einer Saponin bedingten Membranperforation.

U-937-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Saponinum album inkubiert und anschließend die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand mittels LDH-Freisetzungs-Assay bestimmt. Die in Abb. 1b (3.1.2) dargestellte Eigentoxizität von Saponinum album gegenüber U-937-Zellen war nicht auf die Saponinen im allgemeinen zugewiesene Lyse der Zellmembran zurückzuführen (Abb. 2). Dies zeigt außerdem, dass der durch Saponinum album vermittelte zytotoxische Synergismus nicht auf den Saporintransfer durch Saponinum album induzierte Poren zurückzuführen ist.

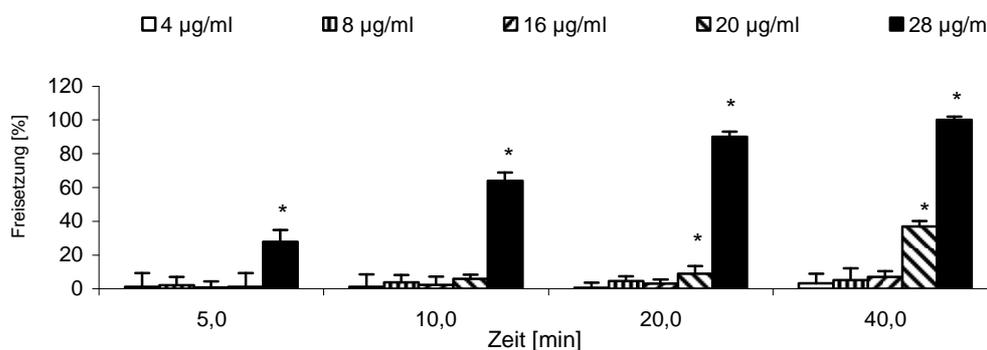


Abb. 2 Saponinum album (SA) induzierte LDH-Freisetzung aus U-937-Zellen.

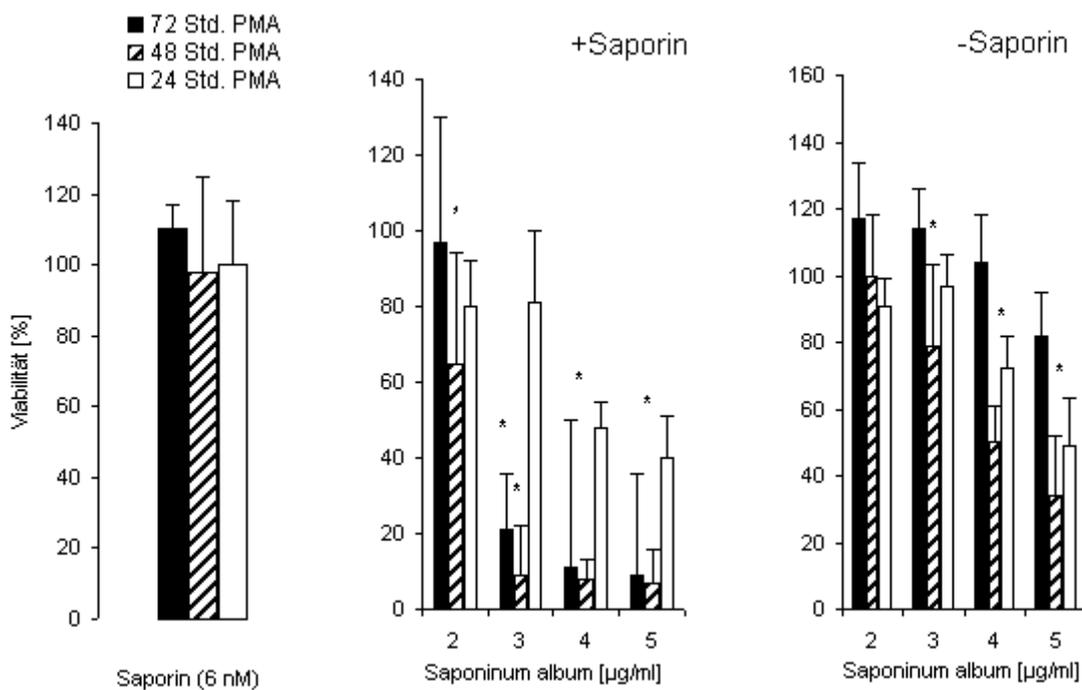
SA-Konzentrationen $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ verursachten keine signifikante Lyse der Zellmembran. Kontrollzellen wurden nicht mit Saponinum album behandelt. Die Werte stellen Mittelwerte aus je 5 Einzelmessungen dar, $n=2$.

*signifikant zur Kontrolle, $p=0,1$ U-Test

3.1.3 Festlegung der Differenzierungszeit mit PMA

Nach Differenzierung von U-937-Zellen mit PMA (20 nM) (Jang et al., 2005) zu Makrophagen und Inkubation mit Saponinum album (2–5 $\mu\text{g/ml}$) +/- Saporin (6 nM) zeigten PMA behandelte Zellen eine vom Differenzierungsstatus abhängige Sensitivität gegenüber

Saponinum album/Saporin. Die geringste Empfindlichkeit gegenüber Saponinum album (2–5 $\mu\text{g/ml}$)/Saporin (6 nM) wiesen solche U-937-Zellen auf, die lediglich 24 Stunden mit PMA inkubiert wurden (Abb. 3b). Dabei zeigte Saponinum album im Konzentrationsbereich 4–5 $\mu\text{g/ml}$ eine signifikante Zytotoxizität (Abb. 3c). Zellen, die 72 Stunden mit PMA differenziert wurden, erwiesen sich am unempfindlichsten gegenüber reinem Saponinum album (Abb. 3c). Dahingegen zeigten die entsprechenden Mischungen von Saponinum album (3–5 $\mu\text{g/ml}$) mit Saporin (6 nM) eine starke zytotoxische Aktivität (Abb. 3b). Dies war auch bei Zellen zu beobachten, die 48 Stunden mit PMA behandelt wurden. Allerdings war Saponinum album im Konzentrationsbereich 3–5 $\mu\text{g/ml}$ signifikant zytotoxisch. Für alle weiteren Versuche, insbesondere für die Untersuchung der potentiell die Phagozytose stimulierenden Eigenschaften von Saponinum album, wurden die Zellen 72 Stunden mit PMA differenziert.



a

b

c

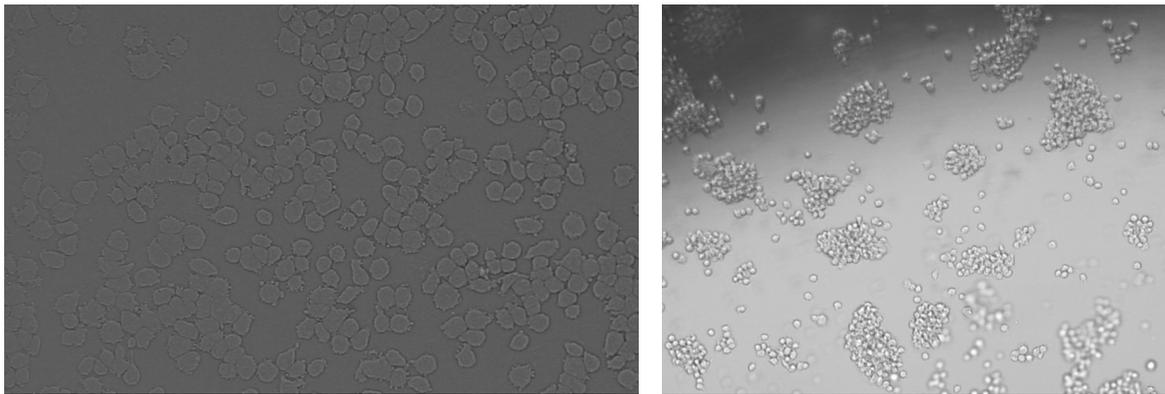
Abb. 3 Zytotoxizität von Saporin (a) Saponinum album (2–5 $\mu\text{g/ml}$) mit Saporin (6 nM) (b) und Saponinum album (c). Saponinum album zeichnete sich durch eine von der Differenzierungszeit abhängige Zytotoxizität mit einem Toxizitätsminimum bei 72 Stunden Inkubation mit PMA (c) aus. Reines Saporin war nicht zytotoxisch (a). Mischungen von Saponinum album (2–5 $\mu\text{g/ml}$) mit Saporin (6 nM) waren in Abhängigkeit von der Differenzierungszeit unterschiedlich zytotoxisch (b). Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (nur PMA differenzierte Zellen) bezogen, $n=2$.

*signifikant, $p=0,05$, U-Test

3.1.4 Adhärenz differenzierter U-937-Zellen

Im Zuge der monozytären Differenzierung zu Makrophagen werden verstärkt Rezeptoren zu extrazellulären Adhärenzfaktoren wie Fibrinonektin auf der Zelloberfläche exprimiert (Boles et al., 2000). Da bei den späteren Untersuchungen mehrmals gewaschen werden sollte, war eine Adhärenz der differenzierten U-937-Zellen an die Kunststoffoberfläche der Gewebekulturplatten von besonderer Wichtigkeit. Neben Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) wurden Gelatine (10 mg/ml), Collagen A (1 mg/ml) und Fibronectin (75 µg/ml) hinsichtlich ihrer Adhärenz vermittelnden Eigenschaften untersucht.

Fibronectin erwies sich als optimales Beschichtungsreagenz, bei dem im Vergleich zu den anderen Beschichtungsreagenzien ein Maximum an Zellen am well-Boden haften blieb (Abb. 4a und b).



a

b

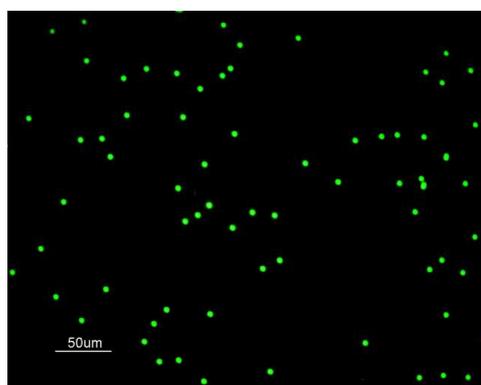
Abb. 4 Adhärenz differenzierter (IFN- γ , 48 Stunden) U-937-Zellen nach Beschichten von 96-well Platten mit Fibronectin (75 µg/ml) und zweimaligem Waschen mit PBS (a). Adhärenz PMA (20 nM) differenzierter U-937-Zellen nach Beschichten von 96-well Platten mit Fibronectin (75 µg/ml) und zweimaligem Waschen mit PBS (b). Bedingt durch verstärkte, interzelluläre Wechselwirkung bilden PMA differenzierte U-937-Zellen Zellnester aus (Cabanas et al., 1990; Hattori et al., 1983).

3.1.5 Phagozytose-Assays

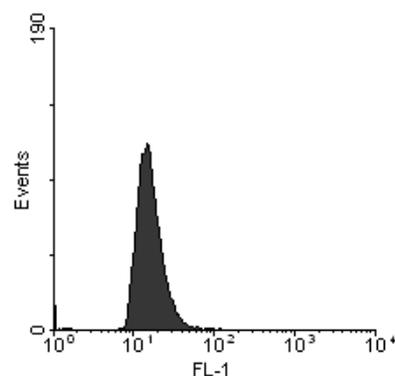
3.1.5.1 Charakterisierung von Alexa-Latex-Partikeln

Für die Untersuchung der Phagozytose induzierenden Eigenschaften des Saponinum album sollte ein Phagozytosemodell etabliert (3.1.1) werden. Die für die Phagozytose-Assays notwendigen Partikel wurden vorab auf ihre Verwendbarkeit hin überprüft und entsprechend charakterisiert. In dieser Arbeit wurden 1- μm -Amino-Latex-Partikel und FITC-*E.coli* verwendet.

Die mit Alexa-Fluor 5-TFP markierten Amino-Latex-Partikel (2.2.3.1) wurden zur näheren Charakterisierung fluoreszenzmikroskopisch (2.2.3.6) und durchflusszytometrisch (2.2.3.5) untersucht. Nach Anregung bei 488 nm zeigten die markierten Latex-Partikel eine starke Grünfluoreszenz (Abb. 5a). Die durchflusszytometrische Analyse ergab die in Abb. 5b dargestellte Normalverteilung mit geringer Varianz. Das ließ auf eine, für den Phagozytose-Assay notwendige, homogene Fluoreszenzmarkierung der Amino-Latex-Partikel schließen. Die Internalisierung nicht homogen gefärbter Partikel hätte zu einer Teilung der zu analysierenden Zellpopulation geführt.



a



b

Abb. 5

Latex-Partikel (1 μm) wurden mit Alexa-Fluor 488 5-TFP markiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch (a) und durchflusszytometrisch (b) analysiert. Nach Anregung bei 488 nm konnten die Partikel als intensiv grün fluoreszierende Punkte sichtbar gemacht werden. Die durchflusszytometrische Analyse ergab die in (b) dargestellte Normalverteilung, was auf eine homogene Fluoreszenzmarkierung der Partikel schließen lässt.

3.1.5.2 Charakterisierung FITC markierter *Escherichia coli*-Partikel

Wie unter 3.1.5.1 erwähnt, mussten für die Phagozytose-Assays die *E.coli*-Partikel entsprechend charakterisiert werden. Die Bakterienkonzentration der FITC-*E.coli* (K-12 strain) wurde mittels Hämocytometer zu 4×10^9 /ml bestimmt. Nach der durchflusszytometrischen Analyse ergab sich die in Abb. 6 dargestellte Normalverteilung, was auf eine homogene Markierung der Bakterien schließen lässt.

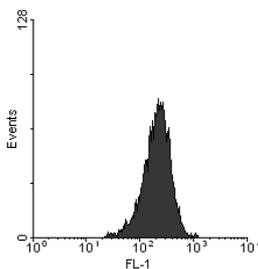


Abb. 6 FACS-Histogramm der FITC-*E.coli*. Die Normalverteilung lässt auf eine homogene Färbung schließen.

3.2 Untersuchungen zu Phagozytose induzierenden Eigenschaften des Saponinum album

3.2.1 Allgemeines zum Auswertungsverfahren

Da das Ausmaß der Phagozytose grundsätzlich von der Art des verwendeten Partikels und der Partikeldichte abhängt, muss in jedem Einzelfall ein optimales Zell/Partikel-Verhältnis experimentell ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Zell/Partikel-Verhältnisse nach Differenzierung der U-937-Zellen mit IFN- γ (1000 U, 48 Stunden) oder PMA (20 nM, 72 Stunden) untersucht. Die Verhältnisse betragen für alle untersuchten Partikelspezies 1/6, 1/12, 1/25, 1/50 und 1/100. Nach entsprechender Aufarbeitung wurden jeweils 10^3 Zellen mittels Durchflusszytometrie (2.2.3.5) analysiert.

Im Folgenden wird das Auswertungsverfahren der einzelnen Phagozytose-Assays erläutert. Abb. 7a stellt den *dot-plot* IFN- γ differenzierter U-937-Zellen dar (schwarze Punktwolke), die nicht mit fluoreszenzmarkierten Partikeln inkubiert wurden (Kontrollzellen). Auf der y-Achse ist die durch differenzierte U-937-Zellen bedingte Autofluoreszenz und auf der x-Achse ist das von den Zellen bei der Anregungswellenlänge (488 nm) gestreute Licht, der *Forward Scatter* (FSC) abgetragen. Er ist ein Maß für die Größe der Zellen, da größere Zellen intensiver streuen als kleine.

Davon ausgehend, dass nach Internalisierung fluoreszenzmarkierter Partikel eine Zunahme der Fluoreszenzintensität stattgefunden hat, wurde zur Auswertung der einzelnen Phagozytose-Assays eine Region R1 im *dot-plot* definiert und alle nach Phagozytose entsprechender fluoreszenzmarkierter Partikel in Region R1 fallende U-937-Zellen gezählt (vgl. Abb. 7a/b). Diese in Region R1 fallende Zellanzahl wurde anschließend auf die gezählte Gesamtzellzahl (10^4) bezogen und prozentual ausgedrückt. Für die Untersuchung einer durch Saponinum album induzierten Phagozytose war dieses Auswertungsverfahren ausreichend, da mögliche Unterschiede zwischen Saponinum album behandelten Zellen und Kontrollzellen (ohne Saponinum album) festgestellt werden konnten. Ausgewertet wurde nach

$$y_t = x_t / 10^4 \times 100 [\%].$$

y_t ist der prozentuale Anteil phagozytischer Zellen nach der Zeit t , und x_t die Zellzahl der nach dieser Zeit in Region R1 detektierten Zellen. Die Phagozytose aller zu untersuchenden Zellen wurde jeweils mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.2.3.6) bei 488 nm überprüft.

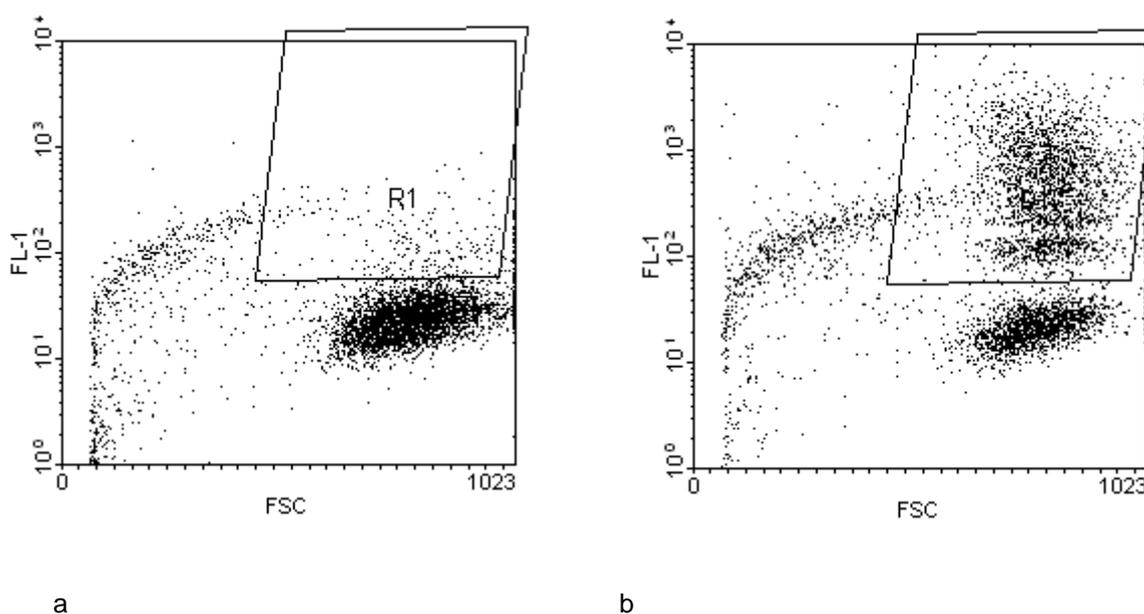


Abb. 7 Auswertungsverfahren der Phagozytose-Assays. (a) stellt die Autofluoreszenz IFN- γ differenzierter U-937-Zellen dar. Über den als Punktwolke (*dot-plot*) dargestellten U-937-Zellen wurde eine Region R1 definiert. Nach Phagozytose fluoreszenzmarkierter Partikel fand eine Verschiebung entsprechender Zellen nach R1 statt (b).

3.2.2 Optimierung des Zell/Partikel-Verhältnisses für Phagozytoseuntersuchungen mit IFN- γ differenzierten U-937-Zellen

Wie unter 3.2.1 erwähnt musste für jede verwendete Partikelart ein optimales Zell/Partikel-Verhältnis (Z/P) experimentell ermittelt werden. Dieses Verhältnis wurde vorab für IFN- γ differenzierte U-937-Zellen optimiert. Wie unten dargestellt (Abb. 8), nahm die Anzahl phagozytisch aktiver Zellen mit steigendem Partikelüberschuss nach dreistündiger Inkubation von 6 \times (Z/P-Verhältnis: 1/6) nach 100 \times (Z/P-Verhältnis: 1/100) zu. Die Auswertung erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben. Für alle weiteren Untersuchungen mit Alexa-Latex- Partikeln wurde ein Z/P-Verhältnis von 1/100 verwendet.

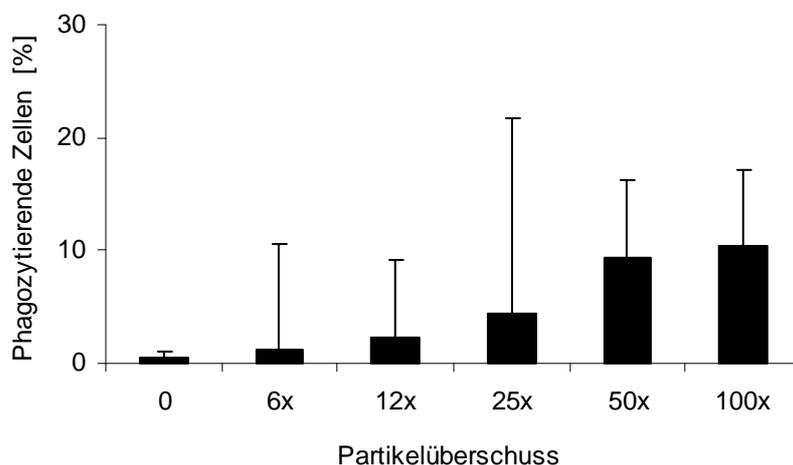
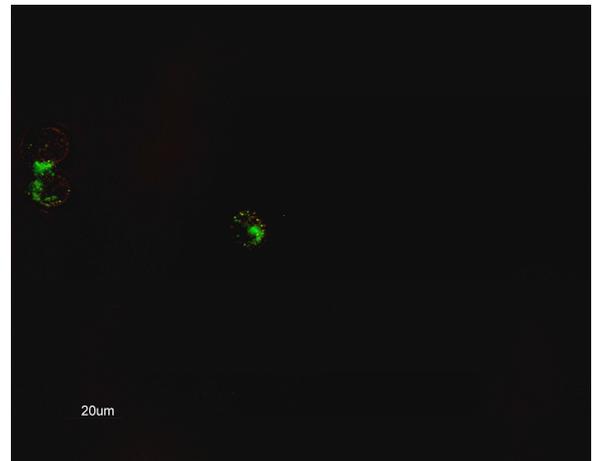
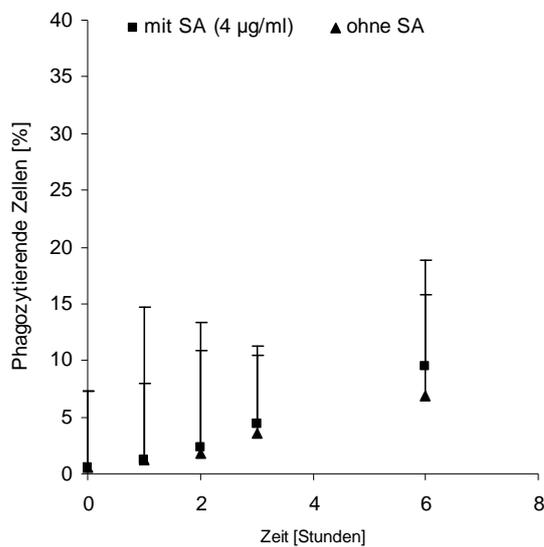


Abb. 8 Optimierung des Zell/Partikel-Verhältnisses (Z/P-Verhältnis).

Differenzierte (IFN- γ , 1000 U, 48 Stunden) U-937-Zellen wurden mit definierten Überschüssen Alexa-Latex-Partikel inkubiert. Die Anzahl phagozytisch aktiver Zellen nahm mit zunehmendem Partikelüberschuss von 6 \times (Z/P-Verhältnis: 1/6) nach 100 \times (Z/P-Verhältnis: 1/100) zu, n=2.

3.2.2.1 Phagozytose von Alexa-Latex-Partikeln (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen)

Nach Optimierung des Zell/Partikel-Verhältnisses wurden IFN- γ differenzierte U-937-Zellen für 1, 2, 3 und 6 Stunden mit einem 100-fachen Partikelüberschuss inkubiert. Die Inkubation erfolgte entweder mit Saponinum album (4 $\mu\text{g/ml}$) oder ohne (Kontrolle). Die Auswertung wurde wie unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Die Phagozytose von Alexa-Latex-Partikeln wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft (Abb. 9b). Die Anzahl phagozytisch aktiver Zellen konnte durch simultane Inkubation mit Saponinum album nicht gesteigert werden. (siehe Abb. 9a). Dies zeigt, dass Saponinum album keinen Einfluss auf die unspezifische Phagozytose nicht opsonierter Alexa-Latex-Partikel ausübte.



a

b

Abb. 9 Phagozytose IFN- γ differenzierter U-937-Zellen.

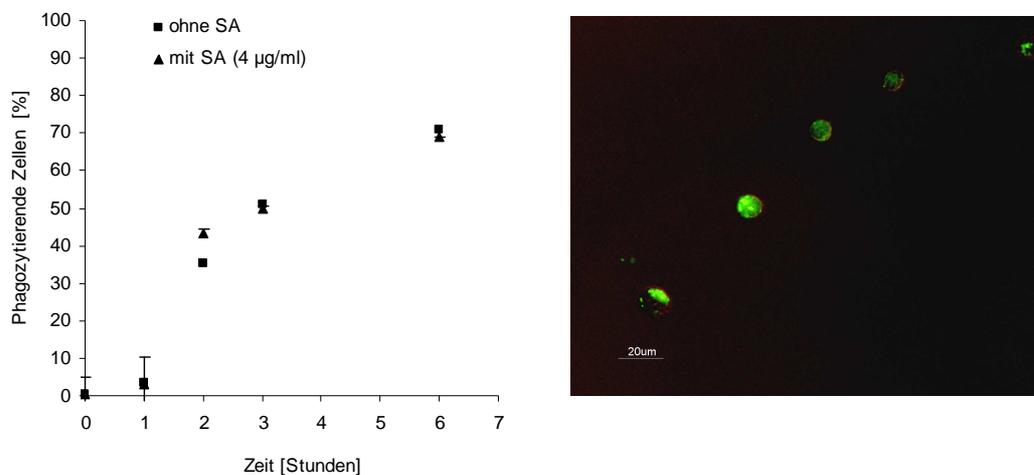
Differenzierte U-937-Zellen wurden mit oder ohne Saponinum album (SA) (4 $\mu\text{g/ml}$) mit einem 100-fachen Überschuss an Alexa-Latex-Partikeln für 1-6 Stunden inkubiert. Die simultane Inkubation mit Saponinum album führte nicht zu einer Steigerung der Anzahl phagozytisch aktiver Zellen (a). Die Partikel wurden phagozytiert (b), n=2.

3.2.2.2 Phagozytose von IgG-Alexa-Latex-Partikeln (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen)

Um den Einfluss von Saponinum album auf die Rezeptor vermittelte Phagozytose der Alexa-Latex-Partikel zu untersuchen, wurden Alexa-Latex-Partikel mit humanem IgG opsoniert und der unter 3.2.2.1 beschriebene Phagozytose-Assay mit diesen Partikeln wiederholt.

Nach Differenzierung mit IFN- γ und Inkubation mit oder ohne Saponinum album (4 $\mu\text{g/ml}$) wurden die Zellen mit einem 100-fachen Überschuss IgG opsonierter Alexa-Latex-Partikel inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Zu Kontrollzwecken erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Prüfung der entsprechenden durchflusszytometrischen Zellproben. Wie Abb. 10b zu entnehmen ist, wurden die Partikel phagozytiert. Durch simultane Inkubation mit Saponinum album konnte die Zahl phagozytisch aktiver U-937-Zellen nicht signifikant gesteigert werden (siehe Abb. 10a). Die Opsonierung mit humanem IgG hatte allerdings sowohl in Saponinum album behandelten als auch in Kontrollzellen eine starke Aktivierung phagozytisch inaktiver Zellen zur Folge.



a

b

Abb. 10 Phagozytose von IgG-Alexa-Latex-Partikeln.

Nach Differenzierung mit IFN- γ wurden U-937-Zellen in Gegenwart eines 100-fachen Überschusses IgG-Alexa-Latex-Partikel +/- Saponinum album (SA) (4 $\mu\text{g/ml}$) 1–6 Stunden inkubiert. Die simultane Inkubation mit SA führte zu keiner Induktion der Phagozytose (a). (b) Differenzierte U-937-Zellen wurden 3 Stunden mit IgG-Alexa-Latex-Partikeln inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie (2.2.3.6) illuminiert. Die Partikel wurden phagozytiert (b), n=2.

3.2.3 Phagozytose von *E.coli* Bakterien (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen)

Um den Einfluss der Partikelart auf die potentiell durch Saponinum album induzierte Phagozytose zu untersuchen wurden als nächstes *E.coli*-Bakterien verwendet. Zuerst erfolgte wieder die Optimierung des Zell/Partikel-Verhältnisses.

U-937-Zellen wurden mit IFN- γ (1000 U) differenziert und nach Inkubation (3 Stunden) mit dem 12- bis 100-fachen Überschuss an FITC markierten *E.coli* Bakterien das optimale Zell/Bakterien-Verhältnis bestimmt. Bei einem 12-fachen Überschuss zeigten ~60 % der Zellen eine phagozytische Aktivität (Abb. 11) Für alle weiteren Untersuchungen wurde mit einem 12-fachen Bakterienüberschuss gearbeitet.

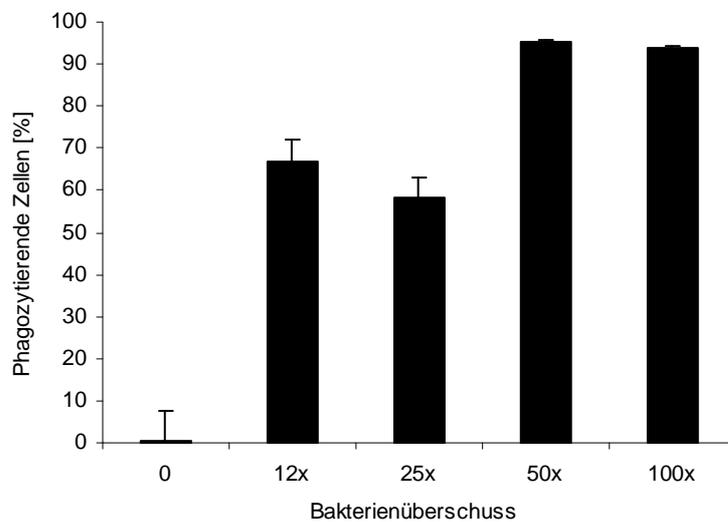
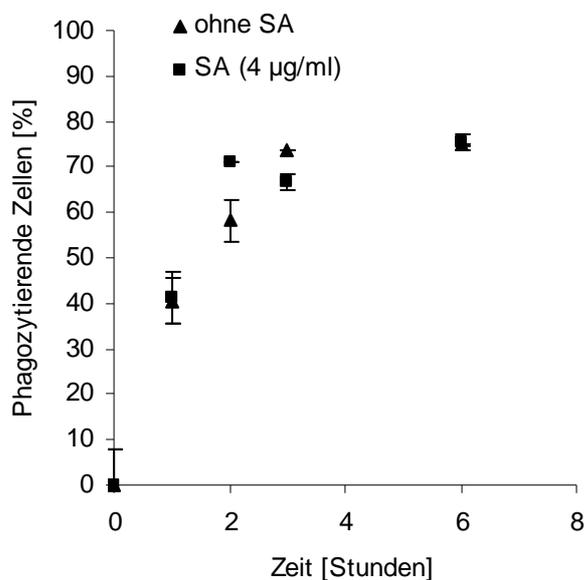


Abb. 11 Optimierung des Zell/Bakterien-Verhältnisses.

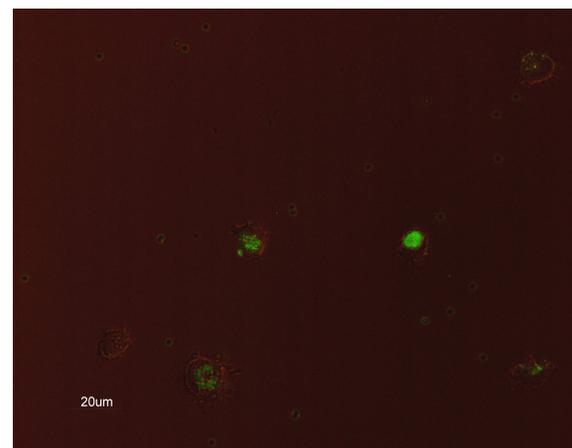
U-937-Zellen wurden mit IFN- γ differenziert und anschließend mit verschiedenen Überschüssen (12 \times bis 100 \times) FITC markierten *E.coli* für 3 Stunden inkubiert. Als optimal erwies sich ein 12-facher Überschuss bei dem ~60 % der Zellen phagozytisch aktiv waren, n=2.

3.2.3.1 Phagozytose FITC markierter *E.coli* (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen)

Nach Ermittlung des optimalen Verhältnisses (3.2.3) erfolgte die zeitabhängige Untersuchung der Phagozytose von FITC markierten Bakterien in IFN- γ differenzierten U-937-Zellen. Dabei wurde entweder mit oder ohne Saponinum album (4 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Wie Abb. 12b zu entnehmen ist, wurden die Bakterien phagozytiert. Allerdings konnte hinsichtlich der Anzahl phagozytisch aktiver Zellen kein Unterschied zwischen Saponinum album behandelten Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 12a). Von einer Saponinum album bedingten Induktion der Phagozytose kann deshalb nicht ausgegangen werden.



a



b

Abb. 12 Phagozytose von FITC-*E.coli*-Bakterien.

Differenzierte (IFN- γ , 1000 U) U-937-Zellen wurden mit einem 12-fachen Überschuss FITC markierter *E.coli* inkubiert und die Saponinum album (SA) induzierte Phagozytose mittels FACS (2.2.3.5) analysiert. Wie aus (b) ersichtlich, wurden die Bakterien phagozytiert. Allerdings konnte kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl phagozytisch aktiver Zellen festgestellt werden (a), n=2.

3.2.3.2 Phagozytose IgG opsonierter FITC markierter *E.coli* (IFN- γ differenzierte U-937-Zellen)

Um den Einfluss des Saponinum album auf die IgG vermittelte Phagozytose der *E.coli*-Bakterien zu untersuchen wurden *E.coli*-Bakterien mit IgG opsoniert und ein Phagozytose-Assay durchgeführt.

U-937-Zellen wurden wie unter 2.2.3.4 beschrieben differenziert und mit einem 12-fachen Überschuss an IgG-FITC-*E.coli* für 1, 2, 3 und 6 Stunden inkubiert. Dabei erfolgte eine Co-Inkubation mit oder ohne Saponinum album. Die Analyse und Auswertung erfolgte wie unter 3.2.1 erläutert. Wie in Abb. 13b dargestellt, wurde die Phagozytose mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

Auch bei IgG-FITC-*E.coli* konnte bezüglich der Anzahl phagozytisch aktiver Zellen kein Unterschied zwischen Saponinum album behandelten Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden (Abb. 13a). Von einer Saponinum album verursachten Auslösung der Phagozytose darf also nicht ausgegangen werden.

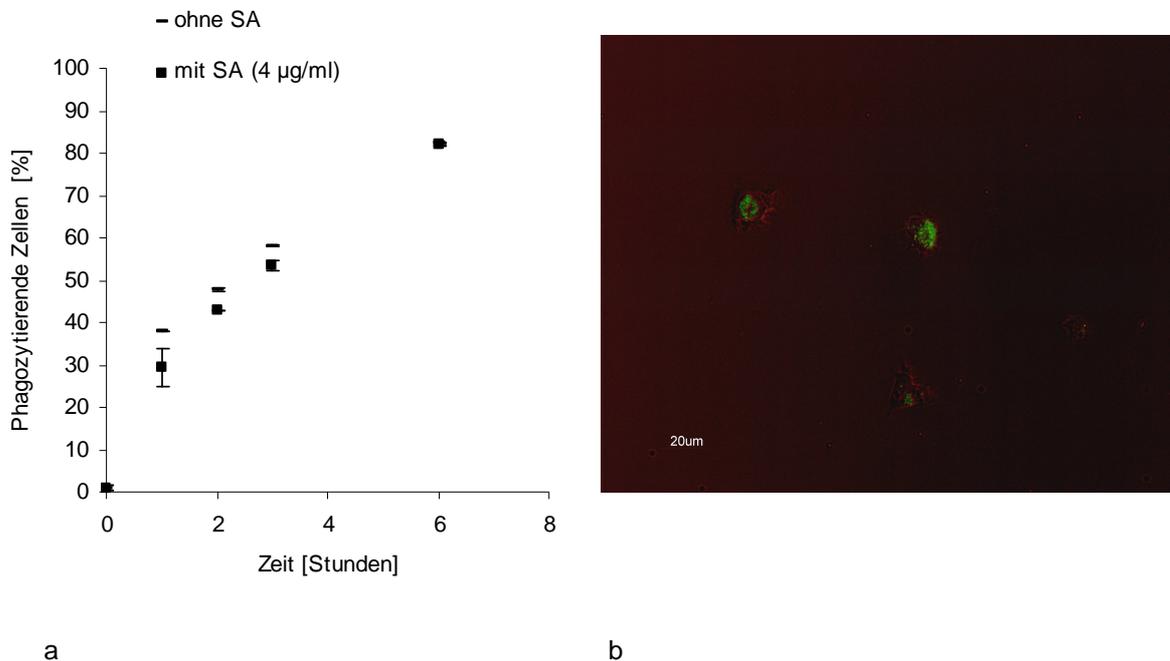


Abb. 13 Differenzierte U-937-Zellen (IFN- γ , 1000 U) wurden mit einem 12-fachen Überschuss IgG-FITC-*E.coli* inkubiert und die Saponinum album (SA) (4 µg/ml) induzierte Phagozytose mittels FACS (2.2.3.5) analysiert. Die Bakterien wurden phagozytiert (b). Die Co-Inkubation mit SA verursachte keine Zunahme der Anzahl phagozytisch aktiver Zellen (a), n=2.

3.2.4 Phagozytoseuntersuchungen in PMA differenzierten U-937-Zellen

3.2.4.1 Phagozytose von Alexa-Latex-Partikeln und IgG-Alexa-Latex-Partikeln

Im Anschluss an die Phagozytoseuntersuchungen mit IFN- γ differenzierten U-937-Zellen wurden dieselben Untersuchungen mit PMA (20 nM, 72 Stunden) behandelten Zellen durchgeführt. Ein möglicher Einfluss des Differenzierungs-Agens auf die potentiell von Saponinum album modulierte Phagozytose sollte so ausgeschlossen werden. Hierbei kommen insbesondere die durch IFN- γ induzierte IgG-Rezeptorsynthese (Yamamoto et al., 2002) und PMA ausgelöste Expression von *toll-like* Rezeptoren (Jang et al., 2005) in Frage. Wie Abb. 14 zu entnehmen ist, konnte weder für Alexa-Latex-Partikel noch für entsprechende IgG opsonierte Partikel ein Unterschied hinsichtlich der Zahl phagozytisch aktiver Zellen in Saponinum album behandelten Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden.

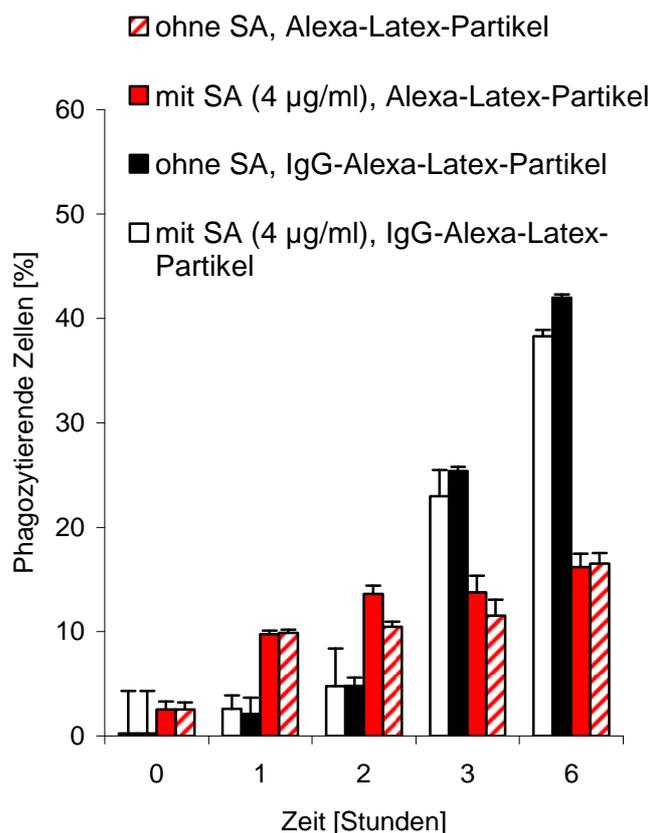


Abb. 14 Phagozytose von Alexa-Latex-Partikeln und IgG-Alexa-Latex-Partikeln in PMA differenzierten U-937-Zellen. Hinsichtlich der phagozytischen Aktivität konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Saponinum album (SA) behandelten Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden. Eine SA bedingte Induktion der Phagozytose konnte somit ausgeschlossen werden, n=2.

3.2.4.2 Phagozytose von FITC-*E.coli* und IgG-FITC-*E.coli* in PMA differenzierten U-937-Zellen

Nach Differenzierung von U-937 Zellen mit PMA (20 nM, 72 Stunden) (2.2.3.4) erfolgte die Inkubation mit einem 12-fachen Überschuss an FITC-*E.coli* oder IgG-FITC-*E.coli* für 1–6 Stunden mit oder ohne Saponinum album. Wie aus Abb. 15 ersichtlich, konnte durch simultane Inkubation mit Saponinum album keine Steigerung der Anzahl phagozytisch aktiver Zellen erreicht werden. Von einer Saponinum album ausgelösten Induktion der Phagozytose ist somit nicht auszugehen.

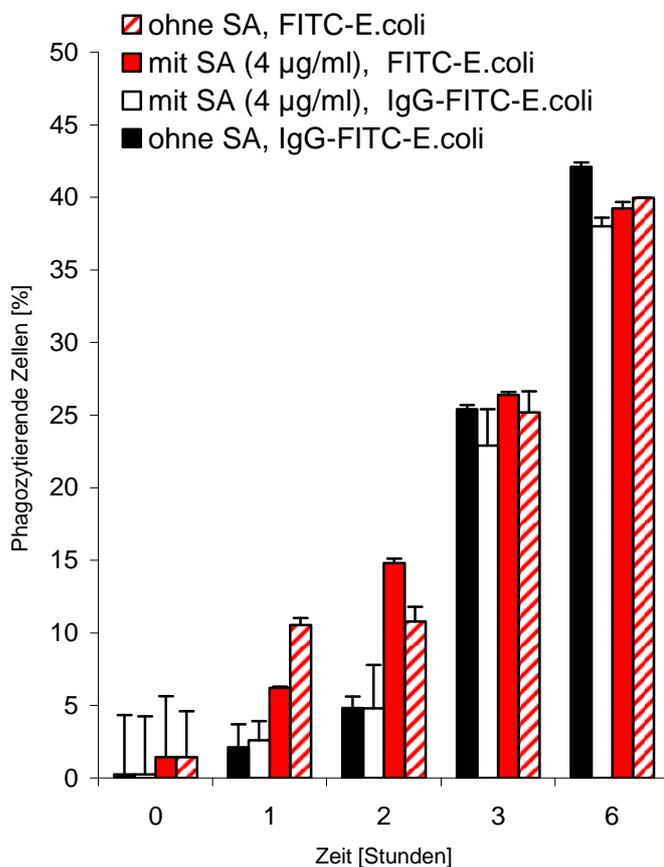


Abb. 15 Nach Differenzierung von U-937-Zellen mit PMA (20 nM, 72 Stunden) erfolgte die Inkubation mit einem 12-fachen Überschuss FITC-*E.coli* oder IgG-FITC-*E.coli* für 1-6 Stunden mit oder ohne Saponinum album (Kontrollzellen). Es konnte kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl phagozytisch aktiver Zellen zwischen Saponinum album behandelten und Kontrollzellen festgestellt werden, n=2.

3.3 Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizität

3.3.1 Vorbemerkungen

Der thematische Hintergrund, der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, war die Beobachtung, dass die wässrigen Rohextrakte von *Agrostemma githago* L. eine starke Zytotoxizität in ECV-304-Zellen aufwiesen (Hebestreit & Melzig, 2003). Nahm man früher an, dass dies hauptsächlich auf die in der Pflanze enthaltenen Triterpensaponine zurückzuführen sei (Teuscher & Lindequist, 1988), konnte später gezeigt werden, dass der beobachteten Zytotoxizität ein Synergismus zwischen dem RIP Typ I (1.3) Agrostin und den entsprechenden Agrostemmasaponinen zu Grunde lag (Hebestreit & Melzig, 2003). Derselbe Synergismus wurde zwischen Gypsophilasaponinen aus *Gypsophila paniculata* L. und Agrostin oder Saporin (ebenfalls ein RIP Typ I) beobachtet (Hebestreit et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich ein Saponinextrakt (Saponinum album) aus den Wurzeln von *Gypsophila paniculata* L. verwendet. Da RIPs vom Typ I (z.B. Agrostin und Saporin) im Gegensatz zu RIPs vom Typ II (z.B. Viscumin) über keine den Zellmembrantransfer vermittelnde B-Kette verfügen, zeichnen sich Agrostin und Saporin durch eine in niedrigen Konzentrationen fehlende Zytotoxizität aus (Peumans et al., 2001). In diesem Zusammenhang wurde die zytotoxizitätssteigernde Wirkung der Gypsophilasaponine auf Agrostin und Saporin auf eine Saponin induzierte Endozytose der RIP vom Typ I zurückgeführt.

3.3.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen in H-2171-, SK-N-SH-, ECV-304-, THP-1-, HL-60-, MOLT-3- und HEP-G2-Zellen

Da bis dato keine Untersuchungen zur Zellspezifität des zytotoxischen Synergismus durchgeführt wurden, sollte die von Saponinum album induzierte Toxizitätssteigerung Ribosomen-inaktivierender Proteine vom Typ I in folgenden, malignen Zelllinien charakterisiert werden: H-2171 (Lunge), SK-N-SH (Nervensystem), ECV-304 (Blase), THP-1 und HL-60 (primäres Immunsystem), MOLT-3 (sekundäres Immunsystem), HEP-G2 (Leber). Nach Prüfung der Einzelsubstanzen auf Zytotoxizität (Saponinum album und Saporin) wurden anhand der Ergebnisse entsprechender Voruntersuchungen für die jeweilige Zellart Konzentrationen an Saporin und Saponinum album festgelegt, für die keine Zytotoxizität beobachtet wurde. Dies erklärt die teilweise unterschiedlichen Konzentrationen in Abb. 16. Wie dort zu sehen ist, führte die alleinige Inkubation mit Saponinum album oder Saporin in

keiner der untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Zytotoxizität. Dahingegen erwiesen sich die entsprechenden Mischungen als signifikant zytotoxisch.

Dies ist als Hinweis darauf zu deuten, dass der beobachteten synergistischen Zytotoxizität ein allgemeiner Saponinum album induzierter Mechanismus zu Grunde liegt, der eine Sensibilisierung gegenüber RIPs Typ I zur Folge hat.

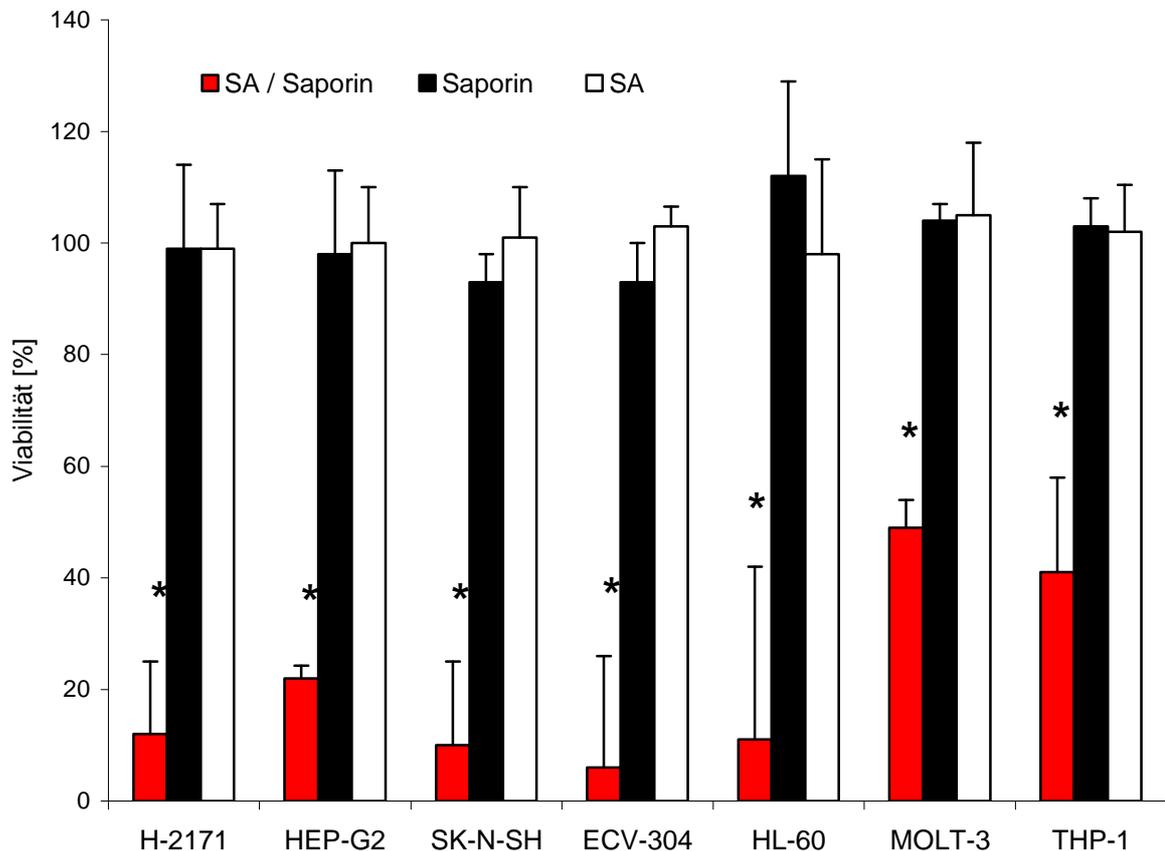


Abb. 16 Zellspezifität der synergistischen Zytotoxizität.

ECV-304-, SK-N-SH-, HEP-G2-, H-2171- und HL-60-Zellen wurden simultan mit Saponinum album (SA) (4 $\mu\text{g/ml}$) +/-Saporin (6 nM) oder Saporin (6 nM) für 72 Stunden inkubiert. Bei MOLT-3-Zellen erfolgte die Inkubation mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Saponinum album und 6 nM Saporin und bei THP-1-Zellen mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Saponinum album und 0,6 nM Saporin. Wie ersichtlich, waren die Mischungen aus Saponinum album und Saporin signifikant zytotoxisch. Dahingegen zeigten die entsprechenden Monosubstanzen keine zytotoxische Aktivität. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) bezogen, $n=2$.

*signifikant, $p=0,05$, U-Test

3.3.3 Derivatisierung von *Histidin tagged Saporin* (^{his}Saporin)

Für die nähere Charakterisierung des der synergistischen Zytotoxizität zu Grunde liegenden Mechanismus wurden verschiedene Derivatisierungen des Saporins durchgeführt. Ziel war die Herstellung einer in der Zellkultur noch hinreichend zytotoxisch aktiven Saporinvariante. Auf Grund möglicher Verunreinigungen nativen Saporins (Peumans et al., 2001) wurde für die Markierungsversuche in *Escherichia coli* exprimiertes, dem Saporin-3 entsprechendes ^{his}Saporin verwendet (Weng et al., 2008).

Zusammenfassend sollen im Folgenden die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen des ^{his}Saporins mit Alexa-Fluor 488 5-TFP, Natriumborhydrid/Formaldehyd und Natrium^{3[H]}borhydrid/Formaldehyd beschrieben werden.

3.3.3.1 Markierung von ^{his}Saporin mit Alexa-Fluor 488 5-TFP

^{his}Saporin wurde, wie unter 2.3.3.4 beschrieben mit Alexa-Fluor 488 5-TFP umgesetzt und anschließend mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Konzentration wurde zu 826 µg/ml Alexa-^{his}Saporin ermittelt. Anschließend erfolgte die biologische Testung in Kombination mit Saponinum album (4 µg/ml). Alexa-^{his}Saporin erwies sich in Kombination mit Saponinum album als stark zytotoxisch (Abb. 17b).

3.3.3.2 Reduktive Methylierung von ^{his}Saporin mit Natriumborhydrid/Formaldehyd

^{his}Saporin wurde, wie unter 2.3.3.2 beschrieben mit Natriumborhydrid/Formaldehyd methyliert und mittels Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt.

Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels Bradford-Assay (2.3.1) anhand einer mit ^{his}Saporin erstellten Kalibrierfunktion.

Methyl-^{his}Saporin (4 µg) und 2 µg ^{his}Saporin wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, die entsprechenden Banden (Abb. 17a) nach Commassie-Färbung herausgeschnittenen und mittels NanoLC-ESI-MS/MS (3.3.3.2.1) analysiert. Die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität in Kombination mit Saponinum album (4 µg/ml) erfolgte mittels XTT-Assay (2.2.2.1). Die entsprechenden Mischungen von Saponinum album und Methyl-^{his}Saporin erwiesen sich als stark zytotoxisch (Abb. 17b).

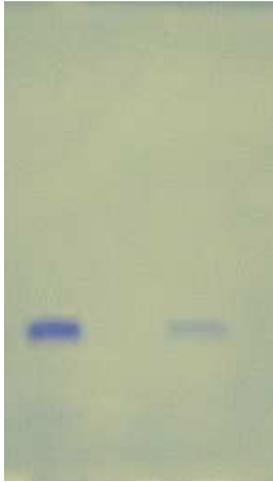


Abb. 17a SDS-Gelelektrophorese von 4 μg Methyl-^{his}Saporin (linke Bande) und 2 μg ^{his}Saporin. Beide Banden wurden herausgeschnitten und mittels NanoLC-ESI-MS/MS (3.3.3.2.1) analysiert.

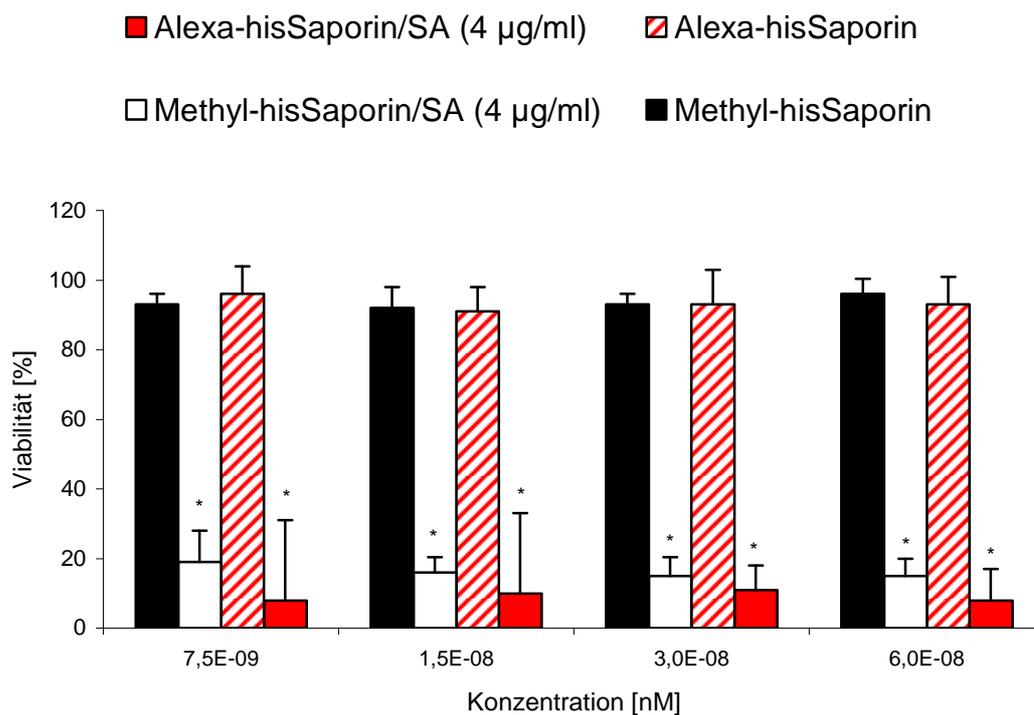


Abb. 17b Zytotoxizität von Methyl-^{his}Saporin und Alexa-^{his}Saporin jeweils in Kombination mit Saponinum album (SA) in ECV-304-Zellen nach 4 Stunden Inkubation.

Die simultane Inkubation beider Toxinderivate mit Saponinum album verursachte starke Zytotoxizität. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte mittels XTT-Assay (2.2.1.3). Entsprechende Kontrollen wurden weder mit Toxin noch mit Saponinum album behandelt. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) bezogen, $n=2$.

*signifikant zur Kontrolle, $p=0,05$, U-Test

3.3.3.2.1 NanoLC-ESI-MS/MS von Methyl-^{his}Saporin

Um die Methylierung des ^{his}Saporins zu überprüfen wurde die aus der Gelelektrophorese erhaltene Bande 1 (Methyl-^{his}Saporin) (Abb. 17a) tryptisch gespalten, mittels NanoLC aufgetrennt und mit ESI-MS/MS analysiert. Das Protokoll der vom FMP durchgeführten Analyse von Methyl-^{his}Saporin ist nachfolgend aufgeführt. Es wurden eine Mischung von Isoformen des Saporins und zwei bakterielle Proteine identifiziert (Tab 1a). Dies ist auf die rekombinante Expression des Saporins in *E.coli*-Bakterien zurückzuführen.

^{His}Saporin-3 konnte in der Bande 1 mit sehr hohem *Sequence Coverage* identifiziert werden (86 % im Normalverdau). Somit konnten 22 der 24 Lysin-Aminosäuren des ^{his}Saporin-3 eindeutig nachgewiesen werden.

Tab. 1 Ergebnisse der NanoLC-ESI-MS/MS-Analyse von Methyl-^{his}Saporin. Es wurden Isoformen des Saporins (Tab. 1a) und eine Vielzahl mono- und dimethylierter Peptide detektiert (Normalverdau). Dies bewies die Methylierung entsprechender Aminogruppen (Tab. 1b).

Tab 1a

Bande 1	(P27559) Ribosome-inactivating protein saporin-2 precursor	RIP2_SAPOF	2110	141
	(P20656) Ribosome-inactivating protein saporin-6 precursor	RIP6_SAPOF	1580	123
	(P27560) Ribosome-inactivating protein saporin-3	RIP3_SAPOF	933	45
	(P0ACJ8) Catabolite gene activator (cAMP receptor protein)	CRP_ECOLI	564	16
	(P0A9K9) FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase slyD	SLYD_ECOLI	354	12

Tab 1b

Pos	Start	End	Observed	Mr(calc)	Miss	Sequence	Modification	ion
77	70	78	472.80	943.58	1	GTVSLGLKR	Methyl (K)	48
77	70	78	479.80	957.60	1	GTVSLGLKR	di-Methylation (K)	43
144	136	146	616.31	1230.63	1	NAQITQGDKSR	Methyl (K)	59
144	136	146	623.30	1244.65	1	NAQITQGDKSR	di-Methylation (K)	61
144	136	147	453.91	1358.73	2	NAQITQGDKSRK	Methyl (K)	28
oder 147								
144	136	147	687.38	1372.74	2	NAQITQGDKSRK	di-Methylation (K)	28
oder 147								
171	169	175	415.25	828.48	1	VVKNEAR	Methyl (K)	40
171	169	175	422.25	842.50	1	VVKNEAR	di-Methylation (K)	52
199	192	199	496.79	991.57	0	YIQNLVTK	Methyl (K)	50
199	192	204	803.95	1605.89	1	YIQNLVTKNFPNK	di-Methylation (K)	43
204	200	210	677.33	1352.64	1	NFPNKFSDSNK	di-Methylation (K)	39
220	220	230	590.83	1179.65	1	KISTAIYGDAK	Methyl (K)	75
220	220	230	597.82	1193.67	1	KISTAIYGDAK	di-Methylation (K)	55
230	221	236	575.97	1724.91	1	ISTAIYGDAKNGVFNK	di-Methylation (K)	39
236	231	244	811.38	1620.76	1	NGVFNKDYDFGFGK	Methyl (K)	64

236	231	244	818.38	1634.77	1	NGVFNKDYDFGFGK	di-Methylation (K)	71
244	237	246	609.30	1216.59	1	DYDFGFGKVR	Methyl (K)	39
244	237	246	411.20	1230.60	1	DYDFGFGKVR	di-Methylation (K)	53
261	247	263	664.70	1991.09	2	QVKDLQMGLLLMYLGKPK	Methyl (K); Oxidation (M)	43
261 oder 263	247	263	506.27	2021.11	2	QVKDLQMGLLLMYLGKPK	di-Methylation (K); 2 Oxidation (M)	23
261 oder 263	250	263	545.63	1633.89	1	DLQMGLLLMYLGKPK	di-Methylation (K)	49
261 oder 263	250	263	550.96	1649.89	1	DLQMGLLLMYLGKPK	di-Methylation (K); Oxidation (M)	29
261 oder 263	250	263	551.62	1651.87	1	DLQMGLLLMYLGKPK	Methyl (K); 2 Oxidation (M)	36
261 oder 263	250	263	556.30	1665.88	1	DLQMGLLLMYLGKPK	di-Methylation (K); 2 Oxidation (M)	31
261 oder 263	250	263	560.97	1679.90	1	DLQMGLLLMYLGKPK	di-Methylation (K); Methyl (K); 2 Oxidation (M)	22
261 + 263	250	263	847.96	1693.91	1	DLQMGLLLMYLGKPK	2 di-Methylation (K); 2 Oxidation (M)	38

3.3.3.3 Charakterisierung von ³[H]_{his}Saporin

Nach Optimierung der reduktiven Methylierung mit nichtradioaktiven Chemikalien und Testen des entstandenen Methylderivates in der Zellkultur, wurde tritiummarkiertes Natriumborhydrid (25 mCi, 15 Ci/mmol) (2.3.3.3) für die Herstellung des eigentlichen *Tracers* verwendet. Dabei wurde exakt nach der mit „kaltem“ Natriumborhydrid optimierten Methode gearbeitet (2.3.3.2).

Den einzelnen Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie wurde je 1 µl zur Aktivitätsbestimmung (2.6.1) entnommen. Wie Abb. 18a (Seite 57) zu entnehmen ist, nahm die Radioaktivität von Fraktion 2 bis 5 zu, fiel dann abrupt ab und stieg in Fraktion 7 schließlich massiv an. Die abrupte Radioaktivitätsabnahme in Fraktion 6 war auf einen geringen Proteingehalt zurückzuführen, der in Fraktion 7 noch weiter abnahm (Abb. 18b). Die starke Radioaktivitätszunahme in Fraktion 7 war eluiertem überschüssigem ³[H] Borhydrid geschuldet (a). Die spezifische Aktivität wurde zu 120 GBq/mmol errechnet. Für Zellkulturexperimente wurden die Fraktionen 3–5 nach Proteinquantifizierung anhand der in Abb. 18c dargestellten Kalibrierfunktion verwendet.

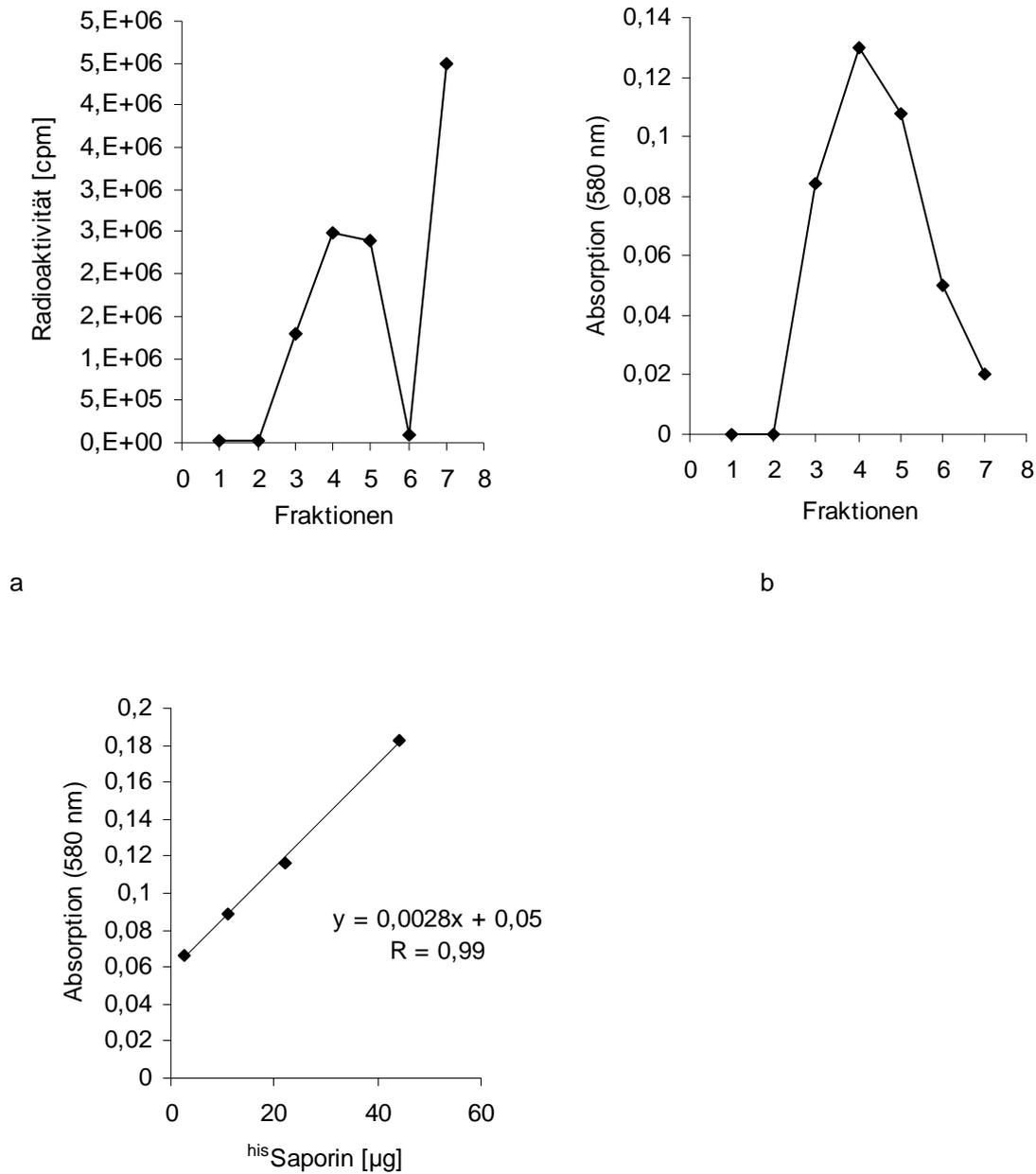


Abb. 18 Charakterisierung von ^3H his Saporin.

Je 1 µl wurde den Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie entnommen und mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) die Radioaktivität bestimmt (a). Anschließend wurde mittels Bradford-Assay (2.3.1) quantifiziert (b) und anhand einer Kalibrierfunktion (c) die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen ermittelt.

3.3.4 Vergleichende Toxizitätsuntersuchungen in ECV-304-Zellen

Um die von Saponinum album induzierte toxisitätssteigernde Wirkung auf Saporin zu veranschaulichen, erfolgte ein Toxizitätsvergleich mit Viscumin aus *Viscum album* L. im Zellmodell (ECV-304-Zellen). Viscumin (LD₅₀: 2,4-80 µg/kg, Maus) ist neben Abrin (LD₅₀: 0,7 µg/kg, Maus) aus *Abrus precatorius* L. und Ricin (LD₅₀: 2,7 µg/kg, Maus) aus *Ricinus communis* L. eines der toxischsten Ribosomen-inaktivierenden Proteine vom Typ II (Marquardt & Schäfer, 2004).

Wie aus Abb. 19a (Seite 59) ersichtlich weisen die Konzentrations-Effekt-Kurven in der halblogarithmischen Darstellung vergleichbare sigmoide Verläufe auf. Die Kombination von Saporin mit Saponinum album führte also zu einer dem Viscumin vergleichbaren toxischen Aktivität. Zur Ermittlung der GI₅₀-Werte von Viscumin und Saporin (mit Saponinum album) wurde mit den, im linearen Bereich von Abb. 19a befindlichen Messwerten jeweils eine lineare Regression durchgeführt.

Die ermittelten GI₅₀-Werte betragen für Saporin/Saponinum album (4 µg/ml) $42,5 \times 10^{-12}$ M und für Viscumin $21,5 \times 10^{-12}$ M. Die Kombination von Saporin mit Saponinum album führte also zu einer der Lektineinheit (B-Kette) von Viscumin vergleichbaren Transfereffizienz der entsprechenden N-Glycosidase.

Nach Harris (1994) lässt sich die Empfindlichkeit allgemein als Signaländerung (hier Zytotoxizität) bezogen auf Konzentrationsänderung definieren. Mathematisch entspricht dies der Steigung.

Durch Bildung des Quotienten aus $m = -1974,9$ für Viscumin (Abb. 19b) und $m = -849,7$ für Saporin (19b) konnte eine 2,3-fach höhere zelluläre Empfindlichkeit für Viscumin abgeleitet werden.

Der Saponinum album vermittelte Transfer von Saporin ins Zytosol erfolgt also nicht mit einer dem Viscumin entsprechenden Transfereffizienz der toxischen N-Glycosidase da eine Erhöhung der Saporinkonzentrationen zu keiner so starken Zunahme der Zytotoxizität führt als die Variation der Viscuminkonzentration.

Dies ist auf einen abweichenden Aufnahmemechanismus des Viscumins zurückzuführen, der über die an zelluläre Galaktosereste bindende Lektinunterheit (B-Kette) vermittelt wird (Mikeska et al., 2005).

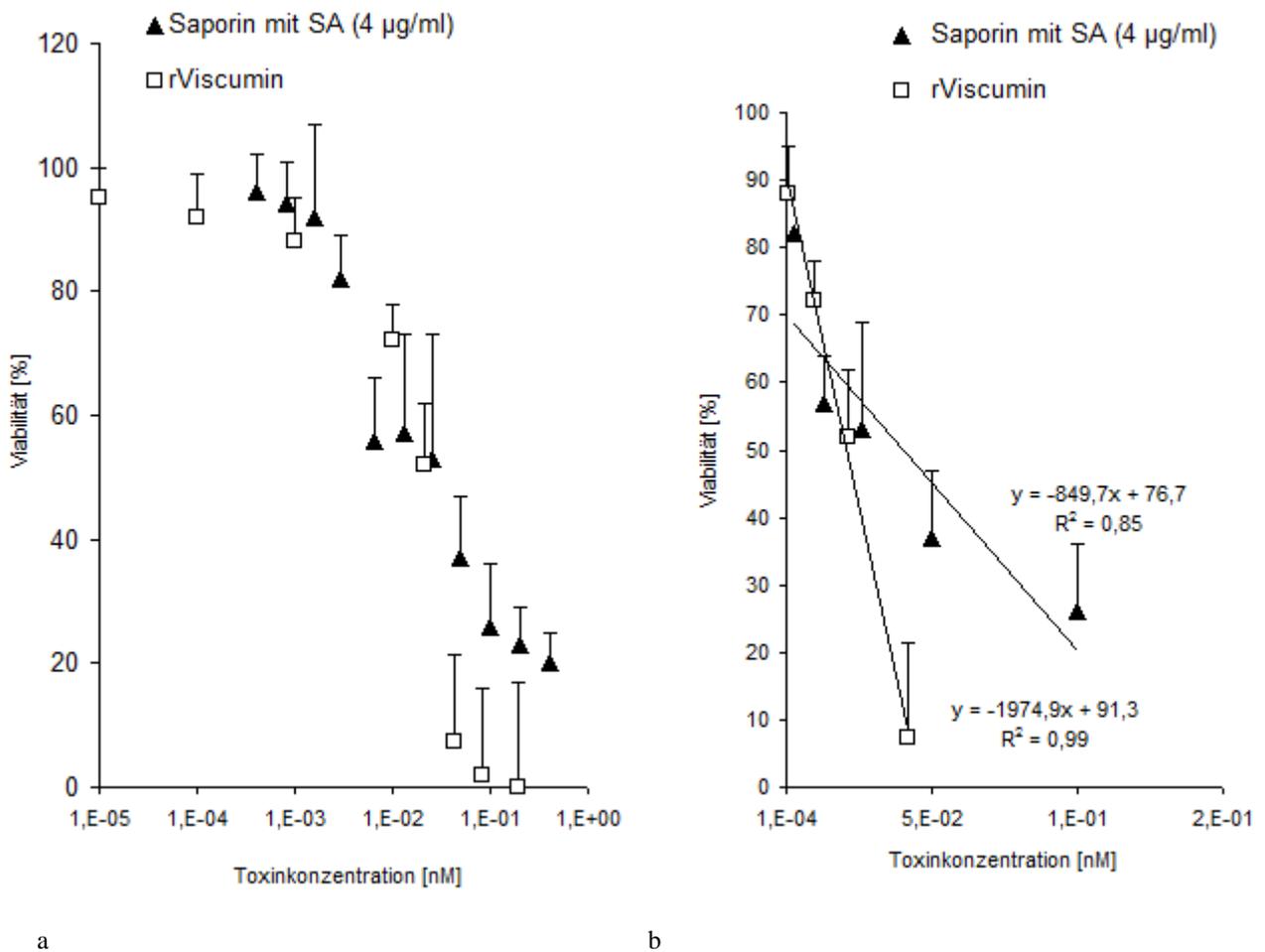


Abb. 19 Zytotoxizität von Saporin mit Saponinum album (SA, 4 µg/ml) und rViscumin in ECV-304-Zellen.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Viscumin und Saporin/Saponinum album (a) weisen vergleichbare Verläufe auf. Mit den nach linearer Regression erhaltenen Geradengleichungen wurde ein GI_{50} von $21,5 \times 10^{-12}$ M für rViscumin und $42,5 \times 10^{-12}$ M für Saporin/SA errechnet. Hieraus konnte auf eine Saponin abhängige, der Lektineinheit (A-Kette) von Viscumin vergleichbare Membrantransfereffizienz der entsprechenden *N*-Glycosidase geschlossen werden. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (Lösungsmittel behandelte Zellen) bezogen, $n=2$.

3.3.5 Hemmung der Saponinum album/Saporin Zytotoxizität

3.3.5.1 Vorbemerkung

Ausgehend von der Hypothese, dass die synergistische Zytotoxizität zwischen Saponinum album und Saporin auf einer Saponin abhängigen Induktion der Saporinendozytose beruht (Hebestreit et al., 2003 und 2006), wurde ein Hemmstoff abhängiger inhibitorischer Effekt auf die Saporin/Saponinum album Zytotoxizität untersucht. Dies sollte Informationen über den der Saporinendozytose zu Grunde liegenden Aufnahmemechanismus liefern. Hierbei wurden Chlorpromazin, Imipramin (Wang et al., 1993; Day et al., 2001; Maginnes et al., 2005) und Cyclosporin A (Wang et al., 2007; Wang & Heitman, 2005; Marks & McMahon, 1998; Engisch & Nowycky, 1998) als Inhibitoren der Clathrin abhängigen und Filipin III (Schnitzer et al., 1994) und Okadiinsäure (Botos et al., 2006; Kiss et al., 2004) als Hemmstoffe der Caveolae abhängigen Endozytose verwendet. Cytochalasin B (Ivanov, 2008) wurde als Inhibitor der Makropinozytose und Bafilomycin A1 als Hemmstoff der vakuolaren ATPase (Bowmann et al., 1988) eingesetzt.

Da die ausgewählten Hemmstoffe bei längerer Inkubation ebenfalls Zytotoxizität hervorrufen, musste im Vorfeld zu den eigentlichen Versuchen eine nicht toxische, hemmstoffspezifische Konzentration ermittelt und die Inkubationszeit mit dem entsprechenden Inhibitor reduziert werden. Auf diese Weise sollte es möglich sein, einen zytotoxizitätsinhibierenden Effekt des jeweiligen Hemmstoffes aufzudecken. Eine Reduktion der Hemmstoffinkubationszeit wurde über die Ermittlung einer zum Auftreten von signifikanter Zytotoxizität erforderlichen Mindestinkubationszeit mit Saporin/Saponinum album erreicht. Wie Abb. 20 (Seite 61) zu entnehmen ist, trat bei einer Saporin/Saponinum album Inkubationszeit von 3 und 4 Stunden ein signifikant zytotoxischer Effekt auf. Für alle weiteren Experimente wurden die Zellen 4 Stunden mit Saporin/Saponinum album inkubiert.

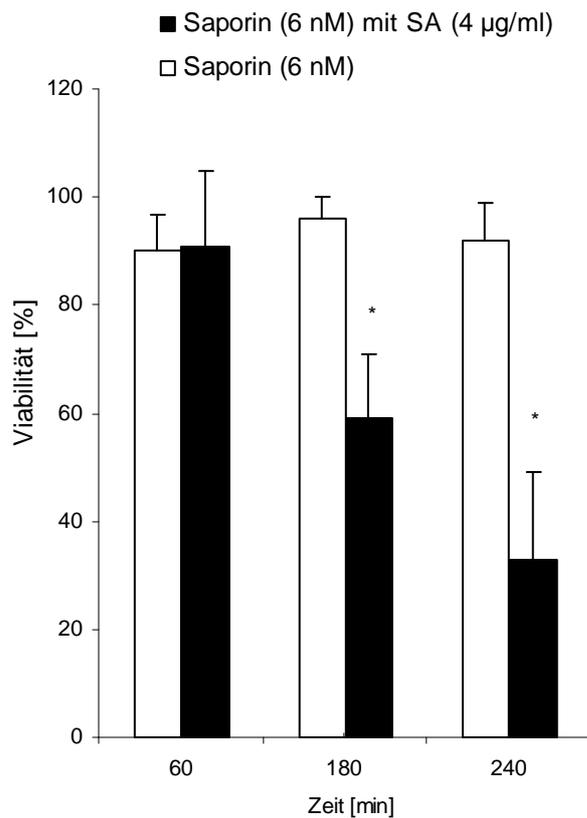


Abb. 20 Zytotoxizität von Saporin (6 nM)/Saponinum album (SA, 4 µg/ml) nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Nach 3 und 4 Stunden trat ein signifikant zytotoxischer Effekt auf. Die Viabilität wurde mittels XTT-Assay (2.2.1.3) bestimmt. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) bezogen, n=2.

*signifikant, p=0,05, U-Test

3.3.5.2 Hemmung der Saporin/Saponinum album Zytotoxizität

Wie unter 3.3.5.1 erwähnt, musste für jeden eingesetzten Hemmstoff eine optimale, nicht toxische Konzentration experimentell ermittelt werden. Nach Ermittlung der entsprechenden Konzentrationen wurden ECV-304-Zellen 30 min mit den Hemmstoffen inkubiert und anschließend für weitere 4 Stunden mit Saporin/Saponinum album behandelt. In Abb. 21a ist die Hemmstoff verursachte Inhibition der Saporin/Saponinum album induzierten Zytotoxizität dargestellt. Eine Eigentoxizität der Hemmstoffe konnte ausgeschlossen werden (weiße Balken). Die schwarz/weiß gestreiften Balken stellen die Saporin/Saponinum album Toxizität aus den jeweiligen Versuchsreihen dar, in denen der entsprechende Hemmstoff untersucht wurde. Da die Versuchsreihen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, unterschieden sich auch die jeweiligen Positivkontrollen (Saporin/Saponinum album) voneinander (Abb. 21, schraffierte Balken). Auf Grund einer möglichen Eigentoxizität der Hemmstoffe wurden die entsprechenden Messwerte außerdem einem Signifikanztest (U-Test) unterzogen.

Okadiinsäure (OS), Filipin III (FIL) und Cytochalasin B (CYT. B) zeigten keine Abschwächung der Saporin/Saponinum album induzierten Zytotoxizität. Offensichtlich spielten eine Caveolae abhängige Endozytose und makropinozytotische Prozesse bei der Aufnahme des Saporins keine Rolle .

Chlorpromazin (CPZ), Imipramin (IMI) und Cyclosporin A (CIS.A) verursachten eine signifikante Abnahme der Saporin/Saponinum album bedingten Zytotoxizität. Dies kann als Hinweis auf eine Saponinum album induzierte, Clathrin vermittelte Endozytose des Saporins interpretiert werden. Bafilomycin A1, ein Hemmstoff der vakuolaren ATPase (Bowmann et al., 1988) und des Transports zwischen frühen und späten Endosomen (Bayer et al., 1998) verursachte ebenfalls eine signifikante Hemmung der Saporin/Saponinum album bedingten Zytotoxizität. Das mittels Clathrin abhängiger Endozytose internalisierte Saporin gelangt also in das endosomale Transportsystem und wird in heranreifenden Endosomen in tiefere Zellkompartimente transportiert, wo auf bisher noch nicht geklärte Weise die Liberation ins Zytosol erfolgt. Diese Annahme wird durch Untersuchungen mit Alexa^{his}Saporin gestützt. ECV-304-Zellen wurden 30 min mit dem Mikrotubulus hemmenden Nokodazol (5 µM) und anschließend mit Alexa^{his}Saporin/Saponinum album (4 µg/ml) für 6 Stunden inkubiert. Da kein Weitertransport entlang der Mikrotubuli mehr erfolgen konnte, akkumulierten Alexa^{his}Saporinmoleküle in endosomalen Vesikeln (vgl. Abb. 21b und c).

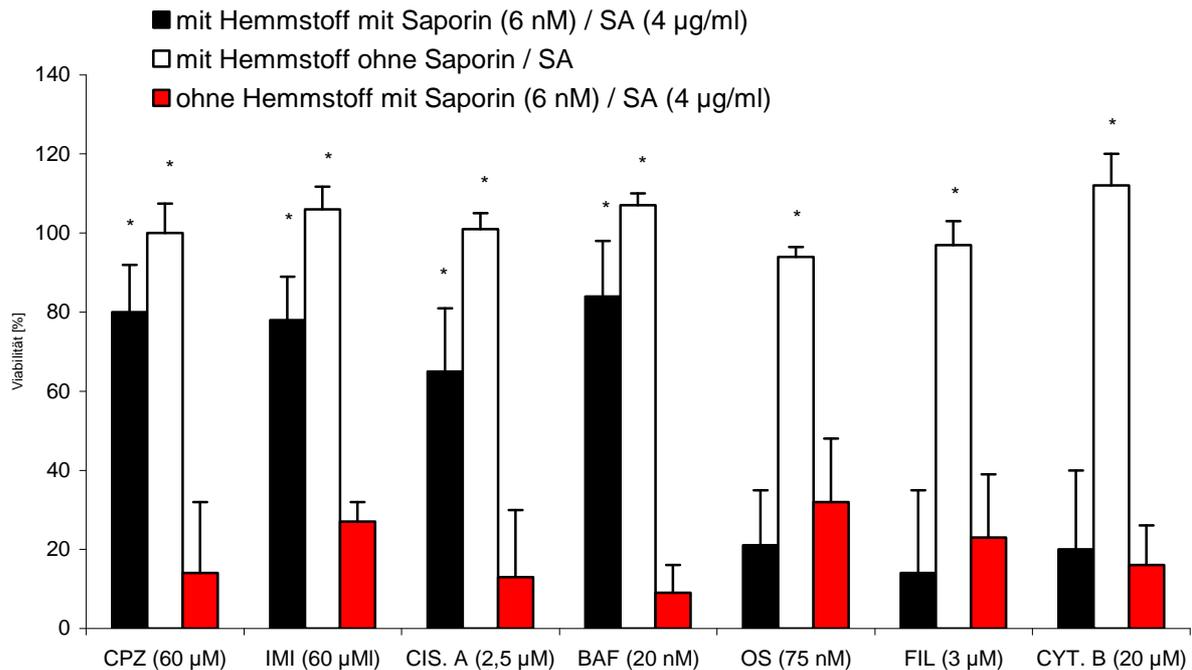
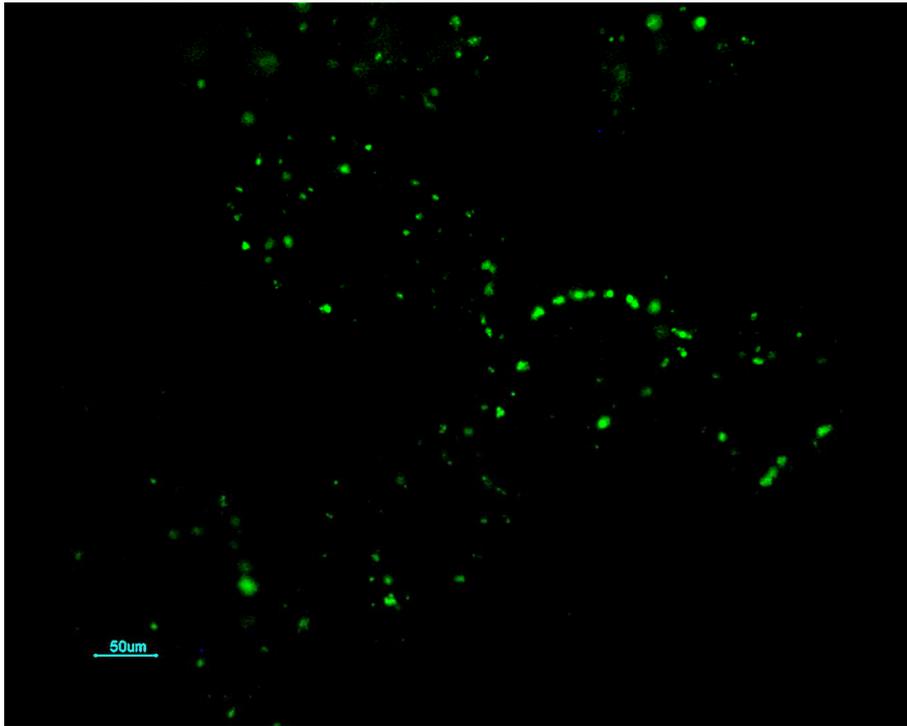


Abb. 21a Hemmung der Saporin/Saponinum album Zytotoxizität in ECV-304-Zellen.

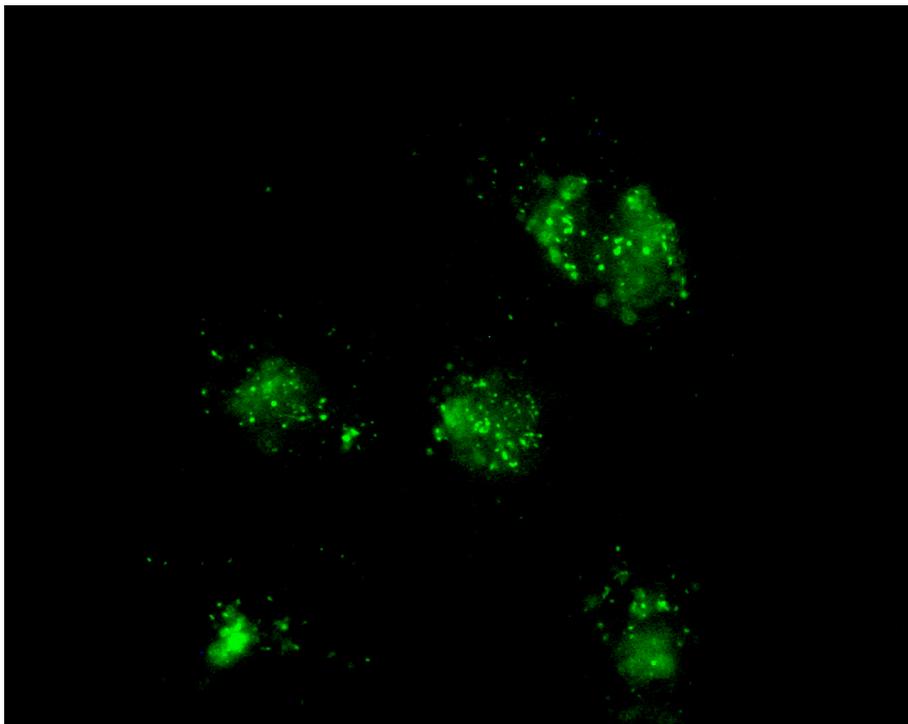
Chlorpromazin (CPZ), Imipramin (IMI), Bafilomycin A1 (BAF) und Cyclosporin A (CIS. A) verursachten eine signifikante Abschwächung der Saporin/Saponinum album (SA) Zytotoxizität (schwarze Balken). Okadiinsäure (OS), Filipin III (FIL) und Cytochalasin B (CYT. B) zeigten hingegen keinen hemmenden Effekt auf die Saporin /SA Zytotoxizität. Bei den untersuchten Hemmstoffkonzentrationen trat nach 4,5 Stunden Inkubation keine inhibitorbedingte Zytotoxizität auf. Da der Effekt der Hemmstoffe auf die Saporin/Saponinum album Zytotoxizität an unterschiedlichen Tagen untersucht wurde, unterschieden sich auch die jeweiligen Positivkontrollen (Saporin/SA) voneinander.

Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Mittelwerte der Negativkontrollen bezogen (Lösungsmittel behandelte Zellen).

*signifikant zur Positivkontrolle $p = 0,05$, U-Test



b



c

Abb. 21b/c Fluoreszenzmikroskopische Bilder ($600\times$, Ex. 488 nm) von ECV-304-Zellen die mit (b) oder ohne (c) Nokodazol 30 min und nach Zugabe von Alexa-^{his}Saporin 6.5×10^{-7} M/Saponinum album ($4\ \mu\text{g/ml}$) 6 Stunden inkubiert wurden. Im Vergleich zu den Kontrollzellen verursachte Nokodazol eine Akkumulation von Alexa-^{his}Saporin in endosomalen Vesikeln (b). Der Maßstab beider Abbildungen ist in (b) dargestellt.

3.3.6 Untersuchungen mit $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin

3.3.6.1 Vorbemerkung

Da die Nachweisgrenze radioaktiv markierter *Tracer* weit unter der entsprechender fluoreszenzmarkierter Varianten liegt, wurde eine tritiummarkierte Variante des $^{\text{his}}$ Saporins hergestellt. Damit sollte insbesondere eine Saponinum album bedingte Modulation der $^{\text{his}}$ Saporininternalisierung eindeutig feststellbar sein. Nach Optimierung und Durchführung der Endozytose-Assays wurden weitere Transportstudien durchgeführt, die alle eine präzise Charakterisierung der Saponinum album abhängigen, synergistischen Toxizität zum Ziel hatten.

3.3.6.2 Optimierung der $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporinkonzentration

Ausgehend von der Hypothese der Saponinum album induzierten Saporininternalisierung wurde der Endozytose-Assay mit Saponinum album behandelten ECV-304-Zellen durchgeführt. Nach Vorinkubation mit Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erfolgte die Zugabe von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin in verschiedenen Konzentrationen und eine weitere Inkubation für eine und zwei Stunden (2.6.7.1).

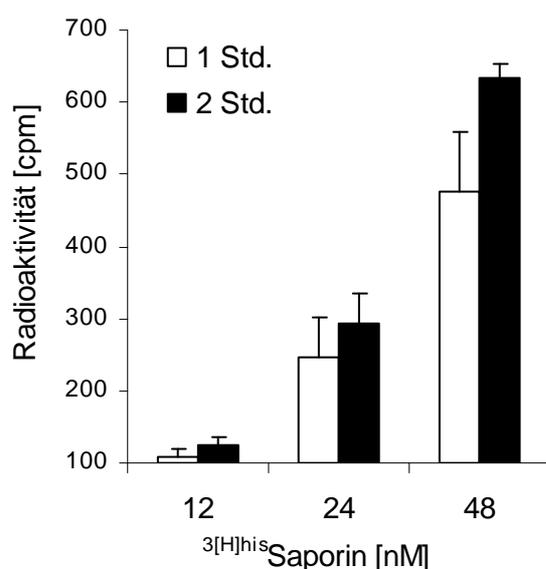


Abb. 22 Optimierung des Endozytose-Assays.

ECV-304-Zellen wurden zuerst mit Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und anschließend mit 12, 24 oder 48 nM $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin für 1 oder 2 Stunden inkubiert. Als Arbeitskonzentration wurden 48 nM gewählt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die zelluläre Radioaktivität bestimmt.

3.3.6.3 ^3H his Saporinendozytose

Nach Ermittlung einer für die Untersuchung der ^3H his Saporinendozytose optimalen Konzentration wurden ECV-304-Zellen über verschiedene Zeiträume (2–240 min) mit ^3H his Saporin (48 nM) +/- Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert (2.6.7.2). Wie aus Abb. 23 ersichtlich, unterschied sich die ^3H his Saporinendozytose in mit Saponinum album behandelten Zellen nicht signifikant von Kontrollzellen, die ausschließlich mit ^3H his Saporin inkubiert wurden. Von einer Saponinum album induzierten Saporinendozytose darf also entgegen früherer Hypothesen (Hebestreit et al., 2005) nicht ausgegangen werden.

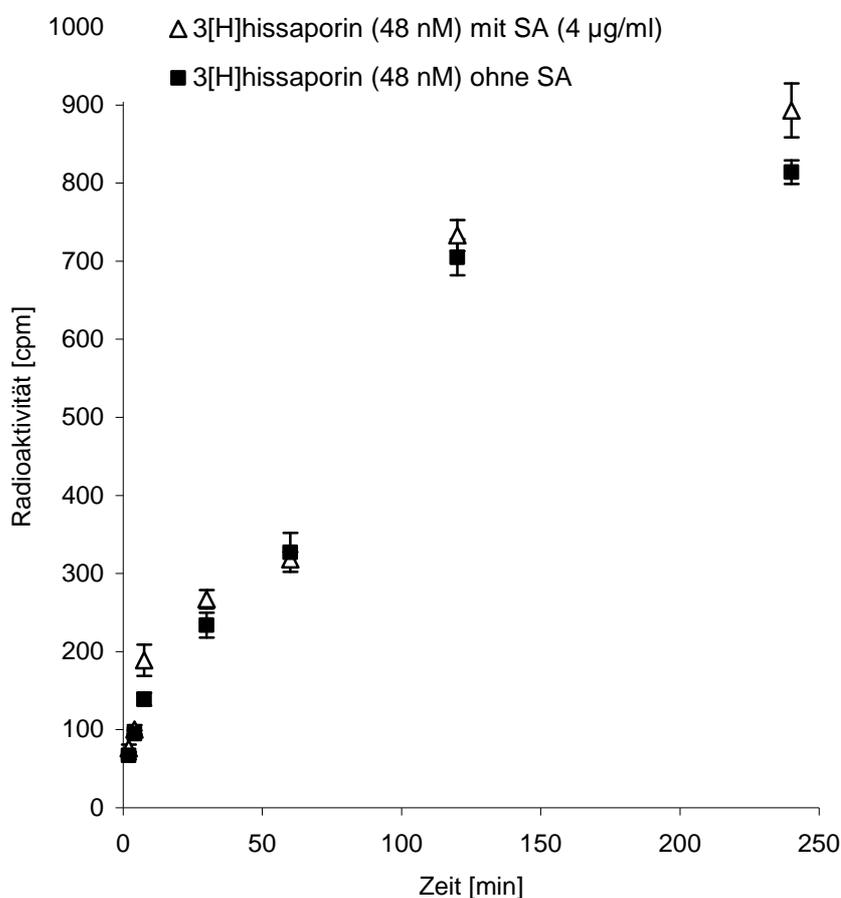


Abb. 23 Endozytose von ^3H his Saporin.

ECV-304-Zellen wurden 2–240 min mit ^3H his Saporin +/- Saponinum album inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und die zelluläre Radioaktivität bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der ^3H his Saporinendozytose festgestellt werden.

3.3.6.4 Exozytose von unmodifiziertem und degradiertem $^3\text{[H]his}$ Saporin

Wie in Abschnitt 3.3.6.3 dargelegt, kann die durch Saponinum album bedingte Zytotoxizitätssteigerung von Saporin nicht auf einer durch Saponinum album ausgelösten Induktion der Toxinendozytose beruhen. Denkbar ist allerdings eine Saponinum album vermittelte Modulation exozytotischer Prozesse von intaktem oder degradiertem $^3\text{[H]his}$ Saporin. Hierfür wurden ECV-304-Zellen 4 Stunden mit 48 nM $^3\text{[H]his}$ Saporin +/- Saponinum album (4 µg/ml) inkubiert und anschließend über Zeiträume unterschiedlicher Dauer (15–240 min) mit frischem Medium bedeckt.

Die entsprechenden Überstände wurden auf 10 % TCA eingestellt und die Radioaktivität in den TCA unlöslichen Anteilen als Maß für die Exozytose von nicht degradiertem $^3\text{[H]his}$ Saporin bestimmt. Umgekehrt diente die im TCA löslichen Anteil detektierte Aktivität als Maß für degradiertes $^3\text{[H]his}$ Saporin (Batelli et al., 2004). Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Exozytose von unmodifiziertem und degradiertem $^3\text{[H]his}$ Saporin festgestellt werden (Abb. 24). Die schon nach 15 min detektierte Radioaktivität von 600–700 cpm deutete auf eine sofort nach Entfernen des $^3\text{[H]his}$ Saporin enthaltenden Mediums einsetzende Exozytose des $^3\text{[H]his}$ Saporins hin. Die in den Überständen bestimmten Aktivitäten sowohl des intakten als auch des degradierten $^3\text{[H]his}$ Saporins nahmen kontinuierlich ab und waren nach 240 min nahezu auf das Hintergrundrauschen gesunken.

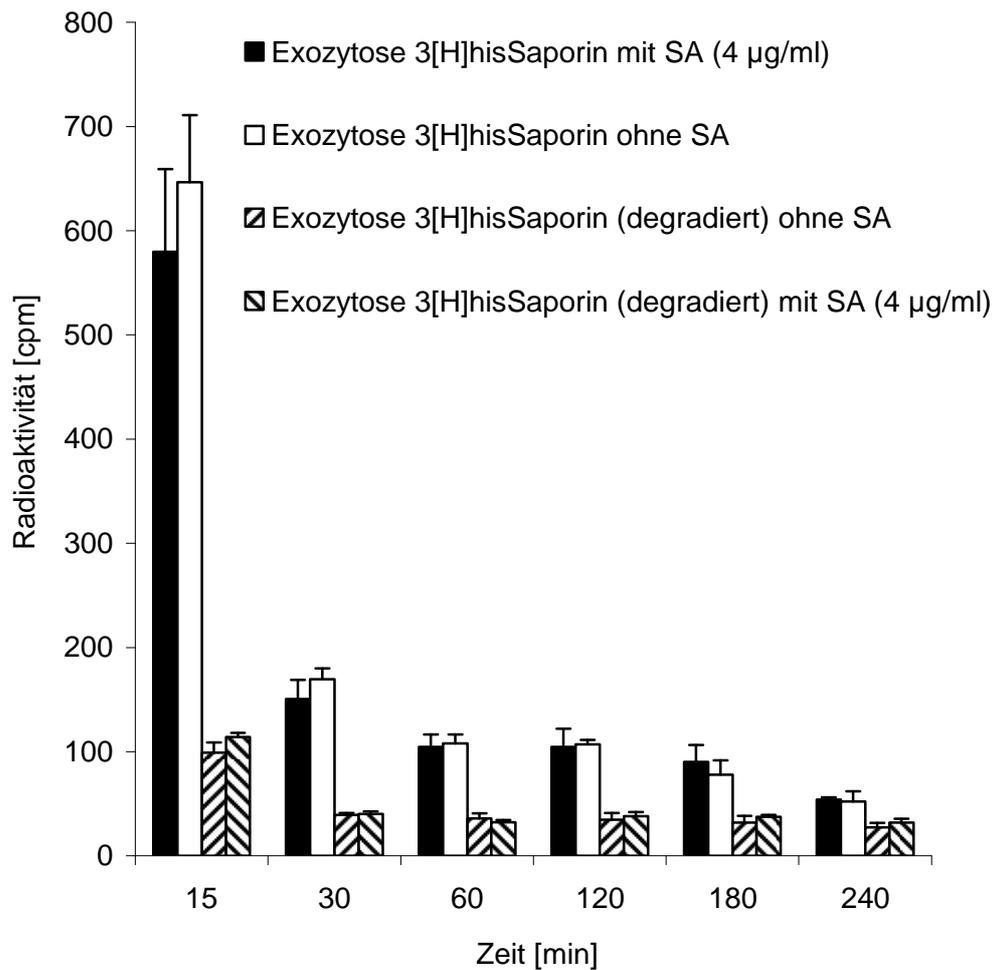


Abb. 24 Exozytose von $^3\text{[H]his}$ Saporin.

ECV-304-Zellen wurden 4 Stunden mit 48 nM $^3\text{[H]his}$ Saporin +/- Saponinum album (4 µg/ml) inkubiert und anschließend für 15, 30, 60, 120, 180 oder 240 min mit frischem Medium bedeckt. Die einzelnen Überstände wurden auf 10 % TCA eingestellt und die Aktivität in den TCA unlöslichen Anteilen als Maß für intaktes und die Aktivität in den TCA löslichen Anteilen wurde als Maß für degradiertes $^3\text{[H]his}$ Saporin bestimmt. In Saponinum album behandelten Zellen konnte bezüglich der Exozytose von intaktem und degradiertem $^3\text{[H]his}$ Saporin kein signifikanter Unterschied zu Kontrollzellen festgestellt werden. Kontrollzellen wurden ausschließlich mit $^3\text{[H]his}$ Saporin inkubiert.

3.3.6.5 Zelluläre Halbwertszeit ($t_{1/2}({}^3\text{H}^{\text{his}}\text{Saporin})$)

Die zelluläre ${}^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporinhalbwertszeit wurde in ECV-304-Zellen nach vierstündiger Inkubation mit ${}^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin +/- Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bestimmt (2.6.7.4). Die Zellen wurden gewaschen und verschiedene Zeiten (0–240 min) mit Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der zellassoziierten Radioaktivität. Mit $y = -90,1 \ln(x) + 798,2$ für ${}^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin +/- Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und $y = -92,5 \ln(x) + 809,6$ für ${}^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin ließ sich eine zelluläre Halbwertszeit $t_{1/2}({}^3\text{H}^{\text{his}}\text{Saporin})$ von 78 min für mit Saponinum album behandelte Zellen und 75 min für Kontrollzellen ableiten (Abb. 25).

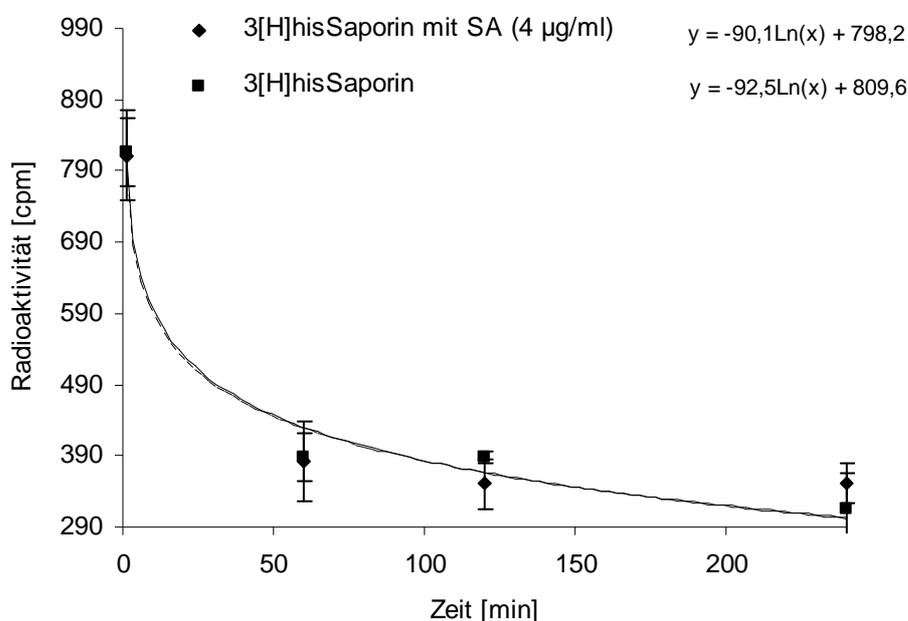


Abb. 25 Zelluläre Halbwertszeit von ${}^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin.

Die $t_{1/2}({}^3\text{H}^{\text{his}}\text{Saporin})$ betrug für Saponinum album (SA) behandelte Zellen 78 min und für Kontrollzellen (ohne SA) 75 min. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten festgestellt werden.

3.3.6.6 Bestimmung von intaktem und degradiertem intrazellulärem $^3\text{[H]his}$ Saporin

Konnte in 3.3.6.4 eine Saponinum album bedingte Modulation der Exozytose von intaktem und degradiertem $^3\text{[H]his}$ Saporin ausgeschlossen werden, sollte in einem weiteren Experiment der Einfluss von Saponinum album auf den direkten intrazellulären Abbau des $^3\text{[H]his}$ Saporins untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden ECV-304-Zellen 30–240 min mit 48 nM $^3\text{[H]his}$ Saporin +/- Saponinum album (4 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und nach den entsprechenden Inkubationszeiten mit Triton-X lysiert. Nach Einstellen der Zelllysate auf 10 % TCA erfolgte die Radioaktivitätsbestimmung in den TCA unlöslichen Anteilen als Maß für intaktes Saporin. Die Aktivitätsbestimmung in den löslichen Anteilen erfolgte als Maß für degradiertes $^3\text{[H]his}$ Saporin (Batelli et al., 2004). Gemäß Abb. 26 folgte der $^3\text{[H]his}$ Saporinabbau in Saponinum album behandelten Zellen sowie Kontrollzellen im betrachteten Zeitraum von 30–240 min einer Kinetik 0. Ordnung, also mit einer konstanten Abbaugeschwindigkeit. Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des intrazellulären Abbaus von $^3\text{[H]his}$ Saporin zwischen Saponinum album behandelten Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden. Ein Saponinum album bedingter, hemmender Einfluss auf den $^3\text{[H]his}$ Saporin-Abbau hätte zu einer signifikanten Abnahme des Anteils an degradiertem $^3\text{[H]his}$ Saporin und umgekehrt zu einer bedeutenden Zunahme an intaktem $^3\text{[H]his}$ Saporin führen müssen. Beides war nicht der Fall.

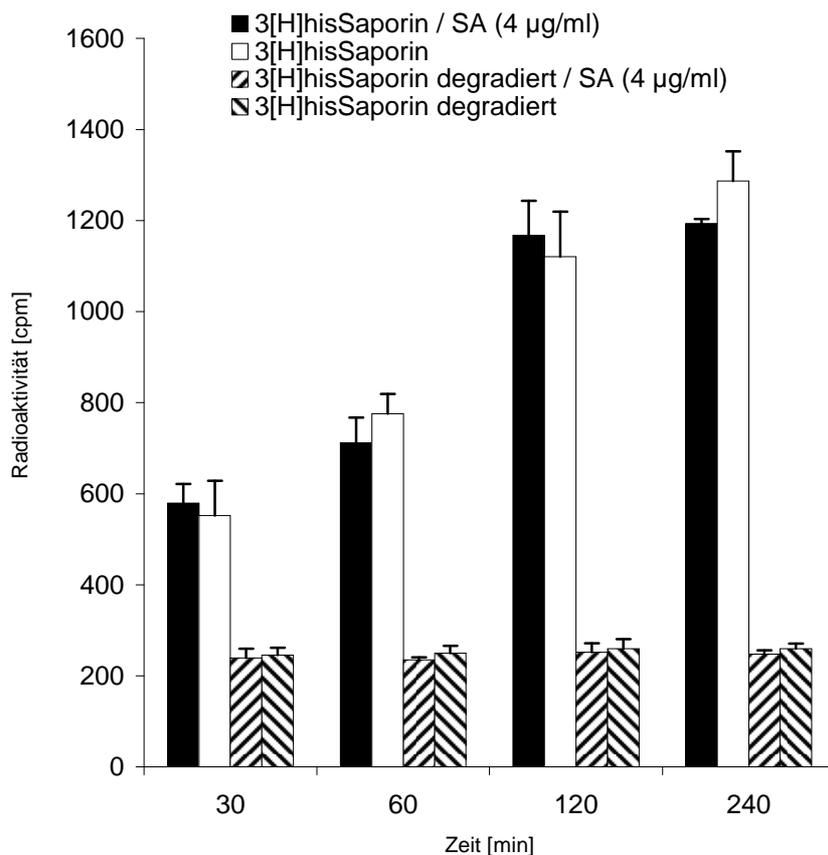


Abb. 26 Intrazelluläre Degradation von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin.

Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporinabbaus zwischen Saponinum album behandelten Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden.

3.3.6.7 Hemmung der Internalisierung von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin bei 4°C

Nach der Untersuchung der Saponinum album bedingten Modulation der $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporinendozytose und Exozytose zielten die weiteren Experimente auf die Charakterisierung des Aufnahmemechanismus von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin in Saponinum album behandelten ECV-304-Zellen. Die ATP-Abhängigkeit der $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporininternalisierung wird in Abb. 27 verdeutlicht. Der unter 3.3.6.3 beschriebene Endozytose-Assay wurde bei 37°C und simultan bei 4°C durchgeführt (2.6.7.6). Die Inkubation bei 4°C führte zu einer starken Hemmung der $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporininternalisierung (Abb. 27)

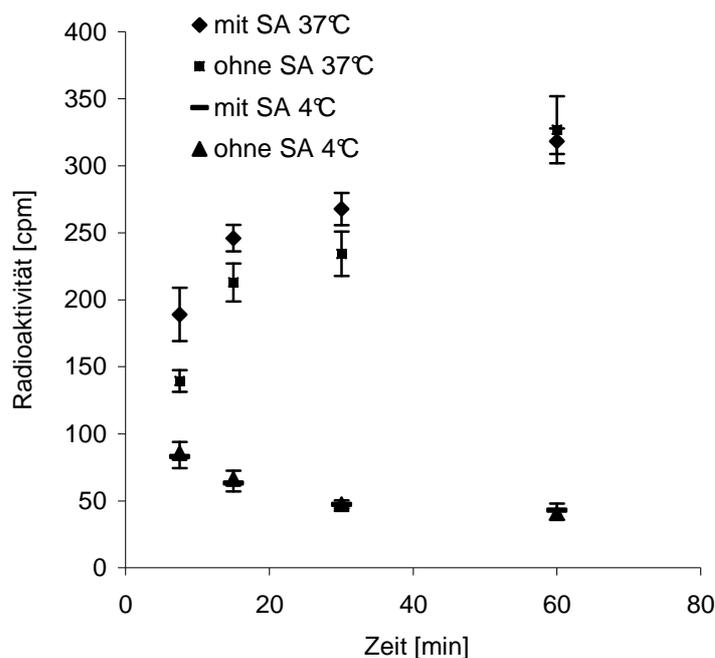


Abb. 27 Temperaturabhängigkeit der ^3H his-Saporinendozytose in Saponinum album (SA) behandelten Zellen und Kontrollzellen (ohne SA).

ECV-304-Zellen wurden 7,5–60 min mit 48 nM ^3H his-Saporin bei 37°C oder 4°C inkubiert. Die Inkubation bei 4°C führte zu einer starken Hemmung der ^3H his-Saporininternalisierung sowohl in SA behandelten als auch in Kontrollzellen.

3.3.6.8 Einfluss verschiedener Hemmstoffe auf die Internalisierung von ^3H his-Saporin

Um den hemmenden Einfluss verschiedener Substanzen auf die Internalisierung des ^3H his-Saporins zu untersuchen, wurden ECV-304-Zellen vor Zugabe des Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und ^3H his-Saporins (48 nM) mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert (2.6.7.7).

Der Effekt des anionischen Heparins wurde nach einer Vorinkubation entsprechender Aliquote ^3H his-Saporin (48 nM) mit unterschiedlichen Konzentrationen Heparin und anschließender Zugabe zu den Zellen untersucht.

Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch zusammengestellt (Tab. 2). Hemmstoffe der Clathrin vermittelten Endozytose (Ivanov, 2008, siehe auch 3.3.5.2) wie Chlorpromazin oder Phenylarsenoxid verursachten eine signifikante Abnahme der ^3H his-Saporinendozytose. Bafilomycin A1, das zu einer signifikanten Abnahme der Saporin/Saponinum album Zytotoxizität führte (3.3.5.2), übte dagegen keinen hemmenden Einfluss auf die ^3H his-Saporinendozytose (48 nM) aus. Der signifikant moderat hemmende Effekt des Heparins (29, 468 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ist eher auf eine unspezifische Interaktion anionischer Gruppen des Heparins mit dem basischen $^{\text{his}}$ Saporin (Korenykh et al., 2007) zurückzuführen. Der gegen den α 2-

Makroglobulin-Rezeptor gerichtete Antikörper Anti- α 2M-R/LRP führte zu keiner Hemmung der $^3\text{[H]his}$ Saporinendozytose. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten (Bagga et al., 2003).

Tab. 2 Hemmstoff bedingte Inhibition der $^3\text{[H]his}$ Saporinendozytose in Saponinum album behandelten ECV-304-Zellen. E_H : Endozytose von $^3\text{[H]his}$ Saporin in mit Hemmstoff und Saponinum album behandelten Zellen. E_K : Endozytose von $^3\text{[H]his}$ Saporin in Kontrollzellen (ohne Hemmstoff)

*signifikant U-Test, $p=0,05$

Hemmstoff		$[E_H (^3\text{[H]hisSaporin}) / E_K (^3\text{[H]hisSaporin})] \times 100$
Bafilomycin A1	200 nM	100 \pm 4
	20 nM	104 \pm 7,7
	2 nM	90 \pm 4,8
Chlorpromazin	60 μM	69* \pm 13
	30 μM	78 \pm 7,2
Phenylarsenoxid	10 μM	26* \pm 12
	5 μM	53* \pm 10
	2,5 μM	51* \pm 10
Anti- α 2M-	1 μg	116 \pm 8
	2 μg	107 \pm 17
	4 μg	95 \pm 9
Filipin III	3 μM	91 \pm 4
	1,5 μM	87 \pm 11
	0,75 μM	97 \pm 7,6
	0,37 μM	99 \pm 14
Amilorid	6 mM	116 \pm 14
	3 mM	101 \pm 19
	1,5 mM	99 \pm 10
	0,75mM	103 \pm 5,5
Heparin	937 $\mu\text{g/ml}$	84 \pm 15
	468 $\mu\text{g/ml}$	74* \pm 24
	234 $\mu\text{g/ml}$	86 \pm 8
	58 $\mu\text{g/ml}$	85 \pm 21
	29 $\mu\text{g/ml}$	76* \pm 4
	15 $\mu\text{g/ml}$	79 \pm 11

3.3.7 Ultrazentrifugation

Wie in 3.3.6.3 – 3.3.6.4 beschrieben führte Saponinum album zu keiner Modulation der Endo- und Exozytose von $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin. Die Beobachtung, dass das den endosomalen Transport hemmende Bafilomycin A1 (Bayer et al., 1998; Bowman et al., 1988) zu einer signifikanten Hemmung der Saporin/Saponinum album Toxizität (3.3.5.2) und nicht zu einer Modulation der $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporinendozytose (3.3.6.8) führte, deutete auf eine verstärkte, Saponin vermittelte Saporinliberation aus endosomalen Vesikeln hin. Deshalb sollte mittels Ultrazentrifugation das Zytosol (Huber et al., 2003 und Pasquali et al., 1997) Saponinum album behandelter und entsprechender Kontrollzellen nach Inkubation mit $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin isoliert werden. Wie aus Abb. 28 ersichtlich, konnte in Saponinum album behandelten Zellen nach Inkubation mit $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin eine signifikant höhere Radioaktivität detektiert werden als in Kontrollzellen, die nicht mit Saponinum album behandelt wurden. Dies stützt die Hypothese einer Saponinum album vermittelten, verstärkten endosomalen Liberation des Saporins aus entsprechenden endosomalen Vesikeln.

Die relative zytoplasmaassoziierte Radioaktivität von 16 % in der Kontrolle (ohne Saponinum album) lässt sich auf die Ruptur endosomaler Membranen während der Aufarbeitung für die Ultrazentrifugation zurückführen. Bei den eingesetzten Konzentrationen (96 nM) wäre auch eine partielle Aufnahme des Saporin ins Zytosol denkbar.

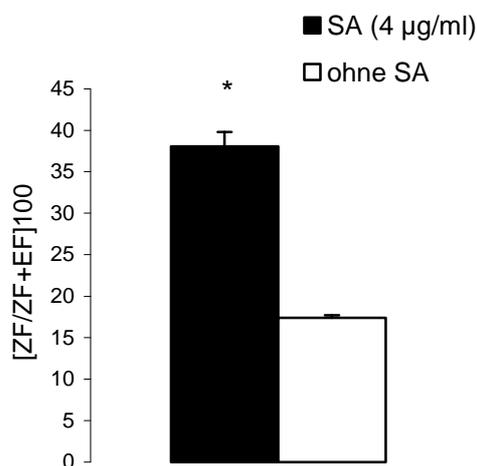


Abb. 28 Zytoplasmaassoziierte Radioaktivität Saponinum album behandelter ECV-304-Zellen.

Nach Inkubation mit Saponinum album respektive $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin (96 nM) wurden die Zellen für die Ultrazentrifugation aufgearbeitet. Anschließend erfolgte die Radioaktivitätsbestimmung der Endosomenfraktion (EF) und Zytoplasmafraktion (ZF). Zur Auswertung wurden die Aktivitätsquotienten (ZF/ZF+EF) gebildet und prozentual ausgedrückt. Die zytoplasmaassoziierte Radioaktivität war in Saponinum album behandelten Zellen signifikant höher als in Kontrollzellen, die nur mit $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin inkubiert wurden. Alle Werte stellen Mittelwerte aus je drei Messungen dar. * signifikant zur Kontrolle (t -Test: $p \leq 0.05$)

3.3.8 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Endosomenintegrität

Die in 3.3.7 aufgestellte Hypothese einer Saponinum album vermittelten Permeabilitäts-erhöhung endosomaler Kompartimente sollte in einem Acridinorange-Endosomen-Integritäts-Assay überprüft werden. Davon ausgehend, dass Saponinum album eine transiente oder permanente Permeabilisierung endosomaler Membranen verursacht, könnte über den durch Membranporen stattfindenden Verlust von Acridinorange(AO)-Molekülen eine Abnahme der AO bedingten Rotfluoreszenz beobachtbar sein. AO akkumuliert nach einem „Ionenfall-Prinzip“ in aciden Zellkompartimenten (Tragagnos & Darzynkiewicz, 1994; Kågedal et al., 2001).

ECV-304-Zellen wurden zuerst mit verschiedenen Konzentrationen Saponinum album und anschließend mit AO inkubiert. Wie Abb. 29 zu entnehmen ist, führte die Inkubation mit Saponinum album zu einer leichten Abnahme der Fluoreszenzintensität durch in aciden Endosomen akkumulierte AO-Moleküle. Der Verlust an AO kann möglicherweise auf die durch Saponinum album verursachte Destabilisierung endosomaler Membranen zurückgeführt werden. Statistisch kann dieser Unterschied jedoch nicht gesichert werden, so dass diese Ergebnisse weniger als Beweis, sondern als ein weiteres Indiz für eine Saponin induzierte Destabilisierung endosomaler Kompartimente angesehen werden muss.

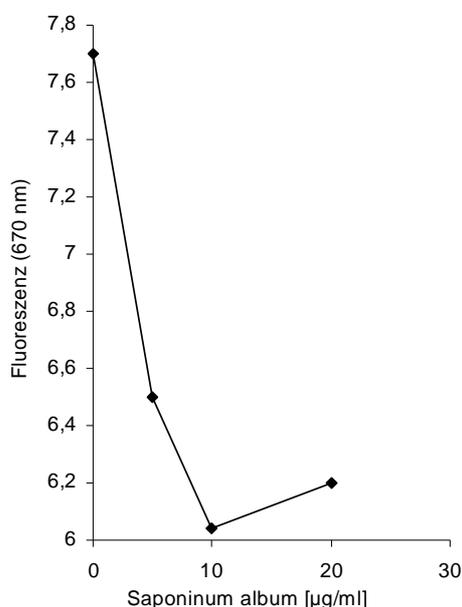


Abb. 29 Untersuchung der Endosomenintegrität.

ECV-340-Zellen wurden mit 0, 5, 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ Saponinum album und Acridinorange (4 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Behandlung mit Saponinum album führte zu einer leichten Abnahme der Acridinorange-Fluoreszenz. Dies ist möglicherweise auf eine Saponin bedingte Destabilisierung endosomaler Kompartimente zurückzuführen, $n=2$.

3.4 ³[H]Saponinum album

3.4.1 Partialsynthese und Testung markierter Saponinum album Derivate

Für die Herstellung eines in der Zellkultur zu verwendenden Saponinum album *Tracers* wurden nach verschiedenen Methoden (2.5.1) Saponinacetylderivate partialsynthetisiert und anschließend die Zytotoxizität in Kombination mit Saporin bestimmt. Anhand der Daten aus erneuten Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde ein hinreichend biologisch aktives Derivat ausgewählt und anschließend näher charakterisiert. Wie aus Abb. 30a ersichtlich, erwies sich eine Acetylierungszeit von 3,5 min als optimal, da die entsprechenden Saponinderivate (8 µg/ml) keine Toxizität und im Vergleich zu den anderen Acetylderivaten die stärkste zytotoxitätssteigernde Wirkung auf Saporin (6 nM) zeigten.

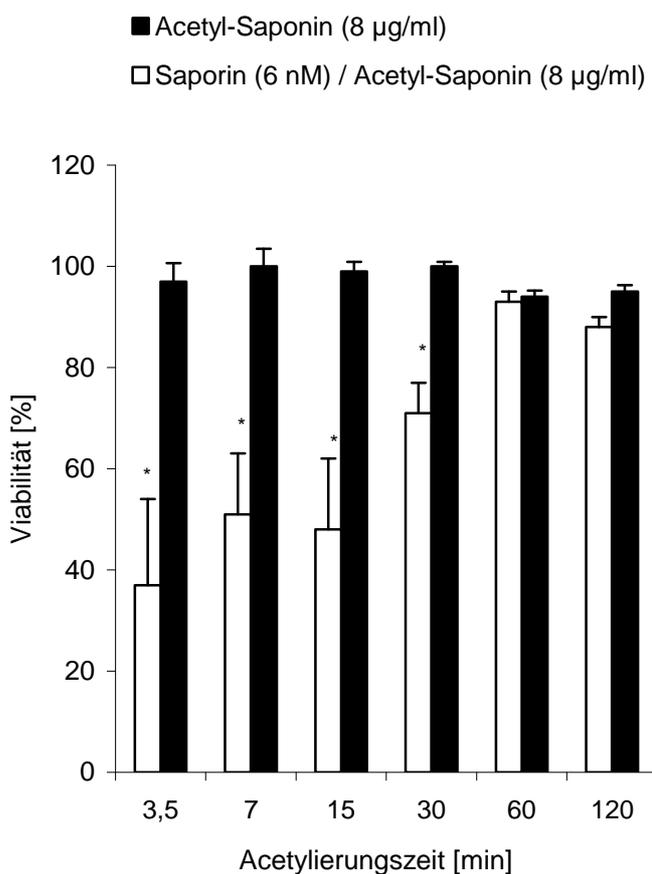


Abb. 30a Abhängigkeit zwischen Acetylierungszeit und Zytotoxizität.

Eine Acetylierungszeit von 3,5 min erwies sich als optimal, da in Kombination mit Saporin (6 nM) der stärkste zytotoxische Effekt auftrat und eine Toxizität der Saponine ausgeschlossen werden konnte. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) bezogen, n=2.

*signifikant zur Kontrolle, p=0,05, U-Test

Für alle weiteren Untersuchungen wurde Saponinum album 3,5 min acetyliert. In Kombination mit Saporin (6 nM) wurde die GI_{50} des entsprechenden Acetyl-Saponinum album gemäß Abb. 30b mit 8,6 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die GI_{50} von Saponinum album in Kombination mit Saporin (6 nM) wurde mit 3,9 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die Markierung des Saponinum album mit Acetyl-Gruppen führte also zu einer um den Faktor 2,6 abnehmenden, zellulären Empfindlichkeit der Saponinum album vermittelten Saporintoxizitätssteigerung. Vergleicht man die Steigungen der beiden Geraden wird ebenfalls ersichtlich, dass es sich um zwei strukturell unterschiedliche Saponine handelt. Hätte eine durch zelluläre Esterasen katalysierte Hydrolyse der Saponin-Acetyl-Ester stattgefunden, hätte die lineare Regression der Zytotoxizitätsdaten von Acetyl-Saponinum album/Saporin und Saponinum album/Saporin zu identischen Geradengleichungen, IC_{50} -Werten und Steigungen der Dosis-Effekt-Kurven führen müssen. Um eine potentielle Verunreinigung mit nicht acetyliertem Saponinum album auszuschließen erfolgte die weitere Charakterisierung mittels HPTLC auf Kieselgel-60-Glasplatten.

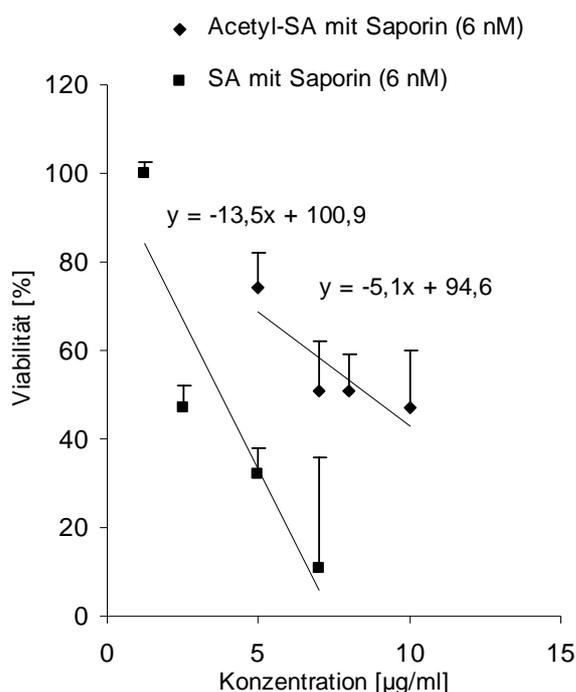


Abb. 30b Bestimmung der GI_{50} von Saponinum album (SA) und Acetyl-Saponinum album (Acetyl-SA) jeweils in Kombination mit Saporin (6 nM) in ECV-304-Zellen.

Die GI_{50} von Acetyl-SA wurde entsprechend der Geradengleichung mit 8,6 $\mu\text{g/ml}$ und von SA mit 3,9 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) bezogen, $n=2$.

*signifikant zur Kontrolle, $p=0,05$, U-Test

Als Elutionsmittel diente die obere Phase einer Essigsäure (99 %)/Aqua dest./Butanol-Mischung (10:40:50). Wie aus Abb. 30c ersichtlich, unterschieden sich die entsprechenden acetylierten Saponinderivate hinsichtlich ihres Elutionsverhaltens in dem verwendeten Fließmittel. Die linke Bahn (a) entspricht dabei der wässrigen Matrix, aus der die acetylierten Saponine extrahiert wurden. Der Vergleich mit den Punkten der darauffolgenden Bahnen (b, c, d) lässt eine nahezu quantitative Extraktion der Acetyl-Saponine aus der Reaktionsmatrix erkennen. Dabei entsprechen die Bahnen b, c und d Saponinderivaten, die 3,5 min (b und d) oder 7 min (c) acetyliert wurden. Das im Vergleich zu Saponinum album (Bahn e) verursachte „Schmierer“ der acetylierten Saponinderivate über die gesamte Laufstrecke ist ein typisches Kennzeichen der Acetyl-Saponine und wirkte sich nicht nachteilig auf die Auswertung aus, da eine Verunreinigung der Acetyl-Saponine mit nicht modifiziertem Saponinum album eindeutig ausgeschlossen werden konnte (vgl. Bahnen a-d). Dies erübrigte eine Fließmitteloptimierung.

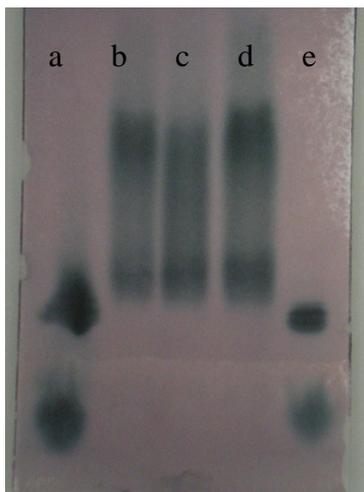


Abb. 30c HPLC-Chromatogramm verschiedener Saponinderivate.

Saponinum album wurde 3,5 min (Bahn b und d) oder 7 min (Bahn c) acetyliert und die entsprechenden Acetyl-Derivate auf Kieselgel-60-Platten aufgetragen. Bahn e entspricht Saponinum album und Bahn a der Reaktionsmatrix, aus der die Acetyl-Saponine extrahiert wurden. Eine Verunreinigung der Acetyl-Derivate durch Saponinum album konnte ausgeschlossen werden (vgl. Bahnen b,c,d, mit e).

3.4.2 Spezifische Aktivität von ^3H Saponinum album

Nach Optimierung der für die Markierung notwendigen Acetylierungszeit und Testung der entsprechenden Saponinderivate erfolgte die Radiosynthese des ^3H Saponinum album mit tritiummarkiertem Acetanhydrid (25 mCi). Die Radioaktivität von jeweils 6,7; 12,5; 25 und 50 μg ^3H Saponinum album wurde mittels Flüssigkeitsszintillation (2.6.1) bestimmt. In Abb. 31 ist gegen die entsprechenden Massen die von ihnen ausgehende Radioaktivität aufgetragen. Es konnte eine spezifische Aktivität von 36,8 Mcpm/mg ^3H Saponinum album errechnet werden.

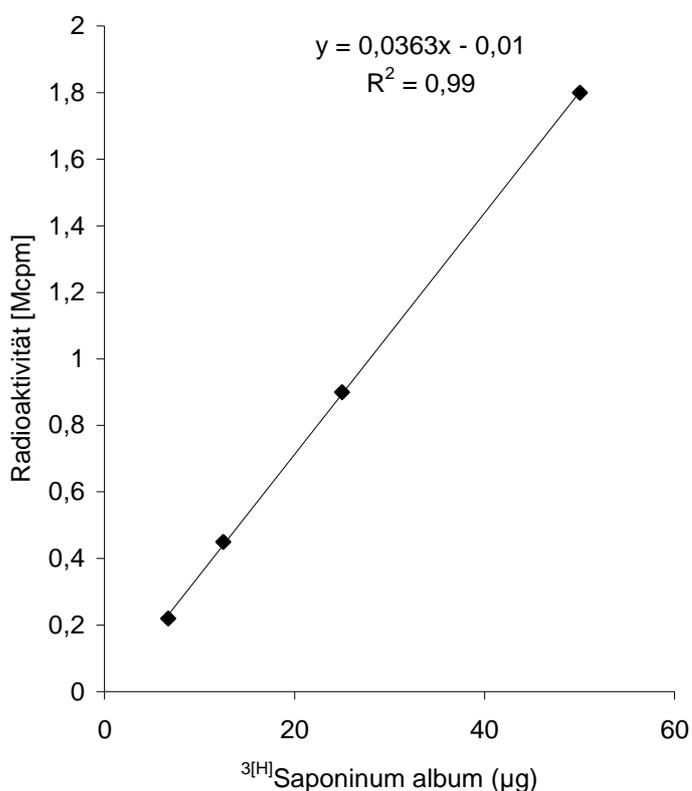


Abb. 31 Bestimmung der spezifischen Aktivität von ^3H Saponinum album.

Nach Synthese des ^3H Saponinum album und Aktivitätsbestimmung von 6,7; 12,5; 25 und 50 μg ergab sich der oben dargestellte lineare Zusammenhang zwischen Masse (μg Saponin) und Radioaktivität. Die spezifische Aktivität konnte zu 36,8 Mcpm/mg errechnet werden.

3.4.3 *In vitro* Untersuchungen mit ^3H Saponinum album

3.4.3.1 Zeitabhängige Aufnahme von ^3H Saponinum album

Nach Inkubation von ECV-304-Zellen mit ^3H Saponinum album ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) für 2,5–360 min erfolgte die Bestimmung der zellassozierten Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillation. Die Inkubation mit ^3H Saponinum album führte über einen Zeitraum von 60 min zu einer kontinuierlichen Aufnahme von ^3H Saponinum album. Nach 60 min trat Sättigung ein, die auch nach einer verlängerten Inkubation von bis zu 360 min nicht aufgehoben werden konnte.

Wahrscheinlich war nach 60 min ein *steady state* erreicht, in dem die aufgenommene Menge an Saponin der abgegebenen entsprach (Abb. 32).

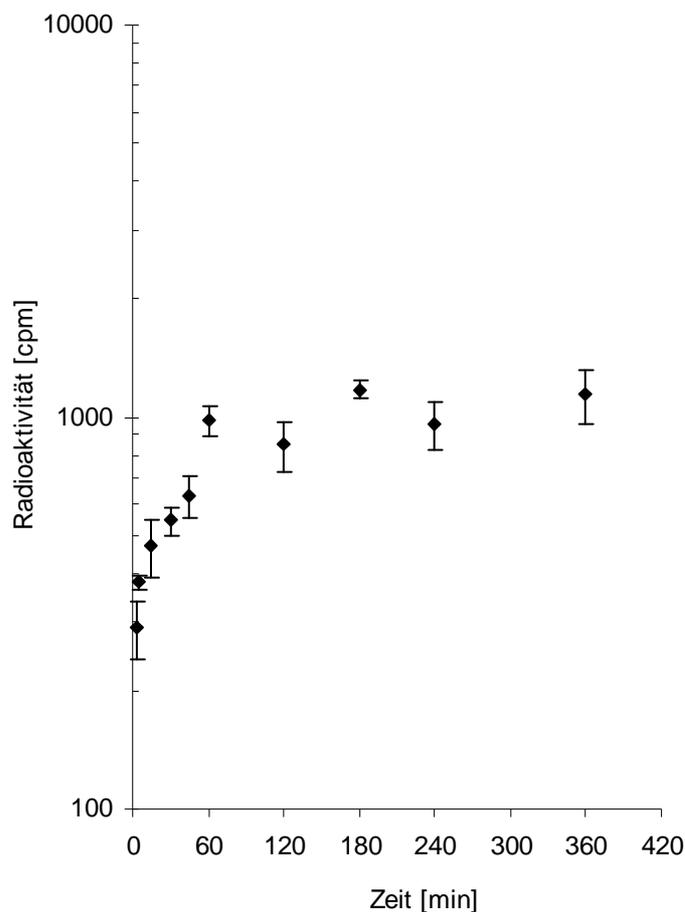


Abb. 32 Zeitabhängige Aufnahme von ^3H Saponinum album.

Nach Inkubation von ECV-304-Zellen mit ^3H Saponinum album ($10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) für 2,5–360 min wurde die zellassozierte Radioaktivität bestimmt. Bis zu 60 min erfolgte eine zeitabhängige Aufnahme von ^3H Saponinum album in die Zellen, gefolgt von einer Sättigung. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 5 Einzelwerten dar, $n=2$.

3.4.3.2 Konzentrationsabhängige Aufnahme von ^3H Saponinum album

ECV-304-Zellen wurden mit 1–40 $\mu\text{g/ml}$ für 1 Stunde inkubiert und anschließend mittels Flüssigkeitsszintillation analysiert (2.6.1).

Es wurde eine konzentrationsabhängige, möglicherweise diffusionsbedingte Einlagerung von ^3H Saponinum album in die Zellen beobachtet (Abb. 33).

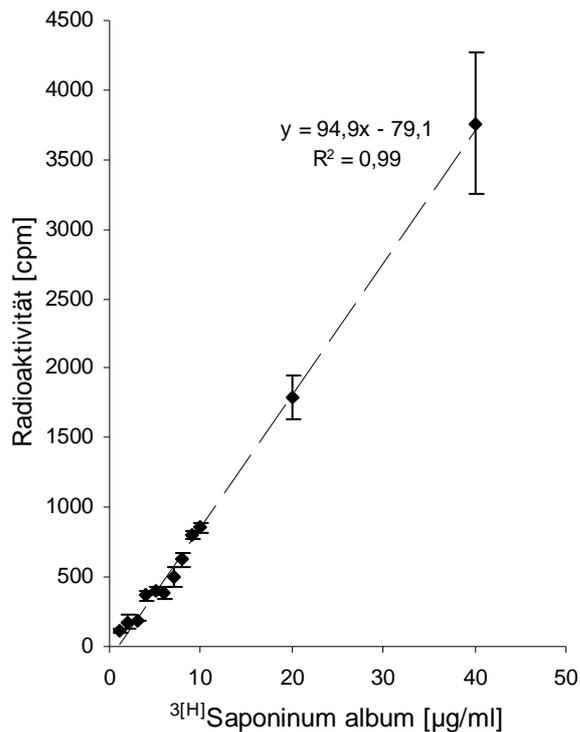


Abb. 33 Konzentrationsabhängige Einlagerung von ^3H Saponinum album.

ECV-304-Zellen wurden mit 1–40 $\mu\text{g/ml}$ für 1 Stunde inkubiert und anschließend mittels Flüssigkeitsszintillation analysiert. Die Aufnahme von ^3H Saponinum album in ECV-304-Zellen war konzentrationsabhängig. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 5 Einzelwerten dar, $n=2$.

3.4.3.3 Konkurrenz von ^3H Saponin album

Um die Interaktion zwischen ^3H Saponin album und potentiellen membranständigen Bindungsstellen näher zu charakterisieren, sollte in einem Konkurrenz-Assay die Bindungsspezifität der nach einer Stunde gebundenen ^3H Saponin album Moleküle bestimmt werden. Dabei wurden die nach einstündiger Inkubation mit Saponin gesättigten Zellen sequentiell mit jeweils verschiedenen konzentrierten Saponin album Lösungen (entweder aufsteigend von 0–40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder absteigend von 40–0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) überschichtet. Anschließend wurde die Radioaktivität in allen Lösungen und den verbleibenden Zellmonolayern bestimmt. Die durch die Konzentrationsreihe 40–0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdrängten Anteile an ^3H Saponin album hätten bei einer spezifischen, rezeptorartigen Bindung von ^3H Saponin album signifikant höher sein müssen, da die Lösungen entsprechend ihrem Konzentrationsgefälle eine höhere Konkurrenzaktivität besaßen. Um eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Datensätze zu ermöglichen, wurden alle Werte jeweils auf die zellassoziierte Restradioaktivität bezogen, ausgedrückt als $A_{\text{Überstand}} (A_{\text{Ü}}) / A_{\text{Zellen}} (A_{\text{Z}})$.

Wie in Abb. 34 dargestellt, unterschieden sich die Quotienten $A_{\text{Überstand}} (A_{\text{Ü}}) / A_{\text{Zellen}} (A_{\text{Z}})$ der Konzentrationsreihen 40–0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 0–40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht signifikant. Sofern eine Bindung des ^3H Saponin album stattfindet, muss von einer unspezifischen durch Saponin album nicht kompetitiven Bindung ausgegangen werden.

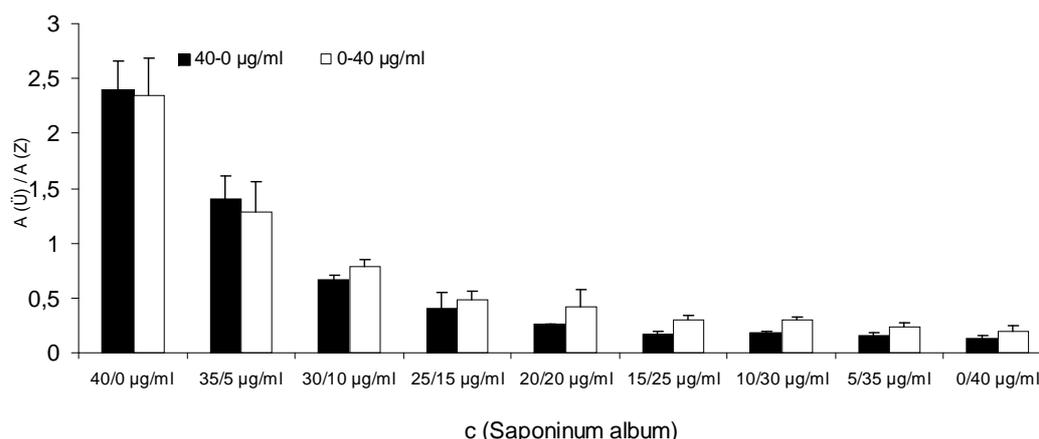


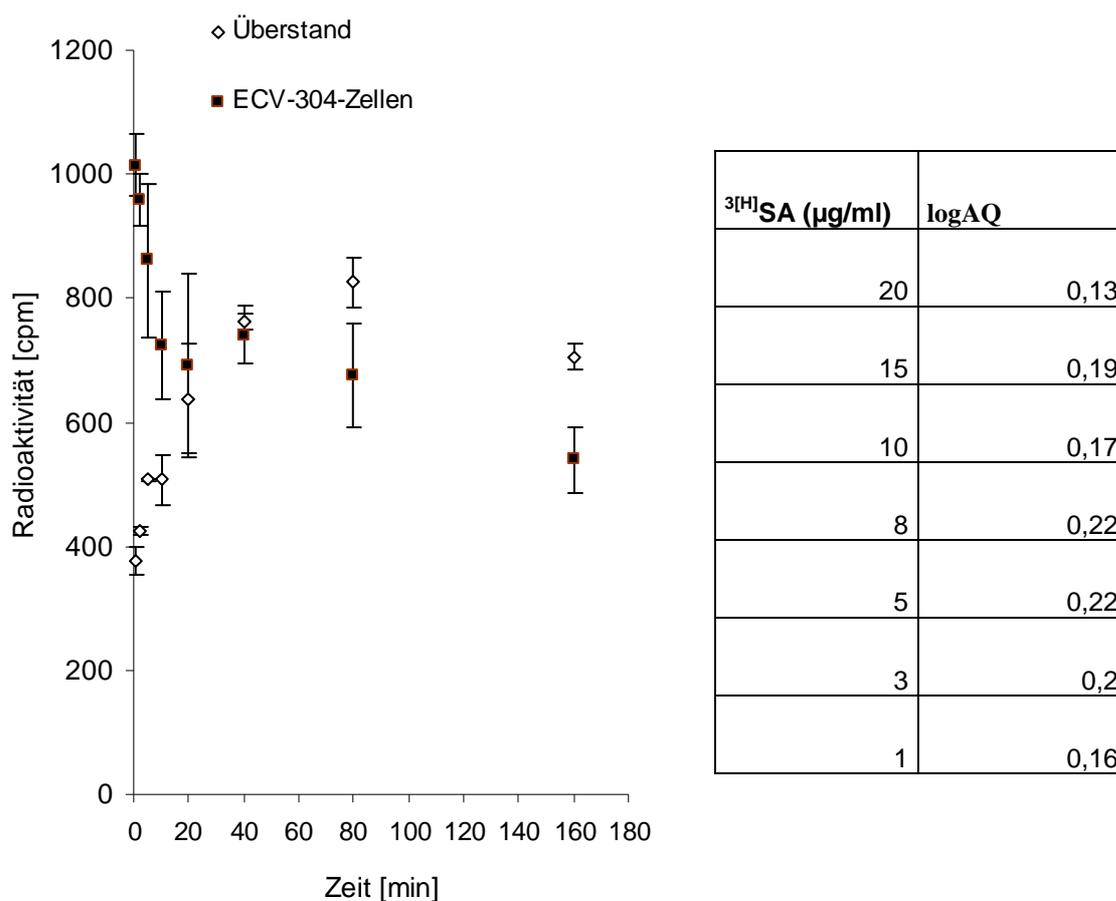
Abb. 34 Konkurrenz von ^3H Saponin album.

ECV-304-Zellen wurden 60 min mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^3H Saponin album inkubiert, gewaschen und anschließend mit Lösungen steigender (0–40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder abnehmender (40–0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Konzentration an Saponin album überschichtet. Alle Werte wurden auf die jeweilige, zellassoziierte Restradioaktivität bezogen, ausgedrückt als $A_{\text{Überstand}} (A_{\text{Ü}}) / A_{\text{Zellen}} (A_{\text{Z}})$. Hinsichtlich der durch die verschiedenen Konzentrationsreihen verdrängten Anteile an ^3H Saponin album konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, $n=2$.

3.4.3.4 Liberation von ^3H Saponinum album aus ECV-304-Zellen

Wie in Abschnitt 3.4.3.1 dargelegt fand nach einstündiger Inkubation mit ^3H Saponinum album keine weitere Aufnahme von ^3H Saponinum album in die Zellen statt. Um eine aus den Zellen stattfindende Liberation von Saponinmolekülen zu untersuchen, wurden ECV-304-Zellen durch einstündige Inkubation mit ^3H Saponinum album gesättigt und anschließend 2,5–160 min mit FCS haltigem PBS überschichtet. Unmittelbar nach Entfernen des ^3H Saponinum album enthaltenden Mediums fand eine Saponinliberation in die entsprechenden Zellkulturüberstände statt (Abb. 35a). Dabei nahm die zellassoziierte Radioaktivität (A_{Zellen}) ab und die in den zugehörigen Zellkulturüberständen detektierte entsprechend zu ($A_{\text{Überstand}}$). Nach 40 min galt näherungsweise $(A)_{\text{Zellen}} = (A)_{\text{Überstände}}$. Im weiteren Verlauf wurde mehr Saponin aus den Zellen in die Überstände verteilt. Nach 80 min war ein Gleichgewicht erreicht, das sich über einen Zeitraum bis 120 min durch einen nahezu konstanten Aktivitätsquotienten $\text{AQ} = (A)_{\text{Überstand}} / (A)_{\text{Zellen}}$ auszeichnete.

Der Verteilungskoeffizient $P = [C]_{\text{oct}} / [C]_{\text{H}_2\text{O}}$ wird in der Toxikologie zur Beurteilung der Lipophilie eines Stoffes herangezogen und stellt das Verhältnis der Stoffkonzentration in einer wässrigen ($C_{\text{H}_2\text{O}}$) und einer organischen Phase dar (C_{oct}). P wird normalerweise als $\log P$ ausgedrückt und stellt eine stoffspezifische Verteilungskonstante dar. Der in Analogie zu $\log P$ gebildete $\log \text{AQ}$ war für alle untersuchten Konzentrationen nahezu konstant (Abb. 35b).



a

b

Abb. 35 Liberation von ^3H Saponinum album (^3H SA).

(a) Nach Inkubation der ECV-304-Zellen mit ^3H Saponinum album für 60 min und Überschichten mit PBS erfolgte die Radioaktivitätsbestimmung nach 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 oder 160 min sowohl in den Zellen als auch in den Überständen. Es fand eine zeitabhängige Rückverteilung von ^3H Saponinum album in die entsprechenden Überstände statt. Nach 80 min war ein Distributionsgleichgewicht erreicht. (b) ECV-304-Zellen wurden mit 1, 3, 5, 8, 10, 15 oder 20 $\mu\text{g/ml}$ ^3H Saponinum album für eine Stunde inkubiert und 80 min mit PBS überschichtet. Anschließend erfolgte die Aktivitätsbestimmung in den Überständen und den entsprechenden Zellmonolayern. Der logAQ (siehe Text) war für jede Konzentration nahezu konstant. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 5 Einzelwerten dar, $n=2$.

3.4.3.5 Erschöpfende Liberation von ^3H Saponinum album aus ECV-304-Zellen

Wie in Abschnitt 3.4.3.4 dargelegt, stellte sich ein Saponinverteilungsgleichgewicht zwischen Überstand und Zellen ein, das sich über einen Konzentrationsbereich von 1–20 $\mu\text{g/ml}$ durch nahezu konstante logAQ-Werte auszeichnete.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Zellen eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen (4–20 $\mu\text{g/ml}$) ^3H Saponinum album inkubiert, gewaschen, 80 min mit FCS

haltigem PBS überschichtet, abermals gewaschen und anschließend 6-mal mit jeweils 1 ml PBS (10 % FCS) für jeweils 10 min inkubiert. Durch die ständige Erneuerung (alle 10 min) des Puffers sollte entsprechend dem Verteilungsgleichgewicht $AQ = (A)_{\text{Überstand}} / (A)_{\text{Zellen}}$ eine kontinuierliche Störung der Gleichgewichts und somit Rückverteilung von Saponinmolekülen in den Überstand erreicht werden. Die in den einzelnen 1-ml-Überständen detektierte Radioaktivität nahm über einen Gesamtzeitraum von 60 min kontinuierlich auf teilweise nicht signifikante Werte ab (siehe Abb. 36). Die einzelnen 1-ml-Überstände sind in Abb. 36 von 1 bis 6 nummeriert.

Ein komplettes Auswaschen des von den Zellen aufgenommenen ^3H Saponinum album war allerdings nicht möglich, da nach Beendigung des Waschzyklus nach 60 min weiterhin eine beträchtliche, zellassozierte Aktivitätsmenge (rechte Balken in Abb. 36) detektiert werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass entweder ein signifikanter Anteil an ^3H Saponinum album internalisiert und so intrazellulär akkumuliert oder auf Grund der membranaktiven Eigenschaften von Saponinen ein Teil des ^3H Saponinum album fest in die Zellmembran eingelagert wurde. In beiden Fällen wäre ein Auswaschen des gebundenen und aufgenommenen Anteils nicht mehr möglich.

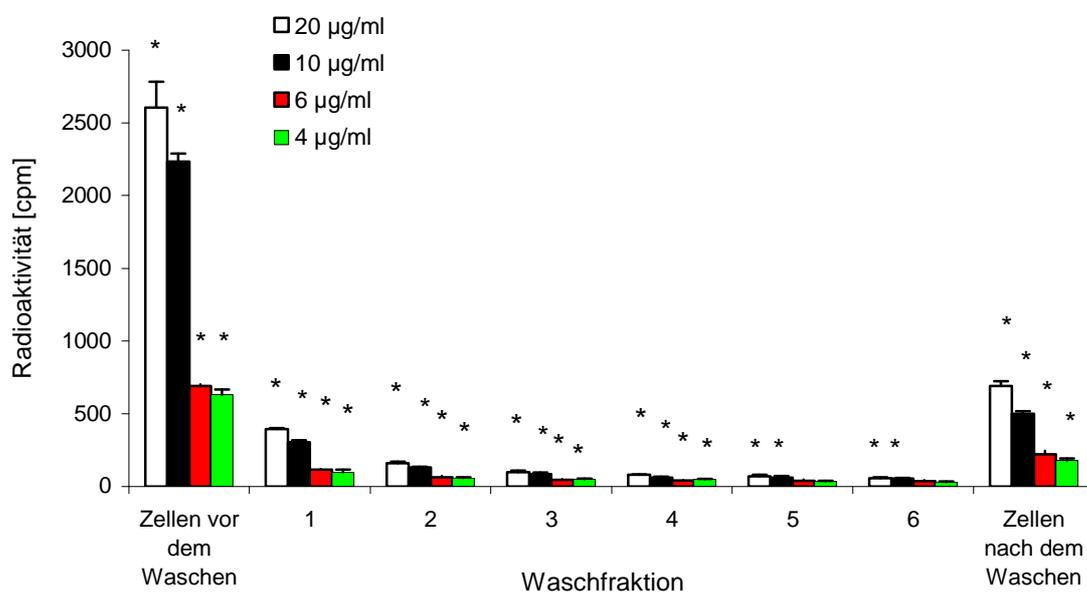


Abb. 36 Erschöpfende Liberation von ^3H Saponinum album aus ECV-304-Zellen.

ECV-304-Zellen wurden 1 Stunde mit 4–20 µg/ml ^3H Saponinum album inkubiert, 80 min mit PBS überschichtet und anschließend 6-mal mit PBS (1 ml) für jeweils 10 min inkubiert. Die Radioaktivität nahm in den Überständen (nummeriert von 1 bis 6) kontinuierlich auf teilweise nicht signifikante Werte ab. Die Restaktivität in den Zellen (rechte Balken) war von der zellassozierten Saponinmenge vor dem Waschzyklus abhängig (linke Balken). Alle Werte stellen Mittelwerte aus 5 Einzelwerten dar, n=2.

*signifikant zur Kontrolle (ohne ^3H Saponinum album), p=0,05, U-Test

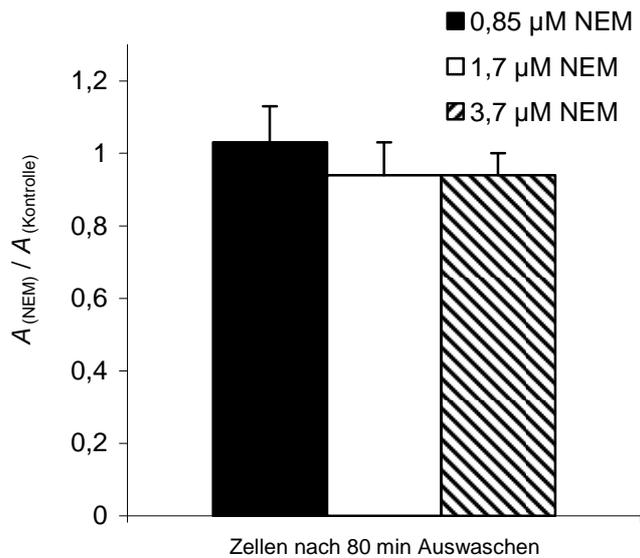
3.4.3.6 Einfluss von N-Ethylmaleimid auf die Aufnahme von ^3H Saponinum album

Um den Einfluss möglicher Transportproteine auf die Aufnahme des ^3H Saponinum album näher zu charakterisieren, wurde das unspezifische SH-Gruppen-Reagenz N-Ethylmaleimid (NEM) verwendet. Insbesondere *Flippasen* könnten hierbei als Transportproteine eine Rolle spielen. Dies wird für andere Substanzen wie Anthrazykline diskutiert (Regev & Eytan, 1997). *Flippasen* sind natürlicherweise am Phospholipid-flipping zwischen äußerer und innerer Membranhälfte beteiligt und neben den sogenannten *Floppasen* und *Scramblasen* an der Aufrechterhaltung der Transbilayer-Lipid-Asymmetrie beteiligt (Daleke, 2003). Bedingt durch diese Asymmetrie unterscheiden sich äußere und innere Membran in ihrer Lipid- und Cholesterol-Zusammensetzung (Daleke, 2003).

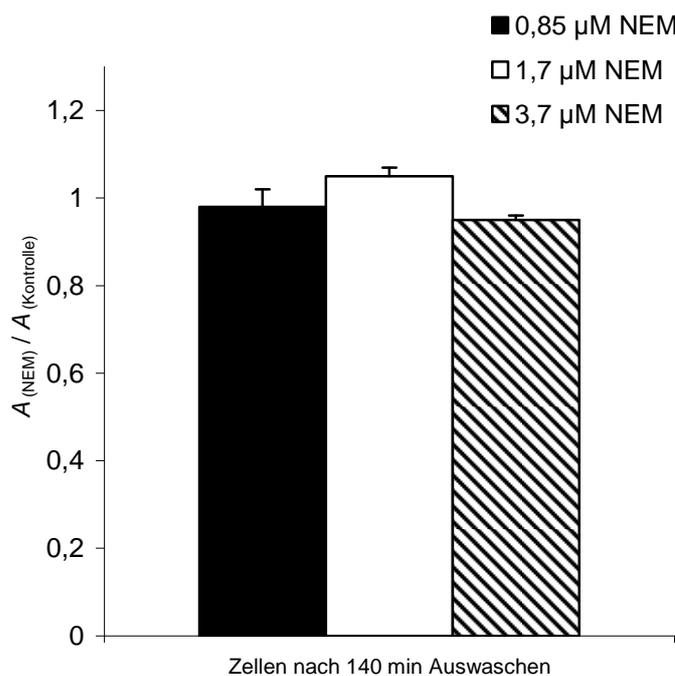
So finden sich Phosphatidylcholin und Sphingomyelin hauptsächlich in der äußeren und Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin hauptsächlich in der inneren Schicht der Plasmamembran. Die Aufrechterhaltung dieser Asymmetrie ist für die Membranhomöostase essentiell (Daleke, 2003). Welchen Einfluss die unterschiedlichen Zusammensetzungen der beiden Membranschichten auf die Aufnahme und das Bindungsvermögen des festgebundenen Saponinanteils (siehe 3.4.3.5) ausüben, sollte durch gezielte Störung der Lipid-Asymmetrie untersucht werden. Da NEM Flippasen inaktiviert (Boon et al., 2003) wurden ECV-304-Zellen entweder mit (0,85–3,7 μM) oder ohne (Kontrolle) NEM 30 min vorinkubiert.

Die eingesetzten Konzentrationen wurden im Vorfeld mittels LDH-Assay bestimmt und zeigten keine Zytotoxizität. Nach Inkubation mit ^3H Saponinum album (10 $\mu\text{g/ml}$, 1 Stunde) wurde 80 min wie oben beschrieben (3.4.3.5) mit PBS überschichtet und die zellassoziierte Radioaktivität in NEM behandelten Zellen und Kontrollzellen (ohne NEM) bestimmt. Zur Auswertung wurden die Quotienten aus den Aktivitäten in NEM behandelten und Kontrollzellen gebildet ($A_{(\text{NEM})}/A_{(\text{Kontrolle})}$). Hätte NEM einen Einfluss auf die Insertion von ^3H Saponinum album ausgeübt, hätte dieser Quotient weit unter 1 liegen müssen. Wie aus Abb. 37a ersichtlich, war dies nicht der Fall.

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen wie oben beschrieben mit ^3H Saponinum album inkubiert, 80 min mit PBS überschichtet, anschließend jedoch 6-mal mit je 1 ml PBS (10 % FCS) für je 10 min überschichtet. Danach erfolgte die Bestimmung der zellulären Radioaktivität (Abb. 37b). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie oben beschrieben. Wie aus Abb. 37b ersichtlich, zeigte NEM keinen hemmenden Einfluss auf die Insertion von ^3H Saponinum album. Die Lipid-Asymmetrie der Plasmamembran spielt bei der Aufnahme von Saponinum album offensichtlich keine Rolle.



a



b

Abb. 37 Einfluss von N-Ethylmaleimid auf die Insertion von ^3H Saponinum album.

ECV-304-Zellen wurden 30 min mit NEM (0,85–3,7 µM) oder ohne NEM (Kontrollzellen) vorinkubiert und mit 10 µg/ml ^3H Saponinum album gesättigt. Danach wurde ^3H Saponinum album entweder 80 min (a) oder 140 min (b) ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der zellassozierten Radioaktivität. NEM übte keinen Einfluss auf die ^3H Saponinum album Aufnahme aus. $A_{(NEM)}$ = Radioaktivität in NEM behandelten Zellen. $A_{(Kontrolle)}$ = Radioaktivität in Kontrollzellen (ohne NEM). Alle Werte stellen Mittelwerte aus 5 Einzelwerten dar, n=2.

3.4.3.7 Prüfung auf lineare Zusammenhänge

Zwischen den nach 80 min Auswaschen erhaltenen, zellassozierten Radioaktivitätswerten (3.4.3.4) und den initialen ^3H Saponinum album Konzentrationen, mit denen die Zellen 1 Stunde inkubiert wurden (3.4.3.2), bestand nach Abb. 38 ein linearer Zusammenhang (Zellen, 80 min). Dasselbe wurde für Zellen festgestellt, die nach dem 80 min andauerndem Überschichten mit PBS weitere 60 min mit frischen PBS ausgewaschen (3.4.3.5) wurden (Zellen, 140 min).

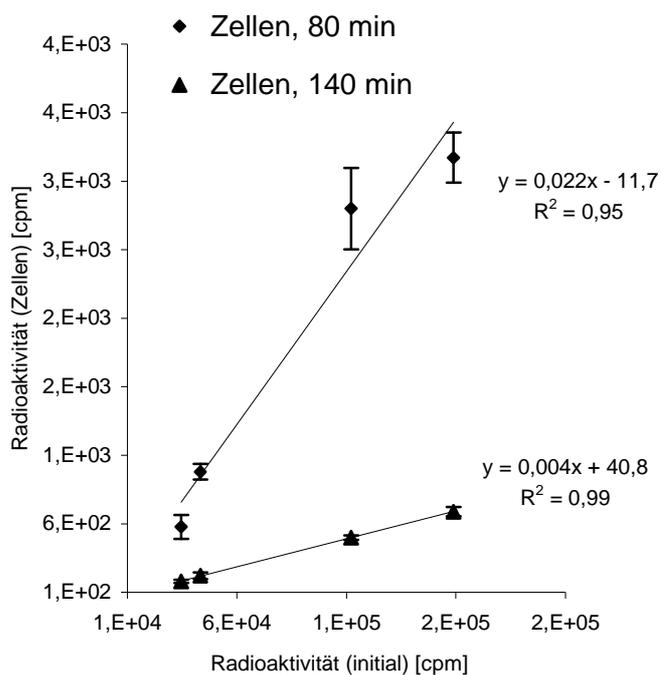


Abb. 38 Prüfung auf Linearität.

Die nach 80 und 140 min Spülen detektierte, zellassozierte Radioaktivität stand in linearer Beziehung zu der initialen Saponinkonzentration, mit der die Zellen 1 Stunde inkubiert wurden.

3.5 Liberations – und Zytotoxizitätsversuche mit Saponinum album

Wie in Abschnitt 3.4.3.5 gezeigt, blieb ein Teil des nach Inkubation mit ^3H Saponinum album in die Zellen eingelagerten Anteils dauerhaft gebunden.

Dieser gebundene Anteil war für die Auslösung der Saponin vermittelten, zytotoxizitätssteigernden Wirkung auf Saporin ausreichend. In Abb. 39 wurden ECV-304-Zellen 1 Stunde mit nicht modifiziertem Saponinum album (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 60 inkubiert und anschließend entsprechend den mit ^3H Saponinum album durchgeführten Versuchen für insgesamt 140 min mit PBS (10 %) FCS (siehe 3.4.3.5) ausgewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Saporins. Dann wurde für weitere 72 Stunden inkubiert und die Viabilität bestimmt. In Kontrollzellen erfolgte keine Auswaschung des Saponinum album. Diese wurden durchgehend mit Saponinum album/Saporin inkubiert. Das Auswaschen von Saponinum album verursachte keine Zytotoxizitätsabschwächung (Abb. 39).

Es kann also von einer lang andauernden, Saponin bedingten zellulären Sensibilisierung gegenüber Saporin ausgegangen werden.

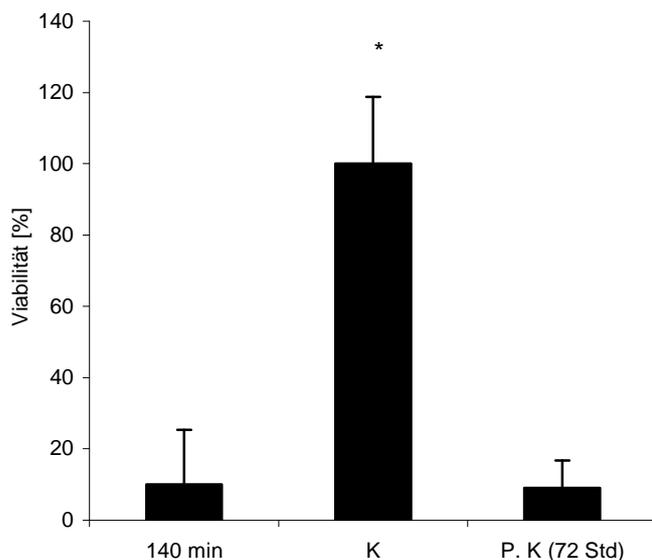


Abb. 39 Liberations- und Zytotoxizitätsversuche mit Saponinum album.

ECV-304-Zellen wurden 60 min mit 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Saponinum album (SA) inkubiert. SA wurde anschließend insgesamt 140 min ausgewaschen. Danach erfolgte die Saporinzugabe (6 nM). Als Positivkontrolle wurde SA (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/Saporin (6 nM) (P. K) verwendet. Kontrollzellen (K) wurden demselben Waschprozedere unterworfen wie SA behandelte. Die Menge des fest gebundenen Anteils von SA (140 min) war für die Auslösung der zytotoxizitätssteigernden Wirkung auf Saporin ausreichend. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Messwerten dar, n=2.

*signifikant zur Positivkontrolle, p=0,05, U-Test

3.6 Saponinum album

Wie unter 1.1 beschrieben, stellt Saponinum album ein komplex zusammengesetztes im DAB 7 monographiertes Gemisch aus Triterpensaponinen dar, das aus *Gypsophila paniculata* L. gewonnen wird. Die chromatographische Auftrennung des Saponinrohgemisches ist material-, zeit- und kostenintensiv.

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten phytochemischen Untersuchungen des Saponinum album war nicht die Isolierung sämtlicher Einzelkomponenten, sondern die gezielte Separation eines - vor allem für die zielgerichtete Tumorthherapie (Bachran et al., 2009) notwendigen - Reinsaponins. Sämtliche bis dato durchgeführten Untersuchungen zur Saponin vermittelten, toxizitätsstimulierenden Wirkung Saponin basierter chimärer Toxine wurden mit dem Rohsaponingemisch Saponinum album durchgeführt (Bachran et al., 2009).

3.6.1 ESI-TOF-MS

Um sich einen Überblick über die in Saponinum album vorkommenden Komponenten zu verschaffen, wurde das Rohsaponingemisch mittels ESI-TOF-MS analysiert.

Fragmentierungsreaktionen können bei dieser Vorgehensweise vernachlässigt werden. Über die Detektion der Molekularionen konnte ein repräsentatives Bild des Inhaltsspektrums von Saponinum album erzeugt werden (siehe Abb. 40). Für alle m/z wurden Signale detektiert. Dies unterstreicht die außerordentliche Komplexität des Saponinrohgemisches.

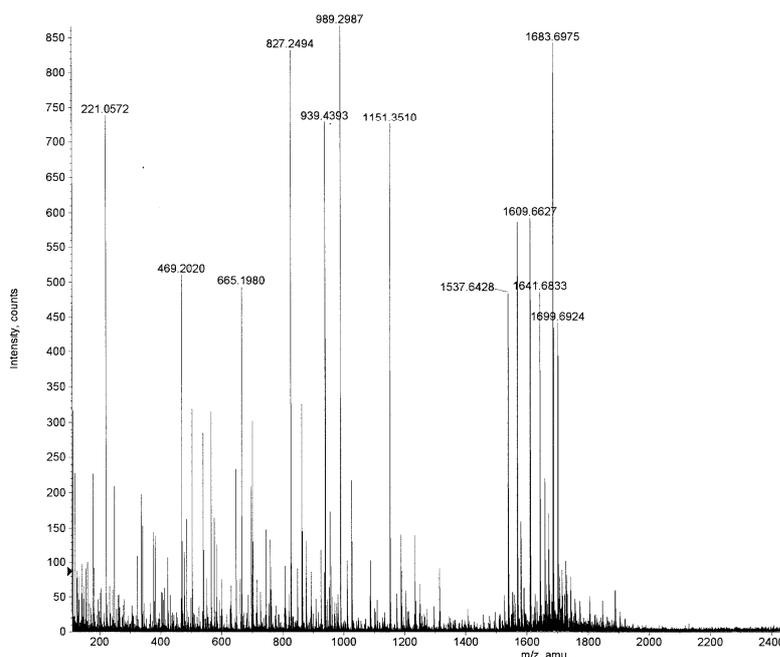


Abb. 40 ESI-TOF-Massenspektrum von Saponinum album. Die Vielzahl detektierter Signale unterstreicht die außerordentliche Komplexität des Saponinum album.

3.7 Isolation eines Saponins aus Saponinum album

Auf Grund bisheriger Untersuchungen zum zytotoxischen Synergismus zwischen Saponinum album und Saporin (Hebestreit, 2005) oder Saporin basierten chimären Toxinen (Bachran et al., 2006) kann davon ausgegangen werden, dass Saponine mit einem ungefähren $m/z \geq 1500$ eine im Sinne des zytotoxischen Synergismus biologische Aktivität aufweisen. Im Fokus des Interesses standen deshalb die in Abb. 40 dargestellten Saponine mit $1500 \leq m/z \leq 1800$, die im Folgenden als „Ziel-Saponine“ bezeichnet werden.

Da die eigentliche Auftrennung des Saponinum album mittels HPLC erfolgen sollte, musste in Voruntersuchungen ein geeignetes Säulenmaterial ermittelt werden.

Eine C-18-Umkehrphase mit einem Methanol/Aqua dest.(0,01 % TFA)-Gradienten erwies sich hierbei als optimal. Saponinum album wurde unter diesen Bedingungen chromatographiert und alle im Chromatogramm von Abb. 41a detektierten *Peaks* mittels ESI-TOF-MS analysiert. Die *Ziel-Saponine* wurden dabei im Bereich $40 \text{ min} \leq R \leq 50 \text{ min}$ (1,5 ml/min) eluiert. Eine Auftrennung der *Ziel-Saponine* in die entsprechenden Einzelkomponenten konnte allerdings nicht erreicht werden. Selbst die Re-Chromatographie einzelner *Peaks* im Bereich $40 \text{ min} \leq R \leq 50 \text{ min}$ mit einem Aqua. dest/Acetonitril-Gradienten führte in entsprechenden Vorexperimenten zu keiner zufriedenstellenden Trennung der Saponine.

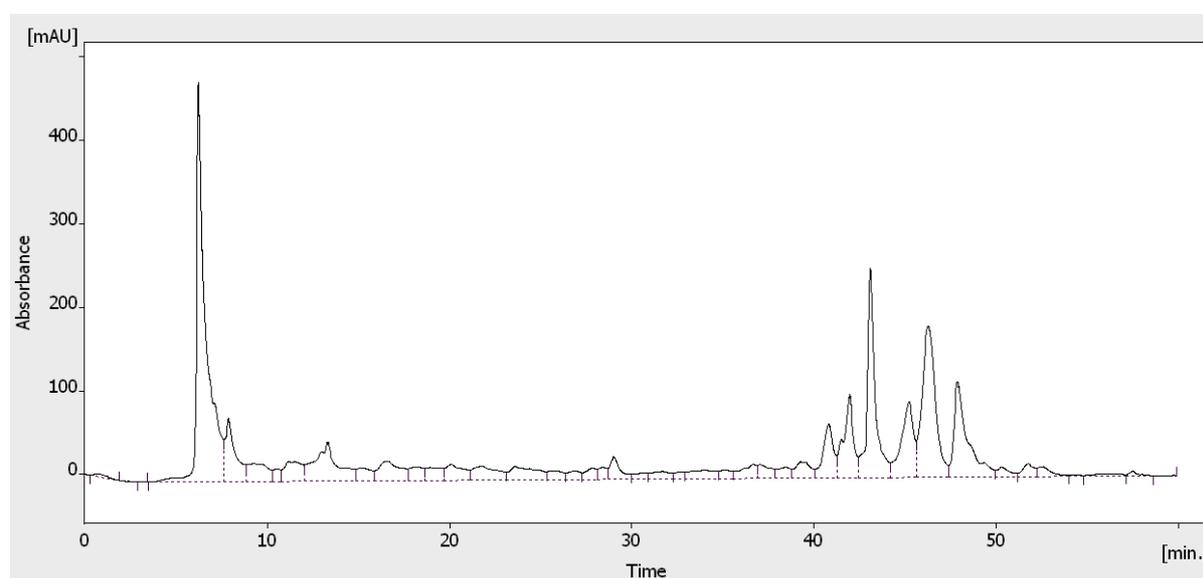


Abb. 41a HPLC-Chromatogramm von Saponinum album. Die als *Ziel-Saponine* definierten Saponine mit m/z 1500–1800 (Abb. 40) wurden im Bereich $40 \text{ min} \leq R \leq 50 \text{ min}$ eluiert.

Da Saponinum album ein Multikomponentengemisch aus Saponinen unterschiedlicher Molekularität darstellt, wurde die Trennungseffizienz des gewählten HPLC-Verfahrens durch eine Reduktion der Stoffkomplexität des Saponingemisches erhöht.

Betrachtet man die für das Auftreten der synergistischen Zytotoxizität notwendigen Strukturkomponenten (Bachran et al., 2006; Melzig et al., 2005; Weng, 2005), darf das gewählte Verfahren zu keiner Elimination der glykosidisch gebundenen Saccharide am C₃ des Aglycons führen, so dass lediglich die am C₂₈ gebundenen Zuckerester als funktionelle Ansatzpunkte für eine Reduktion der Stoffkomplexität in Frage kommen. Aus der organischen Chemie ist bekannt, dass die Hydrolyseempfindlichkeit von Estern mit zunehmend sterischer Komplexität der Alkoholkomponente abnimmt. So werden Methylester wesentlich schneller hydrolysiert als die entsprechenden Isopropylester.

Es ist also davon auszugehen, dass sich mehrfach verzweigte Zucker im Gegensatz zu nicht verzweigten Zuckerresten durch eine geringere Hydrolyseempfindlichkeit der C₂₈-Zuckerester auszeichnen.

Da sich Glycosidbindungen im Alkalischen nicht spalten lassen, wurde Saponinum album einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Dabei wurde entweder 1 oder 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt oder bei 40°C 24 Stunden gerührt.

Um eine Aussage über den Reinheitsgrad treffen zu können, wurden alle HPLC-*Peaks* mittels ESI-TOF-MS analysiert. Als optimal erwies sich eine Hydrolyse von 24 Stunden bei 40°C. In Abb. 41b ist das zugehörige HPLC-Chromatogramm und in Abb. 41c das Massenspektrum des isolierten Saponin-1641 abgebildet.

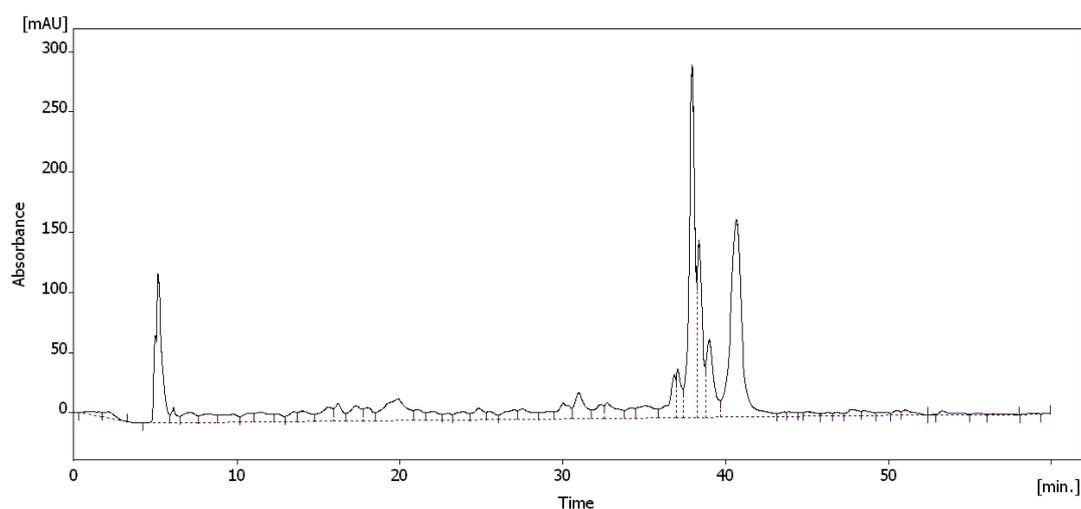


Abb. 41b HPLC-Chromatogramm von partialhydrolysiertem Saponinum album.

Das Saponin mit der Retentionszeit R= 42 min (letzter Peak in Abb. 41b) war besonders rein. In Abb. 41c ist das zugehörige Massenspektrum abgebildet.

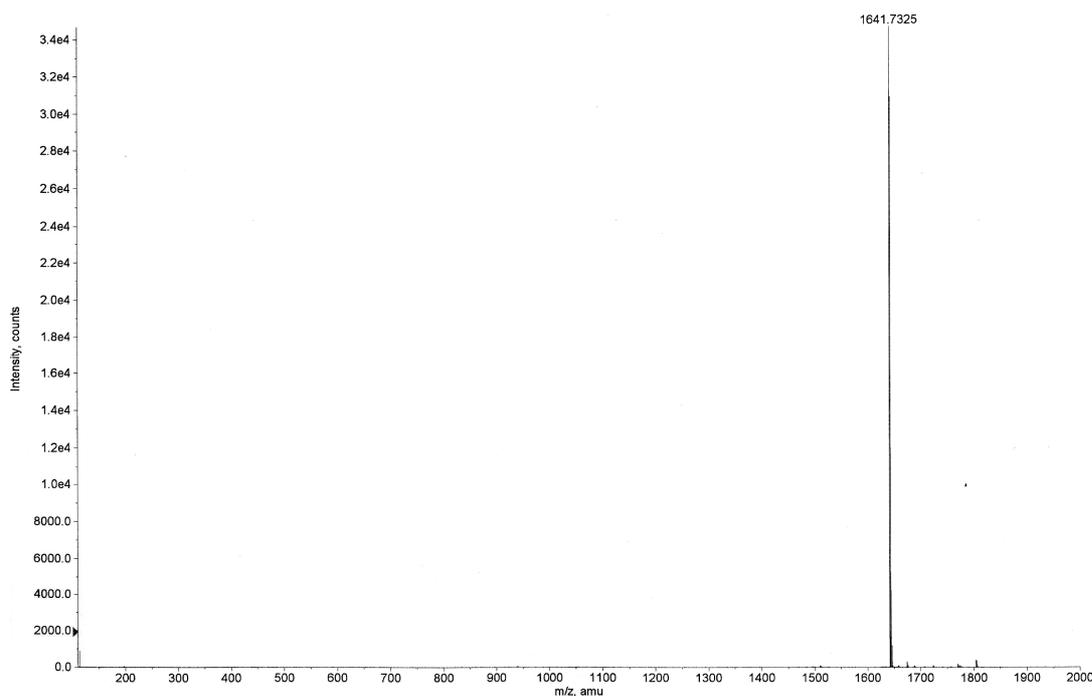


Abb. 41c ESI-TOF-Massenspektrum des in Abb. 41b isolierten Saponins mit R= 42 min.

3.7.1 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR

Das isolierte Saponin mit m/z 1641,7325 wurde von Herrn Dr. Peter Schmieder (FMP Berlin) nach lösen in Pyridin mittels $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR analysiert und die entsprechenden Daten von Frau PD Dr. Kristina Jenett-Siems (FU-Berlin) interpretiert. Die nachfolgend gelisteten Strukturdaten (Tab. 3) stehen weitgehend in Übereinstimmung mit einem von Kim et al. (1997) aus *Saponinum album* isolierten Saponin mit m/z 1641. Es finden sich jedoch geringe Abweichungen in den Zuckern.

Tab. 3 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR Daten des Saponins mit m/z 1641,7325 (Pyridin d-5)

Gypsogenin

Kohlenstoff	^1H -NMR	^{13}C -NMR
1	1,33 0,82	38,0
2	1,80 2,09	25,0
3	4,32	85,1
4	-	55,0
5	1,43	48,2

6	1,21 1,42	20,5
7	1,11 1,38	32,5
8	-	40,1
9	1,65	47,5
10	-	36,0
11	1,82 1,85	23,4
12	5,35	122,2
13	-	143,5
14	-	41,9
15	1,49 1,96	28,1
16	1,83 2,08	23,7
17	-	48,3
18	3,08	41,9
19	1,17 1,68	46,0
20	-	30,5
21	1,12 1,28	33,0
22	1,68	32,2
Kohlenstoff	H¹-NMR	C¹³-NMR
23	10,01	211,8
24	1,42	10,8
25	0,77	15,2
26	1,00	17,1
27	1,18	25,7
28	-	177,0
29	0,84	32,8
30	0,81	23,0
Glukuronsäure		
1	4,86	103,6
2	4,30	77,8
3	4,26	85,9
4	4,45	71,0
5	4,49	77,0
6	-	n.d.
Galaktose		
1	5,55	103,8
2	4,48	73,4
3	4,01	75,2
4	4,56	69,9
5	4,10	76,3
6	4,40/4,50	61,3

Xylose (1)		
1	5,32	104,7
2	3,97	74,8
3	4,08	78,2
4	4,16	70,5
5	3,66/4,30	67,0
Rhamnose		
1	6,40	101,1
2	4,77	71,4
3	4,69	72,5
4	4,22	84,8
5	4,42	68,0
6	1,72	18,2
Fukose		
1	5,95	94,1
2	4,61	74,1
3	4,17	76,7
4	3,97	84,0
5	3,90	71,3
6	1,53	18,2
Xylose (3)		
1	5,17	105,3
2	4,05	75,1
3	4,12	77,7
4	4,12	70,4
5	3,66/4,22	66,9
Xylose (2)		
1	5,01	106,6
2	4,02	75,0
3	4,05	86,8
4	4,08	68,2
5	3,50/4,23	66,6
Chinovose		
1	4,96	106,2
2	4,01	75,5
3	4,04	78,1
4	3,62	76,1
5	3,69	73,0
6	1,53	16,9

Nach Vergleich der in Tab. 3 gelisteten Daten mit publizierten Strukturdaten eines massenidentischen Saponins aus Saponinum album (Kim et al., 1997) ließ sich die in Abb. 42 dargestellte Struktur ableiten.

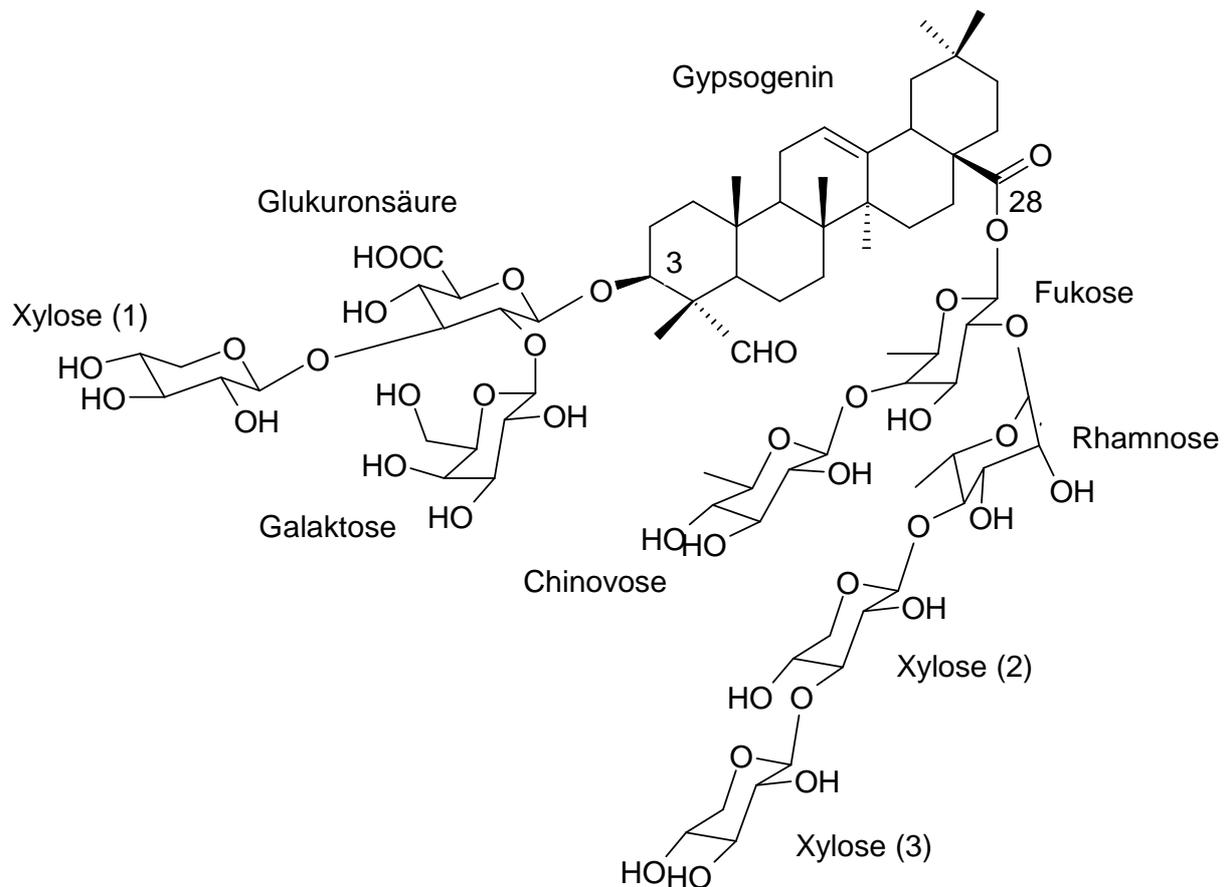


Abb. 42 Struktur des isolierten Saponins aus Saponinum album mit m/z 1641,7325

3.7.2 Biologische Testung des Saponin-1641

Von dem Saponin mit m/z 1641, nachfolgend als Saponin-1641 bezeichnet, wurde eine für die weitere Charakterisierung notwendige Menge isoliert (ca. 20 mg) und die Toxizität sowohl mit als auch ohne Saporin (3 nM) mittels XTT-Assay in ECV-304-Zellen bestimmt.

Wie aus Abb. 43a ersichtlich wies Saponin-1641 eine deutlich geringere Toxizität gegenüber ECV-304-Zellen auf, als Saponinum album. Allerdings trat bei Saponin-1641 die zytotoxizitätsstimulierende Wirkung auf Saporin (3 nM) erst bei 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf. Bei Saponinum album war dieser Effekt schon bei 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu beobachten (Abb. 43b).

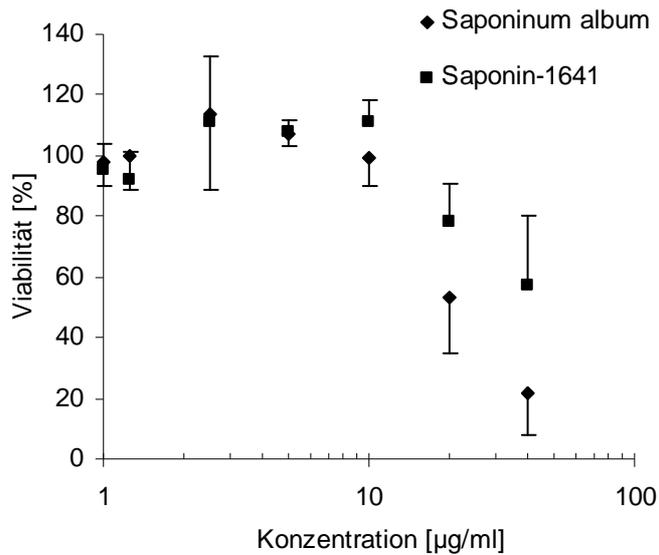


Abb. 43a Zytotoxizität von Saponin-1641.

ECV-304-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Saponin-1641 oder Saponinum album inkubiert. Saponinum album wies im Gegensatz zu Saponin-1641 eine stärker zytotoxische Aktivität gegenüber ECV-304-Zellen auf. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) bezogen.

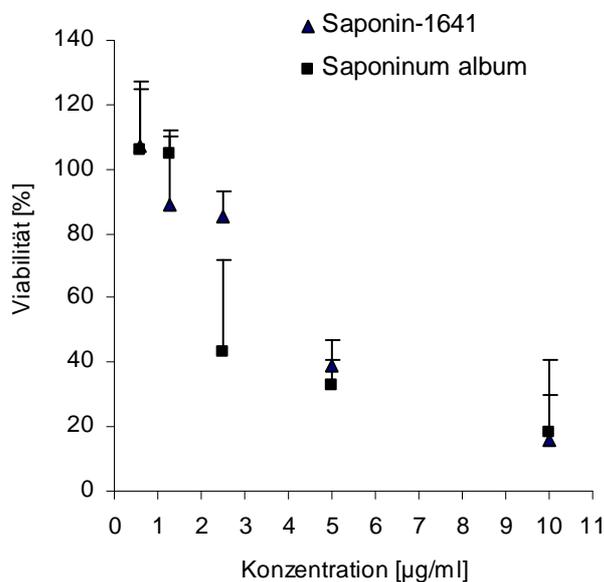


Abb. 43b Saponin-1641 induzierte Toxizitätssteigerung des Saporins.

ECV-304-Zellen wurden simultan mit Saporin (3 nM) und verschiedenen Konzentrationen Saponin-1641 oder Saponinum album inkubiert. Die Saponin bedingte zytotoxizitätssteigernde Wirkung auf Saporin trat bei Saponin-1641 erst bei 5 µg/ml auf. Alle Werte stellen Mittelwerte aus 8 Einzelmessungen dar und wurden auf die Werte der Negativkontrollen (unbehandelte Zellen) bezogen.

4. Diskussion

4.1 Hintergrund

Seit der erstmaligen Beschreibung der synergistischen Zytotoxizität zwischen speziellen triterpenoiden Saponinen aus *Agrostemma githago* L. und dem Typ I Ribosomen-inaktivierenden Protein Agrostin (Hebestreit & Melzig, 2003) ist dies auch für ein Saponingemisch (Saponinum album) triterpenoider Saponine aus *Gypsophila paniculata* L. und Agrostin oder Saporin beschrieben worden (Hebestreit et al., 2006). Über die Zellspezifität dieser Saponin vermittelten Effekte war bisher nur wenig bekannt. Das Auftreten der synergistischen Zytotoxizität in insgesamt sieben verschiedenen humanen Zelllinien (3.3.2) unterschiedlicher Originalität lässt allerdings ein allgemeines Saponin abhängiges Prinzip der Saporintoxizitätssteigerung vermuten. Bisherige Hypothesen führten dies auf potentiell Endozytose induzierende Eigenschaften der Saponine zurück, was letztlich zur verstärkten Internalisierung der erst intrazellulär toxischen *N*-Glycosidasen (Saporin) führen sollte (Hebestreit et al., 2006).

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Charakterisierung der synergistischen Zytotoxizität zwischen triterpenoiden Saponinen aus *Gypsophila paniculata* L. und Saporin sowie die Untersuchung der Endozytose stimulierenden Eigenschaften dieser Saponine.

4.2 Phagozytose

Wie unter 1.2.1 erwähnt, stellt die Phagozytose eine Unterform der Endozytose dar, zu der nur auf die Elimination von Antigenen spezialisierte Zellen des Immunsystems befähigt sind. Die Idee, durch gezielte Modulation der spezifischen oder unspezifischen Phagozytose die Antigenelimination zu stimulieren, ist nicht neu und für Ginseng- (Joo & Lee, 2008; Kang et al., 2008), Astragalus- (Xu et al., 2007; Toshkova et al., 2007) und Diosgenylsaponine (Zhang et al., 2007) beschrieben.

Um die Phagozytose stimulierenden Eigenschaften des in dieser Arbeit verwendeten Saponinum album zu untersuchen, wurde ein Phagozytosemodell etabliert und der Saponin bedingte Einfluss auf die Phagozytose in differenzierten U-937-Zellen untersucht. In der Annahme, dass Saponinum album die rezeptorvermittelte Endozytose stimuliert, wurde als Differenzierungsagens IFN- γ verwendet, da dieses in U-937-Zellen die Fc γ RI (IgG-Rezeptor Typ I) Expression induziert (Yamamoto et al., 2002). Um eine Aussage über die

Rezeptorspezifität der Saponin bedingten Phagozytosestimulation treffen zu können, wurden die Zellen alternativ mit PMA differenziert, was nach Jang et al. (2005) zu einer verstärkten Expression von *toll-like*-Rezeptoren führt. Nach Differenzierung der U-937-Zellen und dem Testen der Saponinum album/Saporin Zytotoxizität erfolgte die Durchführung der einzelnen Phagozytose-Assays. Die Inkubation mit Saponinum album führte weder in IFN- γ noch in PMA differenzierten U-937-Zellen zu einer signifikanten Zunahme phagozytisch aktiver Zellen. Dies traf sowohl für nicht IgG opsonierte (unspezifische Phagozytose) als auch für IgG opsonierte Partikel (spezifische Phagozytose) zu. Dabei war die Art des verwendeten Partikels irrelevant (siehe 3.2.2.1–3.2.4.2). Die in früheren Arbeiten (siehe oben) für strukturell andere Saponine beobachtete Modulation phagozytischer Prozesse konnte für Saponinum album ausgeschlossen werden.

Dies steht im Widerspruch zu älteren Untersuchungen, bei denen eine Gypsophilasaponin ausgelöste Stimulation der Phagozytose um 40–75 % festgestellt wurde (Luo et al., 2006). Die hierfür notwendigen Saponinkonzentrationen lagen jedoch mit 10–100 $\mu\text{g/ml}$ weit über den in dieser Arbeit verwendeten (4 $\mu\text{g/ml}$), so dass die beobachtete Induktion der Phagozytose wahrscheinlich auf die durch Gypsophilasaponine verursachte Bildung von Membranporen (Francis et al., 2002) zurückzuführen ist.

4.3 Charakterisierung der synergistischen Zytotoxizität

Wie eingangs erwähnt (4.1), wurde die synergistische Zytotoxizität zwischen speziellen, triterpenoiden Saponinen und Ribosomen-inaktivierenden Proteinen Typ I (RIPs Typ I) erstmalig für Agrostemmasaponine und Agrostin aus *Agrostemma githago* L. beschrieben (Hebestreit & Melzig, 2003). Neben Agrostemmasaponinen wurde als nächstes Saponinum album aus *Gypsophila paniculata* L. als Toxizitätsverstärker von RIPs Typ I identifiziert (Hebestreit et al., 2006). Gleichzeitig erfolgten Untersuchungen zur Spezifität des Effektes, indem verschiedene Toxoide wie Diphtherietoxin aus *Corynebakterium diphtheriae*, Microcristin LR aus Cyanobakterienarten wie *Microcystis aeruginosa*, Nigrin b aus *Sambucus niger* L. oder die Ricin-A-Kette mit Saponinum album kombiniert wurden. Eine im Vergleich zur Monoapplikation der Reintoxine signifikante Toxizitätssteigerung konnte allerdings nur für Agrostin, Saporin und rekombinantes ^{his}Saporin festgestellt werden (Hebestreit et al., 2006). Da eine direkte, im Sinne einer Komplexbildung stattfindende Interaktion der Saponine mit den RIPs Typ I ausgeschlossen werden konnte, wurde die durch den Endozytoseinhibitor Latrunculin A aus *Latrunculia magnifica* verursachte signifikante

Hemmung der Saponin/Saporin Zytotoxizität als Indiz für eine Saponin induzierte Endozytose des Saporin interpretiert (Hebestreit et al., 2006).

Ergebnisse zur Temperatur- und somit ATP-Abhängigkeit der Saponin vermittelten Saporinzytotoxizität verliehen dieser Hypothese zusätzliche Plausibilität.

Die systematische Untersuchung verschiedener Endozytosehemmstoffe scheint diese Hypothese zu stützen, da insbesondere Inhibitoren der Clathrin vermittelten Endozytose, darunter das Neuroleptikum Chlorpromazin, das trizyklische Antidepressivum Imipramin und Cyclosporin A aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* eine signifikante Hemmung der Saponin/Saporin Zytotoxizität in ECV-304-Zellen bewirkten (3.3.5.2). Darüber hinaus übte Bafilomycin A1, ein vakuolarer ATPase-Hemmstoff (Bowmann et al., 1988) eine starke Inhibition auf die Saponin/Saporin Zytotoxizität aus (3.3.5.2). In HeLa-Zellen hemmte Bafilomycin A1 den vesikulären Transport zwischen frühen und späten Endosomen (Bayer et al., 1998) und in HEP-G2-Zellen den endosomalen Flux zwischen späten Endosomen und Lysosomen (van Weert et al., 1994). Berücksichtigt man, dass der Mikrotubulus-Polymerisationsinhibitor Nokodazol, der ebenfalls den endosomalen Transport zwischen frühen und späten Endosomen hemmt (Bayer et al., 1998; Mellman, 1996; Gruenberg & Howell, 1989), zu einer intravesikulären Akkumulation fluoreszenzmarkierter ^{his}Saporinmoleküle führte (3.3.5.2), ist es höchst wahrscheinlich, dass die internalisierten, als *chlathrin coated vesicles* umschlossenen Saporinmoleküle innerhalb des endosomalen Transportsystems in tiefere Zellkompartimente gelangen und im Zuge der endosomalen Reifung von frühen zu späten Endosomen ins Zytosol liberiert werden.

Darf allerdings aus der Beobachtung einer durch Hemmstoffe verursachten Inhibition der Saponin/Saporin Zytotoxizität der Schluss gezogen werden, dass Saponinum album die Endozytose der toxischen *N*-Glycosidase Saporin induziert ?

Die in älteren Arbeiten aufgestellte Hypothese einer Saponin induzierten Endozytose des Saporins (Hebestreit, 2005) basiert auf der Annahme, dass jedes in die Zelle gelangte Saporinmolekül Zytotoxizität verursacht. Die in 3.3.6.3–3.3.6.4 dargestellten Ergebnisse lassen diese Annahme falsch erscheinen, da durch Saponinum album weder die Endo- noch die Exozytose des ³[H]^{his}Saporin signifikant moduliert werden konnte. Die Voraussetzung für das Auftreten einer Saporin verursachten Zytotoxizität ist also nicht allein die Internalisierung des Toxins, sondern die intrazelluläre Liberation des Saporins aus entsprechenden Zellkompartimenten. Die Saporin/Saponinum album induzierte Zytotoxizität als Surrogat-Parameter der Saporinendozytose anzusehen, führt folglich ebenso in die falsche Richtung wie die Prognose von Zytotoxizität bei beobachteter Endozytose des Saporins.

Allein die Kombination funktionaler Assays (Zytotoxizität) mit nicht funktionalen Assays (Endozytose) lässt die Formulierung einer exakten Hypothese zu.

Nach Herstellung und biologischem Test des Acetyl-Saponinum album folgte die *in vitro* Untersuchung des ^3H Saponinum album in ECV-304-Zellen. Dabei sollten insbesondere die Aufnahme und möglicherweise Abgabe von membrangebundenem ^3H Saponinum album mit den zytotoxizitätsstimulierenden Eigenschaften des Saponinum album korreliert werden.

Wie in 3.4.3.1 dargestellt, führte die Inkubation mit ^3H Saponinum album (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zu einer kontinuierlichen Aufnahme von Saponinmolekülen in ECV-304-Zellen. Allerdings trat nach 60 min eine zelluläre Sättigung ein, da über einen weiteren Inkubationszeitraum von 3 Stunden keine zusätzliche Aufnahme erfolgte. Dieser als *steady state* bezeichnete Zustand war durch ein dynamisches Gleichgewicht (Gleichgewicht I) gekennzeichnet, in dem die aufgenommene Menge Saponin der abgegebenen entsprach. Eine entsprechende Saponinrückverteilung aus den Zellen nach Störung des Gleichgewichts I wurde belegt (3.4.3.4). In der Folge stellte sich ein weiterer, als Gleichgewicht II bezeichneter Zustand ein, für den die Aktivitätsquotienten aus der zellassozierten Aktivität und der im Kulturüberstand detektierten Aktivität $A_{(\text{Zell})}/A_{(\text{Überstand})}$ für Ausgangskonzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konstant war (3.4.3.4).

Auch Gleichgewicht II stellte ein dynamisches Gleichgewicht dar, da nach Störung des Gleichgewichts ebenfalls eine Saponinrückverteilung in das Zellkulturmedium erfolgte (3.4.3.5). Durch ständige Erneuerung des Kulturmediums und somit kontinuierliche Störung der Gleichgewichtseinstellung konnten die Zellen derart ausgewaschen werden, dass die in den Zellkulturüberständen detektierte Radioaktivität auf nicht signifikante Werte sank (3.4.3.5).

Wurde in der Folge die zellassozierte Radioaktivität bestimmt, konnte ein fest gebundener Saponinanteil detektiert werden (3.4.3.5). Dieser Anteil war wiederum von der initial eingesetzten Konzentration abhängig, mit der die Zellen ursprünglich 1 Stunde inkubiert wurden (3.4.3.7). Für die Auslösung der synergistischen Zytotoxizität erwies sich dieser Anteil nach ursprünglicher Inkubation der Zellen mit 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Saponinum album jedoch als ausreichend (3.5). Dies deutet auf eine lang andauernde, durch Gypsophilasaponine verursachte, zelluläre Sensibilisierung gegen Ribosomen-inaktivierende Proteine Typ I hin und ist für die zielgerichtete Tumorthherapie mit Saporin basierten, chimären Toxinen (1.1.2) von großer Bedeutung, da so die Zytotoxizität der Toxine nachhaltig erhöht werden kann (der Begriff der Nachhaltigkeit wird weiter unten näher erläutert).

Ob es sich bei dem fest gebundenen Saponinanteil um zellmembrangebundenes oder um endosomal assoziiertes, internalisiertes Saponin handelte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Nach Insertion der Saponinmoleküle in die Zellmembran und lateraler Diffusion in der Membran Ebene – Plasmamembranen zeigen ein hohes Maß an Fluidität (Hollán, 1996) – könnte jedoch eine Internalisierung in der Membranhülle der *clathrin coated vesicles* erfolgen und zu einer konzentrationsabhängigen intrazellulären Akkumulation der Saponine führen.

Nach Fusion saponinhaltiger Membranen entsprechender Transportvesikel mit frühen Endosomen könnten Saponine in die Membran früher und nach Folgefusion anschließend in die Membran später Endosomen gelangen. Die vom Reifungszustand abhängige Struktur endosomaler Kompartimente (Ganley et al., 2004; Griffiths et al., 1990) könnte eine zunehmende, saponininduzierte Destabilisierung der endosomalen Integrität nach sich ziehen und in späten Endosomen zur partiellen endosomalen Liberation des Saporins führen.

Die nach Inkubation mit $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant höhere zytosolische Radioaktivität (3.3.7) in Saponinum album behandelten Zellen, stützt die Hypothese einer Saponin induzierten Lyse endosomaler Kompartimente. Die bei den gewählten Saponinkonzentrationen ausbleibende Zytotoxizität (3.3.2) und lytische Aktivität (Störmer, 2008) des Saponinum album legt keine vollständige Lyse endosomaler Membranen nahe, da ansonsten eine signifikante Toxizität zu erwarten gewesen wäre. Vielmehr führt Saponinum album lediglich zu einer Partiallyse endosomaler Kompartimente, die von einer nur sehr geringen Penetrationsrate des Saporins begleitet wird. Berücksichtigt man jedoch den stark zytotoxischen Effekt der Saponinum album/Saporin Mischungen, ist es wahrscheinlich, dass diese geringe Penetrationsrate auf zytosolischer Seite durch die überaus starke *N*-Glycosidaseaktivität des Saporins mit 140 pmol Adenin/pmol Saporin pro Stunde (Heisler et al., 2002) kompensiert wird. Die synergistische Zytotoxizität zwischen Gypsophilasaponinen und RIPs Typ I basiert also nicht auf der massenmäßigen, intrazellulären Akkumulation toxischer Proteine, sondern auf einer Saponin vermittelten Penetrationskatalyse einzelner Enzyme mit hoher Wechselzahl. Gypsophilasaponine können demzufolge in Analogie zu den *Ionophoren* als *Enzymophore* aufgefasst werden.

Dies scheint nicht für Toxine mit Enzymaktivität zuzutreffen, die wie Diphterietoxin (DT) über eine die Endosomenmembran perforierende Untereinheit verfügen, wodurch die toxische Enzymuntereinheit ins Zytosol gelangen kann. Im Falle des DT scheint dieser Transfer mit so großer Effizienz abzulaufen, dass die Saponinum album verursachte, endosomale Partiallyse zu keiner Zytotoxizitätssteigerung des DT führen kann. Diese Annahme steht in

Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Hebestreit et al., 2006), in denen Gypsophilasaponine keine zytotoxizitätssteigernde Wirkung auf DT zeigten. Gypsophilasaponine sind demgemäß *Enzymophore*, deren Wirkung auf Enzymtoxine ohne Endosomen-Zytosol-Transfer vermittelnde Untereinheit beschränkt zu bleiben scheint.

Vergleicht man die GI_{50} von $42,5 \times 10^{-12}$ M für Saporin/Saponinum album (4 $\mu\text{g/ml}$) mit der GI_{50} des hoch toxischen RIP Typ II Viscumin von $21,5 \times 10^{-12}$ M (3.3.4), wird die Effizienz des diskutierten Mechanismus deutlich, so dass Saponinum album als der B-Kette des Viscumins äquivalentes Haptomer der RIPs Typ I angesehen werden kann.

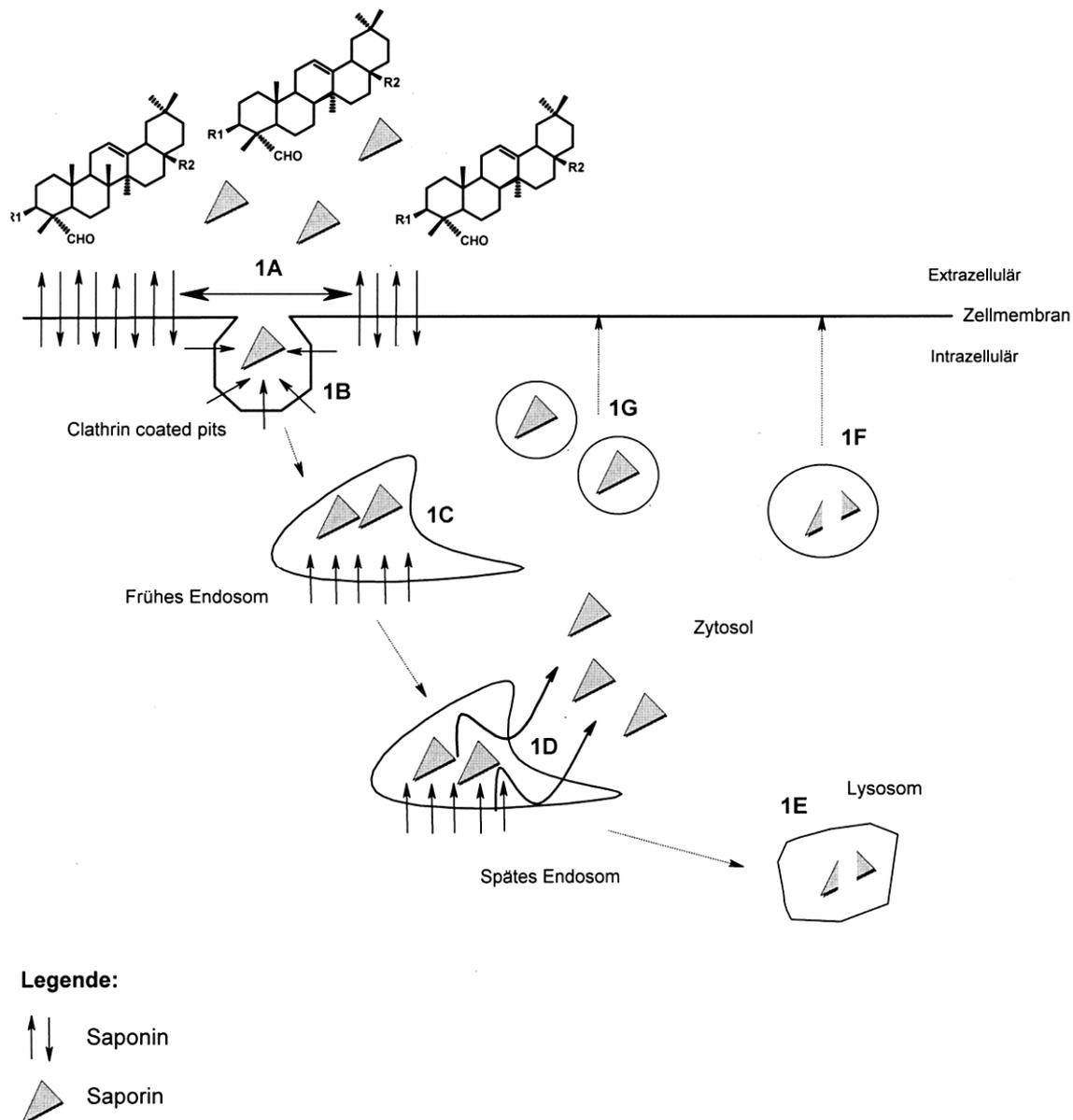
Die oben erwähnte Nachhaltigkeit der Saporintoxizität könnte auf gleichgewichtsartigen Verteilungsvorgängen der Saponine zwischen den Membranen endosomaler Kompartimente und dem Zytosol beruhen. Über die Einstellung intrazellulärer Saponungleichgewichte zwischen Endosomenmembran und Zytosol könnte ein zytosolischer *Saponin pool* aufgebaut werden, der zur nachhaltigen zellulären Sensibilisierung gegenüber RIPs Typ I beiträgt. Im Sinne dieser nachhaltigen Empfindlichkeitszunahme ist es denkbar, dass membrangebundenes oder zytosolisch angereichertes Saponin im Zuge der Zellteilung auf Tochterzellen übertragen wird. Danach sollte die zelluläre Sensitivität gegenüber Saporin und Saporin basierten chimären Toxinen (1.1.2) mit der Anzahl der Zellteilungen in Saponinum album behandelten Zellen abnehmen.

Bei der Aufnahme des Saponinum album handelt es sich um einen unspezifischen Prozess, da die Aufnahme von radioaktiv markiertem Saponinum album durch unmodifiziertes Saponinum album nicht beeinflussbar war (3.4.3.3). Die Aufnahme des Saponinum album in ECV-304-Zellen war zudem konzentrationsabhängig (3.4.3.2) und es bestand ein streng linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration, mit der die Zellen 1 Stunde mit Saponin gesättigt wurden, und der zellassoziierten Saponinmenge im Gleichgewicht II (3.4.3.7). Des Weiteren spielte die, für die Aufrechterhaltung zellulärer Funktionen wichtige Membran-Lipid-Asymmetrie (Daleke, 2003) keine Rolle bei der Einlagerung des Saponinum album in die Zellen (3.4.3.6). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es sich bei der Aufnahme des Saponinum album um diffusionskontrollierte Vorgänge handelt.

Acridinorange wird pH abhängig in endosomalen Kompartimenten akkumuliert und bei intakten Endosomen und Lysosomen nach einem „Ionen-Fall-Prinzip“ retiniert (Tragagnos & Darzynkiewicz, 1994; Kågedal et al., 2001). Eine Saponinum album induzierte Endosomenperforation sollte auch von einem signifikanten Verlust intraendosomal akkumulierter AO-Moleküle begleitet sein. Dies wäre als Hinweis auf eine unspezifische, durch Saponinum album verursachte Lyse entsprechender Kompartimente zu werten. Allerdings führte die Inkubation mit Saponinum album (5–20 µg/ml) nur zu einer leichten, im Vergleich zu Kontrollzellen (ohne Saponinum album) nicht signifikanten Abnahme der AO-Rotfluoreszenz (3.3.8). Dies legt eine spezifische intraendosomale Interaktion zwischen Gypsophilasaponinen und Saporin nahe. Denkbar ist beispielsweise eine innerhalb früher oder später Endosomen stattfindende, intermediäre Iminbildung zwischen der am C₃ des Aglycons gebundenen Formylfunktion und entsprechender ε-Aminolysinreste des Saporins. Die Beobachtung, dass Saponine ohne Formylfunktion wie Hederacosid C oder Glycyrrhizinsäure keinen toxizitätssteigernden Effekt auf RIPs Typ I ausübten, (Melzig et al., 2005, Weng, 2005) und der sehr hohe Lysingehalt des Saporins (Korenykh et al., 2007) lassen diese Annahme plausibel erscheinen. Allerdings konnte Hebestreit (2005) eine Iminbildung unter Zellkulturbedingungen ausschließen. Darüber hinaus liegen ε-Aminolysinreste im aciden Milieu der Endosomen weitgehend protoniert vor, so dass eine Iminbildung nicht begünstigt wird (siehe dazu auch 2.3.3.1). Die leichte, nicht signifikante Abnahme der AO-Fluoreszenz in Saponinum album behandelten Zellen kann auf eine nur sehr schwache Partiallyse endosomaler Kompartimente zurückgeführt werden. Für den Transfer toxischer Enzyme ins Zytosol ist diese Membranpermeabilisierung jedoch ausreichend (siehe auch oben).

Eine wirkstoffinduzierte Ruptur von Membranstrukturen ist bisher für eine durch DMSO hervorgerufene, endosomale Freisetzung des Saporins beschrieben (Geden et al., 2007). Allerdings steht die DMSO vermittelte, 125-fache Zunahme der zellulären Saporin-sensitivität (Geden et al., 2007) in keinem Verhältnis zur Saponinum album abhängigen, um den Faktor 10⁵ gesteigerten Saporintoxizität (Hebestreit et al., 2006). Daneben sind Arbeiten beschrieben, in denen nach Applikation und UV-Bestrahlung spezieller Fotosensibilisatoren eine Ruptur endosomaler Kompartimente mit verstärkter zytosolischer Freisetzung Saporin basierter chimärer Toxine beobachtet wurde (Yip et al., 2007; Weyergang et al., 2006). Als Nachteil dieser Technologie kann die von der Bestrahlungszeit abhängige Toxizität der Fotosensibilisatoren angesehen werden, die vermutlich auf eine verstärkte Ruptur endo- und lysosomaler Kompartimente zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ist auf der Grundlage der in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse zur synergistischen Zytotoxizität zwischen Gypsophilasaponinen und RIPs Typ I das unten dargestellte vereinfachte Fließschema entwickelt worden (Schema 1).



Schema 1. Stark vereinfachtes Fließschema zum Mechanismus der Gypsophilasaponin abhängigen synergistischen Zytotoxizität.

Saponine diffundieren konzentrationsabhängig in die Plasmamembran und werden bis zur Erreichung eines dynamisches Gleichgewichts entsprechend rückverteilt. Mittels lateraler Diffusion (symbolisiert als Doppelpfeil, 1A) diffundieren Saponine in die Membranhülle sich abschnürender *clathrin coated pits* (1B). Durch Fusion saponinhaltiger Membranen mit frühen Endosomen gelangen Saponine in die Membran früher- und anschließend später Endosomen. Hier erfolgt auf bisher ungeklärte Weise eine saponinabhängige endosomale Liberation des Saporins ins Zytosol (1D). Parallel zu diesen Prozessen wird Saporin kontinuierlich abgebaut (1E) und sowohl intaktes (1G) als auch degradiertes Saporin (1F) exozytiert.

4.4 Bedeutung des α_2 -Makroglobulin-Rezeptors für Saporinendozytose

Ergebnisse früherer Arbeiten belegen eine Endozytose des Saporins (Vago et al., 2005) und stehen insofern in Einklang mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen zur Clathrin vermittelten Endozytose des Saporins (3.3.5.2). Allerdings gehen viele Autoren davon aus, dass die Saporinaufnahme über eine Interaktion mit dem α_2 -Makroglobulin-Rezeptor (Carvallaro et al., 1995) vermittelt wird, durch den unter anderem die Internalisierung von Pseudomonas Exotoxin A (Moestrup, 1994) erfolgt.

Die Inkubation mit einem gegen die extrazelluläre Domäne (515 kDa) des α_2 -Makroglobulin-Rezeptors (α_2 M-R) gerichteten, monoklonalen Antikörper führte jedoch nicht zu einer Abnahme des zellulären $^3\text{H}^{\text{his}}$ Saporin-Pools (3.3.6.8). Das heißt, dass α_2 -Makroglobulin-Rezeptoren bei der Saporinendozytose entweder keine Rolle spielen oder auf Grund einer fehlenden Expression des α_2 M-R auf ECV-304-Zellen keine Internalisierung stattfinden kann. Welche dieser Annahmen zutrifft, ist für die weitere Problembehandlung irrelevant, da für beide Fälle eine Rolle des α_2 M-R bei der Internalisierung des Saporins ausgeschlossen werden kann. Auf Grund der Tatsache, dass die von Carvallaro et al., (1995) durchgeführten Untersuchungen zur Bindung des Saporins an α_2 M-R im zellfreien Modell mit isolierten Rezeptoren erfolgten, ist eine unspezifische Bindung des Saporin an α_2 M-R nicht ausgeschlossen. Die Beobachtung, dass die Ricin-A-Kette eine nahezu identische Bindungsaffinität zu α_2 M-R aufweist wie Saporin (Carvallaro & Soria 1995) und etliche andere Liganden an α_2 M-R binden (Moestrup, 1994) verleiht dieser Annahme Plausibilität. Nach Bagga et al., 2003 und den Ergebnissen in dieser Arbeit (3.3.6.8) kann eine Rolle des α_2 M-R bei der Internalisierung des Saporins ausgeschlossen werden.

4.5 Saponinum album

Wie in 1.1 ausgeführt stellt Saponinum album ein aus *Gypsophila paniculata* L. gewonnenes außerordentlich komplexes Stoffgemisch aus Triterpensaponinen (3.6) dar.

Schon bald nach der ersten Charakterisierung der synergistischen Zytotoxizität (Hebestreit & Melzig, 2003) folgten Untersuchungen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen Saponinum album und einem Saporin basierten chimären Toxin (Bachran et al., 2006). Allerdings fand die stoffliche Komplexität des Saponinum album (3.6) bei diesen Untersuchungen keine Beachtung und das als Hauptkomponente angesehene Gypsosid A wurde als wirksamkeitsbestimmende Komponente betrachtet. Die Annahme, dass Gypsosid A

als Hauptglycosid von *Saponinum album* anzusehen ist (Hagers Handbuch, Band 5, 1993), geht wahrscheinlich auf Untersuchungen in den 1960er Jahren zurück. So wurde das aus anderen *Gypsophila*-Arten isolierte Gypsosid A (Abb. 44) (Kochetkov et al., 1963) angeblich auch in *Gypsophila paniculata* L. gefunden (Khorlin et al., 1963). Formulierung wie „*the triterpene saponin of Gypsophila paniculata* L. is identical to gypsosid“ (Khorlin et al., 1963) legen den Verdacht nahe, dass schon damals Gypsosid A als Hauptkomponente des *Saponinum album* angesehen wurde.

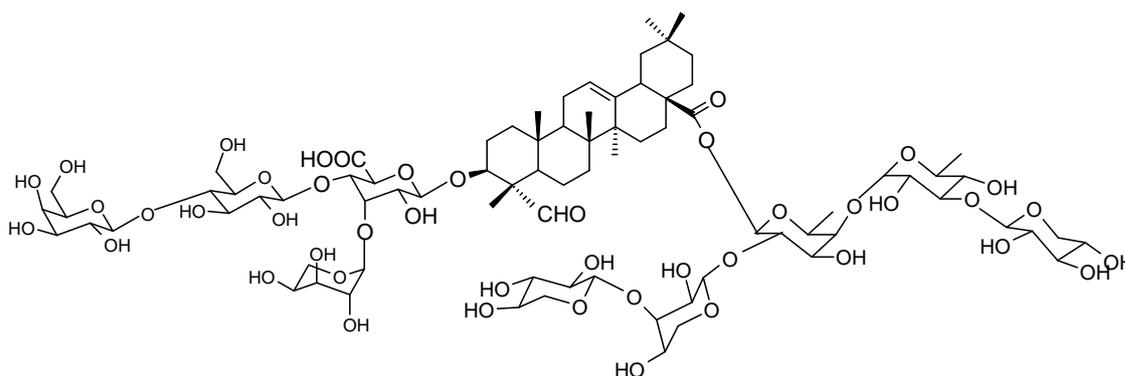


Abb. 44 Gypsosid A, das deklarierte Hauptsaponin aus *Saponinum album*

Entsprechend der Masse müsste Gypsosid A im ESI-TOF-Massenspektrum bei $m/z \sim 1790$ detektiert werden. Da bei $m/z \sim 1790$ im ESI-TOF-Massenspektrum des *Saponinum album* (3.6) kein entsprechender Molekularpeak detektiert werden konnte, ist es fraglich, ob Gypsosid A überhaupt in nennenswerten Mengen, geschweige denn als Hauptkomponente in *Saponinum album* vorkommt.

Aufgabe der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen zur Isolation eines Saponins aus *Saponinum album* war die Entwicklung eines simplen chromatographischen Trennverfahrens. Durch eine Partialhydrolyse des *Saponinum album* konnte die Komplexität des *Saponinum album* reduziert (siehe auch 3.7) und nach chromatographischer Reinigung ein Saponin isoliert werden. Das isolierte Saponin-1641 besitzt die in Abb. 42 (3.7.1) dargestellte Struktur und zeigte ab $5 \mu\text{g/ml}$ eine starke zytotoxizitätsstimulierende Wirkung auf Saporin (3.7.2). Im Gegensatz zu *Saponinum album* zeichnete sich das isolierte Saponin-1641 durch eine geringere Eigentoxizität sowohl in ECV-304-Zellen (3.7.2) als auch in epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor exprimierenden HER14-Zellen (Weng et al., 2009) aus. Dabei wurde die Toxizität des chimären Toxins Saporin-Epidermal-Wachstumsfaktor (Sap-EGF) durch *Saponinum album* um den Faktor

3090 und durch Saponin-1641 um den Faktor 4900 erhöht. Die für das Auftreten der synergistischen Zytotoxizität notwendigen strukturellen Voraussetzungen sind auch in diesem Saponin vorhanden. Dies betrifft das aus 30 C-Atomen bestehende Gypsogenin, die Formylfunktion am C₄ und eine am C₃ glycosidisch gebundene Glukuronsäure, die mit weiteren Zuckerresten verknüpft ist (Weng, 2005; Melzig et al., 2005). Nach Hebestreit (2005) trifft dies für eine Reihe von Gypsophilasaponinen zu, so dass davon ausgegangen werden darf, dass neben Saponin-1641 eine Vielzahl im ESI-TOF-Massenspektrum (3.6.1) detektierter Saponine aus *Saponinum album* eine toxisitäts-stimulierende Wirkung auf Saporin und Sap-EGF aufweisen.

Es handelt sich also nicht um eine definierte, wirksame Komponente, sondern um eine Vielzahl wirksamer Saponinvarianten, die als gemeinsames Merkmal die oben beschriebenen, strukturellen Voraussetzungen aufweisen.

Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass alle Gypsophilasaponine auf Grund der unterschiedlichen Zuckerverknüpfungen am C₂₈ mehr oder weniger zytotoxisch wirken. Dies erklärt die Toxizitätsunterschiede des Saponin-1641 gegenüber *Saponinum album* (3.7.2). Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung von Gypsophilasaponinen mit Sap-EGF (Bachran et al., 2009) ist eine möglichst geringe Eigentoxizität der Saponine wünschenswert, da dadurch die therapeutische Breite einer solchen Behandlung vergrößert wird. Dies macht eine Auftrennung einzelner Saponine unbedingt erforderlich.

4.6 Signifikanz der synergistischen Zytotoxizität

Die Entdeckung und erstmalige Beschreibung des zytotoxischen Synergismus zwischen *Saponinum album* und dem Ribosomen-inaktivierenden Protein Typ I Saporin führte zu der kombinierten Applikation der genannten Saponine mit einem Saporin basierten chimären Toxin (Sap-EGF) (siehe auch 1.1.2), das therapeutisch gegen EGF-positive, maligne Tumoren eingesetzt werden soll. Die Beobachtung, dass die Kombination des Sap-EGF mit *Saponinum album* zu einer 385000-fachen Verstärkung der Toxinzytotoxizität führte (Heisler et al., 2005) unterstreicht die Bedeutung von *Saponinum album* in der zielgerichteten Tumorthherapie.

Betrachtet man die Fülle der bis heute hergestellten Saporin-Konjugate, kann das therapeutische Potential der Gypsophilasaponine erahnt werden. So sind Saporin-Transferrin- (Lizzi et al., 2005; Ippoliti et al., 1998), Saporin-Insulin- (Ippoliti et al., 1996), Saporin-Urokinase-plasminogen-Aktivator- (uPA) (Carvallaro & Soria, 1995), Anti-CD166-Saporin-

(Piazza et al., 2005), Anti-CTLA-4-Saporin- (Curti et al., 2001), Anti-CD2-Saporin- (Tazzari et al., 1994), Substanz-P-Saporin- (Martin & Slovirer, 2001), Anti-CD80/CD86-Saporin- (Bolognese et al., 2000), 192-immunoglobulin-Saporin- (Kwok et al., 1999), Anti-gp185-Saporin- (Di Lazzaro et al., 1994) und Anti-Transferrin-Saporin-Konjugate (Cazzolla et al., 1991) beschrieben.

So mannigfaltig und exotisch diese meist rekombinant hergestellten Saporin-Konjugate auch erscheinen mögen, so müssen doch alle internalisiert und nach erfolgter Endozytose aus zellulären Kompartimenten freigesetzt werden. Dieser, im angloamerikanischen Raum als *endosomal escape* bezeichneter Prozess findet nicht notwendig statt und stellt in der zielgerichteten Tumorthherapie ein großes Problem dar, da dadurch die zytosolische Anreicherung der Toxinmoleküle eingeschränkt wird.

Sollte es durch die Behandlung mit Gypsophilasaponinen möglich sein, auf eine schonende und untoxische Weise zelluläre Kompartimente für Saporin oder andere Enzym basierte Toxinkonjugate mit Serinprotease (Liu et al., 2003) oder RNase Aktivität (Newton et al., 2009) durchlässiger zu machen, würde dies (1) zur therapeutischen Renaissance des Saponinum album führen und (2) die zielgerichtete Tumorthherapie mit enzymbasierten, chimären Toxinen revolutionieren, da dadurch die einzusetzenden Toxinkonzentrationen drastisch reduziert und die unerwünschten Wirkungen einer solchen Therapie gesenkt werden könnten.

5. Zusammenfassung

Triterpenoide Saponine aus *Gypsophila paniculata* L. sind dafür bekannt, die Zytotoxizität spezieller Toxine drastisch zu steigern. Bei diesen Toxinen handelt es sich um Ribosomen-inaktivierende Proteine Typ I (RIPs Typ I), die durch ihre N-Glycosidase-Aktivität einen essentiellen Adeninrest von der ribosomalen RNA abspalten, so dass die Proteinsynthese zum Erliegen kommt. Bisherige Untersuchungen führten die Saponin abhängige außerordentliche Zytotoxizitätssteigerung Ribosomen-inaktivierender Proteine Typ I auf eine Saponin induzierte Modulation der Endozytose oder Phagozytose zurück.

Ausgehend von dieser Arbeitshypothese wurden nach Etablierung geeigneter In-vitro-Modelle die Endozytose, Exozytose und Phagozytose modulierenden Eigenschaften der Gypsophilasaponine untersucht. Durch Gypsophilasaponine konnte jedoch weder die Phagozytose nichtopsonierter oder opsonierter *Escherichia-coli*-Bakterien noch die Aufnahme von Latex-Partikeln induziert werden. Die weiteren, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatten die Charakterisierung der synergistischen Zytotoxizität zum Ziel.

In ECV-304-Zellen wurde die GI_{50} des Saporins (RIP Typ I), in Kombination mit Gypsophilasaponinen mit 42×10^{-12} M bestimmt und war mit der GI_{50} (21×10^{-12} M) des hoch toxischen Ribosomen-inaktivierenden Proteins Typ II, Viscumin, vergleichbar.

Diese außerordentliche Toxizitätssteigerung des Saporins war nicht auf ECV-304-Zellen beschränkt und konnte in weiteren sechs humanen Zelllinien beobachtet werden. Dies deutet auf einen allgemeinen Saponin abhängigen Mechanismus der Zytotoxizitätssteigerung Ribosomen-inaktivierender Proteine Typ I hin.

Die Beobachtung, dass Inhibitoren der Clathrin vermittelten Endozytose zu einer Hemmung der Saponin/Saporin-Zytotoxizität führten, unterstreicht zudem die Bedeutung der Clathrin vermittelten Endozytose bei der Saporininternalisierung.

Gypsophilasaponine übten jedoch weder einen stimulatorischen Einfluss auf die Clathrin vermittelte Endozytose noch auf die Exozytose internalisierten Saporins aus. Ein modulatorischer Einfluss der Gypsophilasaponine auf den Saporinabbau konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Weitere im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen deuten auf eine Saponin induzierte, endosomale Freisetzung der mittels Clathrin vermittelter Endozytose internalisierten RIPs Typ I hin. Dieser, im Angloamerikanischen als *endosomal escape* bezeichnete, durch Gypsophilasaponine katalysierte Saporintransfer liegt der außerordentlichen Saporin-Toxizitätssteigerung als Mechanismus zu Grunde.

Da die Endosomenmembran nicht vollständig lysiert wird und nur sehr wenige Toxinmoleküle das Zytosol zu erreichen scheinen, kommt der enzymatischen Aktivität des Saporins mit 140 pmol Adenin/pmol Saporin pro Stunde eine besondere Rolle zu. Dadurch kann die geringe, Saponin vermittelte Saporintransfereffizienz auf zytosolischer Seite kompensiert werden.

In Analogie zu den *Ionophoren* können Gypsophilasaponine demgemäß als *Enzymophore* aufgefasst werden.

6. Summary

Triterpenoid saponins from *Gypsophila paniculata* L. are known to enhance the cytotoxicity of type I ribosome-inactivating proteins (type I RIP). These proteins exhibit N-glycosidase activity and remove an essential adenine residue from the ribosomal RNA. Up to now it was assumed that the saponin-mediated toxicity enhancement of these toxins is due to an increased endocytosis or phagocytosis in saponin treated cells.

To scrutinize this hypothesis, appropriate in vitro models were established and the influence of *Gypsophila* saponins on endocytosis, exocytosis and on phagocytosis was investigated.

Gypsophila saponins showed no influence on the phagocytosis of opsonated and non-opsonated *Escherichia coli*-bacteria. This was also observed for microspheres.

In combination with *Gypsophila* saponins the cytotoxicity of saporin (type I RIP) was increased to a level similar to that of the highly toxic type II RIP rViscumin. rViscumin achieved an IC_{50} value of 21.5×10^{-12} M on ECV-304 cells and the combination of saporin with *Gypsophila* saponins 42.5×10^{-12} M. This tremendous toxicity enhancement was not restricted to ECV-304 cells but was observed in six further cell lines, indicating a general saponin dependent mechanism of toxicity enhancement of type I ribosome-inactivating proteins. It was further shown, that the internalization of saporin was mediated by clathrin-mediated endocytosis. However *Gypsophila* saponins did not modulate the clathrin-mediated endocytosis of saporin. This was also shown for other transport processes such as exocytosis. Degradation processes of saporin were also not influenced by the saponins. Further experiments showed a saponin-mediated endosomal escape of the N-glycosidase saporin. Additional investigations indicate that only few saporin molecules traverse through the endosomal membrane into the cytosol of saponin-treated cells. These low saporin penetration rate through endosomal membranes could be balanced by the strong N-glycosidase activity of saporin with up to 140 pmol adenine/pmol saporin per h. In this context and in analogy to *ionophores* *Gypsophila* saponins could be defined as *enzymophores*.

7. Literaturverzeichnis

- Allayee, H., Laffitte, B.A., Lusis, A.J., An absorbing study of cholesterol, *Science* 290 (2000) 1709–11.
- Bachran, C., Drywa, G., Dürkop, H., Sutherland, M., Bachran, D., Müller, C., Weng, A., Melzig, M.F., Fuchs, H., Inhibition of tumor growth by targeted toxins in mice is massively improved by saponinum album in a synergistic way, *J. Immun. Ther.* (2009) *in press*.
- Bachran, C., Sutherland, M., Heisler, I., Hebestreit, P., Melzig, M.F., Fuchs, H., The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure. *Exp. Biol. Med.* 231 (2006) 412–420.
- Bagga, S., Hosur, M.V., Batra, J.K., Cytotoxicity of the ribosome-inactivating protein saporin is not mediated through alpha2-macroglobulin receptor, *FEBS lett.* 541 (2003) 16–20.
- Baranji, K., Baranji, L., Yoshida, T., Okada, N., Okada, H., A low molecular weight phagocytosis-inhibitory factor obtained from human erythrocyte membranes specifically down regulates mac-1 activity on tetradecanoyl phorbol acetate-stimulated monocytic cell lines in a Ca²⁺ dependent manner, *J. Immunol.* 153 (1994) 1724–1730.
- Batelli, M.G., Musiani, S., Buonamici, L., Santi, S., Riccio, M., Maraldi, N.M., Girbes, T., Stirpe F., Interaction of volkensin with HeLa cells: binding, uptake, intracellular localization, degradation and exocytosis, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2004) 1975–1984.
- Bayer, N., Schober, D., Prchla, E., Murphy, R.F., Blaas, D., Fuchs, R., Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: Implications for viral uncoating and infection, *J. Virol.* 72 (1998) 9645–9655.
- Boles, B.K., Ritzenthaler, J., Birkenmeier, T., Roman, J., Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription, *Am. J. Physiol. Cell Mol. Physiol.* 278 (2000) L703–712.
- Bolognesi, A., Polito, L., Tazzari, P.L., Lemoli, R.M., Lubelli, C., Fogli, M., Boon, L., de Boer, M., Stirpe, F., In vitro anti-tumour activity of anti-CD80 and anti-CD86 immunotoxins containing type I ribosome-inactivating proteins, *Br. J. Haematol.* 110 (2000) 351–361.
- Boon J.M., Lambert T.N., Sisson, A.L., Davis, A.P., Smith, B.D., Facilitated phosphatidylserine (PS) flip-flop and thrombin activation using a synthetic PS scramblase, *J. AM Chem. Soc.* 125 (2003) 8195-8201.

- Botos, E., Turi, A., Müllner, N., Kovalszky, I., Tatrai, P., Kiss, A.L., Regulatory role of kinases and phosphatases on the internalization of caveolae in HepG2 cells, *Micron*. 38 (2006) 313–320.
- Bowmann, E.J., Siebers, A., Altendorf, K., Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 7972–7976.
- Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteon-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- Buttke, T.M., McCubrey, J.A., Qwen, T.C., Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent call lines, *J. Immunol. Meth.* 157 (1993) 233–24.
- Cabanas, C., Sanchez-Madrid, S., Aller, A., Yague, E., Bernabeu, C., Phorbol esters induce differentiation of human promonocytic cells in the absence of LFA/ICAM-1-mediated intercellular adhesion, *Eu. J. Biochem.* 191 (1990) 599–604.
- Carvallaro, U., Soria, M.R., Targeting plant toxins to the urokinase and α_2 -macroglobulin receptors, *Semin. Cancer Biol.* 5 (1995) 269–278.
- Carvallaro, U., Nykjaer, A., Nielsen, M., Soria, M.R., α_2 -macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins, *Eur. J. Biochem.* 232 (1995) 165–171.
- Cazzola, M., Bergamaschi, G., Dezza, L., D’Uva, R., Ponchio, L., Ascari, E., Cytotoxic activity of an anti-transferrin receptor immunotoxin on normal and leukemic human hematopoietic progenitors, 51 (1991) 536–541.
- Chan, W.Y., Zheng, W.T., Huang, H., Tam, S.C., Relationship between trichosanthin cytotoxicity and its intracellular concentration, *Toxicology* 177 (2002) 245–51.
- Chan, W.Y., Huang, H., Tam, S.C., Receptor-mediated endocytosis of trichosanthin in choriocarcinoma cells, *Toxicology* 186 (2003) 191–203.
- Chao, A.C., Nguyen, J.V., Broughall, M., Recchia, J., Kensil, C.R., Daddona Fix, J.A., Enhancement of intestinal model compound transport by DS modified Quillaja saponin, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 1395–1399.
- Cho, S.Y., Sim, J.S., Kang, S.S., Jeong, C.S., Enhancement of heparin and heparin disaccharide absorption with the *Phytolacca* saponins, *Arch. Pharm. Res.* 26 (2003) 1102–1108.

- Cox, J.C., Sjolander, A., Barr, I.G., ISCOMS and other saponin based adjuvants, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 32 (1998) 247–271.
- Curti, A., Biancone, L., Camussi, G., Ferrara, G.B., Stirpe, F., Immunotoxins containing recombinant anti-CTLA-4 single-chain fragment variable antibodies and saporin: in vitro results and in vivo effects in an acute rejection model, *J. Immunol.* 167 (2001) 4222–4229.
- Daleke, L., Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry, *J. Lip. Res.* 44 (2003) 233–242.
- Day, P.M., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Papillomaviruses infect cells via clathrin-dependent pathway, *Virology* 307 (2003) 1–11.
- Di Lazzaro, C., Digiesi, G., Tecce, R., Lotti, L.V., Torrissi, M.R., Natal, P.G., Immunotoxins to the HER-2 oncogene product: functional and ultrastructural analysis of their cytotoxic activity, *Cancer Immunol. Immunoth.* 39 (1994) 318–324.
- Engisch, K.L., Nowycky, M.C., Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarization in bovine adrenal chromaffin cells, *J. Physiol.* 506 (1998) 591–608.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., Giacca, M., Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat Fusion Proteins, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 34141–34149.
- Francis, G., Kerem, Z., Harinder, P., Makkar, S., Becker, K., The biological action of saponins in animal systems: a review, *Brit. J. Nutr.* 88 (2002) 587–605.
- Fuchs, H., Bachran, D., Panjideh, H., Schellmann, N., Weng, A., Melzig, M.F., Sutherland, M., Bachran, C., Saponins as tool for improved targeted tumor therapies, *Curr. Drug Targets* 10 (2009) 140–151.
- Gaidi, G., Correia, M., Chauffert, B., Beltramo, J.L., Wagner, H., Lacaille-Dubois, M.A., Saponins-mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxicity in human colon cancer cells, *Planta Med.* 68 (2002) 70–72.
- Ganley, I., Carroll, K., Bittova, L., Pfeffer, S., Rab9 GTPase Regulates Late Endosome Size and Requires Effector Interaction for Its Stability, *Mol. Biol. Cell*, 15 (2004) 5420–5430.
- Geden, S.E., Gardner, R.A., Fabbrini, M.S., Ohashi, M., Phanstiel, Iv.O., Teker, K., Lipopolyamine treatment increases the efficacy of intoxication with saporin and an anticancer saporin conjugate, *FEBS Lett.* 274 (2007) 4825–4836R.

- Gee, J.M., Wal, J.M., Miller, K., Atkinson, H., Grigoriadou, F., Wijnands, M., Pannik, A.H., Wortley, G., Johnson, I.T., Effect of saponin on the transmemucosal passage of beta-Lactoglobulin across the proximal small intestine of normal beta-lactoglobulin-Sensitised rats, *Toxicology* 117 (1997) 219–28.
- Goodwin, C.J., Holt, S.J., Downes, S., Marshall, N.J., Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS, *J. Immunol. Meth.* 179 (1995) 95–103.
- Griffiths, G., Matteoni, R., Back, R., Hoflack, B., Characterization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor-enriched prelysosomal compartment in NRK cells, 95 (1990) 441–61.
- Gruenberg, J., Howell, K., Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays, *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7 (1989) 453–481.
- Hagers Handbuch 5. Ausgabe (1991), Band 5, Drogen.
- Harris, C., Lehrbuch der quantitativen Analyse (1994), Vieweg Lehrbuch, Springer-Verlag Berlin.
- Hattori, T., Pack, M., Boughoux, P., Chang, Z.L., Hoffman, T., Comparison with other agents that promote differentiation of human myeloid or monocyte like cell lines, *J. Clin. Inves.* 72 (1983) 237–244.
- Hebestreit, P., Dissertation, Untersuchung zum Synergismus von Saponinen und Toxinen bei in vitro kultivierten Säugetierzellen, Humboldt-Universität- Berlin (2005).
- Hebestreit, P., Melzig, M.F., Cytotoxic activity of the seeds from *Agrostemma githago* var *githago*, *Planta Med.* 69 (2003) 921–925.
- Hebestreit, P., Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., Melzig, M.F., Enhancement of cytotoxicity of lectins by saponinum album, *Toxicon* 47 (2006) 330–335.
- Heisler, I., Keller, J., Tauber, R., Sutherland, M., Fuchs, H., A colorimetric assay for the quantitation of free adenine applied to determine the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins, *Anal. Biochem.* 302 (2002) 114–122.
- Heisler, I., Sutherland, M., Bachran, C., Hebestreit, P., Schnitger, A., Melzig, M.F., Fuchs, H., Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells, *J Control Release* 106 (2005) 123–137.
- Hollán, S., Membrane fluidity of blood cells, *Haematol. (Budap.)* 27 (1996) 109–127.
- Huber, L.A., Pfaller, K., Vietor, I., Organelle proteomics: Implications for subcellular fractionation in proteomics, *Circ. Res.* 92 (2003) 962–968.

- Ippoliti, R., Lendaro, E., Bellelli, A., Fiani, M.L., Benedetti, P.A., Evangelista, V., Brunori, M., Saporin-insulin conjugate: synthesis and biochemical characterization, *Nat. Toxins*, 4 (1996) 156–162.
- Ippoliti, R., Ginobbi, P., Lendaro, E., D'Agostino I., Ombres, D., Benedetti, P.A., Brunori, M., Citro, G., The effect of monensin and chloroquine on the endocytosis and toxicity of chimeric toxins, 54 (1998) 866–875.
- Ivanov, A.I., Pharmacological inhibition of endocytic pathways: Is it specific enough to be useful? *Methods Mol. Biol.* 440 (2008) 15–33.
- Jang, B.C., Jung, T.Y., Paik, J.H., Kwon, Y.K., Shin, S.W., Kim, S.P., Ha, J.S., Suh, M.H., Suh, S.I., Tetradecanoyl phorbol acetate induces expression of toll-like receptor 2 in U-937 cells: involvement of PKC, ERK and NF- κ B, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 328 (2005) 70–77.
- Joo S.S., Lee D.I., Potential effects of microglial activation induced by ginsenoside Rg3 in rat primary culture: enhancement of type A Macrophage Scavenger Receptor expression. *Arch. Pharm. Res.* 28 (2005) 1164–1169.
- Kågedal, K., Zhao, M., Svensson, I., Brunk, U.T., Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases, *Biochem. J.* 359 (2001) 335–343.
- Kang, K.A., Kang, J.H., Yang, M.P., Ginseng total saponin enhances the phagocytic capacity of canine peripheral blood phagocytes in vitro, *J. Chin. Med.* 36 (2008) 329–41.
- Kim, Y.C., Higuchi, R., Komori, T., Application of hydrothermolysis to the studies on the constituents of the Merck Saponin, *Liebigs Ann. Chem.* 9 (1992) 941–946.
- Kiss, A.L., Botos, E., Auri, T., Müllner, N., Ocadaic acid treatment causes tyrosine phosphorylation of caveolin-2 and induces internalization of caveolae in rat peritoneal macrophages, *Micron.* 35 (2004) 707–715.
- Khorlin, A.Y., Ovodov, Y.S., Ovodova, R.G., Identity of gypsoside and a triterpene saponin from *Gypsophila paniculata* L., *Russian Chem. Bull.* 12 (1963) 1387–1388.
- Korenykh, A.V., Correll, C.C., Piccirilli, J.A., Evidence for the importance of electrostatics in the function of two distinct families of ribosome inactivating proteins, *RNA* 13 (2007) 1391–1396.
- Kochetkov, N.K., Khorlin, A., Ovodov Y., Triterpenoid saponins, communication 9. Structure of gypsoside, *Russian Chem. Bull.* (1963) 1345–1353.
- Kwok, K.H., Law, K.B., Wong, R.N., Yung, K.K., Immunolesioning of nerve growth factor p75 receptor-containing neurons in the rat brain by a novel immunotoxin: anti-p75-anti-mouse IgG-trichosanthin conjugates, *Brain Res.* 846 (1999) 154–163.

- Levavi-Sivan, R., Hedvat, T., Kanias, F., George, K., Becker Z., Exposure of tilapia pituitary cells to saponins: Insight into their mechanism of action, *Com. Biochem. Physiol.* 140 (2005) 79–86.
- Liu, Y., Cheung, L.H., Hittelman, W.N., Rosenblum, M.G., Targeted delivery of human pro-apoptotic enzymes to tumor cells: In vitro studies describing a novel class of recombinant highly cytotoxic agents, *Mol. Cancer Ther.* 12 (2003) 1341–1350.
- Lizzi, A.R., D'Alessandro, A.M., Zeolla, N., Brisdelli, F., D'Andrea, G., Pitari, G., Oratore, A., Bozzi, A., Ippoliti, R., The effect of AZT and chloroquine on the activities of ricin and a saporin-transferrin chimeric toxin, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 560–590.
- Luo, J.G., Kong, L.Y., Takaya, Y., Niwa, M., Two new monodesmosidic triterpene saponins from *Gypsophila oldhamiana*, *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2006) 1200–1202.
- Maginnis, M.S., Mainou, B.A., Derdowski, A., Johnson, E.M., Zent, R., Dermody, T.S., NPXY motifs in the beta 1 integrin cytoplasmic tail are required for functional reovirus, *Entry. J. Virol.* 23 (2008) 3181–3191.
- Marks, B., McMahon, H., Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals, *Cur. Biol.* 8 (1998) 740–749.
- Martin, J.L., Sloviter, R.S., Focal inhibitory interneuron loss and principal cell hyperexcitability in the rat hippocampus after microinjection of a neurotoxic conjugate of saporin and a peptidase-resistant analog of Substance P, *J. Comp. Neurol.* 436 (2001) 127–152.
- Marquart, H., Schäfer, S.G., *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. Auflage (2004), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbh Stuttgart.
- Means, G.E., Feeney, R.E., Reductive alkylation of proteins, *Anal. Biochem.* 224 (1995) 1–16.
- Mellman, I., Endocytosis and molecular sorting, *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* 12 (1996) 575–625.
- Melzig, M.F., Hebestreit, P., Gaidi, G., Lacaille-Dubois, M.A., Structure-activity-relationship of saponins to enhance toxic effects of agrostin, *Planta Med.* 71 (2005) 1088–90.
- Mikeska, R., Wacker, R., Arni, T.P., Singh, A., Mikhailov, A., Gabdoulkhakov, W., Betzel, V.C., Mistletoe lectin I complex with galactose and lactose reveals disinct sugar-binding properties, *Acta Cryst. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61 (2005) 17–25.

- Moestrup, S.K., The α_2 -macroglobulin receptor and epithelial glycoprotein-330: Two giant receptors mediating endocytosis of multiple ligands, *Biochim. Biophys. Acta* 6, 1197 (1994) 197–213.
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65, (1983) 55–63.
- Newton, D.L., Stockwin, L.H., Rybak, S.M., Anti-CD22 Onconase: preparation and characterization, *Methods Mol. Biol.* 525 (2009) 425–443.
- Nilson, K., Boston, R.S., Ribosome-Inactivating Proteins: A Plant Perspektive Annual Review of Plant Physiologie and Plant Molecular Biology, 52 (2001) 785–816.
- Organikum, 13. Auflage (1974), VFB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- Pasquali, C., Fialka, I., L., Huber, A., Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins, *Electrophoresis* 18 (1997) 2573–2581.
- Pelkmans, L., Helenius, A., Endocytosis via Caveolae, *Trafic* 3 (2002) 311–320.
- Peumans, W., Hao, Q., van Damme, E., Ribosome-inactivating proteins from plants: More than RNA N-glycosidases ?, *FASEB J.* 15 (2001) 1493–1506.
- Pharmacopoea Europaea (Ph. Eur. 5), 5 Ausgabe (2005).
- Piazza, T., Cha, E., Bongarzone, I., Canevari, S., Bolognesi, A., Polito, L., Bargellesi, A., Sassi, F., Ferrini, S., Fabbi, M., Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single-chain recombinant antibody, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 1515–1525.
- Ramon, G., Procèdes pour accroître la production des antitoxines, *Ann. Inst. Pasteur Paris* 40 (1926) 1–10.
- Regev, R., Eytan, G.D., Flip-Flop of Doxorubicin across Erythrocyte and lipid membranes, *Biochem. Pharm.* 54, (1997) 1151–1158.
- Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., Glasebrook, A.L., An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT, *J. Immunol. Meth.* 142 (1991) 257–365.
- Sasaki, M., Hashimoto, H., Yachiku, S., Studies on enhancement of drug absorption through the bladder mucosa, *Nippon Hinyokika Gakkai Zashi*, 85 (1994) 1353–1362.
- Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E., Allard, J., Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and permeability of select macromolecules, *J. Cell Biol.* 127 (1994) 1217–1232.

- Scudiero, D., Shoemaker, R., Paull, K., Monks, A., Tierney, S., Currens, D., Boyd, M., Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other cell lines, *Cancer Res.* 28 (1987) 4827–4833.
- Störmer, T., Diplom, Untersuchungen zur Zytotoxizität ausgewählter Naturstoffe Diplomarbeit, Universität Greifswald, 2008.
- Sung, M.K., Kendall, C.W., Rao, A.V., Effect of soybean saponins and Gypsophila saponin on morphology of colon cells in culture, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 357–66.
- Tazzari, P.L., Polito, L., Bolognesi, A., Pistillo, M.P., Capanni, P., Palmisano, G.L., Lemoli, R.M., Curti, A., Biancone, L., Camussi, G., Conte, R., Ferrara, G.B., Stirpe, F., Immunotoxins containing recombinant anti-CTLA-4 single-chain fragment variable antibodies and saporin: in vitro results and in vivo effects in an acute rejection model, *J. Immunol* 167 (2001) 4222–4229.
- Tragagnos, F., Darzynkiewicz, Z., Lysosomal proton pump activity: Supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocytes subpopulation, *Meth. Cell. Biol.* 41 (1994) 185–195.
- Teuscher, E., Lindequist, U., Biogene Gifte 1. Auflage (1988), Akademie-Verliag Berlin
- Toshkova, R.A., Krasteva, I.N., Wesselinova, D.W., Nikolov, S.D., Influence of purified saponin mixture from *Astragalus corniculatus* Bieb. on phagocytic cells in Graffitumor bearing hamsters, *J. Ethnopharmacol.* 109 (2007) 394–399.
- Vago, R., Marsden, C.J., Lord, J.M., Ippoliti, R., Flavell, D.J., Flavell, S.U., Ceriotti, A., Fabbrini, M.S., Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells, 19 (2005) 4983–95.
- Van Weert, A.W., Dunn, K.W., Geuze, H.J., Maxfield, F.R., Storrvoegel, W., Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membran proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump, *J. Biol. Chem.* (1995) 130 821–834.
- Wang, L., Rothberg, G., Anderson, R.G.W., Mis-Assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation, *J. Cell Biol.* 123 (1993) 1107–1117.
- Wang, H., Yao, S., Lin, W., Du, Y., Biang, X., He, S., Huang, C., Wei, Q., Different roles of Loop 7 in inhibition of calcineurin, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 362 (2007) 263–268.

- Wang, P., Heitman, J., The cyclophilins, *Genome Biol.* 6 (2005) 226.
- Weng, A., Diplom, Untersuchungen zur Wechselwirkung von Saponinen und Lektinen an humanen U-937 Zellen, Universität Greifswald, 2005.
- Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., M. F. Melzig, *Soapwort* saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type I ribosome-inactivating protein, *Chem Biol Interact.* 176 (2008) 204–11.
- Weng, A., Bachran, D., Görick, C., Bachran, C., Fuchs, H., Melzig, M.F.,
A simple method for isolation of *Gypsophila* saponins for the combined application of targeted toxins and saponins in tumor therapy, *Planta Med.* (2009), published ahead of print.
- Weyergang, A., Selbo, P.K., Berg, K., Photochemically stimulated drug delivery increases the cytotoxicity and specificity of EGF-saporin, *J. Cont. Rel.* 111 (2006) 165–173.
- Xu, H.D., You, C.G., Zhang, R.L., Gao, P., Wang, Z.R., Effects of Astragalus polysaccharides and astragalosides on the phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by macrophages, *J. Int. Med. Res.* 35 (2007) 84–90.
- Yamamoto, N., Shichijo, M., Kokubo, T., Establishment of the superoxide production assay with human monocytic cell line , U-937 for the evaluation of Syk kinase inhibitor, *J. Immunol. Meth.* 268 (2002) 123–130.
- Yip, W.L., Weyergang, A., Berg, K., Tønnesen, H.H., Selbo, P.K., Targeted delivery and enhanced cytotoxicity of cetuximab-saporin by photochemical internalization in EGFR-positive cancer cells, *Mol. Pharm.* 2 (2007) 241–251.
- Zhang, X.F., Cui, Y., Huang, J.J., Zhang, Y.Z., Nie, Z., Yan, B.Z., Immuno-stimulating properties of diosgenyl saponins isolated from *Paris polyphylla*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 2408–2413.

8. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten in Fachzeitschriften

A. Weng, K. Jenett-Siems, P. Schmieder, C. Bachran, D. Bachran, , H. Fuchs, C. Görick, M.F. Melzig.

Three saponins from the roots of *Gypsophila paniculata* L. with toxicity enhancing properties on N-glycosidases. (2009), submitted

C. Bachran, **A. Weng**, D. Bachran, S. B. Riese, N. Schellmann, M. F. Melzig, H. Fuchs
The Biodistribution Kinetics of Saponins in Mice Affects the High Synergistic Anti-tumor Activity in Combination with Chimeric Toxins. Br. J. Pharmacol. (2009), accepted manuscript

A. Weng, C. Bachran, H. Fuchs, E. Krause, H. Stephanowitz, M.F. Melzig.

Enhancement of saporin cytotoxicity by *Gypsophila* saponins - more than stimulation of endocytosis. Chem. Biol. Int. (2009), published ahead of print

C. Bachran, H. Dürkop, M. Sutherland, D. Bachran, C. Müller, **A. Weng**, M.F. Melzig, H. Fuchs. Inhibition of Tumor Growth by Targeted Toxins in Mice is Massively Improved by Saponinum album in a Synergistic Way. J. Immunother. (2009), 32 (7): 713-25

A. Weng, C. Görick, M.F. Melzig.

Enhancement of Toxicity of Saporin Based Toxins by *Gypsophila* Saponins – Kinetic of the saponin. Exp. Biol. Med. (Maywood) (2009), 234 (8): 961-6

A. Weng, D. Bachran, C. Görick, C. Bachran, H. Fuchs, M.F. Melzig.

A simple method for isolation of *Gypsophila* saponins for the combined application of targeted toxins and saponins in tumor therapy. Planta Med. (2009), published ahead of print

A. Weng, C. Bachran, H. Fuchs, M. F. Melzig

Enhancement of Saporin Toxicity Against U937 Cells by *Gypsophila* Saponins. J. Immunotoxicol. (2008), 5 (3): 287–92

A. Weng, C. Bachran, H. Fuchs, M. F. Melzig

Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type I ribosome-inactivating protein. *Chem. Biol. Interact.* (2008), 176 (2-3): 204–11

A. Weng, K. Jenett-Siems, C. Görick M.F. Melzig

Enhancement of cytotoxicity of ribosomen-inactivating proteins typ I by saponinum album is not based on stimulation of phagocytosis. *J. Pharm. Pharmacol.* (2008), 60 (7): 925–30

P. Hebestreit, **A. Weng**, C. Bachran, H. Fuchs, M.F Melzig.

Enhancement of cytotoxicity of lectins by Saponinum album. *Toxicon* (2006), 47 (3): 330–5

Übersichtsarbeiten

H. Fuchs, D. Bachran, H. Panjideh H, N. Schellman, **A. Weng**, M.F. Melzig, M. Sutherland, C. Bachran.

Saponins as tool for improved targeted tumor therapies. *Curr. Drug Targets* (2009), 10 (2): 140–51

Patente

A. Weng, M.F. Melzig.

Isolierung eines, die intrazelluläre Wirkung von Lektinen potenzierenden Saponins aus *Gypsophila paniculata* L. durch Kombination von Dialyse und HPLC (High Performance Liquid Chromatography)
(2009), Patentanmeldung

Vorträge

A. Weng, K. Jenett-Siems C. Bachran, H.Fuchs, M.F. Melzig.

Mechanistic aspects of the synergistic cytotoxicity between *Gypsophila* saponins and type I ribosome-inactivating proteins. 4th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology 2nd TARGETED TUMOR THERAPIES. Berlin, Germany: 1–3 April, 2009.

A. Weng, C. Bachran, D. Bachran, H. Fuchs, K. Jenett-Siems, M.F. Melzig

In vitro characterisation of $^3\text{[H]}$ *Gypsophila* saponins. International conference on Saponins, new trends in saponins. Nancy, France: 9–11 July, 2009

Arbeiten in Buchform

A. Weng

Diplom, Untersuchung zur Wechselwirkung von Saponinen und Lektinen an humanen U-937 Zellen, Diplomarbeit Universität Greifswald, 2005.

Poster

A. Weng, M.F. Melzig

Cytotoxicity of β -aescin/agrostin mixtures in different cell lines depends on their growth characteristic. 54th Annual Congress on Medical Plant Research. Helsinki, Finland: 29. August–2. September, 2006

A. Weng, M.F. Melzig

Enhancement of cytotoxicity of ribosomen-inactivating proteins typ I by saponinum album is not based on stimulation of phagocytosis. DPhG Landesgruppentagung. Berlin, 4. Juli, 2008

9. Curriculum Vitae

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

Danksagung

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. M.F. Melzig, der mich während der gesamten Promotionszeit durch sein stetiges Interesse und seine fachliche Expertise auf hervorragende Weise betreut hat. Ohne sein Engagement und seine ständige Ansprechbarkeit wäre eine Vielzahl von Untersuchungen nicht möglich gewesen.

Für die Herstellung des ^{his}Saporins danke ich Dr. C. Bachran (Charité Berlin) und PD. Dr. H. Fuchs.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Kleuser (FU-Berlin) bedanke ich mich für die Nutzung des Radioaktivlabors.

Des Weiteren sei Dr. E. Krause (FMP Berlin) für die MS-Analyse des methylierten Saporins gedankt. Dr. P. Schmieder (FMP Berlin) danke ich für die Durchführung der Strukturanalysen und Frau PD. Dr. K. Jennett-Siems (FU-Berlin) für die Interpretation der entsprechenden Daten.

Maria danke ich für die vielen fachlichen Auseinandersetzungen und die intensive Korrekturarbeit der vorliegenden Arbeit. Monika & Henner danke ich für die orthographische Korrektur und Mona für die Lösung von Formatierungsproblemen.

Für die emsige Suche nach einem geeigneten HPLC-Säulenmaterial, die Bereitstellung einer immer betriebsbereiten HPLC-Anlage und für die kreative Bearbeitung des Doktorhutes danke ich Cornelia Görick.

10. Eidesstattliche Erklärung

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

Berlin, 14.09.2009

Alexander Weng