

Charakterisierung des synergistischen Effektes von Saponinen und Proteintoxinen auf die zielzellspezifische Cytotoxizität des Toxinanteils

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diana Bachran

Berlin, Januar 2010

Die praktischen Arbeiten wurden am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, in der Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. Hendrik Fuchs angefertigt.

ERSTER GUTACHTER : Priv.-Doz. Dr. H. Fuchs
Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und
Pathobiochemie
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

ZWEITER GUTACHTER : Prof. Dr. R. Mutzel
Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie
Freie Universität Berlin

Tag der Disputation : 24. März 2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungen | 5 |
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Zielgerichtete Toxine in der Tumorthherapie | 7 |
| 1.1.1 Saporin als Bestandteil zielgerichteter Toxine | 10 |
| 1.1.2 Der EGFR als tumorassoziiertes Antigen | 11 |
| 1.2 Therapieoptionen für Zervixkarzinome | 12 |
| 1.3 Saponine | 14 |
| 1.4 Endocytose | 16 |
| 1.5 Zelltod | 17 |
| 1.5.1 Apoptose | 17 |
| 1.5.2 Nekrose | 18 |
| 1.5.3 Autophagie | 19 |
| 1.6 Zielsetzung | 21 |
| 2 Materialien und Methoden | 23 |
| 2.1 Materialien | 23 |
| 2.1.1 Geräte | 23 |
| 2.1.2 Chemikalien und Proteine | 24 |
| 2.1.3 Saponine | 25 |
| 2.1.4 Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 2.1.5 Kits | 25 |
| 2.1.6 Antikörper | 26 |
| 2.1.7 Bakterienstämme | 26 |
| 2.1.8 Vektoren | 26 |
| 2.1.9 Oligonukleotide | 27 |
| 2.1.10 Marker | 27 |
| 2.1.11 Puffer und Medien | 27 |
| 2.1.12 Medien und Lösungen für die Zellkultur | 27 |
| 2.1.13 Zelllinien | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.1.14 | Statistische Auswertungen | 29 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 2.2.1 | Transformation | 29 |
| 2.2.2 | Präparation von Plasmid-DNA | 29 |
| 2.2.3 | RNA-Isolierung | 30 |
| 2.2.4 | Reverse Transkriptase PCR | 31 |
| 2.2.5 | DNA-Agarosegelelektrophorese | 31 |
| 2.3 | Proteinbiochemische Methoden | 32 |
| 2.3.1 | Proteinexpression in <i>E. coli</i> | 32 |
| 2.3.2 | Proteinaufreinigung | 32 |
| 2.3.3 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 33 |
| 2.3.4 | Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen | 34 |
| 2.3.5 | Westernblot und Immunodetektion | 34 |
| 2.3.6 | Stripping | 35 |
| 2.3.7 | Aufkonzentrieren von Proteinlösungen | 35 |
| 2.3.8 | Proteinkonzentrationsbestimmung | 35 |
| 2.4 | Zellbiologische Methoden | 36 |
| 2.4.1 | Kultivierung von adhärennten Zellen | 36 |
| 2.4.2 | Cytotoxizitätsassay | 37 |
| 2.4.3 | Zellyse zur Proteinanalyse im Westernblot | 37 |
| 2.4.4 | Durchflusszytometrie | 38 |
| 2.4.5 | Transfektion und Generierung stabiler Klone | 39 |
| 2.4.6 | EGFR-ELISA | 39 |
| 2.4.7 | DNA-Fragmentierung | 40 |
| 2.4.8 | Membranintegrität | 41 |
| 3 | Ergebnisse | 43 |
| 3.1 | Cytotoxische Wirkung von Saporin und des zielgerichteten Toxins SE auf Zervixkarzinomzelllinien | 43 |
| 3.1.1 | Untersuchungen an HER14- und NIH-3T3-Zellen | 43 |
| 3.1.2 | Untersuchungen an humanen Zervixkarzinomzellen | 46 |
| 3.1.3 | Untersuchungen an MDA-MB-435S-Zellen | 50 |
| 3.2 | Analyse des Zusammenhangs zwischen der EGFR-Expression und der Cytotoxizität von SE und Saporin | 51 |
| 3.2.1 | Quantifizierung der EGFR-Expression | 51 |
| 3.2.2 | Korrelation der Cytotoxizität von SE und Saporin mit der EGFR- Expression | 53 |

| | | |
|-----------------------------|---|------------|
| 3.3 | Untersuchungen zur Wirkung von Spn | 55 |
| 3.3.1 | Einfluss von Spn auf die EGFR-Expression | 55 |
| 3.3.2 | Analyse der Aufnahme von SE in An- und Abwesenheit von Spn | 56 |
| 3.3.3 | Einfluss von Spn auf den retrograden Transport | 69 |
| 3.4 | Charakterisierung des durch SE vermittelten Zelltodes | 70 |
| 3.4.1 | PARP-Spaltung | 71 |
| 3.4.2 | DNA-Fragmentierung | 72 |
| 3.4.3 | Untersuchung der Membranintegrität | 73 |
| 3.4.4 | Analyse der Wirkung von SE auf Zellen mit veränderten Apoptose- eigenschaften | 74 |
| 3.5 | Analyse der verstärkenden Wirkung einzelner Saponine | 76 |
| 3.5.1 | Untersuchung der verstärkenden Wirkung des isolierten Saponins 1641 aus <i>Saponinum album</i> | 77 |
| 3.5.2 | Untersuchung der verstärkenden Wirkung der isolierten Saponine aus <i>Gypsophila paniculata</i> | 79 |
| 4 Diskussion | | 83 |
| 4.1 | Cytotoxische Wirkung des zielgerichteten Toxins SE und von Saporin auf Zervixkarzinomzelllinien | 83 |
| 4.2 | Analyse des Zusammenhangs zwischen der EGFR-Expression und der Cytotoxizität von SE und Saporin | 86 |
| 4.3 | Untersuchungen zur Wirkung von Spn | 87 |
| 4.4 | Charakterisierung des durch SE vermittelten Zelltodes | 92 |
| 4.5 | Analyse der verstärkenden Wirkung einzelner Saponine | 95 |
| 5 Anhang | | 97 |
| 5.1 | Parameter für Cytotoxizitätsassays | 97 |
| 5.1.1 | Cytotoxische Wirkung von SE und Saporin auf verschiedene Zell- linien | 98 |
| 5.1.2 | Untersuchungen zur Wirkung von SE | 99 |
| 5.1.3 | SE vermittelter Zelltod und isolierte Saponine | 99 |
| 5.1.4 | Eigentoxizität der inhibitorischen Substanzen | 100 |
| 5.2 | Statistische Auswertungen | 101 |
| Zusammenfassung | | 105 |
| Summary | | 109 |
| Literaturverzeichnis | | 111 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| Lebenslauf | 124 |
| Publikationsverzeichnis | 125 |
| Danksagung | 130 |

Abkürzungen

| | |
|------------------|---|
| Apaf-1 | <i>apoptotic protease activating factor 1</i> |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bak | <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> |
| Bax | <i>Bcl-2-associated x protein</i> |
| BH3-only | <i>B-cell lymphoma 2 homology domain 3-only</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| His-tag | Histidin-tag aus sechs Histidinresten |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>) |
| IgG | Immunglobulin G |
| λ | Wellenlänge |
| LB-Medium | <i>lysogeny broth</i> -Medium, auch Luria-Bertani-Medium |
| NAD ⁺ | Nicotinamidadenindinukleotid |
| Ni-NTA | Nickel-Nitrilotriacetat |
| NP-40 | Nonylphenylpolyethylenglycol |
| PARP | Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| RIP | Ribosom inaktivierendes Protein (<i>ribosome-inactivating protein</i>) |
| RT-PCR | Reverse Transcriptase PCR |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SE | zielgerichtetes Toxin aus Saporin und EGF |

| | |
|--------------|--|
| SI | <i>survival index</i> |
| Spn | <i>Saponinum album</i> |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TGF α | <i>trans-forming growth factor α</i> |
| Tris | Tris-hydroxymethylaminoethan |
| Triton X-100 | T-octylphenoxypolyethoxyethanol |
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitanmonolaurat |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| v/v | Konzentrationsangabe als Volumenanteil am Gesamtvolumen |
| w/v | Konzentrationsangabe als Gewichtsanteil in Gramm am Gesamtvolumen in Millilitern |
| $\times g$ | \times -faches der Erdbeschleunigung |

Einleitung

1.1 Zielgerichtete Toxine in der Tumorthherapie

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache weltweit. Es erkranken jährlich 11 Millionen Menschen an Krebs und 7,9 Millionen sterben pro Jahr daran. Allein in Deutschland führen Krebserkrankung zu 200 000 Todesfällen jährlich und doppelt so vielen Neuerkrankungen [1]. Aufgrund der erhöhten Lebenserwartung der Menschen wird eine weitere Steigerung der Krebserkrankungen erwartet. Aber auch in Entwicklungsländern ist die Anzahl der Krebserkrankungen und der resultierenden Sterbefälle besonders hoch, da im Gegensatz zu den Industrieländern Vorsorgeuntersuchungen kaum möglich sind. Die häufigste Krebserkrankung bei Männern ist Prostatakrebs und bei Frauen Brustkrebs. Die Mutationen in der DNA, die zur Transformation einer normalen Zelle in eine Krebszelle führen, sind durch verschiedene Faktoren bedingt. Dazu gehören unter anderem energiereiche Strahlung, Tabakrauch, Chemikalien, chronische Infektionen und ein erhöhter Alkoholkonsum [2].

Therapiemöglichkeiten für eine Krebsbehandlung sind in erster Linie die chirurgische Entfernung des Tumors, die Behandlung mit Chemotherapeutika und die Bestrahlung. Wichtig für alle Tumorthapien ist die frühzeitige Erkennung einer solchen Erkrankung. Die chirurgische Entfernung kann nur bei gut zugänglichen soliden Tumoren angewandt werden. Dabei besteht jedoch immer die Möglichkeit, dass einzelne Tumorzellen zurück bleiben und zu einem neuen Tumor anwachsen können oder auch zur Metastasenbildung führen. Aus diesem Grund findet im Anschluss meist die Behandlung mit Chemotherapeutika oder eine Strahlentherapie statt. Die Bestrahlung mit Röntgenstrahlen erfolgt meist nur lokal begrenzt, es können aber auch radioaktive Präparate direkt in die Nähe des Tumors gebracht werden. Die Chemotherapie wirkt im Gegensatz dazu systemisch und wird auch gezielt zur Behandlung von Metastasen und Leukämien eingesetzt. Es existiert eine Vielzahl verschiedener Chemotherapeutika, die jedoch alle zu einer Hemmung des Zellwachstums führen, weshalb sie auch als Zytostatika bezeichnet werden. Beispiele sind Doxorubicin [3], Cisplatin [4], Paclitaxel [5], Topotecan [6] und 5-Fluorouracil [7]. Die Zytostatika wirken primär auf schnell pro-

liferierende Zellen, wie Tumorzellen, sind aber nicht spezifisch für diese. Daher treten bei einer Chemotherapie teilweise starke Nebenwirkungen auf.

Durch zielgerichtete Wirkstoffe wird die spezifische Eliminierung von Tumorzellen erhöht und dadurch die Nebenwirkungen verringert. Es existieren verschiedene Möglichkeiten für eine zielgerichtete Behandlung von Tumoren, dazu zählen die Verwendung von Antikörpern und zielgerichteten Toxinen. Die eingesetzten Antikörper binden an ein bestimmtes Oberflächenprotein, das verstärkt oder sogar ausschließlich auf der Zelloberfläche der Tumorzellen vorkommt (tumorassoziertes Antigen). Diese spezifische Wechselwirkung ermöglicht die gezielte Behandlung von Tumorzellen. Bei den verwendeten Antikörpern handelt es sich um monoklonale Antikörper, die meist murinen Ursprungs sind. Um einer Eliminierung durch das Immunsystem des Patienten zu entgehen, werden die Antikörper humanisiert. Dazu werden die murinen Aminosäuresequenzen durch humane ausgetauscht [8] oder die Antigen bindende Region des murinen Antikörpers ersetzt diese Region in einem humanen Antikörper. Die Antikörper können eine Reihe verschiedener Wirkungen gegenüber den Tumorzellen vermitteln. Durch die Bindung an die für den Antikörper spezifischen tumorassozierten Antigene wird die Bindung des natürlichen Liganden unterbunden. Zusätzlich kann der Komplex aus Antikörper und dem Antigen internalisiert und degradiert werden, wodurch die Menge des tumorassozierten Antigens auf der Tumorzelloberfläche verringert wird. Ist das tumorassozierte Antigen ein Rezeptor für extrazelluläre Signale, so verhindert die Bindung des Antikörpers die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade. Neben den daraus resultierenden zytostatischen Effekten, können die monoklonalen Antikörper auch eine cytotoxische Wirkung vermitteln. Dabei kann beispielsweise Apoptose oder *antibody-dependent cytotoxicity* durch Aktivierung des Immunsystems ausgelöst werden. Der monoklonale Antikörper Cetuximab wurde bereits in Kombination mit Chemotherapeutika zur Behandlung von metastasierenden Kolonkarzinomen zugelassen [9, 10]. Cetuximab ist gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gerichtet. Panitumumab ist ein weiterer monoklonaler Antikörper, der gegen den EGFR gerichtet ist [11]. Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen *cluster of differentiation* (CD) 20, ein Oberflächenprotein von B-Zellen, gerichtet ist [12, 13]. Er ist für die Behandlung von Non-Hodgkin B-Zell-Lymphomen zugelassen. Für die Behandlung von metastasierenden Brustkrebstumoren ist der monoklonale Antikörper Trastuzumab zugelassen [14, 15]. Dieser ist gegen den HER2-Rezeptor, einen Wachstumsfaktorrezeptor, gerichtet und wird auch in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt [16]. Ein weiteres Beispiel für einen monoklonalen Antikörper in der Tumorthherapie ist Bevacizumab. Er ist als erstes Anti-Angiogenesemedikament in Kombination mit Chemotherapeutika für die Behandlung von metastasierenden Kolonkarzinomen zugelassen [17]. Bevacizumab ist gegen den *vascular endothelial growth*

factor (VEGF) gerichtet, eines der wichtigsten Proteine der Angiogenese, der Neubildung von Blutgefäßen. Dieser Vorgang ist für die Tumorentwicklung von großer Bedeutung [18]. Durch die Bindung an VEGF wird dessen Bindung an den VEGF-Rezeptor unterbunden. Dadurch wird das Angiogenesesignal blockiert und das Ausbleiben der Neubildung von Blutgefäßen unterbindet das Wachstum des Tumors aufgrund zu geringer Sauerstoff- und Nährstoffversorgung [19].

Zusätzlich zu den monoklonalen Antikörpern werden auch zielgerichtete Toxine für die Tumorthherapie entwickelt. Diese ermöglichen eine noch effektivere Eliminierung der Tumoren, da hochwirksame Toxine spezifisch zu den Tumorzellen transportiert und von diesen aufgenommen werden. Zielgerichtete Toxine setzen sich aus einer toxischen Substanz und einer zielgerichteten Struktur zusammen. Diese beiden Komponenten werden entweder als rekombinante Fusionsproteine exprimiert oder über einen Linker durch eine chemische Reaktion miteinander verknüpft [20]. Dieser muss jedoch hinreichend stabil sein, damit sich die Verbindung nicht vor Erreichen des Tumors löst [21]. Handelt es sich bei der zielgerichteten Struktur um einen Antikörper oder ein Antikörperfragment, werden die Konjugate oft als Immunotoxine bezeichnet. Ist die zielgerichtete Struktur hingegen ein tumorassoziiertes Antigen, spricht man von chimären Toxinen oder einfach zielgerichteten Toxinen. Übliche Zielstrukturen sind der Interleukin 2 Rezeptor, der EGFR oder Leukocytenantigene, wie das CD22 [22]. Als toxische Substanz werden kleine cytotoxische Moleküle, natürlich vorkommende Toxine oder auch radioaktive Substanzen eingesetzt. Radio-Immunokonjugate bestehen aus einem monoklonalen Antikörper und einem Radionuklid. Über den Antikörper bindet das Konjugat an die Tumorzellen und die emittierte Strahlung des Radionuklids tötet die in der Nähe befindlichen Tumorzellen. Die beiden Radio-Immunokonjugate Zevalin und Bexxar sind bereits zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen [23, 24]. Beide sind gegen CD20 gerichtet, besitzen aber unterschiedliche Radionuklide. Zevalin ist mit ^{90}Y markiert und Bexxar mit ^{131}I . Ein weiteres zielgerichtetes Toxin, das zur Behandlung von Tumorerkrankungen zugelassen wurde, ist Mylotarg. Es besteht aus dem monoklonalen Antikörper Gemtuzumab und der toxischen Substanz Ozogamicin und wurde 2000 zur Behandlung von akuten myelogenen Leukämien zugelassen [25]. Bei Verwendung von natürlichen Toxinen als toxische Substanz werden hauptsächlich Proteintoxine eingesetzt, die in der Tumorzelle die Proteinbiosynthese blockieren und somit den Zelltod initiieren [26]. Momentan befinden sich zahlreiche zielgerichtete Toxine in klinischen Studien, welche die beiden ADP-ribosylierenden Proteine Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* oder Pseudomonas Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* sowie das pflanzliche Ribosom inaktivierende Protein (RIP) Ricin aus *Ricinus communis* enthalten [22]. Ein bereits seit 1999 zugelassenes zielgerichtetes Toxin mit der katalytischen Domäne und der Translokationsdomäne von Diphtherietoxin ist On-

tak [27]. Als zielgerichtete Struktur enthält es das humane Interleukin 2 und wurde zur Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen, die nicht mit herkömmlichen Methoden erfolgreich behandelt werden konnten. Ein weiteres vielversprechendes Proteintoxin für die Verwendung in zielgerichteten Toxinen ist das RIP Saporin. In vielen *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen in Mausmodellen wurde eine starke cytotoxische Wirkung auf Tumorzellen nachgewiesen [22, 28, 29, 30].

1.1.1 Saporin als Bestandteil zielgerichteter Toxine

Saporin ist ein pflanzliches Proteintoxin, das von *Saponaria officinalis*, dem Seifenkraut, gebildet wird [31]. In der Pflanze existieren etwa 10 Isoformen mit Molekülmassen von etwa 27 bis 30 kDa. Saporin gehört zu den RIPs, die N-Glykosidaseaktivität besitzen und dadurch das Adenin 4324 aus der 28S-rRNA abspalten [32]. Die Proteinbiosynthese der Zellen wird dadurch gestoppt und die Zellen sterben. Jedoch ist Saporin auch in der Lage Adenin aus anderen RNA-Molekülen und auch aus DNA freizusetzen [33, 34].

RIPs werden in zwei Typen unterteilt, die Typ-1- und Typ-2-RIPs. Saporin besteht nur aus einer einzigen Polypeptidkette und gehört daher zu den Typ-1-RIPs. Im Gegensatz dazu besitzen die Typ-2-RIPs zwei strukturelle Domänen, die A- und B-Kette. Auf der A-Kette befindet sich die katalytische Funktion und auf der B-Kette die Rezeptor bindende Domäne und die Translokationsdomäne. Das sehr toxische Ricin ist ein Beispiel für ein Typ-2-RIP. Saporin besitzt keine B-Kette und weist daher auch im Vergleich zu Typ-2-RIPs eine geringere Toxizität auf. Die Aufnahme von Saporin erfolgt möglicherweise über clathrinvermittelte Endocytose [35]. Es ist jedoch noch unstritten, über welchen Rezeptor Saporin in die Zellen gelangt. Von Cavallaro *et al.* wurde nachgewiesen, dass Saporin an den aufgereinigt vorliegenden α_2 -Makroglobulinrezeptor binden kann und diese Bindung zusätzlich durch Liganden des Rezeptors inhibiert werden kann [36]. Bagga *et al.* konnten jedoch zeigen, dass die Cytotoxizität unabhängig von der Expression des α_2 -Makroglobulinrezeptors erfolgt [37]. Die intrazelluläre Transportroute von Saporin ist ebenfalls noch nicht bekannt. Vago *et al.* konnten jedoch nachweisen, dass Saporin nicht wie die Proteintoxine Ricin oder *Pseudomonas* Exotoxin A durch retrograden Transport über das Golgi-Netzwerk und das endoplasmatische Retikulum in das Cytosol gelangt [38].

Saporin wird bei zahlreichen zielgerichteten Toxinen als toxische Substanz eingesetzt [22, 28, 39]. Um Saporin oder andere Proteintoxine zu den Tumorzellen zu bringen, werden Konjugate mit Antikörpern, Antikörperfragmenten oder Liganden von tumorassoziierten Antigenen, wie dem Interleukin 2-Rezeptor oder dem EGFR hergestellt.

1.1.2 Der EGFR als tumorassoziiertes Antigen

Der EGFR ist ein 170 kDa großes Transmembranprotein mit einer Transmembrandomäne [40, 41]. Er gehört zur EGFR1 / HER1 (ErbB 1) Unterfamilie der EGFR-Familie. Weitere Mitglieder der EGFR-Familie sind HER2 / c-neu (ErbB 2), HER3 (ErbB 3) und HER4 (ErbB 4). EGFR kann Homodimere ausbilden oder Heterodimere mit ErbB 2 oder ErbB 3, wodurch auch die Signalweiterleitung der Rezeptoren verändert wird. Der EGFR ist der erste Rezeptor, für den eine Tyrosinkinase-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Neben der Phosphorylierung von Zielmolekülen ist die Kinaseaktivität auch gegen Tyrosine innerhalb des Rezeptors in der cytosolischen Domäne gerichtet (Autophosphorylierung) [42].

Die zwei bekanntesten Liganden des EGFR sind der *epidermal growth factor* (EGF) und der *transforming growth factor* ($TGF\alpha$). Weitere Liganden sind der *Heparin-binding EGF-like growth factor*, Betacellulin, Amphiregulin und Epiregulin. Die Liganden kompetieren um die Bindungsstelle am Rezeptor, vermitteln jedoch dieselben biologischen Funktionen [41]. Allerdings sind EGF und $TGF\alpha$ nicht in der Lage an die anderen Rezeptoren der EGFR-Familie zu binden. Durch die Bindung von EGF an den EGFR wird eine Dimerisierung mit einem weiteren EGFR eingeleitet, der dann wiederum ein EGF-Molekül bindet. Dabei wird vermutet, dass die EGF-Bindung zu einer Konformationsänderung in der extrazellulären Domäne des EGFR führt, wodurch eine schnelle Homodimerisierung ermöglicht wird [41]. Durch die Dimerisierung findet ebenfalls eine Konformationsänderung in der Transmembrandomäne statt, was zur Aktivierung der Tyrosinkinase in der cytoplasmatischen Domäne führt. Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors und zur Phosphorylierung zellulärer Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Weiterhin kommt es zur clathrinabhängigen Endocytose des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Der Komplex wird schließlich in den Lysosomen degradiert und dadurch die Anzahl an EGFR an der Zelloberfläche reduziert [40].

In zahlreichen Tumoren konnte eine Überexpression des EGFR nachgewiesen werden, dazu zählen unter anderem Speiseröhren-, Blasen-, Zervix- und Brustkarzinome [43]. Aus diesem Grund sind diese Tumoren für die Behandlung mit Medikamenten geeignet, die gegen den EGFR gerichtet sind. Durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen EGFR wird die Spezifität der Behandlung deutlich erhöht. Bisher werden zwei monoklonale Antikörper für die Behandlung von Tumoren eingesetzt, bei denen der EGFR überexprimiert ist. Cetuximab bindet mit einer höheren Affinität an den EGFR als dessen Liganden EGF und $TGF\alpha$ und führt zur Internalisierung und zur Degradierung des Rezeptors in den Lysosomen [11]. Somit wird die Menge an EGFR an der Zelloberfläche deutlich herunter reguliert. Die Bindung von Cetuximab verhindert zusätzlich noch die Aktivierung des Rezeptors durch Autophosphorylierung. Weiter-

hin induziert Cetuximab einen Zellzyklusarrest, löst apoptotische Prozesse in den Zellen aus und verhindert die Produktion von pro-Angiogeneseproteinen. Panitumumab ist ein humaner Volllänge-IgG2 monoklonaler Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet ist. Die Behandlung mit Panitumumab führt nur zu geringen Nebenwirkungen und wurde in klinischen Studien sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Medikamenten untersucht [44]. Die Verwendung zielgerichteter Toxine zur Behandlung von EGFR-überexprimierenden Tumoren ermöglicht, wie auch schon mit den monoklonalen Antikörpern, eine Erhöhung der Spezifität gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika. Zusätzlich werden die Tumorzellen noch durch die potenten Toxine eliminiert. Die Wirkung einiger zielgerichteter Toxine wird zurzeit in klinischen Studien untersucht [22]. Dazu zählen Konstrukte, die als Toxin das *Pseudomonas* Exotoxin A oder Diphtherietoxin tragen und TGF α oder EGF als Ligand für den EGFR.

1.2 Therapieoptionen für Zervixkarzinome

Pro Jahr erkranken weltweit etwa 450 000 Frauen an Zervixkarzinomen und 300 000 Erkrankte sterben [45]. Zervixkarzinome stellen damit die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen dar [46]. In den Industrieländern führten erfolgreiche Maßnahmen zur Prävention von Zervixkarzinomen in den letzten 50 Jahren zu einer 75%igen Verringerung der Neuerkrankungen. In Entwicklungsländern sind solche Präventionen jedoch nicht oder kaum möglich, sodass dort Zervixkarzinome noch immer eine sehr große Rolle bei den durch Krebs hervorgerufenen Todesfällen bei Frauen spielen. Zervixkarzinome werden hauptsächlich durch humane Papillomviren, einer Gruppe sexuell übertragbarer Viren, hervorgerufen. Die häufigsten Typen der damit assoziierten Papillomviren sind Typ-16 (HPV 16) und -18 (HPV 18). Seit kurzem ist zu den üblichen Vorsorgeuntersuchungen auch die Impfung gegen die virale Infektion möglich (Gardasil und Cervarix) [47, 48]. Die Infektion mit den Papillomviren ist eine notwendige, aber nicht ausreichende Voraussetzung für die Entwicklung von Zervixkrebs. Es handelt sich dabei vielmehr um einen vielstufigen Prozess, an dem zahlreiche Kofaktoren beteiligt sind [49].

Die Behandlungsmöglichkeiten für Zervixkarzinome beschränken sich momentan noch auf die chirurgische Entfernung des Tumors, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Bei der operativen Behandlung muss das Tumorgewebe vollständig entfernt werden, damit sich aus den verbleibenden Tumorzellen kein neuer Tumor bilden kann oder Metastasen entstehen können. Sowohl die Strahlentherapie als auch die Chemotherapie weisen keine Spezifität für Krebszellen auf, sodass es zu starken Nebenwirkungen besonders im Knochenmark, den Nieren und der Leber kommen kann. Somit ist der Einsatz spezifisch wirkender Medikamente von großer Bedeutung für die Behandlung

von Zervixkarzinomen und anderen Krebsformen. Eine neue Strategie zur Inhibierung des Wachstums sekundärer oder wiederkehrender Karzinome ist die Therapie mit Angiogenesehemmern [50]. Eines der wichtigsten Proteine für die Neubildung von Blutgefäßen ist der VEGF [51]. Die Überexpression des VEGF steht im Zusammenhang mit einer schnelleren Tumorentwicklung und laut einiger Studien auch mit einer geringen Überlebensrate der Patienten [51]. Für Zervixkarzinome konnte eine erhöhte Expression von VEGF nachgewiesen werden [52]. Die Kombination von Bevacizumab, einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen VEGF-A, mit dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil ergab bei der Behandlung von Patienten mit rezidierenden Zervixkarzinomen vielversprechende Ergebnisse [53]. In klinischen Studien wird momentan die Wirkung von Bevacizumab bei der Behandlung von Zervixkarzinomen untersucht. Dabei wird Bevacizumab als Monotherapie, in Kombination mit der Strahlentherapie und Cisplatin sowie in Kombination mit Topotecan und Cisplatin eingesetzt [51]. Auch die Expression des EGFR ist in Zervixkarzinomen deutlich hochreguliert [51, 54]. Bei 90% der untersuchten Zervixkarzinomen lag eine EGFR-Überexpression vor [55]. Diese steht im Zusammenhang mit einer geringeren Überlebensrate der Patienten [56, 57]. Somit ist der EGFR ein ideales Ziel für die zielgerichtete Bekämpfung der Tumorzellen. In präklinischen Studien konnte der humanisierte monoklonale Antikörper Cetuximab, der an den EGFR bindet, erfolgreich die Proliferation der Tumoren inhibieren. In klinischen Studien wird die Verwendung von Cetuximab als Monotherapie und in Kombination mit der Strahlentherapie zur Behandlung von Zervixkarzinomen untersucht [51]. Auch der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren bei Zervixkarzinomen wird in klinischen Studien untersucht. Jedoch zeigte der Inhibitor Gefitinib als Monotherapie keine starke Wirkung. Dennoch werden die Auswirkungen weiterer Tyrosinkinaseinhibitoren analysiert. Dabei wird der Inhibitor Erlotinib ebenfalls als Monotherapie eingesetzt, aber auch in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin und der Strahlentherapie. Lapatinib, ein Inhibitor sowohl des EGFR als auch von ErbB 2 (HER2), wird als Monotherapie und in Kombination mit Pazopanib, einem weiteren Tyrosinkinaseinhibitor, untersucht [51]. Kürzlich konnten Andersson *et al.* einen starken Effekt für die Kombination des Chemotherapeutikums Cyclosporin A mit einem zielgerichteten Toxin in einem Mausmodell für Zervixkarzinome nachweisen [58]. Eine zentrale Eigenschaft zielgerichteter Toxine in der Tumorthherapie stellt die Aufnahme in die Zielzellen dar. Einige Untersuchungen haben für zielgerichtete Toxine eine verstärkte Wirkung durch die Kombination mit bestimmten pflanzlichen Glykosiden, den Saponinen, zeigen können.

1.3 Saponine

Saponine weisen als Grundstruktur ein Steroid mit 27 Kohlenstoffatomen oder ein Triterpen mit 30 Kohlenstoffatomen auf. An dieses Grundgerüst, das auch als Aglykon bezeichnet wird, sind eine oder auch mehrere Zuckerketten assoziiert. Saponine stellen eine sehr diverse Gruppe dar, was durch verschiedene Aglykonstrukturen und verschiedene Monosaccharide in variablen Verknüpfungsmöglichkeiten bedingt wird [59, 60]. Aufgrund der großen strukturellen Vielfältigkeit der Saponine ergeben sich auch zahlreiche unterschiedliche Eigenschaften und Verwendungszwecke.

In der Landwirtschaft finden Saponine Anwendung als Futterzusatz für Wiederkäuer, um deren Wachstum, sowie die Milch- oder Wollproduktion positiv zu beeinflussen. Saponine sollen dabei die Protozoen vernichten, deren Nahrungsquelle die für die Nutztiere lebenswichtigen Bakterien im ersten Magen sind [61]. Weiterhin weisen Saponine auch schaumstabilisierende Eigenschaften auf und werden daher in der Brauereiindustrie eingesetzt. Zu der bekanntesten Eigenschaft der Saponine gehört deren Fähigkeit zur Permeabilisierung von Membranen [62, 63]. Daher werden sie auch häufig verwendet, um Antikörpern den Zugang zu Zellkompartimenten zu ermöglichen [64]. Dabei handelt es sich jedoch um einen unspezifischen Vorgang, für den eine Interaktion zwischen dem Saponin und membranassoziertem Cholesterol nachgewiesen wurde [65]. Jedoch konnte für ein Ginsengsaponin auch eine gewisse Spezifität nachgewiesen werden. Es interagiert nur mit der extrazellulären Seite der Zellmembran [66]. Die Menge an Cholesterol ist für die Interaktion mit Saponinen von großer Bedeutung [67]. Allerdings bestehen dabei auch Einschränkungen, so konnten Hu *et al.* nachweisen, dass die Porenbildung durch Saponine mit zwei Zuckerketten unabhängig von Cholesterol erfolgt. Saponine mit nur einer Zuckerkette benötigen jedoch für die Porenbildung Cholesterol [68]. Die hämolytische Eigenschaft einiger Saponine gegenüber Erythrozyten wird durch die Entfernung von Cholesterol blockiert und für andere Saponine im Gegensatz noch gesteigert [69]. Die Anzahl der Zuckerketten wiederum kann ebenfalls die hämolytischen und permeabilisierenden Eigenschaften der Saponine beeinflussen. Woldemichael *et al.* haben gezeigt, dass Saponine mit zwei Zuckerketten eine geringere Aktivität aufweisen, als solche mit nur einer Zuckerkette [70]. Die Wirkung eines Saponins hängt demnach von verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählen die Beschaffung der Zielzellmembran, die Art der assoziierten Zuckerketten und der Aufbau des Aglykons [71, 72, 73]. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit Zellmembranen weisen einige Saponine auch Fähigkeiten als Adjuvantien auf [74, 75]. Das Saponin Quil A aus *Quilaja saponaria*, dem Seifenrindenbaum, wird zur Ausbildung von *immunostimulating complexes* (ISCOM) eingesetzt. Das Saponin bildet dabei zusammen mit Cholesterol eine käfigartige micellenähnliche Struktur. Durch die Verwendung von ISCOM wird

die Immunantwort deutlich verstärkt. Obwohl in klinischen Studien keine toxischen Effekte auf den Menschen beobachtet wurden, erfolgt der Einsatz von ISCOM bisher ausschließlich im veterinärmedizinischen Bereich.

Für einige Saponine konnte auch eine antitumorale Wirkung nachgewiesen werden. Bereits 1976 zeigten Ebbesen *et al.*, dass Quil A in der Lage war, das Überleben von Mäusen, die eine spontane Leukämie entwickelten, zu verlängern [76]. Das Saikosaponin a inhibiert die Zellproliferation humaner Hepatomzelllinien [77] und das Saponin Tubimoside 1 zeigte starke antitumorale Effekte in einem Mausmodell für Hauttumoren [78]. Für zahlreiche weitere Saponine konnten ähnliche Effekte beobachtet werden, die meist auf der Aktivierung der Apoptose und der Unterbrechung des Zellzyklus beruhen [60, 79]. Ein weiteres erfolgversprechendes Einsatzgebiet für die Saponine ist die Kombination mit antitumoralen Wirkstoffen. In vielen Untersuchungen konnten additive oder synergistische Eigenschaften für Saponine in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika oder auch zielgerichteten Toxinen beschrieben werden [60, 79]. Der wachstumshemmende Effekt der Chemotherapeutika 5-Fluorouracil, Cisplatin und Paclitaxel konnte durch Saponine noch gesteigert werden [80, 81, 82, 83]. Jedoch zeigen einige Saponine keine oder nur eine schwache Steigerung der Wirkung von Chemotherapeutika [84, 85, 86]. Vermutlich ist hierbei auch die Struktur der Saponine von großer Bedeutung. Interessanterweise konnte ebenfalls die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber der Bestrahlungstherapie in einem Mausmodell durch Saponin deutlich gesteigert werden [87]. Da Chemotherapeutika nicht nur von Tumorzellen aufgenommen werden, besteht durch die Verstärkung von deren Wirkung die Möglichkeit, dass Nebeneffekte ebenfalls verstärkt werden. Daher ist der Einsatz zielgerichteter Toxine in Kombination mit Saponinen ein möglicher Ansatz um Nebenwirkungen zu verringern und gezielt Tumorzellen zu bekämpfen. Angeregt wurde der gemeinsame Einsatz von Saponinen und zielgerichteten Toxinen durch den Fund, dass dies in ähnlicher Weise bereits in der Natur erfolgt. Die Toxizität der Samen der Kornrade (*Agrostemma githago L.*) beruht nicht, wie lange angenommen, auf dem in der Pflanze vorkommenden Agrostemmasaponin 1, sondern auf der gemeinsamen Wirkung des Saponins mit Agrostin [88]. Agrostin ist ein Typ-1-RIP, wie auch das Saporin (1.1.1). Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass Saponin *In-vitro* in einer Konzentration eingesetzt wurde, die keine Porenbildung hervorruft. Das deutet im Gegensatz zur unspezifischen Membranpermeabilisierung auf einen völlig anderen, möglicherweise spezifischen Verstärkungseffekt durch Saponin hin. In weiterführenden Untersuchungen wurde eine Verstärkung der Cytotoxizität eines zielgerichteten Toxins durch das Saponingemisch *Saponinum album* (Spn) aus *Gypsophila paniculata* (Schleierkraut) nachgewiesen [89]. Das eingesetzte zielgerichtete Toxin war ein Fusionsprotein aus dem humanen EGF und dem Typ-1-RIP Saporin. Für

die erhöhte Wirksamkeit des zielgerichteten Toxins wurde ein Einfluss des *Saponinum album* auf die rezeptorvermittelte Endocytose vermutet.

1.4 Endocytose

Die Endocytose ist ein essentieller Mechanismus eukaryotischer Zellen, um Membranproteine, Lipide, extrazelluläre Proteine und lösliche Proteine aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Dies steht im Gegensatz zur Exocytose, bei der die Zellen verschiedene Moleküle aus dem Cytosol entfernen können und Lipide und Proteine zur Zellmembran transportieren. Bisher konnten zahlreiche endocytotische Wege identifiziert werden. Sie werden abhängig von den transportierten Molekülen und den daran beteiligten Proteinen unterteilt. Zwei besonders intensiv untersuchte Endocytosewege sind die clathrinvermittelte [90] und caveolinvermittelte [91] Endocytose.

Typische Beispiele für Liganden-Rezeptoren-Komplexe, die clathrinabhängig internalisiert werden, sind der Transferrinrezeptor [92, 93] und der EGFR [94]. Clathrin bildet ein Hexamer, das aus drei schweren und drei leichten Untereinheiten aufgebaut ist und in Form eines Triskelions vorliegt [95, 96, 97]. Der Zusammenschluss mehrerer Clathrinmoleküle führt zur Bildung einer Struktur, die aus Hexagonen zusammengesetzt ist. Verschiedene Adapterproteine vermitteln die Polymerisierung der Clathrinmoleküle an dem Zellmembranabschnitt, der internalisiert werden soll [98]. Dabei bildet Clathrin zusammen mit den Adapterproteinen um die bereits eingestülpte Zellmembran eine käfigartige Struktur, die als *clathrin coated pit* bezeichnet wird [90]. Ein wichtiges Adapterprotein, das an diesem Prozess beteiligt ist, ist das AP 2 (*adaptor protein 2*). Aufgrund der gebildeten Clathrinstruktur wird die eingestülpte Zellmembran am oberen Vesikelende näher zusammengebracht. An dieser Stelle vermittelt die GTPase Dynamin 2 die Abschnürung des eingestülpten Vesikels von der Zellmembran [99]. Dynamin 2 wird durch Amphiphysin, das zusätzlich an Clathrin bindet, zur Zellmembran transportiert [100]. Dynamin 2 weist eine helikale Struktur auf, die sich vermutlich um den Hals des eingestülpten Vesikels legt. Durch die Hydrolyse von GTP kommt es zu einer Konformationsänderung, was in einer Rechtsdrehung des Proteins resultiert, wodurch der Membranhals eingeschnürt wird und letztendlich auseinander bricht [99, 101]. Nachdem das Vesikel vollständig internalisiert wurde, zerfällt die Clathrinstruktur wieder und das Vesikel wird entlang des Cytoskeletts weiter in die Zelle transportiert. Der Austausch der 44. Aminosäure (K44A) des Dynamin 2-Proteins führt zur Ausbildung eines nicht funktionellen Proteins, wodurch die clathrinvermittelte Endocytose inhibiert wird [100, 102, 103].

Neben der clathrinabhängigen Endocytose existieren noch weitere Aufnahmemechanismen, die unabhängig von Clathrin erfolgen. Ein Beispiel ist die caveolinabhängige

Endocytose. Caveolae sind sackförmige Einstülpungen der Zellmembran, die unter dem Elektronenmikroskop erkennbar sind. Es handelt sich dabei um eine spezielle Form von *Lipid Rafts*. *Lipid Rafts* sind Bereiche auf der Zellmembran, die reich an Cholesterol sind. Das wichtigste Protein, das an der Ausbildung von Caveolae beteiligt ist, ist das Caveolin [104]. Es existieren drei Caveolinproteine, wobei nur das Caveolin 1 gehäuft in den Caveolae vorliegt und notwendig für deren Ausbildung ist [105]. Die caveolinabhängige Endocytose erfolgt ebenfalls unter der Beteiligung von Dynamin 2 [91]. Neben den beiden erläuterten Endocytosewegen existiert noch mindestens ein weiterer dynaminabhängiger Weg, die RhoA-abhängige Endocytose [106]. Allerdings ist Dynamin 2 nicht an allen Endocytoseprozessen beteiligt, sodass auch clathrin- und dynaminunabhängige Endocytosemechanismen existieren [91, 105]. Unabhängig vom Weg der Aufnahme der zielgerichteten Toxine in die Tumorzelle stoppt die toxische Komponente nach Erreichen des Cytosols die Proteinsynthese und die betroffene Zelle stirbt ab.

1.5 Zelltod

1.5.1 Apoptose

Apoptose ist eine schon seit langer Zeit bekannte Form des programmierten Zelltodes [107, 108]. Als programmierter Zelltod wird eine genetische Kontrolle der daran beteiligten Prozesse bezeichnet. Apoptose ist ein wichtiger Prozess während der Entwicklung von Organismen, bei dem Erhalt von Organstrukturen und der Entfernung von beschädigten Zellen [109, 110, 111]. Abhängig von dem Apoptosestimulus kann einer von zwei Signalwegen ausgelöst werden, die zur Aktivierung der Caspasen führen. Die Caspasen sind die Effektorproteasen der Apoptose.

Die Aktivierung des extrinsischen Signalwegs erfolgt durch die Bindung von Mitgliedern der Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie an so genannte „Todesrezeptoren“, Mitglieder der TNF-Rezeptorfamilie [112]. Durch die Bindung des Liganden kommt es zur Trimerisierung der Rezeptoren [113], was wiederum zur Rekrutierung von Adapterproteinen und der Procaspase 8 führt. Die Bildung des entstandenen Komplexes (*death inducing signaling complex*) ermöglicht die Dimerisierung der Initiatorcaspase Procaspase 8, woraufhin diese durch Spaltung aktiviert wird [114, 115]. Die Caspase 8 aktiviert die Effektorcaspasen 3 und 7. An diesem Punkt treffen der extrinsische und der intrinsische Signalweg aufeinander.

Der intrinsische oder mitochondriale Signalweg wird durch verschiedene Faktoren aktiviert. Beispiele dafür sind der Überschuss an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies, erhebliche DNA-Schädigungen oder ein Mangel an Wachstumsfaktoren [116]. Zu Be-

ginn des intrinsischen Signalweges kommt es zu einer erhöhten Membranstabilität der Mitochondrien, was zur Freisetzung von proapoptotischen Proteinen, wie dem Cytochrom c, in das Cytosol führt [117]. Weitere proapoptotische Proteine sind die *B-cell lymphoma 2 (Bcl2) homology domain 3-only* (BH3-only) Proteine, dazu gehören unter anderem *Bcl2 interacting mediator of cell death* (BIM), *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA) und *BH3 interacting domain death agonist* (BID) [118, 119, 120]. Die BH3-only Proteine binden und inhibieren die antiapoptotischen Bcl 2-Proteine und ermöglichen so die Freisetzung der proapoptotischen Proteine *Bcl2-associated x protein* (Bax) und *Bcl2 homologous antagonist/killer* (Bak) [121]. Diese beiden führen zu einer Erhöhung der Permeabilität der Mitochondrienmembran und somit zu einer verstärkten Freisetzung von Cytochrom c. Dieses bindet an den im Cytosol vorliegenden Rezeptor *apoptotic protease activating factor 1* (Apaf 1), wodurch dieser oligomerisiert und eine ringförmige Struktur ausbildet, die als Apoptosom bezeichnet wird [115, 122]. Das Apoptosom ermöglicht die Dimerisierung der ebenfalls an Apaf 1 gebundenen Procaspase 9, wodurch auch diese Initiatorcaspase aktiviert wird [115]. Wie auch schon die Caspase 8, so aktiviert die Caspase 9 durch Spaltung die zentralen Effektorprocaspasen 3 und 7 [116]. Die Caspasen 3 und 7 spalten zelluläre Substrate, was letztendlich zu den schon seit langem bekannten morphologischen Veränderungen der Zelle führt. Die Zellmembran weist blasenartige Ausstülpungen auf, die Zellen verlieren ihre Kontakte zu den Nachbarzellen, die Organellen schrumpfen, das Chromatin kondensiert und wird zwischen den Nucleosomen geschnitten, wobei die für die Apoptose charakteristische DNA-Leiter entsteht [123]. Zu den durch die Caspasen geschnittenen Substraten gehören der *inhibitor of caspase-activated DNase* (ICAD, DFFA), die *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1* (ROCK1), das DNA-Reparaturenzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP), Aktin, Fodrin und Lamin [124].

1.5.2 Nekrose

Im Gegensatz zur Apoptose wurde die Nekrose lange als ein nicht programmiert ablaufender Prozess beschrieben und daher oft auch als unfallartiger Zelltod bezeichnet. Neuere Untersuchungen deuten jedoch ebenfalls auf einen kontrollierten und programmierten Ablauf der Nekrose hin [125, 126]. Dennoch unterscheidet sich die Nekrose in ihrem Ablauf und den Auswirkungen stark von der Apoptose. Eine sehr charakteristische Folge der Nekrose ist der frühe Verlust der Integrität der Zellmembran. Es kommt zu einem massiven Einstrom von extrazellulären Ionen und Flüssigkeit, wodurch die Organellen und die Zelle anschwellen und diese letztendlich platzt [127]. Die Störungen in den Organellenmembranen ermöglichen auch den Austritt von proteolytischen Enzymen in das Cytosol, wo sie die zellulären Proteine zerstören. Die Ursache

für den Verlust der Membranintegrität ist vermutlich der Verlust des zellulären ATPs, Schädigungen der Membranlipide und / oder der Funktionsverlust der Ionenkanäle in der Membran [116, 127, 128]. Zusätzlich können sich diese Faktoren noch gegenseitig beeinflussen und verstärken. Ein weiterer Faktor für die Auslösung der Nekrose ist neben dem ATP-Verlust der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, entweder durch Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum oder durch das Einströmen extrazellulären Calciums. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration resultiert in der Aktivierung calciumabhängiger Proteasen (Calpain-Proteasen), die wiederum Elemente des Cytoskeletts abbauen. Abhängig von der Menge des freigesetzten Calciums wird Apoptose (200 bis 400 nM) oder Nekrose ($> 1 \mu\text{M}$) ausgelöst [127]. Daher führt die Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Reticulum meist zu apoptotischen Prozessen, wohingegen das massive Einströmen von extrazellulärem Calcium zur Nekrose führt [129]. Ein Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies führt ebenfalls zur Nekrose. Mitochondrien stellen die größte Quelle für die reaktiven Sauerstoffspezies dar, die durch Spaltung von DNA-Doppelsträngen, Crosslinking von DNA und Proteinen oder die Oxidation der Purine zu Mutationen führen können [130]. Diese Schädigungen können zur Aktivierung von p53 und PARP führen, was im Fall von p53 wiederum zur Auslösung der Apoptose und zum Zellzyklusarrest führt. Eine starke Aktivierung der PARP hingegen resultiert in nekrotischen Prozessen. Durch die Inhibierung von PARP wird die Aktivierung der Nekrose verhindert [131, 132, 133]. Die reaktiven Sauerstoffspezies können weiterhin Lipide oxidieren, wodurch sowohl die Zellmembran als auch die Membranen der Organellen, wie den Lysosomen und dem endoplasmatischen Reticulum, geschädigt werden. Dies führt zur Freisetzung von Proteasen, sowie zum Einstrom von Calcium. Zusätzlich können die reaktiven Sauerstoffspezies auch die Calciumkanäle schädigen, wodurch wiederum die Konzentration des intrazellulären Calciums erhöht wird [134].

1.5.3 Autophagie

Die Autophagie wird im Gegensatz zur Apoptose und Nekrose erst seit kurzer Zeit mit dem Zelltod in Verbindung gebracht [135]. Autophagie ist die allgemeine Bezeichnung für den Abbau von cytoplasmatischen Komponenten durch Lysosomen [136, 137]. Es werden drei Formen der Autophagie unterschieden, Macroautophagie, Microautophagie und chaperonvermittelte Autophagie. Im Folgenden wird die Macroautophagie der Einfachheit halber als Autophagie bezeichnet. Eine wichtige Struktur der Autophagie ist das Autophagosom [138]. Es umschließt einen Teil des Cytoplasmas, wodurch unspezifisch Cytoplasmabestandteile aufgenommen werden und durch die Fusion mit Lysosomen abgebaut werden. Dies führt zur starken Vakuolisierung der Zellen, einem morphologischen Merkmal der Autophagie. Weiterhin spielt die Autophagie bei vie-

len Prozessen eine Rolle: bei dem Entgegenwirken des Alterns, bei der Anpassung an die Zufuhr geringer Nährstoffmengen (Hungern), der Beseitigung von Organellen, der Bekämpfung von Mikroorganismen, dem Zelltod, der Tumorsuppression und der Antigenpräsentation [139, 140].

Bisher existiert kein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein eines Autophagie-Zelltodes, es handelt sich dabei eher um ein morphologisches Phänomen, bei dem der Zelltod mit Autophagosomen assoziiert ist [141]. Dennoch ist es durchaus denkbar, dass Autophagie zum Zelltod führen kann. Als Autophagie-Zelltod wird eine Form des programmierten Zelltodes beschrieben, die sich morphologisch von der Apoptose unterscheidet [142]. Im Gegensatz zur Apoptose kommt es schon früh zum Abbau der Organellen, wohingegen das Cytoskelett bis hin zur fortgeschrittenen Phase bestehen bleibt. Weiterhin kommt es bei dieser Form des programmierten Zelltodes erst sehr spät zur Aktivierung der Caspasen und der Fragmentierung der DNA [142]. Wie auch bei der Apoptose kommt es zu keiner Entzündungsreaktion, die für die Nekrose typisch ist. Durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren, die sich auf die Ausbildung des Autophagosoms auswirken, war es möglich den Autophagie-Zelltod zu blockieren [143]. Die Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass der Autophagie-Zelltod erst ausgelöst wird, wenn die Apoptosemechanismen blockiert werden. Möglicherweise erfolgt der durch Apoptose vermittelte Zelltod deutlich schneller, sodass der Autophagie-Zelltod meist keine große Rolle bei dem Absterben der Zellen spielt. Bei Zellen, die einem Mangel an Wachstumsfaktoren ausgesetzt sind, werden in kürzester Zeit apoptotische Prozesse aktiviert. Weisen die gleichen Zellen jedoch eine herunterregulierte Expression der proapoptotischen Proteine Bax und Bak auf, findet ein langsamerer Prozess statt, der zum Absterben der Zellen durch ein „Selbstverdauen“ der Zellen charakterisiert ist [144].

Eine weitere Erklärung für das Vorkommen von Autophagie in sterbenden Zellen ist die Tatsache, dass Autophagie eine Überlebensstrategie darstellt. Diese Hypothese wird durch Studien bestätigt, die ein verstärktes Absterben von Zellen oder Organismen beschreiben, bei denen wichtige Autophagie-Proteine fehlen [145, 146]. Demnach muss die Autophagie von dem Autophagie-Zelltod getrennt betrachtet werden, da sie den Zellen eine Überlebensstrategie bietet, gleichzeitig aber zum Zelltod führen kann, wenn keine apoptotischen Prozesse ablaufen können. An beiden Prozessen sind die gleichen Proteine beteiligt und es kommt jeweils zur Ausbildung des Autophagosoms. Der Unterschied besteht dabei aber vermutlich in veränderten Expressionslevel der notwendigen Proteine [141]. Für eine eindeutige Aufklärung der Zusammenhänge zwischen der Autophagie und dem Zelltod sind trotz zahlreicher Hinweise noch viele weitere Untersuchungen notwendig.

1.6 Zielsetzung

Die Entwicklung und Verbesserung zielgerichteter Toxine für die Tumorthherapie erfordert den eindeutigen Nachweis der Wirksamkeit auf Zielzellen. Aus diesem Grund war eines der Ziele dieser Arbeit die Analyse der cytotoxischen Wirkung des zielgerichteten Toxins SE auf Zervixkarzinomzellen. SE ist ein Fusionsprotein, das als zielgerichtete Struktur den humanen EGF und als toxische Substanz das pflanzliche Proteintoxin Saporin besitzt. Der EGFR ist auf Zervixkarzinomen stark überexprimiert, sodass diese Zellen ideale Ziele für die Behandlung mit SE sind. Die an murinen Zellkulturmodellen identifizierte drastische Verstärkung der Cytotoxizität saporinbasierter zielgerichteter Toxine durch Spn sollte ebenfalls auf den Zervixkarzinomzellen untersucht werden, um die Wirksamkeit der Kombination an humanen Tumorzellen zu zeigen.

Die Überexpression des EGFR ist die Voraussetzung für die Verwendung des zielgerichteten Toxins SE, das an den EGFR bindet und vermutlich zusammen mit dem Rezeptor internalisiert. Es liegt daher nahe, dass zwischen dem Expressionlevel des EGFR und der Wirkung von SE eine direkte Korrelation besteht. Um diese Annahme zu überprüfen, sollte die relative Menge des EGFR auf verschiedenen Zervixkarzinomzellen bestimmt und mit der Empfindlichkeit der Zellen für SE in Zusammenhang gestellt werden. Diese Korrelationsanalyse sollte auch für die durch Spn verstärkte Cytotoxizität von SE ausgeweitet werden, um dadurch erste Hinweise auf den Wirkmechanismus von Spn zu gewinnen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die detaillierte Erforschung der cytotoxizitätssteigernden Wirkung von Spn auf zielgerichtete Toxine. Über den molekularen Mechanismus, der dieser Verstärkung zugrunde liegt, weiß man bisher nur sehr wenig. Die geplanten Untersuchungen sollten klären, ob die Inkubation mit Spn die Expression des EGFR beeinflusst und möglicherweise dadurch indirekt die Cytotoxizität von SE verstärkt. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Aufnahme von Saporin, der toxischen Komponente von SE, clathrinabhängig erfolgt und Spn die Endocytose von Saporin nicht verstärkt. Über die Aufnahmemechanismen von SE ist jedoch nichts bekannt, auch wenn man vermuten kann, dass die Aufnahme aufgrund des im SE enthaltenen EGF über den EGFR verläuft. Es sollten daher durch eingehende Analysen die benötigten Endocytosemechanismen für die Aufnahme von SE ermittelt werden und gleichzeitig untersucht werden, ob sich der Endocytoseweg für SE durch die Kombination mit Spn verändert. Dazu sollten Zellen hergestellt werden, die ein nicht funktionelles Dynamin 2-Protein exprimieren und die Auswirkungen verschiedener Endocytoseinhibitoren analysiert werden. Einige Proteintoxine werden nach der Endocytose durch retrograden Transport zu dem trans-Golgi-Netzwerk transportiert und gelangen von dort aus über das endoplasmatische Retikulum in das Cytosol. Um

zu klären, ob Spn einen Einfluss auf diesen Transportweg ausübt, sollte die Auswirkung von Spn auf den retrograden Transport des Proteintoxins *Pseudomonas* Exotoxin A analysiert werden.

Für eine mögliche Therapie mit den zielgerichteten Toxinen ist es von großer Bedeutung die Auswirkungen der Behandlung zu kennen. Führt die Behandlung zur Nekrose, können starke Nebenwirkungen der Therapie auftreten. Aus diesem Grund ist es von Vorteil, wenn apoptotische Prozesse aktiviert werden. Die Literatur beschreibt das Auslösen von Apoptose durch Inkubation mit Saporin. Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war es daher zu testen, ob durch die Behandlung mit SE ebenfalls Apoptose ausgelöst wird oder ob die Zellen nekrotisch werden. Auch für die Untersuchungen des Zelltodes der Zielzellen sollte der Einfluss der zusätzlichen Behandlung mit Spn in Bezug auf die für SE alleine nachgewiesenen Zelltodcharakteristika bestimmt werden.

Für den Einsatz der Kombinationsbehandlung aus Spn und SE in der Tumorthherapie ist es von besonderem Wert einzelne gereinigte Saponine zu verwenden. Eine leichte Veränderung der Zusammensetzung des Saponingemischs könnte ansonsten die Wirkung des Saponins beeinträchtigen. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit verschiedene isolierte Saponine aus dem erworbenen Saponingemisch *Saponinum album* und dem direkt aus der Pflanze gewonnenen Extrakt hinsichtlich ihrer verstärkenden Eigenschaften auf die Wirkung von SE untersucht werden.

Materialien und Methoden

In der Arbeit sind die verwendeten, geschützten Warenzeichen nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen einer solchen Kennzeichnung kann nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist.

Alle in der Arbeit beschriebenen Methoden wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Veränderte Temperaturbedingungen sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 PCR und Elektrophorese

- Thermocycler Trio-Thermoblock; Biometra
- Horizontal-Elektrophoresesystem Mini Sub Cell GT System; Bio-Rad
- Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele, Geldicke 0,75 mm; CBS

2.1.1.2 Photometer

- Küvettenphotometer DU 640; Beckmann Coulter
- Mikroplatten-Fluoreszenz-Lesegerät Spectra MAX Gemini; Molecular Devices
- Mikroplatten-Photometer Spectra MAX 340 PC; Molecular Devices
- Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer; peQLab

2.1.1.3 Westernblot und Filmentwicklung

- Semidry-Transferzelle trans-Blot SD; Bio-Rad
- Tankblot-Apparatur, Transblot-Cell SD; Bio-Rad
- Entwicklermaschine Optimax Typ TR; MS Laborgeräte

2.1.1.4 Zellkultur

- CO₂-Inkubator Modell 311; Forma Scientific (Thermo)
- Lichtmikroskop Axiovert 25; Zeiss
- Sterile Werkbank Herasafe; Heraeus-Christ

2.1.1.5 Zentrifugen

- Tischzentrifuge 5415 C; Eppendorf
- Tischzentrifuge 5417 R; Eppendorf
- Hochgeschwindigkeitszentrifuge Evolution RC 5C; Sorvall
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R; Heraeus-Christ

2.1.1.6 Sonstige Geräte

- Durchflusszytometer Coulter Epics X; Beckmann Coulter
- Mikrowell-Waschvorrichtung Nunc-Immuno Wash 8; Nunc
- Ultraschallstab Sonoplus HD 2200; Bandelin

2.1.2 Chemikalien und Proteine

Alle Chemikalien wurden in *pro analysis* Qualität bezogen.

- Acrylamid 4K Lösung (30 %) Mix 37,5 : 1 Acrylamid : Bisacrylamid; AppliChem
- Agarose NEEO Ultra; Roth
- Ammoniumsulfat; Roth
- Ampicillin; Roth
- Bafilomycin A1; Alexis
- Chloroquin; Sigma
- Chlorpromazin; Sigma
- Complete Protease-Inhibitor Mix; Roche Diagnostics
- Coomassie Blau R-250; AppliChem
- *Enhanced chemiluminescence*-Westernblot-Detektionsreagenz Immobilon Western; Millipore
- Fluoresceindiacetat; Sigma
- G418 (Geneticin); Calbiochem
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid; Roth
- Latrunculin A; Biomol

- Ni-NTA-Agarose; Qiagen
- *Pseudomonas* Exotoxin A; Sigma
- Staurosporin; Sigma

2.1.3 Saponine

Alle Saponine wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. F. Melzig (FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der Saponine aus *Saponinum album* (Spn) oder *Gypsophila paniculata* erfolgte durch Dr. Alexander Weng (FU Berlin).

- *Saponinum album* aus *Gypsophila paniculata*; Merck
- Saponin 1641, isoliert aus *Saponinum album*
- Gyp 1-10, isoliert aus *Gypsophila paniculata*
- Gyp 2-10, isoliert aus *Gypsophila paniculata*
- Gyp 3-10, isoliert aus *Gypsophila paniculata*

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

- Mikrokonzentriersäulen Amicon 30 kDa; Millipore
- Mikroplatteneinsätze Maxi Sorb U16 Module; Nunc
- Nitrocellulosemembran Hybond *enhanced chemiluminescence*; Amersham Biosciences
- Röntgenfilme Hyperfilm ECL; Amersham Biosciences

2.1.5 Kits

- *Advanced Protein Assay Reagent*; Cytoskeleton
- *660 nm Protein Assay*; Pierce
- *OneStep RT-PCR Kit*; Qiagen
- *Nucleospin RNA/Protein*; Macherey-Nagel
- *NucleoBond Xtra Midi/Maxi Kit*; Macherey-Nagel
- *Cell Death Detection ELISA*; Roche Diagnostics
- *TurboFect in vitro Transfection Reagent*; Fermentas
- *CytoTox-ONE*; Promega

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.2: Auflistung der für die Immunodetektion im Westernblot (2.3.5) verwendeten Primärantikörper.

| Primärantikörper | | Verdünnung |
|----------------------|--|------------|
| H68.4 | monoklonales Maus-IgG gegen die intrazelluläre Domäne des Transferrinrezeptors; Zymed Laboratories | 1 : 5 000 |
| anti-EGFR | monoklonales Ratten-IgG gegen den humanen EGFR; Abcam | 1 : 1 000 |
| anti-PARP | monoklonales Maus-IgG gegen Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (clone C2-10); BD Biosciences | 1 : 2 000 |
| anti- β -Aktin | monoklonales Maus-IgG gegen β -Aktin (clone AC-15); Sigma | 1 : 4 000 |

Tabelle 2.3: Auflistung der für die Immunodetektion im Westernblot (2.3.5) verwendeten Sekundärantikörper.

| Sekundärantikörper | | Verdünnung |
|-----------------------|--|------------|
| RAM* | polyklonales Kaninchen-IgG gegen Maus-IgG, mit Peroxidase konjugiert; DAKO | 1 : 3 000 |
| <i>sheep anti-rat</i> | polyklonales Schaf-IgG gegen Ratten-IgG, mit Peroxidase konjugiert; Abcam | 1 : 1 000 |

2.1.7 Bakterienstämme

- *E. coli* DH5 α ; Invitrogen
- *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS; Novagen

2.1.8 Vektoren

Tabelle 2.4: Auflistung der in der Arbeit eingesetzten Vektoren.

| Vektor | Beschreibung | Herkunft |
|------------------|---|--|
| pET11d | zur Proteinexpression in <i>E. coli</i> | Invitrogen |
| pCDNA3-dyn2-K44A | pCDNA 3 Vektor mit der mutierten DNA des Dynamamin 2-Proteins, zur Transfektion eukaryotischer Zellen | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Petra Knaus, Institut für Chemie und Biochemie, FU Berlin |

2.1.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von metabion bezogen und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2.5: Auflistung der in der Arbeit eingesetzten Oligonukleotide.

| Oligonukleotid | Sequenz (5'→3') | | | | | | |
|-------------------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| forward HA-tag | TAT | GAT | GTT | CCT | GAT | TAT | GC |
| neu reverse dyn-2 | AGA | TAA | GTG | GTG | TGC | ACA | AC |

2.1.10 Marker

- 1 kb Plus DNA ladder; Invitrogen
- Page Ruler Prestained Marker; Fermentas
- Molecular Weight Marker; Fermentas

2.1.11 Puffer und Medien

Bei den hier angegebenen Lösungen handelt es sich um allgemeine Lösungen, die für mehrere Methoden eingesetzt wurden. Weitere, speziell für die jeweilige Methode benötigte Puffer sind zu Beginn der Beschreibung der Methode aufgelistet. Die Herstellung der Puffer erfolgte mit Hilfe von deionisiertem ELIX-Wasser, das mittels einer ELIX-Wasseraufbereitungsanlage von Millipore hergestellt wurde. Das ELIX-Wasser ist vergleichbar mit dem Reinheitsgrad von Typ 2 bidestilliertem Wasser. Für molekularbiologische Arbeiten wurde autoklaviertes MilliQ-Wasser (Reinstwasser) eingesetzt.

| | |
|------------|--|
| PBS-Puffer | 150 mM Natriumchlorid, 8,33 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,67 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4 |
| LB-Medium | 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH 7,0 |

2.1.12 Medien und Lösungen für die Zellkultur

- Dulbecco's *modified eagle medium* High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin; PAA
- Dulbecco's *modified eagle medium* High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin / Ham's F12; PAA
- RPMI 1640 mit L-Glutamin; PAA
- Minimum Essential Medium Eagle; Gibco / Invitrogen

- Dulbecco's PBS mit Calcium und Magnesium (0,9 mM Calcium, 0,5 mM Magnesium); Gibco BRL
- Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium; Gibco BRL
- *Fetal calf serum*; Biochrom KG
- Penicillin (10 000 U); PAA
- Streptomycin (10 000 $\mu\text{g/ml}$); PAA
- Trypsin-EDTA (0,25 % w/v Trypsin, 1 mM EDTA); PAA
- Gelatine; Merck

2.1.13 Zelllinien

Tabelle 2.6: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Zelllinien.

| Zelllinie | Beschreibung | Herkunft |
|--|--|---|
| NIH-3T3 | murine embryonale Fibroblasten | DSMZ |
| HER14 | murine embryonale Fibroblasten (NIH-3T3) stabil transfiziert mit dem humanen EGFR | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. J. J. van Zoelen, Department of Cell Biology, University of Nijmegen, Niederlande |
| HeLa | humane Zervixkarzinomzellen | Zur Verfügung gestellt von Dr. A. M. Kaufmann, Klinik und Poliklinik für Gynäkologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin |
| SiHa | humane Zervixkarzinomzellen | |
| CaSki | humane Zervixkarzinomzellen | |
| PHCC1 | humane Zervixkarzinomzellen | |
| PHCC2 | humane Zervixkarzinomzellen | |
| MCF-7 | humane Brustkrebszellen | Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Peter Daniel, Medizinische Klinik m. S. Hämatologie und Onkologie Charité – Universitätsmedizin Berlin |
| MCF-7 C3 | humane Brustkrebszellen, die Caspase 3 reexprimieren | |
| HCT116 | Kolonkarzinomzellen | |
| HCT116 $\text{bax}^{-/-}$ | Kolonkarzinomzellen, bei denen das proapoptotische Protein Bax ausgeschaltet ist | |
| HCT116 $\text{bax}^{-/-}/\text{bak}^{-/-}$ | Kolonkarzinomzellen, bei denen die proapoptotischen Proteine Bax und Bak ausgeschaltet sind | |
| MDA-MB-435S | humane Melanomzellen | CLS (<i>cell lines service</i>) |
| HeLa Δ Dyn | humane Zervixkarzinomzellen stabil transfiziert mit einem inaktiven Dynamamin 2-Protein (K44A) | im Rahmen dieser Arbeit hergestellt |

2.1.14 Statistische Auswertungen

Für die Berechnungen der Signifikanzen wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Durchgeführt wurden die statistischen Analysen mit dem Programm SPSS 17.0 auf einem Mac OS 10.4 Betriebssystem. Eine 2-seitige asymptotische Signifikanz von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant interpretiert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation

Die Transformation beschreibt die Aufnahme von Plasmid-DNA in kompetente *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*). Die Transformation erfolgte nach der Methode von Hanahan *et al.* [147]. Dabei wird durch einen Hitzeschock die Membran der Bakterien durchlässig und die Plasmide werden von den Zellen aufgenommen. Es wurden $0,5 \mu\text{l}$ aufgereinigte Plasmid-DNA zu $50 \mu\text{l}$ kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42°C , gefolgt von einer Inkubation für 60 s auf Eis. Zu den transformierten Zellen wurden $300 \mu\text{l}$ LB-Medium gegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde zum Animpfen einer Übernachtskultur verwendet.

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

LB_{Amp}-Medium: LB-Medium mit $50 \mu\text{g/ml}$ Ampicillin

Bei den folgenden Lösungen handelt es sich um Komponenten aus dem verwendeten *NucleoBond Xtra Midi/Maxi* Kit.

RES + RNase A: Resuspensionspuffer
LYS : Lysispuffer
EQU : Äquilibrierungspuffer
NEU : Neutralisierungspuffer
WASH : Waschpuffer

Um für die Transfektion ausreichend DNA zu erhalten, wurde aus den Bakterien Plasmid-DNA im Midiformat präpariert. Das Prinzip der DNA-Präparation beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien und der Ethanol-fällung der DNA. Zunächst wurden *E. coli* DH5 α -Zellen mit der DNA transformiert (2.2.1) und in 150 ml LB_{Amp}-Medium über Nacht bei 37°C im Warmluftrundschüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Präparation der DNA mit Hilfe des *NucleoBond Xtra Midi/Maxi* Kits (2.1.5). Bei einer OD_{578 nm} von 1,8 wurde die Übernachtskultur abzentrifugiert (15 min , $4000 \times g$)

und das Pellet in 8 ml RES + RNase A resuspendiert. Durch die Zugabe von 8 ml LYS und fünfmaligem Invertieren wurden die Zellen lysiert und für 5 min inkubiert. Nach der Zugabe von 8 ml NEU wurde die neutralisierte Lösung über einen Filter geklärt und mit der Lösung eine zuvor mit 12 ml EQU äquilibrierte Säule beladen. Das in dem Filter verbliebene Lysat wurde durch die Zugabe von 5 ml EQU ausgewaschen und ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde die Säule mit 8 ml WASH gewaschen und die DNA mit 5 ml ELU eluiert. Um die Plasmid-DNA zu präzipitieren wurde das Eluat mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und nach einer zweiminütigen Inkubation zentrifugiert (60 min, $4000 \times g$, 4°C). Das Pellet wurde mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, $4000 \times g$, 4°C). Das Pellet wurde nach dem Trocknen im Brutschrank (37°C) in $50 \mu\text{l}$ MilliQ-Wasser resuspendiert und die Konzentration bestimmt.

2.2.3 RNA-Isolierung

Die folgenden Puffer sind Bestandteile des verwendeten *Nucleospin RNA/Protein* Kits.

RP1 : Lysispuffer

MDB: Entsalzungspuffer für die Membran

RA2 : Waschpuffer

RA3 : Waschpuffer

Nach der Transfektion (2.4.5) der DNA für das inaktive Dynamin 2-Protein in HeLa-Zellen wurde die zugehörige mRNA nachgewiesen. Dazu wurde die Gesamt-RNA von drei Klonen mit Hilfe des *Nucleospin RNA/Protein* Kits (2.1.5) isoliert. 1×10^6 Zellen wurden in $350 \mu\text{l}$ RP1-Puffer und $3,5 \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol lysiert und über einen Filter in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert (1 min, $11\,000 \times g$). Zu dem Durchlauf wurden $350 \mu\text{l}$ 70%iger Ethanol gegeben und alles auf eine *NucleoSpin RNA/Protein* Säule gegeben, die sich in einem weiteren Eppendorfgefäß befand. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 s, $11\,000 \times g$) wurde das Säulenmaterial durch die Zugabe von $350 \mu\text{l}$ MDB-Puffer und einer erneuten Zentrifugation (1 min, $11\,000 \times g$) entsalzt. Um die noch enthaltene DNA zu verdauen, wurden $10 \mu\text{l}$ der mitgelieferten rekombinanten DNase mit $90 \mu\text{l}$ Reaktionspuffer gemischt und davon $95 \mu\text{l}$ direkt auf die Säule pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurde die Säule mit $200 \mu\text{l}$ RA2-Puffer, der die rekombinante DNase inaktiviert, gewaschen und zentrifugiert (30 s, $11\,000 \times g$). In einem zweiten Waschschrift wurden auf die Säule $600 \mu\text{l}$ RA3-Puffer geladen und diese erneut zentrifugiert (30 s, $11\,000 \times g$). Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei das Puffervolumen auf $250 \mu\text{l}$ gesenkt wurde und die Zentrifugation für 2 min erfolgte. Die RNA wurde im Anschluss durch die Zentrifugation (1 min, $11\,000 \times g$) mit $60 \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser eluiert und konnte für die RT-PCR (2.2.4) eingesetzt werden.

2.2.4 Reverse Transkriptase PCR

Die RT-PCR beinhaltet die reverse Transkription einer bestimmten mRNA in cDNA, die dann anschließend mittels zweier spezifischer Primer in einer PCR amplifiziert wird und dem Nachweis der ursprünglichen mRNA dient. Aus der in 2.2.3 isolierten Gesamt-RNA wurde die cDNA für das mutierte Dynamin 2-Protein gewonnen und anschließend amplifiziert. Die HeLa-Zellen wurden zuvor mit der cDNA für das mutierte Dynamin 2-Protein K44A transfiziert (2.4.5). Für die RT-PCR wurde das *OneStep RT-PCR* Kit von Qiagen eingesetzt. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet.

Tabelle 2.7: Reaktionsansätze für die RT-PCR.

| Reagenz | Menge |
|--|---------------|
| 5 × RT-Puffer (aus dem Kit) | 10 μ l |
| 10 mM dNTP | 2 μ l |
| forward HA-tag (Primer) | 3 μ l |
| neu reverse dyn-2 (Primer) | 3 μ l |
| OneStep RT-PCR <i>Enzyme Mix</i> (aus dem Kit) | 2 μ l |
| isolierte RNA | 30 μ l |
| RNase freies Wasser (aus dem Kit) | ad 50 μ l |

Für die Reaktion wurde folgendes Programm in der PCR-Maschine (2.1.1.1) eingestellt:

| | | |
|--------|-------|-------------|
| 30 s | 50 °C | |
| 15 min | 95 °C | |
| [30 s | 94 °C |] 30 Zyklen |
| 30 s | 52 °C | |
| 1 min | 72 °C | |
| 10 min | 72 °C | |

Das erhaltene Produkt der RT-PCR wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese (2.2.5) analysiert.

2.2.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ml (w/v) Ethidiumbromid

TAE-Puffer : 40 mM Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,2

6 × DNA-Ladepuffer : 60 % (w/v) Saccharose, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 20 mM EDTA

Für die Analyse der bei der RT-PCR erhaltenen Produkte wurden jeweils 10 μl davon mit 2 μl 6 \times DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Zur Größenkontrolle der erhaltenen Produkte wurden 5 μl des Markers (1 kb Plus DNA ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 100 Volt und anschließend wurde eine Aufnahme des Gels unter UV-Licht gemacht.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression der Proteine SE und Saporin wurden die *E. coli*-Zellen vom Stamm Rosetta (DE3) pLysS verwendet. Die Zellen besitzen zusätzliche tRNAs für in *E. coli* selten vorkommende Codons. Dies ermöglicht eine verbesserte Expression eukaryontischer Proteine, da auch für Bakterien unübliche Codons ohne Verzögerung translatiert werden können.

Für die Expression von SE und Saporin wurden *E. coli*-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert (2.2.1). Der Transformationsansatz wurde direkt zum Animpfen einer 400 ml-Übernachtskultur (LB_{Amp}-Medium) verwendet. Die Übernachtskultur wurde bei 37 °C in einem Warmluftrundschüttler bei 220 Umdrehungen pro min geschüttelt, am nächsten Tag in jeweils 100 ml der Übernachtskultur in 300 ml LB_{Amp}-Medium überführt und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,6-0,8 bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ wurde die Expression durch die Zugabe von einer Endkonzentration von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid gestartet. Nach 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 5 000 \times g, 4 °C) pelletiert. Die Pellets wurden anschließend in 10 ml PBS mit 20 mM Imidazol resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proteine nach einem Zellaufschluss (2.3.2).

2.3.2 Proteinaufreinigung

PBS₂₀ : PBS mit 20 mM Imidazol

PBS₅₀ : PBS mit 50 mM Imidazol

PBS₇₀ : PBS mit 70 mM Imidazol

PBS₂₅₀: PBS mit 250 mM Imidazol

Die Aufreinigung von SE und Saporin erfolgte unter nativen Bedingungen mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die nach der Expression (2.3.1) resuspendierten und eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut und mittels Ultraschall (5 \times 20 Impulse, Pulslänge 1 s, maximal 50 % Leistung) aufgeschlossen. Nach

erfolgter Zentrifugation (30 min, $16\,100 \times g$, 4°C), bei der die löslichen Proteine von den unlöslichen Proteinaggregaten, den *inclusion bodies*, abgetrennt wurden, wurde der Überstand auf die zuvor mit PBS_{20} äquilibrierte Ni-NTA-Säule (0,5 ml Ni-NTA-Agarose) aufgetragen. Die Säule wurde mit jeweils 5 ml PBS_{50} und PBS_{70} gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit 5 ml PBS_{250} , wobei jeweils 1 ml-Fractionen aufgefangen wurden. Diese wurden auf einem 12%igem Natriumdodecylsulfat-(SDS)Polyacrylamidgel (2.3.3) analysiert. Anschließend wurden die Fraktionen, die das aufgereinigte Protein enthielten, mittels einer PD10-Säule entsalzt. Die erhaltene Proteinlösung wurde im Anschluss aufkonzentriert, die Proteinkonzentration ermittelt und das Protein bei 4°C gelagert (2.3.7 und 2.3.8).

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Laufpuffer** : 192 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS
 $4 \times$ Probenpuffer: 0,25 M Tris, 40 % (v/v) Glycerol, 8 % (w/v) SDS, 8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Trenngelpuffer : 1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
Acrylamidmix : 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid

Die SDS-PAGE wurde im CBS-Gelkammersystem nach der Methode von Laemmli [148] durchgeführt. Abhängig von dem zu analysierenden Protein wurden für die Auftrennung 10%ige oder 12%ige Trenngele und 4,5%ige Sammegele verwendet.

Tabelle 2.8: Ansätze für Trenn- und Sammelgele.

| Reagenz | 10 % Trenngel | 12 % Trenngel | 4,5 % Sammelgel |
|-----------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| Wasser | 1 770 μl | 1 488 μl | 800 μl |
| Trenngelpuffer | 1 062 μl | 1 062 μl | — |
| Sammelgelpuffer | — | — | 333 μl |
| Acrylamidmix | 2 124 μl | 1 700 μl | 200 μl |
| 10 % APS | 30 μl | 30 μl | 10 μl |
| TEMED | 3 μl | 3 μl | 3 μl |

Von den Proteinlösungen wurden 9 μl , 12 μl oder 15 μl eingesetzt und mit jeweils 1/3 des Volumens $4 \times$ Probenpuffer gemischt. Anschließend wurden die Ansätze für 5 min bei 95°C aufgekocht und vollständig auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 60 min mit 200 Volt und bei 30 mA pro Gel.

2.3.4 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

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

Entfärber : 10 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) Ethanol

Fixierlösung: 25 % (v/v) Methanol, 4 % (v/v) Glycerol

Die Färbung von Proteinen innerhalb eines SDS-Polyacrylamidgels mit Coomassie beruht auf dessen Fähigkeit sich an Arginin, Histidin und aromatische Aminosäuren von Proteinen anzulagern, wodurch sämtliche Proteine unspezifisch angefärbt werden. Nach der SDS-PAGE wurden das Sammel- und Trenngel voneinander abgetrennt und das Trenngel wurde für mindestens 30 min in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel kurz mit Wasser gespült und mit dem Entfärber geschüttelt, bis der Farbstoff nur noch in den Proteinbanden vorlag. Zur Aufbewahrung wurde das Gel getrocknet. Dazu wurde es zunächst mit Wasser gewaschen und für 10 min in der Fixierlösung inkubiert. Daraufhin wurde es luftblasenfrei zwischen zwei Einmachfolien eingeschlagen, auf eine Glasplatte gespannt und über Nacht getrocknet.

2.3.5 Westernblot und Immunodetektion

Semidry-Blotpuffer : 48 mM Tris, 39 mM Glycin

Nassblotpuffer : 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Ethanol

PBSB_{0,2} : PBS mit 0,2 % (w/v) Brij 58

Magermilchlösung : PBSB_{0,2} mit 5 % (w/v) Magermilch

Chemilumineszenzlösung: 1 ml Lösung A (250 mg/l Luminol, 0,1 M Tris (pH 8,6)); 100 μ l Lösung B (1,1 mg/ml para-Coumarinsäure in DMSO); 1 μ l 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese nach der Auftrennung mit der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte mittels *Semidry*- oder Nassblotverfahren. Das Gel, eine gleich große Nitrocellulosemembran und die jeweils benötigten Filterpapiere wurden kurz in dem entsprechenden Blotpuffer vorinkubiert. Ausgehend von der Anode wurde der Blot wie folgt zusammengebaut: Filterpapier (Nassblot = eins, *Semidry*-Blot = zwei), Gel, Membran, Filterpapier (Nassblot = eins, *Semidry*-Blot = zwei). Bei dem *Semidry*-Blot erfolgte der Transfer für 30 min bei 12 Volt und bei dem Nassblot für 50 min bei 50 Volt.

Nach dem erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte die Immunodetektion. Um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren und somit unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit der Membran zu verhindern, wurde diese für 10 min in Magermilchlösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (2.2) auf einem Kippschüttler für 90 min bei

Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach kurzem Spülen mit PBSB_{0,2}, um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (2.3) in PBSB_{0,2} für 30 min auf einem Kippschüttler inkubiert. Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde durch mehrmaliges Waschen (mindestens 6 ×) mit PBSB_{0,2} für 5 bis 10 min entfernt. Daraufhin wurde die Membran für 2 min mit der Chemilumineszenzlösung inkubiert. Alternativ wurde das Chemilumineszenzreagenz von Millipore (2.1.2) verwendet. Dazu wurden jeweils 1 ml der beiden Lösungen gemischt und auf der Membran für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran kurz zwischen Filterpapieren getrocknet, in eine Folie gelegt und auf dieser ein unbelichteter Film aufgelegt und in einer lichtundurchlässigen Filmkassette gelagert. Nach 1 min wurde der Film entwickelt (2.1.1.3) und sogleich ein weiterer Film auf die Membran aufgelegt. Die Belichtungszeit für den zweiten Film variierte abhängig von der erhaltenen Signalintensität des ersten Films.

2.3.6 Stripping

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris (pH 6,7), 2 % (w/v) SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol

Um auf einer bereits mit Primär- und Sekundärantikörper behandelten Nitrocellulosemembran andere Proteine nachzuweisen, müssen die gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu wird die Membran kurz mit Wasser gespült und die Antikörper werden durch die anschließende Inkubation mit dem *Stripping-Puffer* (30 min, 55 °C) abgelöst. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser kann die Membran erneut mit der Magermilchlösung und den neuen Antikörpern inkubiert werden.

2.3.7 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Aufgereinigte und entsalzte Proteinlösungen wurden mit Hilfe von Amicon-Zentrifugationsfiltern aufkonzentriert. Die Zentrifugationsfilter mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa wurden einige Minuten zentrifugiert (3 400 × g), bis das Volumen der Proteinlösung auf etwa 0,5 ml eingengt war. Proteine, die größer als 30 kDa sind, gelangen nicht durch die Filterporen und können somit aufkonzentriert werden. Kleinere Proteine werden aus der Lösung entfernt. Die aufkonzentrierten Proteine wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

2.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der aufgereinigten und aufkonzentrierten Proteine erfolgte mit Hilfe des *Advanced Protein Assay Reagent Kits* von Cytoskele-

ton (2.1.5). Für die Messung der Proteinkonzentration der lysierten Proben für den EGFR-ELISA (2.4.6) wurde der *660 nm Protein Assay* von Pierce (2.1.5) verwendet. Zu 200 μl des Färbereagens wurden 10 μl der Proteinlösung gegeben. Die Lösungen wurden durch mehrfaches Pipettieren gemischt und die Absorption wurde sofort bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ (Cytoskeleton) bzw. 660 nm (Pierce) am Mikroplatten-Photometer gemessen. Mit Hilfe von zusätzlich gemessenen Proteinstandards konnte die Konzentration der Proteinlösung ermittelt werden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

| | |
|---|--|
| Kulturmedium (HeLa, SiHa, CaSki, NIH-3T3, HER14 und HCT116) | : Dulbecco's <i>modified eagle medium</i> High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 10 % <i>fetal calf serum</i> |
| Kulturmedium (PHCC1 und PHCC2) | : Minimum Essential Medium Eagle, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 15 % <i>fetal calf serum</i> |
| Kulturmedium (MDA-MB-435S) | : Dulbecco's <i>modified eagle medium</i> High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin / Ham's F12, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 10 % <i>fetal calf serum</i> |
| Kulturmedium (MCF-7) | : RPMI 1640 mit L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 10 % <i>fetal calf serum</i> |
| Gelatinelösung | : 1 g/l Gelatine in Wasser |

Alle Zellen (2.1.13) wurden bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in Zellkulturschalen unter sterilen Bedingungen kultiviert. Alle verwendeten Zelllinien weisen ein adhärenentes Wachstum in Monolayern auf. Für die beiden Mausfibroblasten HER14 und NIH-3T3 war eine Beschichtung der Zellkulturschalen mit Gelatine notwendig. Dazu wurde die Schale für mindestens 5 min mit der Gelatinelösung inkubiert und anschließend diese wieder abgesaugt. Um die Zellen zu passagieren, wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und mit 300 μl Trypsin-EDTA (2.1.12) inkubiert, bis sich die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und ein kleiner Teil der Zellsuspension in eine neue Zellkulturschale mit 10 ml frischem Kulturmedium überführt. Zum Zählen der Zellen wurden diese in Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium anstelle des Kulturmediums resuspendiert.

2.4.2 Cytotoxizitätsassay

Um die cytotoxische Wirkung von SE, Saporin, *Pseudomonas* Exotoxin A und verschiedener Saponine zu untersuchen, wurde ein Cytotoxizitätsassay durchgeführt. Dazu wurden 2 000 (HER-14 und NIH-3T3), 5 000 (PHCC1, PHCC2, CaSki, MCF-7 und HCT116) oder 10 000 (HeLa, SiHa und MDA-MB-435S) Zellen in 100 μl Kulturmedium pro Vertiefung einer 96-*well* Platte ausgesät. Nach etwa 20 h erfolgte die Inkubation mit den Toxinen und/oder Saponinen. Das Medium wurde abgenommen und durch 180 μl frisches Medium ersetzt. In jede Vertiefung wurden anschließend 20 μl PBS mit unterschiedlichen Konzentrationen von SE, Saporin oder *Pseudomonas* Exotoxin A gegeben. Für die Kombination der Toxine mit Saponinen wurden die 180 μl Medium zuvor mit der gewünschten Saponinkonzentration (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für Spn; 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für Saponin 1641 und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für Gyp 1-10, Gyp 2-10 und Gyp 3-10) angesetzt und 5 min auf den Zellen inkubiert, bevor die Toxine zugegeben wurden. Zur Untersuchung der Eigentoxizität der aufgereinigten Saponine wurden 200 μl Medium mit der entsprechenden Saponinkonzentration in jede Vertiefung pipettiert. Die Kontrollzellen wurden mit 200 μl Medium ohne Saponin behandelt. Die Zellen wurden für 48 h inkubiert. Für die Untersuchung der Eigentoxizität der Endocytoseinhibitoren wurden die entsprechenden Inhibitorkonzentrationen ebenfalls in 200 μl Medium auf die Zellen gegeben und für den angegebenen Zeitraum inkubiert. Das Überleben der Zellen wurde mit Hilfe von Fluoresceindiacetat quantifiziert. In stoffwechselaktiven Zellen wird Fluoresceindiacetat durch kurzlebige cytoplasmatische Esterasen zu Fluorescein hydrolysiert. Fluorescein kann fluorometrisch gemessen werden. Nach 48 h wurde das Medium von den Zellen abgenommen, diese zweimal mit 200 μl PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei 37 °C mit 200 μl der Fluoresceindiacetatlösung (10 mg/ml Fluoresceindiacetat in PBS) inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Excitation von $\lambda = 485 \text{ nm}$ und einer Emission von $\lambda = 538 \text{ nm}$ am Mikroplatten-Fluoreszenz-Lesegerät (2.1.1.2). Im Bezug zu unbehandelten Zellen (100 % Überleben) und der Fluoreszenz ohne Zellen (0 % Überleben) wurde das prozentuale Überleben der behandelten Zellen ermittelt.

2.4.3 Zellyse zur Proteinanalyse im Westernblot

2.4.3.1 Nachweis der PARP-Spaltung

Lysispuffer A: 300 mM Saccharose, 100 mM Kaliumchlorid, 10 mM Imidazol, 2 mM Magnesiumchlorid, 0,2 % Triton X-100

Für den Nachweis der PARP-Spaltung (3.4.1) wurden 270 000 HeLa-Zellen pro 6-*well* Vertiefung ausgesät und nach 24 h mit SE (0,4 nM ohne Spn, 800 nM SE ohne Spn und

0,4 nM mit Spn) oder Staurosporin ($1 \mu\text{M}$) inkubiert. Für die Behandlungen in den 6-well Platten wurde eine höhere SE-Konzentration benötigt um einen SI_{50} -Wert zu erreichen. Aus diesem Grund wurde bei Ansätzen in diesem Format eine höhere SE-Konzentration eingesetzt als für die Versuche im 96-well Format. Als jeweilige Negativkontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit PBS ohne und mit Spn und mit DMSO, dem Lösungsmittel von Staurosporin, inkubiert. Staurosporin diente hierbei als Positivkontrolle, da es Apoptose auslöst [149]. Nach 24 h wurden die Zellen mit dem Lysispuffer A lysiert und $30 \mu\text{g}$ Gesamtprotein wurden für weitere 7 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.3.3) und die PARP mittels Westernblot (2.3.5) nachgewiesen.

2.4.3.2 Nachweis des EGFR und des Transferrinrezeptors

PBS_{EDTA} : 2,3 mM EDTA in PBS ohne Calcium und Magnesium

Lysispuffer: PBS mit 1% Triton X-100

Um die Expression des humanen EGFR und des Transferrinrezeptors im Westernblot nachzuweisen (Abb. 3.14 und Abb. 3.15), wurden HeLa-, HeLa Δ Dyn-, HER14- und NIH-3T3-Zellen mit PBS_{EDTA} abgelöst und 1×10^6 Zellen wurden zentrifugiert (10 min, $200 \times g$). Die Zellpellets wurden in $50 \mu\text{l}$ Lysispuffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (30 min, $16\,100 \times g$, 4°C) wurde die Proteinkonzentration in dem erhaltenen Überstand gemessen und $50 \mu\text{g}$ Gesamtprotein auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.3.3). Der Nachweis des EGFR und Transferrinrezeptors erfolgte im Westernblot (2.3.5).

2.4.4 Durchflusszytometrie

PBS_{EDTA} : 2,3 mM EDTA in PBS ohne Calcium und Magnesium

Blocklösung : 0,2% *fetal calf serum* in PBS

Quenchlösung: 150 mM Natriumchlorid, 20 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,5 mM Kaliumchlorid, 0,04% Trypanblau, pH 5,6

Die Wirksamkeit der verwendeten Endocytoseinhibitoren (Abb. 3.17, Abb. 3.20 und Abb. 3.23) wurde in der Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen mit PBS_{EDTA} abgelöst und 1×10^6 Zellen abzentrifugiert (10 min, $200 \times g$). Das Zellpellet wurde 10 min in $200 \mu\text{l}$ Blocklösung und anschließend mit Transferrin-FITC in Blocklösung ($0,4 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 30 min, 4°C) inkubiert. Darauf folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37°C , um die Internalisierung des inzwischen gebundenen Transferrin-FITC in die Zellen zu ermöglichen. Um die Auswirkungen der inhibitorisch wirkenden Substanzen zu analysieren, wurden die Zellen vor der Inkubation mit Transferrin-FITC

für 30 min mit diesen (200 μ l PBS mit 10 μ M Chlorpromazin, 60 nM Latrunculin A, 3 μ M Chloroquin oder 3 nM Bafilomycin A1) inkubiert und anschließend einmal gewaschen. Im Anschluss an die Inkubation mit Transferrin-FITC wurden die Zellen zweimal mit der Blocklösung gewaschen und kurz vor der Messung der Fluoreszenz am Durchflusszytometer (2.1.1.6) mit 600 μ l Quenchlösung [150] für 2 min bei 37 °C inkubiert, um nicht endocytisiertes Transferrin-FITC zu inaktivieren. Für die Messungen wurde ein Filter mit 525 nm verwendet und es wurde die Fluoreszenz von 10 000 Zellen analysiert.

2.4.5 Transfektion und Generierung stabiler Klone

Zur Herstellung stabil exprimierender Zellen wurden 500 000 HeLa-Zellen pro 24-*well* Vertiefung ausgesät. Nach etwa 24 h erfolgte die Transfektion mit der DNA für das inaktive Dynamin 2-Protein mittels *TurboFect* Kit (2.1.5). In 100 μ l serumfreiem Medium wurde 1 μ g DNA mit 2 μ l *TurboFect* Reagenz gemischt und 20 min inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium auf den Zellen gegen frisches Medium ausgetauscht und anschließend das DNA / Transfektionsreagenz tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach zwei Tagen wurde das Medium gegen frisches Medium mit 1 mg/ml G418 ersetzt. Nach einer Woche wurde die G418-Konzentration in dem Medium auf 1,5 mg/ml erhöht und die Zellen auf größere Zellkulturschalen umgesetzt (6-*well* Format). Schon nach 4 Tagen waren die Zellen so dicht gewachsen, dass sie erneut auf größere Zellkulturschalen (10 cm Schalen) umgesetzt wurden. Gleichzeitig wurde die G418-Konzentration wieder auf 1 mg/ml gesenkt. Eine Woche später konnten einzelne Klone auf einer 10 cm Schale mit Hilfe einer Pipette gepickt werden. Diese wurden zunächst im 96-*well* Format kultiviert und mit der Zeit auf größere Zellkulturschalen umgesetzt.

2.4.6 EGFR-ELISA

- PBS_{EDTA}** : 2,3 mM EDTA in PBS ohne Calcium und Magnesium
Lysispuffer : 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) NP-40, 20 mM Tris, pH 8,0, 1fach *complete* Proteaseinhibitor
PBST_{0,05} : PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20
Färbelösung: 40 mM Citronensäure, pH 3,95, 0,02 % (v/v) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 0,01 % (v/v) Wasserstoffperoxid (frisch zugesetzt), vor Gebrauch filtriert

Die Quantifizierung der EGFR-Expression wurde mit den humanen Zervixkarzinomzelllinien HeLa, CaSki, SiHa, PHCC1 und PHCC2, der humanen Melanomzelllinie MDA-MB-435S, sowie den murinen Fibroblastenzelllinien HER14 und NIH-3T3 durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS_{EDTA} abgelöst und 5×10^6 Zellen abzentrifugiert (10 min, $200 \times g$). Das Pellet wurde in 1 ml Lysispuffer resuspendiert und für 2 h bei 4 °C im

Überkopfschüttler inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (20 min, $16\,100 \times g$, 4°C) wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt (2.3.8). Um zu untersuchen, ob die Inkubation der Zellen mit Spn die EGFR-Expression beeinflusst, wurden HeLa- und HER14-Zellen für 24 h und 48 h in Gegenwart von $1,5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Spn inkubiert, bevor die Zellen abgelöst und lysiert wurden.

Für den ELISA wurden Mikroplatteneinsätze im 96-well Format (2.1.4) verwendet. Zu Beginn wurden die Vertiefungen mit einer SE-Lösung ($2\ \text{ng}/\mu\text{l}$ in PBS) beschichtet ($100\ \mu\text{l}$, 2 h). Anschließend wurden die Vertiefungen gewaschen. Dabei wurde folgende Waschprozedur durchgeführt: Mit Hilfe der Mikrowell-Waschvorrichtung (2.1.1.6) wurde die Lösung aus den Vertiefungen abgesaugt und anschließend in jede Vertiefung $2 \times 200\ \mu\text{l}$ PBST_{0,05} gegeben und sofort wieder abgesaugt. Es wurden erneut $200\ \mu\text{l}$ PBST_{0,05} in jede Vertiefung gegeben und in einem Schüttler inkubiert. Nach 5 min folgte die gleiche Waschprozedur mit drei Waschstritten, wobei die letzte Waschlösung komplett abgesaugt wurde. Freie Oberflächen der Vertiefungen, an die kein SE gebunden hat, wurden im Anschluss mit einer Blockierlösung besetzt ($200\ \mu\text{l}$, 30 min), die Vertiefungen erneut gewaschen und mit $50\ \mu\text{g}$ der Zellysate inkubiert ($100\ \mu\text{l}$, 1 h). Die Vertiefungen wurden gewaschen, mit der Blockierlösung behandelt und nochmals gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-EGFR ($1:250$ in PBST_{0,05}, $100\ \mu\text{l}$, 1 h). Nicht gebundener Primärantikörper wurde durch Waschen entfernt und die Vertiefungen wurden mit dem Sekundärantikörper *sheep anti-rat* inkubiert ($1:500$ in PBST_{0,05}, $100\ \mu\text{l}$, 1 h). Nach Entfernen des Sekundärantikörpers und erneutem Waschen wurden jeweils $100\ \mu\text{l}$ der Färbelösung in die Vertiefungen pipettiert und im Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von $50\ \mu\text{l}$ Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und die Konzentration des dabei gebildeten gelben Farbstoffes am Mikroplatten-Photometer bei $\lambda = 450\ \text{nm}$ gemessen. Um minimale Variationen in der Schichtdicke der Vertiefungen zu korrigieren, wurde von jedem Messwert die Absorption bei $\lambda = 490\ \text{nm}$ abgezogen.

2.4.7 DNA-Fragmentierung

Die folgenden Lösungen und Antikörper sind Komponenten aus dem verwendeten *Cell Death Detection ELISA* Kit.

incubation buffer : Lysispuffer

coating buffer : enthält den Primärantikörper (anti-Histon)

washing solution : Waschpuffer

conjugate solution: enthält den mit Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper

substrate solution : enthält das Substrat für die Farbreaktion

Der Nachweis der DNA-Fragmentierung (3.4.2) nach der Behandlung von HER14-Zellen mit SE und Spn/SE erfolgte mit Hilfe des *Cell Death Detection ELISA* (2.1.5). Mit Hilfe des ELISA kann histonassoziierte DNA in einer Form nachgewiesen werden, die sich nur in den Zellen findet, wenn in dieser apoptotische Prozesse ablaufen.

50 000 HER14-Zellen wurden pro 12-*well* Vertiefung ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen SE-Konzentrationen (0,2 nM, 2 nM, 20 nM und 100 nM) in An- und Abwesenheit von Spn für verschiedene Zeiten (4 h, 12 h, 16 h, 24 h und 48 h) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min mit 500 μl *incubation buffer* behandelt, im Puffer abgelöst und zentrifugiert (10 min, 20 000 \times g). Der Überstand wurde bei -20°C eingefroren.

Für den ELISA wurden Mikroplatteneinsätze im 96-*well* Format (2.1.4) verwendet. Zunächst wurden in die Vertiefungen 100 μl *coating buffer* gegeben und für 1 h inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und es folgte eine Inkubation mit dem *incubation buffer* für 30 min. Anschließend wurden die Vertiefungen 3 \times mit 250 μl auf Raumtemperatur vorgewärmter *washing solution* gewaschen, bevor jeweils 100 μl der bei -20°C eingefrorenen Zellysate in die Vertiefungen pipettiert wurden. Nach 90 min wurde wie schon zuvor gewaschen und es folgte die Inkubation mit der *conjugate solution* (100 μl), die wiederum für 90 min inkubiert wird. Die Vertiefungen wurden erneut gewaschen und es wurden 100 μl auf Raumtemperatur vorgewärmte *substrate solution* hinzugegeben und für 10 bis 20 min inkubiert. Sobald eine eindeutige Farbreaktion sichtbar war, wurde die Menge des entwickelten Farbstoffes am Mikroplatten-Photometer bei $\lambda = 405\text{ nm}$ quantifiziert.

2.4.8 Membranintegrität

Um zu untersuchen, ob sich durch die Inkubation mit SE, Spn/SE und Spn die Membranintegrität verändert (3.4.3), wurde der *CytoTox-ONE* Assay (2.1.5) verwendet. Dabei wird die Freisetzung von Lactatdehydrogenase aus der Zelle in das Medium nachgewiesen. Lactatdehydrogenase ist normalerweise im Cytosol der Zellen zu finden, kann bei nekrotischen Prozessen durch die poröse Membran jedoch aus den Zellen freigesetzt werden.

Pro Vertiefung im 96-*well* Format wurden 2 000 HER14-Zellen ausgesät und am nächsten Tag erfolgte die Inkubation für 24 h, 36 h und 48 h mit SE (SI_{50} -Wert), Spn/SE (1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Spn und SI_{50} -Wert für SE) und 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Spn. Die Behandlung mit PBS diente als Negativkontrolle. Die Ansätze erfolgten in dreifacher Ausführung, jeweils in Doppelbestimmung. Bereits 4,5 h bevor die Inkubation endete, wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht und zwei der drei identischen Ansätze konnten weiter wachsen. Bei dem dritten Ansatz wurde die Lactatdehydrogenase-Menge bestimmt, sie diente als Grundwert. Dieses Vorgehen ermöglicht eine direkte Aussage darüber, wie

viel Lactatdehydrogenase in den letzten 4,5 h der Inkubation mit SE, Spn/SE und Spn freigesetzt wird. Der Zeitraum von 4,5 h wurde gewählt, da Lactatdehydrogenase eine Halblebenszeit von 9 h aufweist und somit sichergestellt ist, dass keine Lactatdehydrogenase abgebaut wurde. Nach der weiteren Inkubation von 4,5 h wurden die Zellen bei einem der Ansätze mit Hilfe der dem Kit beigefügten Lysislösung lysiert. Diese Daten geben die maximal zu erreichenden Werte wider. Bei den nicht lysierten Zellen wurde die Lactatdehydrogenasefreisetzung gemessen.

Für die Messung der Lactatdehydrogenasefreisetzung wurden in jede Vertiefung 100 μl der Farbstofflösung pipettiert und für 9 min inkubiert. Bei dem Farbstoff handelt es sich um Resazurin. Durch die in dem Medium befindliche Lactatdehydrogenase wird Lactat zu Pyruvat umgewandelt, gleichzeitig wird dabei NAD^+ zu $\text{NAD} + \text{H}^+$ reduziert. Die Oxidierung von $\text{NAD} + \text{H}^+$ zu NAD^+ ermöglicht die Umwandlung von Resazurin in den Fluoreszenzfarbstoff Resofurin. Durch die Zugabe einer Stopplösung wird die Reaktion gestoppt und die Fluoreszenz am Mikroplatten-Fluoreszenz-Lesegerät (2.1.1.2) bei einer Excitation von $\lambda = 560 \text{ nm}$ und einer Emission von $\lambda = 590 \text{ nm}$ gemessen.

Ergebnisse

3.1 Cytotoxische Wirkung von Saporin und des zielgerichteten Toxins SE auf Zervixkarzinomzelllinien

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das zielgerichtete Toxin SE (Abb. 3.1) verwendet. Es besteht aus dem pflanzlichen Proteintoxin Saporin (1.1.1) und dem humanen EGF, dem Liganden des humanen EGFR (1.1.2). Die Bindung von SE an Zielzellen sowie die enzymatische Aktivität des Toxinanteils wurde bereits nachgewiesen*. Die Untersuchungen zum *In-vitro*-Nachweis der Enzymaktivität basieren dabei auf dem von Heisler *et al.* entwickelten colorimetrischen Festphasenassay [34] und einer daraus entwickelten vereinfachten Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) -Messmethode†. Der Aufnahmemechanismus von SE, besonders auch in Kombination mit Spn (1.3), ist zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt gewesen. Für einen möglichen Einsatz von SE oder ähnlichen zielgerichteten Toxinen in der Tumorthherapie ist es jedoch notwendig, die molekularen Voraussetzungen für einen effektiven Einsatz zu untersuchen sowie die Wirksamkeit auf möglichen Zielzellen zu analysieren.



Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des zielgerichteten Toxins SE. N-terminal befindet sich ein His-tag, gefolgt von dem Proteintoxin Saporin und EGF, dem Liganden des EGFR.

3.1.1 Untersuchungen an HER14- und NIH-3T3-Zellen

3.1.1.1 Cytotoxizität von SE und Spn/SE

Die cytotoxische Wirkung des zielgerichteten Toxins SE (Abb. 3.1) wurde auf Zellen mit und ohne EGFR untersucht. Dazu wurden HER14- und NIH-3T3-Zellen mit SE in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Um die verstärkende Wirkung von Spn auf die

*unveröffentlicht, Bachran *et al.*

†*submitted*, Urban *et al.*

Cytotoxizität von SE zu untersuchen, wurden beide Zelllinien zusätzlich mit der Kombination (Spn/SE) behandelt. Die Zellen wurden mit steigenden SE-Konzentrationen inkubiert, im Anschluss die noch lebensfähigen Zellen mit Hilfe eines Proliferationsassays (2.4.2) bestimmt und die Ergebnisse in einer Dosis-Wirkungskurve dargestellt (Abb. 3.2).

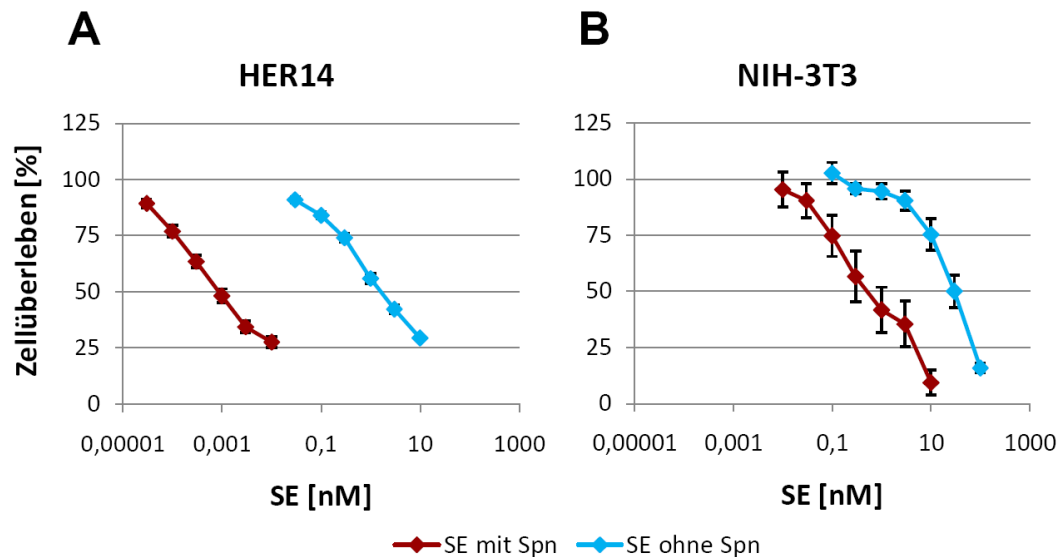


Abbildung 3.2: Cytotoxizität des zielgerichteten Toxins SE alleine und in Kombination mit Spn auf HER14-Zellen (A) und auf NIH-3T3-Zellen (B). Die eingesetzten Zellzahlen und die verwendeten SE-Konzentrationen sind in Tab. 5.11* aufgelistet. Die Zellen wurden für 48 h mit SE und Spn/SE inkubiert und anschließend wurde das Überleben der Zellen durch die Fähigkeit zur Spaltung von Fluoresceindiacetat im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 76 (HER14, SE o. Spn), 40 (HER14, SE m. Spn), 5 bis 12 (NIH-3T3, SE o. Spn) und 2 bis 7 (NIH-3T3, SE m. Spn) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken (in (A) sehr gering und daher kaum sichtbar) repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Sowohl auf HER14-Zellen, die den humanen EGFR exprimieren als auch auf den entsprechenden Kontrollzellen ohne humanen EGFR (NIH-3T3) zeigt SE eine toxische Wirkung. Jedoch liegt ein deutlicher Unterschied bei der Empfindlichkeit in Abhängigkeit von der Expression des EGFR vor. Auf den HER14-Zellen wird bereits bei einer SE-Konzentration von 2,5 nM ein SI_{50} -Wert erreicht, bei den NIH-3T3-Zellen erst bei 30 nM. Der SI_{50} -Wert gibt die Toxinkonzentration an, bei der die Anzahl der Zellen gerade die Hälfte der unbehandelten Kontrollzellen beträgt. SI steht für *survival index*. Die Expression des humanen EGFR führt zu einer größeren Empfindlichkeit gegenüber SE. Durch die Kombination von SE mit Spn wird die Cytotoxizität von SE auf den HER14-Zellen 2800fach verstärkt. Diese Verstärkung ist im Bereich des SI_{50} -Wertes statistisch signifikant (Tab. 5.15*). Spn wurde in einer nicht toxischen Konzentration eingesetzt und auch SE weist bei den in der Kombination verwendeten Konzentrationen alleine keine Toxizität auf, es liegt somit ein eindeutig synergistischer Effekt vor.

*Alle folgenden Tabellen mit der Bezeichnung 5.x befinden sich im Anhang auf den Seiten 87-91.

Auf den NIH-3T3-Zellen wird die cytotoxische Wirkung von SE durch Spn bemerkenswerterweise nur 50fach verstärkt, dennoch ist diese Verstärkung statistisch signifikant (Tab. 5.15). Somit erfolgt die Verstärkung der Toxizität von SE auch auf den Nicht-Zielzellen, jedoch in einem wesentlich geringeren Ausmaß als auf den EGFR-exprimierenden Zielzellen. Unter 3.2.2 sind alle SI_{50} -Werte, sowie die dazugehörigen Verstärkungsfaktoren tabellarisch aufgelistet (Tab. 3.9). Im folgenden Abschnitt wurde die Relevanz des Liganden EGF für die Wirkung von SE untersucht.

3.1.1.2 Cytotoxizität von Saporin und Spn/Saporin

Für den Nachweis, dass die starke cytotoxische Wirkung von SE auf den HER14-Zellen auf der Interaktion von SE mit dem EGFR beruht, wurde die Cytotoxizität des bloßen Toxinanteils (Saporin) von SE auf HER14- und NIH-3T3-Zellen analysiert. Gleichzeitig wurde die verstärkende Wirkung von Spn auf Saporin untersucht. Das Überleben der behandelten Zellen wurde in einer Dosis-Wirkungskurve dargestellt. Für einen besseren Vergleich der Ergebnisse mit denen für SE, wurden in die folgende Abbildung 3.3 ebenfalls die bereits gezeigten Ergebnisse für SE aufgenommen.

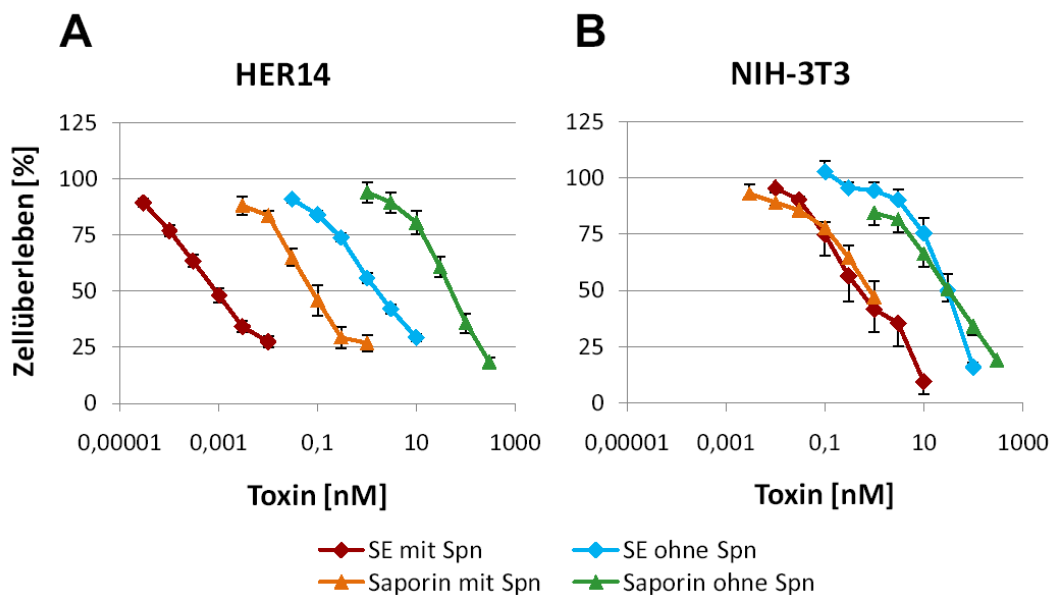


Abbildung 3.3: Cytotoxizität von Saporin alleine und in Kombination mit Spn, sowie von SE und Spn/SE auf HER14-Zellen (A) und NIH-3T3-Zellen (B). In Tab. 5.11 sind die eingesetzten Konzentrationen von Saporin und SE zusammengefasst. Die Durchführung erfolgte wie in der Bildunterschrift zu Abb. 3.2 angegeben. Die für Saporin und Spn/Saporin gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

Die Cytotoxizität von Saporin alleine ist im Vergleich zu SE auf den HER14-Zellen mit einem SI_{50} -Wert von 53nM deutlich geringer (Abb. 3.3) und dieser Unterschied ist auch statistisch signifikant (Tab. 5.15). Die Inkubation von Saporin mit Spn führt

zu einer signifikanten Verstärkung der cytotoxischen Wirkung, ist jedoch mit einem Verstärkungsfaktor von 660 deutlich geringer als bei SE. Die Toxizität von Saporin und SE auf den NIH-3T3-Zellen unterscheidet sich weder alleine noch in Kombination mit Spn signifikant (Tab. 3.9). Die Fusion von Saporin mit EGF, dem Liganden des EGFR, führt demnach zu einer Steigerung der Toxizität auf EGFR-exprimierenden Zellen. Die Aufnahme von Saporin erfolgt unabhängig vom EGFR, wohingegen die Aufnahme von SE abhängig vom Vorhandensein des EGFR ist. Das murine Zellkulturmodell der HER14-Zellen, die zunächst mit dem humanen EGFR transfiziert werden mussten, ist natürlich nur ein artifizielles Modell, das gut zur Etablierung der Methode geeignet ist. Weiterführende Untersuchungen müssen jedoch an humanen Tumorzellen durchgeführt werden, um relevante Aussagen zu erhalten.

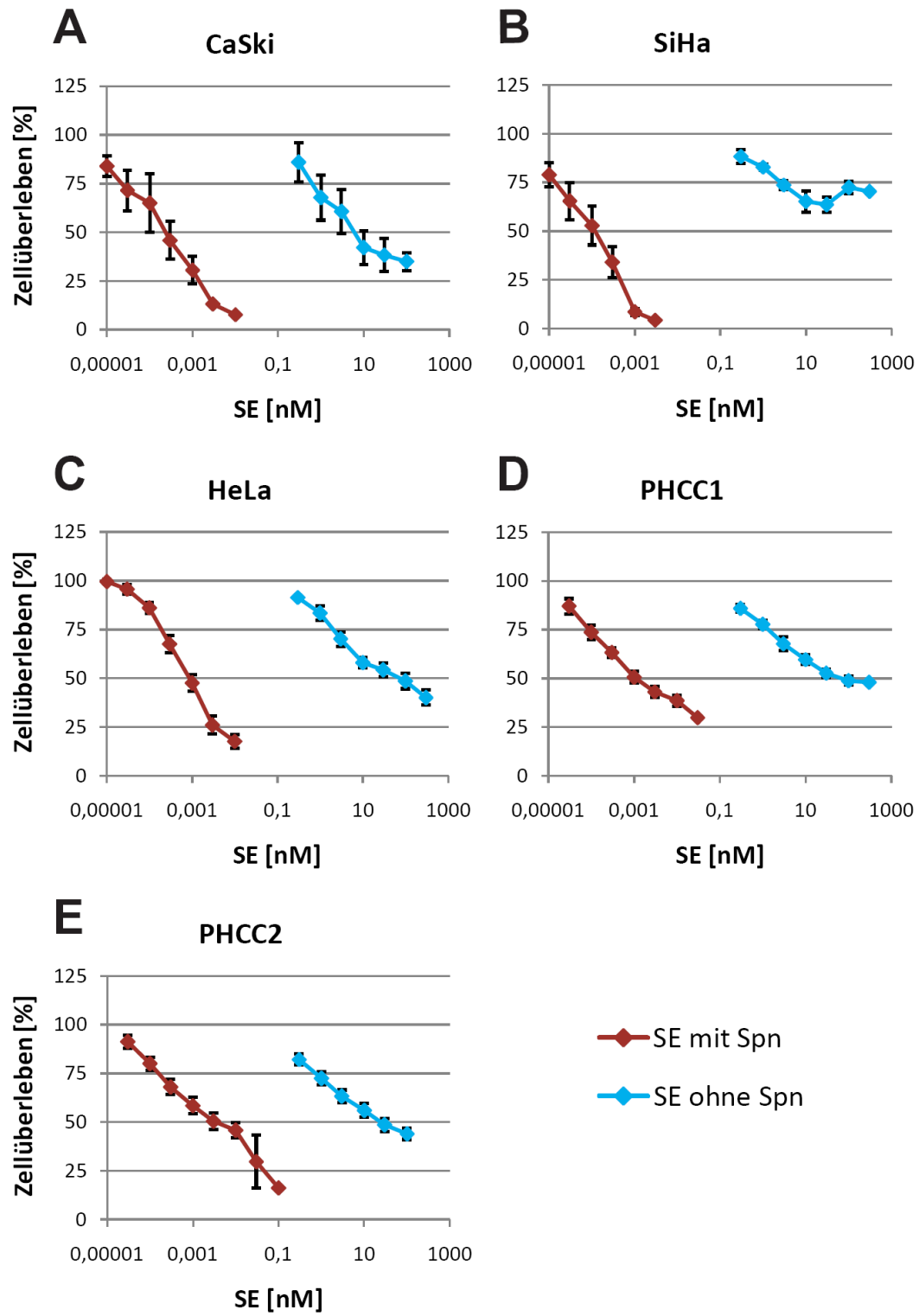
3.1.2 Untersuchungen an humanen Zervixkarzinomzellen

Bei etwa 90 % der Zervixkarzinome ist die Expression des EGFR erhöht, sodass gegen den EGFR gerichtete Therapeutika aussichtsreiche Therapiemöglichkeiten bieten. Aus diesem Grund wurde die cytotoxische Wirkung von SE und Spn/SE an fünf Zervixkarzinomzelllinien untersucht. Die cytotoxische Wirkung von Saporin und Spn/Saporin wurde ebenfalls auf diesen Zellen analysiert. Die Zelllinien CaSki, SiHa und HeLa sind etablierte, lange kultivierte Zelllinien, wohingegen PHCC1 und PHCC2 relativ junge Zelllinien mit weniger als 50 Passagen sind.

3.1.2.1 Cytotoxizität von SE und Spn/SE

CaSki-, SiHa-, HeLa-, PHCC1- und PHCC2-Zellen wurden mit steigenden SE-Konzentrationen inkubiert. Da Spn die Cytotoxizität von SE auf den HER14-Zellen drastisch steigern konnte, wurde ebenfalls untersucht, ob Spn auch auf den Zervixkarzinomzellen eine verstärkende Wirkung für SE aufweist. Das Überleben der fünf Zelllinien nach der SE-Behandlung wurde in einer Dosis-Wirkungskurve graphisch dargestellt (Abb. 3.4).

Abbildung 3.4 : Cytotoxizität von SE alleine und in Kombination mit Spn auf CaSki- (**A**), SiHa- (**B**), HeLa- (**C**), PHCC1- (**D**) und PHCC2-Zellen (**E**). Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abb. 3.2 beschrieben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 5 (CaSki, SE o. Spn), 2 bis 5 (CaSki, SE m. Spn), 4 (SiHa, SE o. Spn), 3 bis 6 (SiHa, SE m. Spn), 9 (HeLa, SE o. Spn), 12 (HeLa, SE m. Spn), 11 (PHCC1, SE o. Spn), 10 (PHCC1, SE m. Spn), 13 (PHCC2, SE o. Spn) und 10 (PHCC2, SE m. Spn) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.



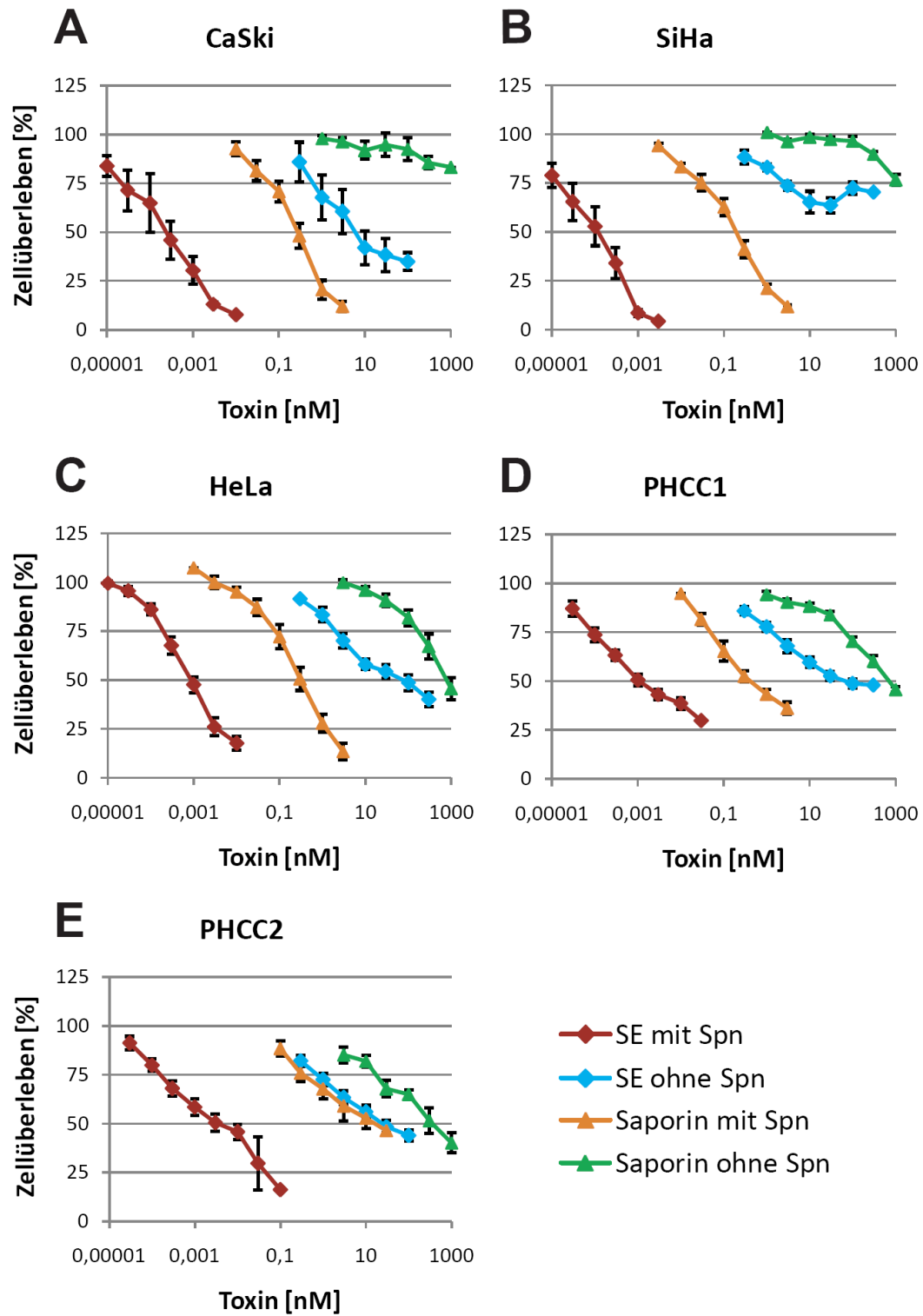
Die Behandlung der Zervixkarzinomzellen mit SE führt zu einer eindeutig konzentrationsabhängigen Cytotoxizität. Für die gering passagierten Zelllinien PHCC1 und PHCC2 sowie für die HeLa-Zellen ergeben sich vergleichbare SI_{50} -Werte von 80 nM, 24,5 nM und 53 nM. Die CaSki-Zellen weisen hingegen eine stärkere Empfindlichkeit für SE auf. Der SI_{50} -Wert von 5 nM ist mit dem SI_{50} -Wert, der für die HER14-Zellen ermittelt wurde, vergleichbar. Lediglich für die SiHa-Zellen kann kein SI_{50} -Wert ermittelt werden, nicht einmal bei der höchsten getesteten Konzentration von 300 nM SE. Die Inkubation der Zellen mit höheren SE-Konzentrationen war aufgrund der erreichbaren Höchstkonzentration von SE nicht möglich.

Die Kombination von SE mit Spn führt bei allen fünf Zelllinien zu einer deutlichen Verstärkung der Wirkung von SE. Dabei ergaben sich Verstärkungsfaktoren von 9 000 bis 2 500 000fach. Der höchste Verstärkungsfaktor von 2 500 000 wurde für SiHa-Zellen erhalten. Auf diesen Zellen konnte für SE alleine jedoch kein SI_{50} -Wert ermittelt werden, sodass der Verstärkungsfaktor anhand des gemessenen Zellüberlebens bei der höchsten SE-Konzentration von 300 nM und dem SI_{50} -Wert für Spn/SE berechnet wurde. HeLa-Zellen weisen einen mit HER14 vergleichbaren SI_{50} -Wert für Spn/SE auf (0,0007 nM). Obwohl SiHa- und CaSki-Zellen eine deutlich unterschiedliche Empfindlichkeit für SE aufweisen (Abb. 3.4), ergaben sich bei der Kombination von SE mit Spn fast identische SI_{50} -Werte von 0,00012 nM und 0,00013 nM. Die SI_{50} -Werte für PHCC1 und PHCC2 liegen mit 0,0011 nM und 0,0027 nM etwas höher als die der anderen Zervixkarzinomzellen. Die Verstärkung der Cytotoxizität von SE ist für alle Zellen signifikant beim Vergleich der SI_{50} -Werte (Tab. 5.15), mit Ausnahme der SiHa-Zellen, für die kein SI_{50} -Wert erreicht werden konnte.

3.1.2.2 Cytotoxizität von Saporin und Spn/Saporin

Wie schon bei den HER14- und NIH-3T3-Zellen durchgeführt, wurden auch die Zervixkarzinomzellen mit Saporin und Spn/Saporin behandelt, um die Rezeptorspezifität für die Wirkung von SE zu untersuchen. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Zellüberleben bestimmt und in der folgenden Abbildung (Abb. 3.5) graphisch dargestellt.

Abbildung 3.5 : Cytotoxizität von Saporin alleine und in Kombination mit Spn auf CaSki- (A), SiHa- (B), HeLa- (C), PHCC1- (D) und PHCC2-Zellen (E). Die Versuche wurden wie in Abb. 3.2 angegeben durchgeführt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 (CaSki, Saporin o. Spn), 2 bis 3 (CaSki, Saporin m. Spn), 4 (SiHa), 8 (HeLa, Saporin o. Spn), 4 bis 9 (HeLa, Saporin m. Spn), 6 (PHCC1, Saporin o. Spn), 5 (PHCC1, Saporin m. Spn), 6 (PHCC2, Saporin o. Spn) und 4 (PHCC2, Saporin m. Spn) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert. Die Inkubation mit SE und Spn/SE erfolgte wie in der Bildunterschrift zu Abbildung 3.4 angegeben.



Wie in der Abbildung 3.5 zu erkennen ist, zeigt die Behandlung der Zervixkarzinomzellen mit Saporin auf einigen Zelllinien kaum eine cytotoxische Wirkung. Die stärkste Wirkung zeigt Saporin auf den PHCC2-Zellen, mit einem SI_{50} -Wert von 338 nM. Für PHCC1- und HeLa-Zellen ergeben sich SI_{50} -Werte von 672 nM und 611 nM. Nahezu unempfindlich für Saporin bei den getesteten Konzentrationen sind CaSki- und SiHa-Zellen. Für beide Zelllinien konnte selbst bei 1000 nM Saporin kein SI_{50} -Wert erreicht werden.

Durch die Kombination mit Spn wird die Cytotoxizität von Saporin verstärkt, sodass für alle Zervixkarzinomzellen ein SI_{50} -Wert ermittelt werden konnte. Für CaSki-, SiHa-, HeLa- und PHCC1-Zellen ergeben sich dabei fast identische SI_{50} -Werte von 0,26 nM, 0,20 nM, 0,24 nM und 0,50 nM, mit einer entsprechenden 1300 bis 5000fachen Verstärkung der Cytotoxizität. Die PHCC2-Zellen waren am empfindlichsten für Saporin, jedoch zeigen sie den geringsten Verstärkungsfaktor (19fach) für Spn/Saporin, was in einem SI_{50} -Wert von 17,2 nM erkennbar ist. Die Cytotoxizität von Saporin wurde durch Spn signifikant verstärkt (Tab. 5.15). Für diese Untersuchung wurden die SI_{50} -Werte verglichen, somit war keine Aussage über die Signifikanz für CaSki- und SiHa-Zellen möglich.

3.1.3 Untersuchungen an MDA-MB-435S-Zellen

Die beiden murinen Zelllinien HER14 und NIH-3T3 stellen ein sehr gutes Modellsystem für eine Positiv- und Negativkontrollzelllinie im Bezug auf die humane EGFR-Expression dar. Ein großer Vorteil ist, dass es sich im Prinzip um die gleichen Zellen handelt, die sich nur in der Expression des humanen EGFR unterscheiden. Da es sich jedoch um murine Zellen handelt, sind sie nicht für alle Versuche uneingeschränkt als Kontrollzellen nutzbar. Aus diesem Grund wurde die humane Zelllinie MDA-MB-435S (2.1.13) analysiert. Anido *et al.* haben diese Zelllinie im Vergleich zu anderen humanen Zellen als nicht-EGFR-exprimierende Zelllinie eingestuft [151]. Somit sollten die MDA-MB-435S-Zellen als Negativkontrolle für die geplante Analyse der EGFR-Expression und der anschließenden Korrelation der Daten mit den SI_{50} -Werten der untersuchten Zervixkarzinomzelllinien dienen. Dazu wurde die Cytotoxizität des zielgerichteten Toxins SE und des Proteintoxins Saporin analysiert und in einer Dosis-Wirkungskurve dargestellt (Abb. 3.6). Zusätzlich wurde die verstärkende Wirkung von Spn auf den MDA-MB-435S-Zellen untersucht.

Anhand der Abbildung 3.6 ist zu erkennen, dass SE eine konzentrationsabhängige Toxizität auf die MDA-MB-435S-Zellen ausübt, diese jedoch insgesamt sehr unempfindlich gegen die Wirkung von SE sind. Für die Behandlung der Zellen mit SE ergibt sich ein SI_{50} -Wert von 206 nM. Die Kombination mit Spn führt zu einer 17000fachen Verstärkung der Cytotoxizität von SE, mit einem SI_{50} -Wert von 0,012 nM. Der To-

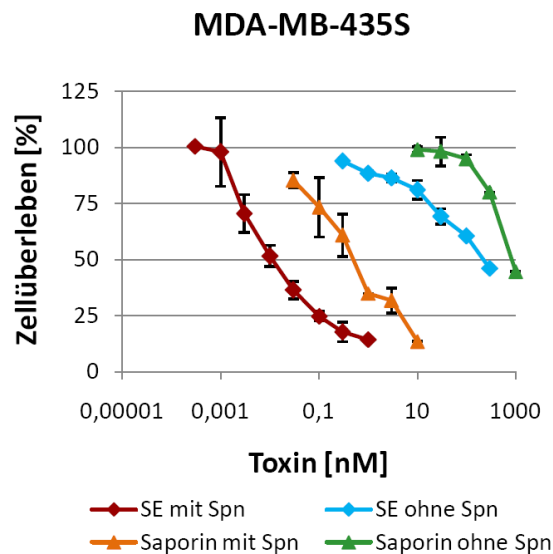


Abbildung 3.6: Cytotoxizität von SE und Saporin alleine und in Kombination mit Spn auf MDA-MB-435S-Zellen. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abb. 3.2 dargestellt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus jeweils 2 unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

xinanteil von SE, das Saporin, weist mit einem SI_{50} -Wert von nur 830 nM eine noch geringere Toxizität auf. Diese wird durch Spn verstärkt (900fach), jedoch in einem deutlich geringeren Maße als die Cytotoxizität von SE (17 000fach). Die geringe Empfindlichkeit gegenüber SE deutet auf einen Zusammenhang zwischen der EGFR-Menge [151] und der Wirkung von SE hin. Dieser Zusammenhang wurde im Weiteren genauer untersucht.

3.2 Analyse des Zusammenhangs zwischen der EGFR-Expression und der Cytotoxizität von SE und Saporin

3.2.1 Quantifizierung der EGFR-Expression

Die cytotoxische Wirkung von SE ist abhängig von der Existenz des EGFR (3.1.1). Auch die Verstärkung der Cytotoxizität von SE durch Spn erfolgt abhängig vom EGFR (3.1.1.1). Somit ist das Vorhandensein des EGFR eine Voraussetzung für die Wirkung von SE. Es ist jedoch nicht bekannt, ob eine Korrelation zwischen EGFR-Menge und der Wirkung von SE besteht.

Zunächst wurde die EGFR-Expression der drei als Kontrollzellen dienenden Zelllinien HER14, NIH-3T3 und MDA-MB-435S sowie der fünf Zervixkarzinomzelllinien mit Hilfe eines ELISA (2.4.6) quantifiziert. Die EGFR überexprimierenden HER14-Zellen

weisen die höchste Expression des humanen EGFR auf, sodass die bei HER14-Zellen gemessenen Werte zur besseren Vergleichbarkeit mit 100 % gleichgesetzt wurden. In der folgenden Abbildung 3.7 sind die relativen EGFR-Expressionslevel der untersuchten Zelllinien graphisch dargestellt.

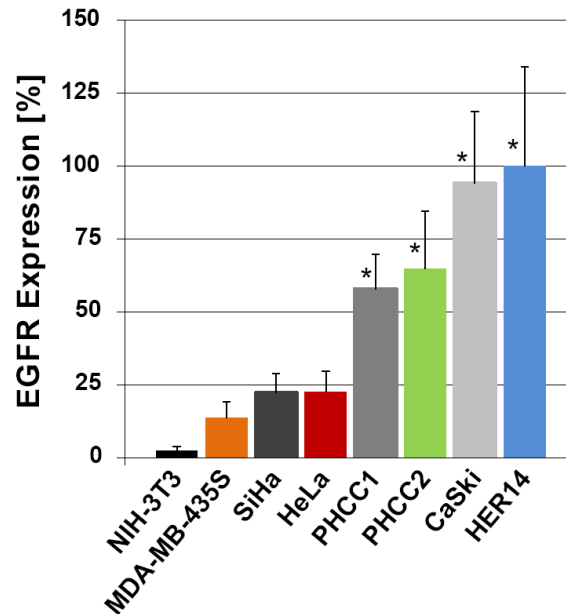


Abbildung 3.7: Relative EGFR-Expression von NIH-3T3-, MDA-MB-5435S-, SiHa-, HeLa-, PHCC1-, PHCC2-, CaSki- und HER14-Zellen. Die Expression der mit dem humanen EGFR transfizierten HER14-Zellen wurde als maximale EGFR-Expression dargestellt. Die Expression des EGFR wurde mit Hilfe eines ELISA (2.4.6) ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 bis 6 unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar. Eine signifikant höhere EGFR-Expression im Vergleich zu MDA-MB-435S-Zellen ist durch ein * gekennzeichnet. $p \leq 0,05$

Die untersuchten Zelllinien weisen große Unterschiede in der Expression des humanen EGFR auf (Abb. 3.7). Die höchste Expression des EGFR zeigen die transfizierten HER14-Zellen (100 %) und die CaSki-Zellen (94 %). Eine etwas geringere EGFR-Expression ist bei den beiden relativ jungen Zervixkarzinomzellen PHCC1 (57,8 %) und PHCC2 (64,6 %) zu beobachten. HeLa- und SiHa-Zellen exprimieren nur 22,5 % bzw. 22,1 % EGFR im Bezug zu den HER14-Zellen. Für MDA-MB-435S-Zellen, die laut Anido *et al.* keinen EGFR exprimieren [151], konnte immerhin noch eine 13,5%ige EGFR-Expression detektiert werden. Die NIH-3T3-Zellen, die keinen humanen EGFR exprimieren, weisen einen Wert von 2,3 % auf, der als Hintergrund angesehen werden kann. Sowohl PHCC1-, PHCC2-, CaSki- als auch HER14-Zellen exprimieren signifikant mehr EGFR als die Kontrollzelllinie MDA-MB-435S (Tab. 5.16).

Nachdem nun für alle Zelllinien das Expressionslevel für den humanen EGFR bestimmt wurde, konnte die cytotoxische Wirkung von SE und Saporin mit diesen korreliert werden (3.2.2).

3.2.2 Korrelation der Cytotoxizität von SE und Saporin mit der EGFR-Expression

Um die Cytotoxizität von SE und Saporin mit dem Expressionslevel von EGFR auf Zielzellen zu korrelieren, sind in der folgenden Tabelle (Tab. 3.9) die SI_{50} -Werte aller Zervixkarzinomzelllinien sowie der drei Kontrollzelllinien HER14, NIH-3T3 und MDA-MB-435S für die Inkubation mit SE und Saporin als auch für die Kombinationsbehandlung mit Spn zusammengefasst.

Tabelle 3.9: SI_{50} -Werte und Verstärkungsfaktoren für SE und Spn/SE auf NIH-3T3-, HER14-, CaSki-, SiHa-, HeLa-, PHCC1-, PHCC2- und MDA-MB-435S-Zellen.

| | SE | | | Saporin | | |
|-------------|----------------------|---------|--------------------|----------------------|--------|--------------------|
| | SI_{50} -Wert [nM] | | Verstärkungsfaktor | SI_{50} -Wert [nM] | | Verstärkungsfaktor |
| | o. Spn | m. Spn | | o. Spn | m. Spn | |
| NIH-3T3 | 30 | 0,6 | 50 | 30 | 0,81 | 40 |
| HER14 | 2,5 | 0,0009 | 2 800 | 53 | 0,08 | 660 |
| CaSki | 5 | 0,00013 | 38 000 | > 1 000 | 0,26 | 3 800 |
| SiHa | > 300 | 0,00013 | 2 500 000 | > 1 000 | 0,2 | 5 000 |
| HeLa | 53 | 0,0007 | 75 700 | 611 | 0,24 | 2 500 |
| PHCC1 | 80 | 0,0011 | 76 000 | 672 | 0,5 | 1 300 |
| PHCC2 | 24,5 | 0,0027 | 9 000 | 338 | 17,2 | 19 |
| MDA-MB-435S | 206 | 0,012 | 17 000 | 830 | 0,9 | 900 |

Die erhaltenen SI_{50} -Werte wurden logarithmiert und auf der Ordinate aufgetragen. Die prozentuale EGFR-Expression wurde dem auf der Abszisse gegenüber gestellt (Abb. 3.8). Für die Korrelation der Daten wurden die Werte für die HER14- und NIH-3T3-Zellen nicht in die Auswertung miteinbezogen, da es sich um murine Zellen handelt. Sie weisen eine höhere Empfindlichkeit für SE und Saporin auf als die humanen Zelllinien. Dennoch sind die Werte in der Abbildung 3.8 mit dargestellt.

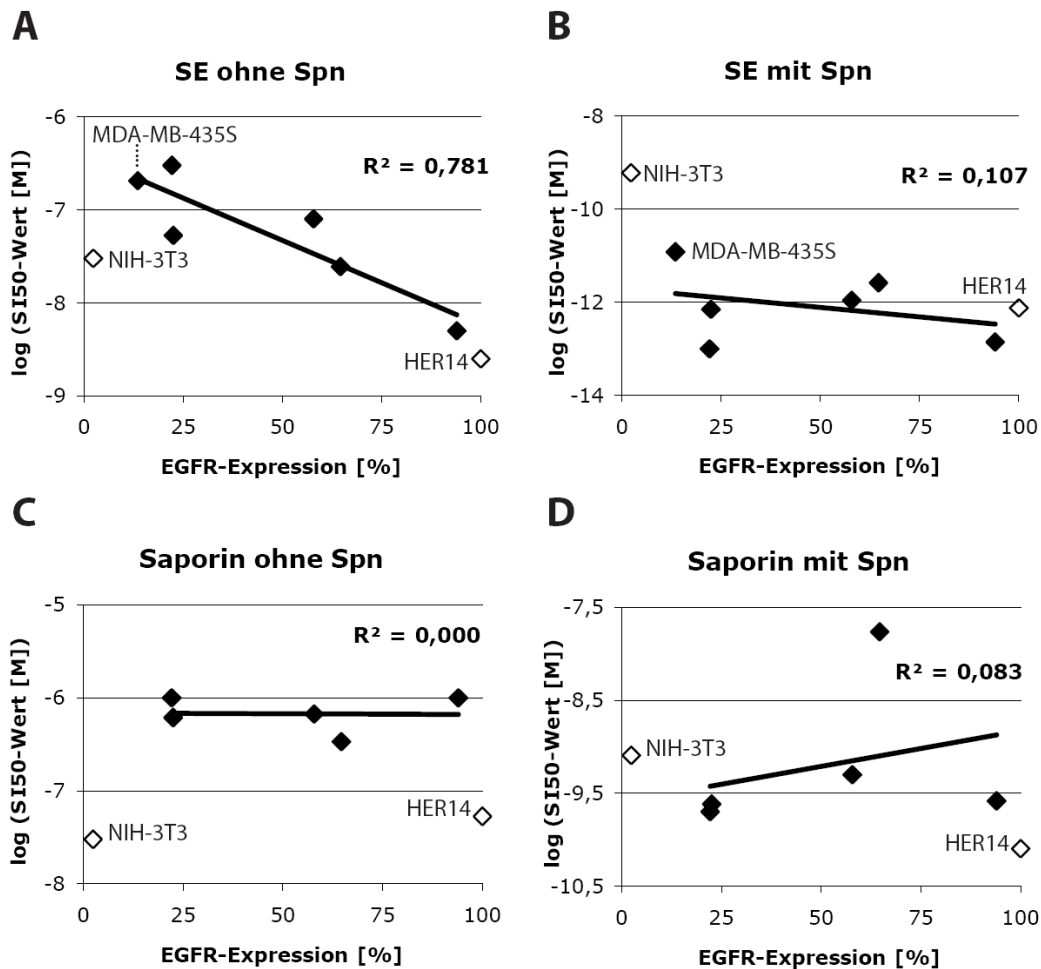


Abbildung 3.8: Korrelation der Cytotoxizität von SE (A), Spn/SE (B), Saporin (C) und Spn/Saporin (D) mit der EGFR-Expression von CaSki-, SiHa-, HeLa-, PHCC1-, PHCC2- und MDA-MB-435S-Zellen. Die Daten für die murinen Kontrollzellen HER14 und NIH-3T3 sind ebenfalls in den Graphiken dargestellt, wurden jedoch nicht bei der Berechnung des Bestimmtheitsmaßes mit einbezogen.

Für die cytotoxische Wirkung von SE ohne Spn besteht eindeutig eine Korrelation mit der EGFR-Expression, mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,781 (Abb. 3.8, A). Somit sind die Zelllinien, die viel EGFR exprimieren, empfindlicher gegenüber SE. Die durch Spn vermittelte gesteigerte Cytotoxizität von SE ist jedoch unabhängig von dem EGFR-Expressionslevel, allerdings nur in dem Maße, dass in Anwesenheit von Spn eine stärkere Expression des EGFR nicht zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber SE führt. Jedoch ist das Vorhandensein des EGFR eine Voraussetzung für die Verstärkung der cytotoxischen Wirkung von SE durch Spn (3.1.1.1, 3.1.2.1, 3.1.3). Die Cytotoxizität von Saporin wird nicht durch die verstärkte Expression des EGFR beeinflusst. Die Aufnahme von Saporin erfolgt unabhängig vom EGFR über einen bisher noch nicht bekannten Rezeptor [36, 37]. Auch bei Saporin ist die Cytotoxizität steigernde Wirkung von Spn unabhängig vom EGFR. Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich die Frage, wie Spn zu einer Verstärkung der Cytotoxizität führt, die zwar abhängig vom Vorhandensein des EGFR ist, aber unabhängig von der Menge.

3.3 Untersuchungen zur Wirkung von Spn

3.3.1 Einfluss von Spn auf die EGFR-Expression

Spn führt zu einer starken Steigerung der cytotoxischen Wirkung von SE. Die molekularen Grundlagen sind jedoch bisher nicht bekannt, aber der EGFR spielt eine wichtige Rolle bei der Wirkung von Spn (3.1). Es konnte nachgewiesen werden, dass keine Korrelation zwischen der Spn-vermittelten Cytotoxizität von SE und der EGFR-Expression besteht (3.2.2). Dennoch wurde untersucht, ob die Inkubation mit Spn die Expression des EGFR beeinflusst. HER14- und HeLa-Zellen wurden für 24 h und 48 h mit Spn inkubiert und anschließend die EGFR-Expression quantifiziert (2.4.6). Zur Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls ohne Spn inkubiert. Die dabei erhaltenen Werte für die EGFR-Expression wurden als maximale Expression betrachtet und die Ergebnisse für die EGFR-Expression nach Spn-Inkubation darauf bezogen (Abb. 3.9).

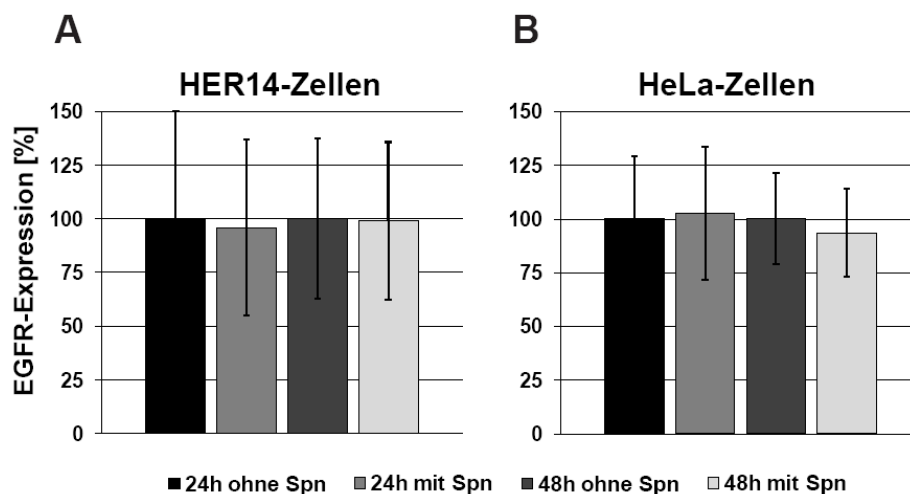


Abbildung 3.9: Relative EGFR-Expression von HER14- (A) und HeLa-Zellen (B) nach einer 24- und 48-stündigen Inkubation mit Spn. Die EGFR-Expression der ohne Spn inkubierten HER14- oder HeLa-Zellen wurde als maximale EGFR-Expression dargestellt. Die Expression des EGFR wurde mit Hilfe eines ELISA (2.4.6) ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus 2 bis 4 (HER14) und 5 bis 6 (HeLa) unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Die Behandlung der HER14- und HeLa-Zellen mit Spn führt weder nach einer 24-stündigen noch nach einer 48-stündigen Inkubation zu einer Veränderung der EGFR-Expression. Spn muss daher über einen anderen Mechanismus die cytotoxische Wirkung von SE steigern können. Die Mechanismen, die der Aufnahme von SE zugrunde liegen, sind bisher nicht untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass SE über den EGF an den EGFR bindet und über rezeptorvermittelte Endocytose von den Zellen aufgenommen wird. In den nächsten Abschnitten wurde daher untersucht, welche Mechanismen

wichtig für die Aufnahme von SE sind und ob es zu Änderungen durch die Behandlung mit Spn kommt.

3.3.2 Analyse der Aufnahme von SE in An- und Abwesenheit von Spn

3.3.2.1 Dynamin

Die Endocytose von SE wurde bisher nicht untersucht. Ein wichtiges Protein beim Endocytoseprozess ist das Dynamin 2. Es handelt sich dabei um eine GTPase, die im Zusammenhang der clathrinabhängigen Endocytose identifiziert wurde. Der Austausch von Lysin durch Alanin in Position 44 führt zu einer dominant funktionsunfähigen Dynamin 2-Mutante, die die Endocytose blockiert. Durch die Transfektion von Zellen mit der mutierten DNA für Dynamin 2 konnte bereits früher die dynaminabhängige Endocytose erfolgreich inhibiert werden [103]. Um zu überprüfen, ob die Aufnahme von SE oder Spn/SE dynaminabhängig erfolgt, wurden HeLa-Zellen stabil mit der DNA für das mutierte Protein transfiziert (2.4.5). Die dabei entstandenen HeLa-Zellen werden als HeLa Δ Dyn bezeichnet.

Die Transkription der integrierten DNA, die für die inaktive Form des Dynamin 2-Proteins codiert, wurde durch die Isolierung der RNA (2.2.3) und einer anschließenden RT-PCR (2.2.4) mit speziellen Primern für die Dynamin-DNA nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 3.10)

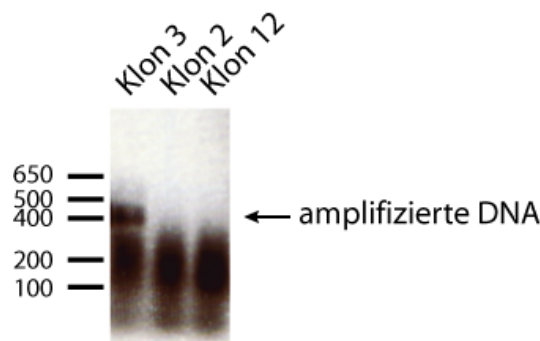


Abbildung 3.10: Nachweis der Transkription der transfizierten DNA durch RT-PCR (2.2.4). Die RT-PCR erfolgte mit Hilfe eines *forward*-Primers, der an den HA-tag bindet und eines *reverse*-Primers, der innerhalb der DNA für das mutierte Dynamin 2-Protein bindet und wurde bei einer Annealingtemperatur von 52 °C durchgeführt. Das Produkt der RT-PCR wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert.

Wie anhand der Abbildung zu erkennen ist, konnte eine Bande in der Höhe von 400 bp detektiert werden. Diese entspricht dem mit Hilfe der Primer amplifizierten DNA-Fragment mit einer Größe von 411 bp. Demnach wird die durch Transfektion in die Zellen eingebrachte DNA transkribiert. Ein Nachweis der Proteinexpression bei den

stabil transfizierten Zellen war nicht erfolgreich. Jedoch konnte das Protein bei transient transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Die Auswirkungen der Transfektion der HeLa-Zellen mit der mutierten DNA auf die Cytotoxizität von SE waren allerdings deutlich zu erkennen (Abb. 3.11). HeLa Δ Dyn-Zellen wurden mit SE und Spn/SE inkubiert und die Ergebnisse mit denen der untransfizierten HeLa-Zellen verglichen.

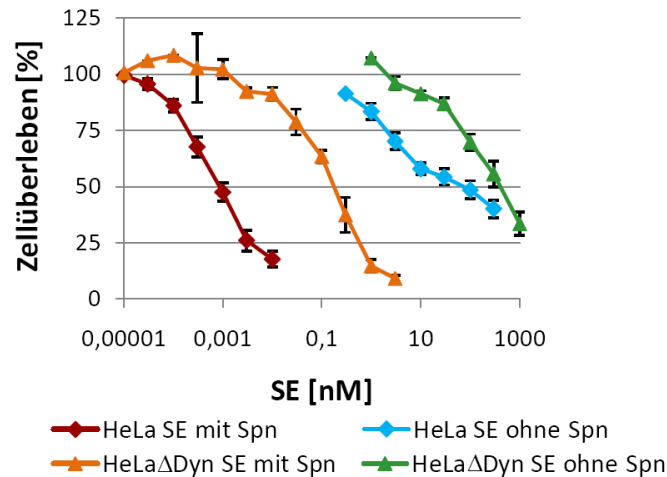


Abbildung 3.11: Cytotoxizität von SE alleine und in Kombination mit Spn auf HeLa- und HeLa Δ Dyn-Zellen. Die Zellen wurden mit den in Tab. 5.12 angegebenen SE-Konzentrationen für 48 h inkubiert. Das Überleben der Zellen wurde durch die Fähigkeit zur Spaltung von Fluoresceindiacetat im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 9 (HeLa, SE o. Spn), 12 (HeLa, SE m. Spn), 4 bis 5 (HeLa Δ Dyn, SE o. Spn) und 2 bis 4 (HeLa Δ Dyn, SE m. Spn) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Die cytotoxische Wirkung von SE und Spn/SE ist auf den HeLa Δ Dyn-Zellen deutlich herabgesetzt (Abb. 3.11). SE erreicht auf untransfizierten HeLa-Zellen den SI_{50} -Wert bei 53 nM und auf den HeLa Δ Dyn-Zellen erst bei 340 nM. Die Spn-vermittelte Cytotoxizität von SE, angegeben als SI_{50} -Wert, wird fast um das 260fache reduziert, von 0,0007 nM (HeLa) auf 0,18 nM (HeLa Δ Dyn). Die Verstärkung der SE-Wirkung durch Spn ist sowohl bei den HeLa-Zellen (Tab. 5.15) als auch bei den HeLa Δ Dyn-Zellen statistisch signifikant (Tab. 5.17). Auch die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien für die Behandlung mit SE und Spn/SE sind signifikant (Tab. 5.18). Die Expression des nicht funktionellen Dynamin-2-Proteins führte zur starken Verringerung der cytotoxischen Wirkung von SE und auch von Spn/SE. SE ist jedoch trotz dieser Blockierung noch in der Lage die Zellen mit verminderter Effektivität abzutöten. Um die verbliebene Restaktivität von SE gegenüber den HeLa Δ Dyn-Zellen näher zu untersuchen, wurde die Cytotoxizität von Saporin auf untransfizierten HeLa-Zellen mit der von SE auf HeLa Δ Dyn-Zellen verglichen (Abb. 3.12).

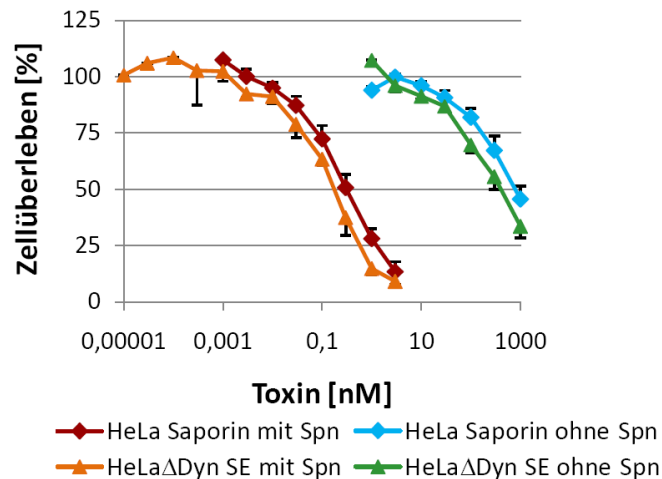


Abbildung 3.12: Vergleich der Cytotoxizität von SE alleine und in Kombination mit Spn auf HeLaΔDyn-Zellen mit der Cytotoxizität von Saporin alleine und in Kombination mit Spn auf HeLaΔDyn-Zellen. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie in der Bildunterschrift zu Abb. 3.11 angegeben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 8 (HeLa, Saporin o. Spn) und 4 bis 9 (HeLa, Saporin m. Spn) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Die noch vorhandene Restaktivität von SE und Spn/SE auf den HeLaΔDyn-Zellen entspricht genau der Cytotoxizität von Saporin und Spn/Saporin auf HeLa-Zellen. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede (Tab. 5.18). Die durch EGF vermittelte spezifische Cytotoxizität von SE konnte durch die Inhibition der dynaminabhängigen Endocytose blockiert werden und die restliche Cytotoxizität wird unspezifisch durch den Saporinanteil von SE vermittelt. Um diese Aussage zu bestätigen, wurden HeLaΔDyn-Zellen mit Saporin inkubiert (Abb. 3.13).

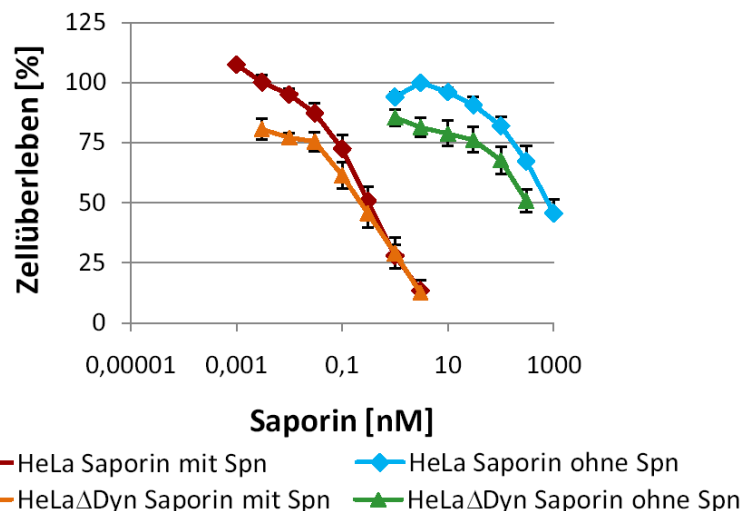


Abbildung 3.13: Cytotoxizität von Saporin alleine und in Kombination mit Spn auf HeLaΔDyn-Zellen und HeLa-Zellen. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.11 beschrieben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 6 (HeLaΔDyn), 8 (HeLa, Saporin o. Spn) und 4 bis 9 (HeLa, Saporin m. Spn) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen vom Mittelwert an.

Die ermittelten Dosis-Wirkungskurven von Saporin auf HeLa Δ Dyn-Zellen und untransfizierten HeLa-Zellen unterscheiden sich nicht nicht signifikant voneinander (Abb. 3.13 und Tab. 5.18). Auch die durch Spn vermittelte Cytotoxizität von Saporin zeigt keine signifikanten Unterschiede auf den beiden Zellen. Somit ist die Wirkung von Saporin unabhängig von Dynamin 2.

Zur Kontrolle wurde die Expression des EGFR auf den HeLa Δ Dyn-Zellen mit der EGFR-Expression auf den untransfizierten HeLa-Zellen verglichen. Dazu wurden Zellysate von den Zellen hergestellt und im Westernblot der EGFR immunologisch detektiert (Abb. 3.14). Als Positiv- und Negativkontrolle wurden die HER14- und NIH-3T3-Zellen verwendet.

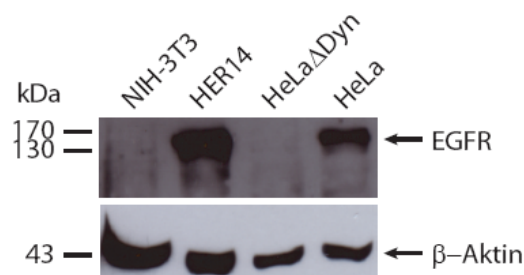


Abbildung 3.14: Nachweis des EGFR im Westernblot. Von den lysierten Zellen wurden 50 μ g Gesamtprotein verwendet und durch SDS-PAGE auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Immundetektion des humanen EGFR erfolgte durch die Antikörper anti-EGFR (Tab. 2.2) und *sheep anti-rat* (Tab. 2.3).

Die HER14-Zellen, die als Positivkontrolle für die EGFR-Expression eingesetzt wurden, geben ein starkes Signal bei etwa 170 kDa (Abb. 3.14), das dem EGFR entspricht. Für die NIH-3T3-Zellen (Negativkontrolle) kann hingegen keine Bande detektiert werden. Auch bei den HeLa-Zellen ist eine deutliche Bande für den EGFR zu sehen, wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie bei den transfizierten HER14-Zellen was die Daten des ELISA (3.7) untermauert. Die HeLa Δ Dyn-Zellen weisen im Gegensatz dazu keine Bande auf, die dem EGFR entsprechen würde. Die Expression des nicht funktionellen Dynamin 2-Proteins führte zu einem Verlust des EGFR.

Auf demselben Blot wurde, nachdem die zuvor gebundenen Antikörper entfernt wurden (2.3.6), die Expression des Transferrinrezeptors nachgewiesen (Abb. 3.15).

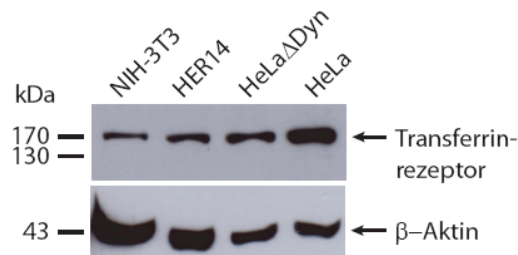


Abbildung 3.15: Nachweis des Transferrinrezeptors im Westernblot. Von den lysierten Zellen wurden 50 μg Gesamtprotein verwendet und durch SDS-PAGE auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Immunodetektion des Transferrinrezeptors erfolgte durch die Antikörper H68.4 (Tab. 2.2) und RAM* (Tab. 2.3).

Bei den untransfizierten HeLa-Zellen ist eine starke Bande zu erkennen, die dem Dimer des Transferrinrezeptors entspricht. Für die HeLa Δ Dyn-Zellen wurde ebenfalls eine Bande für den Transferrinrezeptor detektiert. Jedoch zeigt sich hier im Vergleich zu den HeLa-Zellen eine deutlich schwächere Expression. Die Expression des funktionsunfähigen Dynamin 2-Proteins führte auch zu einer verringerten Expression des Transferrinrezeptors. Auch für die beiden murinen Zelllinien HER14- und NIH-3T3 konnten mit Hilfe des verwendeten Antikörpers Banden für den Transferrinrezeptor detektiert werden.

Die stabile Integration der DNA für das nicht funktionelle Dynamin 2-Protein in die DNA der HeLa-Zellen führte zum Verlust des EGFR (Abb. 3.14). Somit kann keine gesicherte Aussage darüber getroffen werden, ob Dynamin 2 wichtig für die Aufnahme von SE und Spn/SE oder auch Saporin und Spn/Saporin ist. Aus diesem Grund wurde in weiteren Untersuchungen die Notwendigkeit verschiedener wichtiger Mechanismen der Endocytose für die Cytotoxizität von SE untersucht. Zu diesem Zweck wurden spezifische Inhibitoren dieser Mechanismen eingesetzt. Um weiterhin zu untersuchen, ob sich die Aufnahmebedingungen für SE in Gegenwart von Spn verändern, wurden die Auswirkungen der Inhibitoren auch für Spn/SE analysiert.

3.3.2.2 Clathrinvermittelte Endocytose

Die rezeptorvermittelte Endocytose findet fast immer unter Beteiligung von Clathrin (1.4) statt. Dieses bildet dabei eine käfigartige Struktur (*coated pit*) um sich einstülpende Vesikel. Es wird vermutet, dass SE über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen wird, wie auch EGF alleine. Aus diesem Grund wurde Chlorpromazin als spezifischer Inhibitor der clathrinvermittelten Endocytose verwendet, um den Einfluss dieses Aufnahmemechanismus für die SE und Spn/SE vermittelte Cytotoxizität zu bestimmen. Chlorpromazin ist ein kationisches, amphiphiles Reagenz, das die Anzahl an *coated pit* assoziierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche reduziert, was zur Ansammlung von Cla-

thrin und dem Adapterprotein *activating protein 2* in endosomalen Kompartimenten führt [152, 153].

Bevor die Zellen jedoch mit dem Inhibitor inkubiert werden konnten, wurde dessen Eigentoxizität bestimmt. Dazu wurden HER14-Zellen für 30 min, 60 min, 24 h und 48 h mit 10 bis 35 μM Chlorpromazin inkubiert und das Zellüberleben bestimmt (2.4.2). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 3.16).

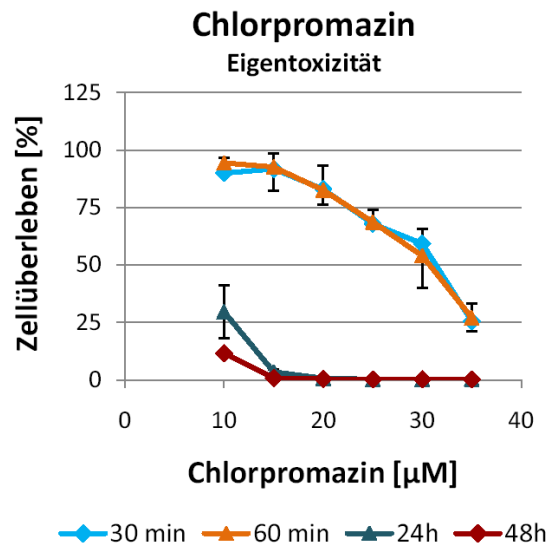


Abbildung 3.16: Eigentoxizität von Chlorpromazin auf HER14-Zellen. Die Zellen wurden 30 min, 60 min, 24 h und 48 h mit 10 bis 35 μM Chlorpromazin inkubiert (Tab. 5.14). Im Anschluss wurde das chlorpromazinhaltige Medium durch frisches Medium ohne Chlorpromazin ersetzt. 48 h nach Beginn der Inkubation mit Chlorpromazin wurde das Überleben der Zellen durch die Fähigkeit zur Spaltung von Fluoresceindiacetat im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus einer Messung in Dreifachbestimmung.

Chlorpromazin weist bei den untersuchten Konzentrationen eine starke Eigentoxizität auf (Abb. 3.16). Schon bei einer 30-minütigen Inkubation bei der höchsten Konzentration von 35 μM ist das relative Zellüberleben nur noch 25 %. Ein identisches Ergebnis ergibt sich für eine 60-minütige Inkubation. Jedoch zeigt Chlorpromazin bis zu einer Konzentration von 20 μM kaum toxische Eigenschaften. Die Behandlung der Zellen für 24 h mit Chlorpromazin führt, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, zu einer massiven Wachstumsinhibition. Schon bei der geringsten Konzentration von 10 μM sinkt das relative Zellüberleben auf 30 % und nach 48 h sogar auf knapp 12 %. Anhand dieser Ergebnisse wurde Chlorpromazin in der geringsten Konzentration von 10 μM für die weiteren Versuche eingesetzt.

Nach der Analyse der Eigentoxizität von Chlorpromazin wurde dessen inhibierende Wirkung in der Durchflusszytometrie (2.4.4) nachgewiesen. Da sich HER14-Zellen in der Durchflusszytometrie nur schlecht handhaben lassen, wurden diese Versuche mit HeLa-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit Chlorpromazin präinkubiert und an-

schließlich mit FITC-markiertem Transferrin (Tf-FITC) inkubiert. Für diese Versuche wurde Transferrin verwendet, da nach der Bindung an den Transferrinrezeptor der gesamte Komplex über clathrinabhängige, rezeptorvermittelte Endocytose von den Zellen aufgenommen wird [92, 93]. Für den Nachweis des internalisierten Tf-FITC in der Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit einer Trypanblau-Quenchlösung behandelt, wodurch die Fluoreszenz der extrazellulären Tf-FITC-Moleküle gequencht wurde (Abb. 3.17).

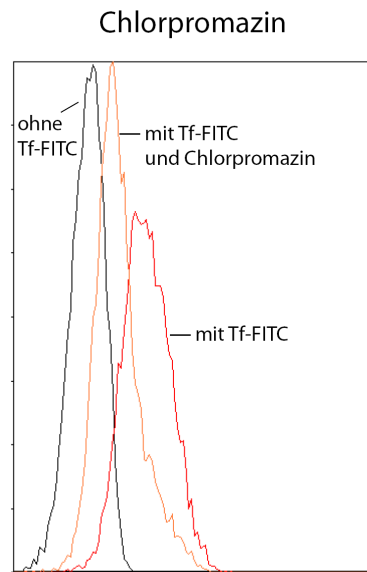


Abbildung 3.17: Aufnahme von Tf-FITC durch HeLa-Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von Chlorpromazin. HeLa-Zellen wurden für 30 min mit $10 \mu\text{M}$ Chlorpromazin präinkubiert und anschließend mit $4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ Tf-FITC für weitere 30 min inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen im Anschluss an die Chlorpromazininkubation mit PBS anstelle von Tf-FITC inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die nur mit Tf-FITC inkubiert wurden. Kurz vor der Messung der Fluoreszenz mit dem Durchflusszytometer wurde die Fluoreszenz der nicht internalisierten Tf-FITC-Moleküle mit einer Trypanblaulösung gequencht.

Die Inkubation der HeLa-Zellen mit Tf-FITC führte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu einer eindeutigen Steigerung der gemessenen Fluoreszenzsignalintensitäten. Dies ist bildlich dargestellt durch eine Verschiebung der Kurve nach rechts (Abb. 3.17). Demnach wurde Tf-FITC von den Zellen internalisiert. Durch die Behandlung der Zellen mit Chlorpromazin vor der Inkubation mit Tf-FITC kommt es zu einer wesentlich geringeren Verschiebung der Kurve. Somit wurde deutlich weniger Tf-FITC von den Zellen aufgenommen. Chlorpromazin konnte die clathrinabhängige Aufnahme von Tf-FITC inhibieren.

Nachdem die Wirksamkeit von Chlorpromazin mit Hilfe von Tf-FITC nachgewiesen wurde, wurden HER14-Zellen mit dem Inhibitor für 60 min präinkubiert. Im Anschluss erfolgte die übliche Inkubation der Zellen mit SE oder Spn/SE (Abb. 3.18).

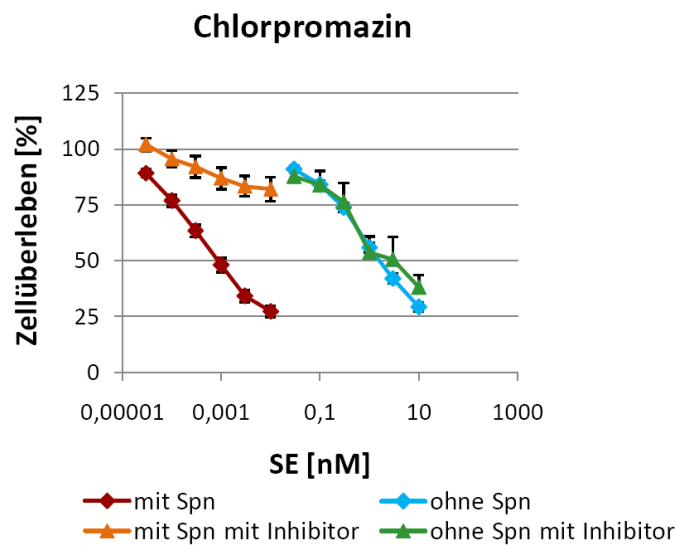


Abbildung 3.18: Cytotoxizität von SE alleine und in Kombination mit Spn auf HER14-Zellen ohne und mit Präinkubation von Chlorpromazin. Die Zellen wurden für 60 min mit $10\ \mu\text{M}$ Chlorpromazin präinkubiert. Die Behandlung mit SE erfolgte wie in Tab. 5.12 angegeben. Die Versuche ohne Chlorpromazin erfolgten wie in Abb. 3.2 beschrieben. Nach 48 h wurde das Überleben der Zellen durch deren Fähigkeit zur Spaltung von Fluoresceindiacetat im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 76 (SE o. Spn), 40 (SE m. Spn), 10 (SE o. Spn, mit Inhibitor) und 8 (SE m. Spn, mit Inhibitor) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Die Cytotoxizität von SE alleine wird durch die Präinkubation mit Chlorpromazin nicht beeinflusst. Dies bedeutet, dass SE unabhängig von der clathrinvermittelten Endocytose von den Zellen aufgenommen wurde. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit Chlorpromazin bei der Kombination mit Spn zu einem starken Verlust der SE-Cytotoxizität (Abb. 3.18), sodass bei den eingesetzten SE-Konzentrationen kein SI_{50} -Wert erreicht wurde. Die Spn-vermittelte Steigerung der Cytotoxizität von SE ist also abhängig von Clathrin.

3.3.2.3 Aktinpolymerisierung

Aktin ist ein ubiquitär exprimiertes eukaryotisches Protein, das neben anderen Funktionen auch an der Endocytose beteiligt sein kann. Die Polymerisierung von Aktin kann durch Latrunculin A inhibiert werden. Zunächst wurde jedoch die Eigentoxizität des Inhibitors untersucht, bevor dessen Auswirkungen auf die Cytotoxizität von SE und Spn/SE analysiert wurden. HER14-Zellen wurden für 40 min, 60 min und 48 h mit 40 bis $65\ \text{nM}$ Latrunculin A inkubiert. Anschließend wurde das Zellüberleben bestimmt (2.4.2) und die Ergebnisse graphisch dargestellt (Abb. 3.19).

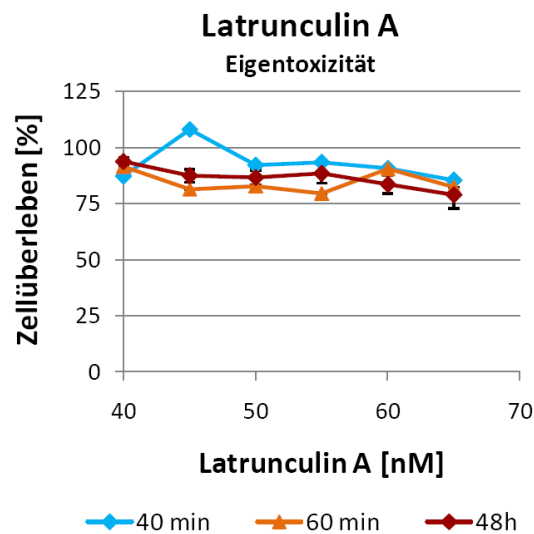


Abbildung 3.19: Eigentoxizität von Latrunculin A auf HER14-Zellen. Die Zellen wurden wie in Abb. 3.16 und Tab. 5.14 beschrieben inkubiert. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus einer (40 und 60 min) und 5 (48 h) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Latrunculin A zeigt auch nach 48 h bei der höchsten Konzentration von 65 nM keine starke cytotoxische Wirkung. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ist das relative Zellüberleben lediglich um 20 % verringert.

Die inhibierende Wirkung von Latrunculin A wurde ebenfalls in der Durchflusszytometrie untersucht. HeLa-Zellen wurden vor der Inkubation mit Tf-FITC für 30 min mit Latrunculin A präinkubiert. Für die Analyse des internalisierten Tf-FITC wurde die Fluoreszenz der nicht internalisierten Moleküle mit Hilfe von Trypanblau gequencht (Abb. 3.20).

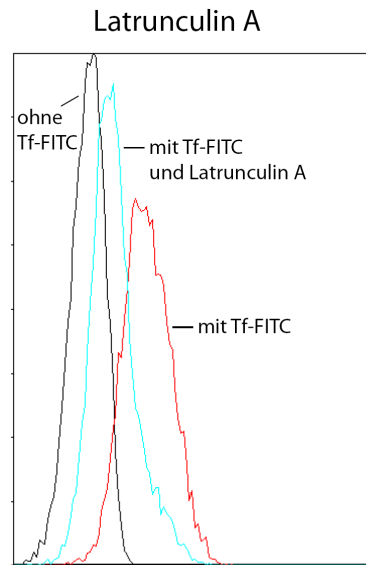


Abbildung 3.20: Aufnahme von Tf-FITC durch HeLa-Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von Latrunculin A. HeLa-Zellen wurden für 30 min mit 60 nM Latrunculin A präinkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.17 beschrieben.

Wie anhand der Abbildung 3.20 zu erkennen ist, haben die Zellen das Tf-FITC internalisiert. Durch die Inkubation der HeLa-Zellen mit Tf-FITC findet eine Zunahme der Signalintensität statt (Verschiebung der Kurve nach rechts). Nach der Präinkubation mit dem Aktin-Polymerisierungsinhibitor Latrunculin A ist diese Verschiebung der Kurve hin zu einer größeren Signalintensität deutlich geringer ausgeprägt, die HeLa-Zellen haben deutlich weniger Tf-FITC internalisiert. Die Inhibition der Aktin-Polymerisierung durch Latrunculin A führte somit zu einer verringerten Aufnahme von Tf-FITC.

Um zu untersuchen, ob Aktin an der Aufnahme von SE beteiligt ist, wurden HER14-Zellen für 60 min mit Latrunculin A präinkubiert, bevor die Inkubation mit SE oder Spn/SE erfolgte (Abb. 3.21).

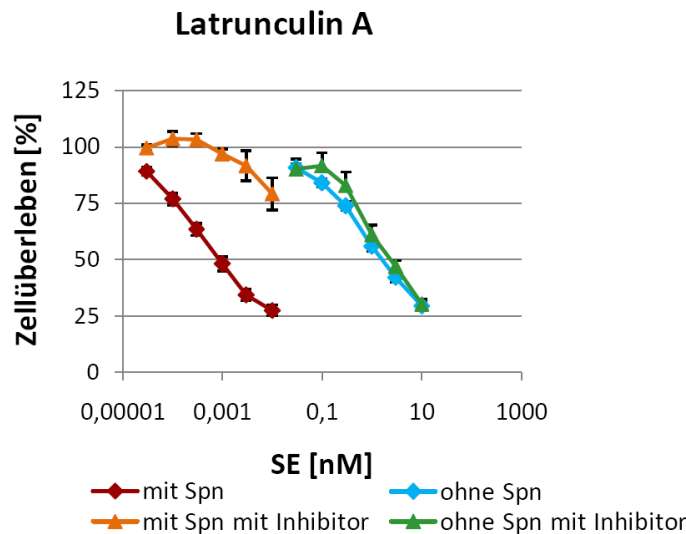


Abbildung 3.21: Cytotoxizität von SE alleine und in Kombination mit Spn auf HER14-Zellen ohne und mit Präinkubation mit Latrunculin A. Die Zellen wurden für 60 min mit 60 nM Latrunculin A präinkubiert. Die Durchführung erfolgte wie in den Bildunterschriften zu Abb. 3.2 und Abb. 3.18 angegeben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 76 (SE o. Spn), 40 (SE m. Spn), 6 (SE o. Spn, mit Inhibitor) und 8 (SE m. Spn, mit Inhibitor) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Die Präinkubation der HER14-Zellen mit Latrunculin A hat keinen inhibitorischen Effekt auf die Cytotoxizität von SE (Abb. 3.21). Die Spn-vermittelte Steigerung der Cytotoxizität von SE wird im Gegensatz dazu deutlich inhibiert. Für die untersuchten Konzentrationen wurde kein SI_{50} -Wert erreicht. Die Aufnahme von SE erfolgt demnach unabhängig von Aktin, für den Verstärkungseffekt durch Spn wird es dagegen benötigt.

3.3.2.4 Ansäuerung der Endosomen

Nach der Abschnürung eines Vesikels von der Zellmembran kommt es zur Ansäuerung der Endosomen. Es handelt sich dabei um einen für viele internalisierte Proteine notwendigen Prozess, um die Bindung zu ihrem Rezeptor aufzuheben. Mit Hilfe von zwei Substanzen, die die Ansäuerung der Endosomen unterbinden, wurde untersucht, ob dieser Prozess für die Aufnahme von SE und die verstärkende Eigenschaft von Spn notwendig ist. Bafilomycin A1 ist ein starker spezifischer Inhibitor der vakuären H^+ -ATPase. Chloroquin hingegen ist ein Molekül, das im sauren Milieu der Endosomen protoniert wird und somit zu einem direkten Anstieg des pH-Wertes führt. Für die Analyse der Eigentoxizität der beiden Substanzen wurden HER14-Zellen für 60 min und 48 h mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin inkubiert und anschließend das Zellüberleben bestimmt (2.4.2). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 3.22).

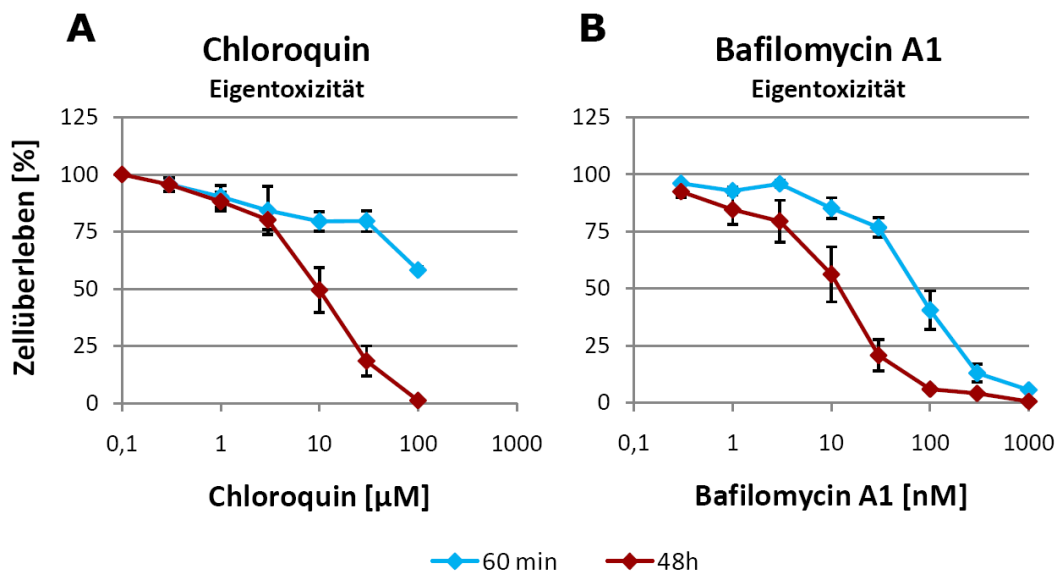


Abbildung 3.22: Eigentoxizität von Chloroquin (A) und Bafilomycin A1 (B) auf HER14-Zellen. Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.16 und Tab. 5.14 dargestellt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 2 bis 5 (Chloroquin) und 2 bis 8 (Bafilomycin A1) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Bei niedrigeren Konzentrationen an Chloroquin ist kein Unterschied zwischen einer 60-minütigen und einer 48-stündigen Inkubation zu erkennen. Ab einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ führt die längere Behandlung mit Chloroquin jedoch zu einer deutlichen Verringerung des relativen Zellüberlebens (80 % und 50 %). Für die weiteren Versuche wurden $3\ \mu\text{M}$ Chloroquin eingesetzt. Bafilomycin A1 weist schon nach einer Inkubationszeit von 60 min eine deutliche Eigentoxizität auf, die durch eine längere Inkubation von 48 h noch weiter gesteigert wird (Abb. 3.22). Bafilomycin wurde in den weiteren Versuchen in einer Konzentration von 3 nM eingesetzt, da bei dieser Konzentration bei einer Inkubation von 60 min keine Verringerung des Zellüberlebens festgestellt wurde.

Die Untersuchung des Einflusses von Bafilomycin A1 und Chloroquin auf die intrazelluläre Wanderung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden HeLa-Zellen 30 min mit 3 nM Bafilomycin A1 oder $3\ \mu\text{M}$ Chloroquin präinkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Tf-FITC und die Messung der internalisierten Tf-FITC-Moleküle nach dem Quenchen der Fluoreszenzsignale der nicht internalisierten Moleküle (Abb. 3.23).

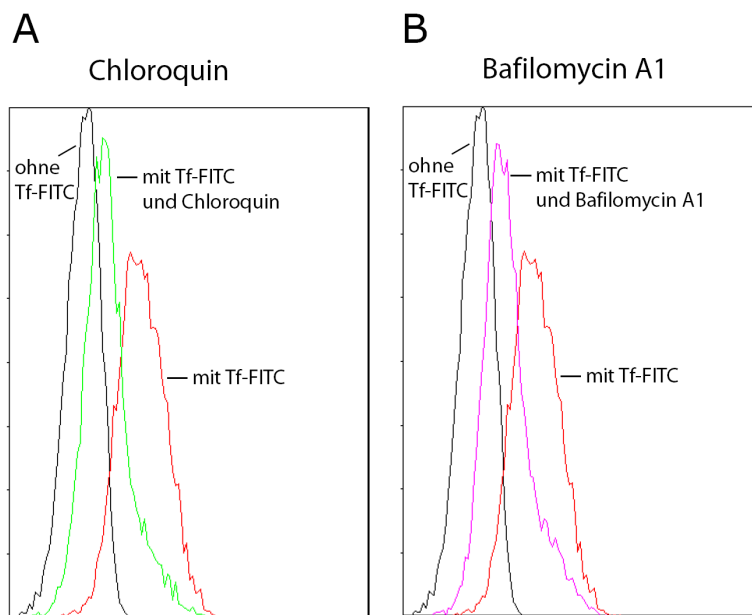


Abbildung 3.23: Aufnahme von Tf-FITC durch HeLa-Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von Chloroquin (A) oder Bafilomycin A1 (B). HeLa-Zellen wurden für 30 min mit $3\mu\text{M}$ Chloroquin oder 3nM Bafilomycin A1 präinkubiert. Die weitere Behandlung der Zellen erfolgt wie in Abb. 3.17 dargestellt.

Bei den mit Tf-FITC behandelten HeLa-Zellen kommt es, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, zu einer Verschiebung der Kurve, die die Verstärkung der Signalintensität aufgrund der Bindung und anschließenden Internalisierung von Tf-FITC darstellt (Abb. 3.23). Sowohl die Behandlungen mit Bafilomycin A1 als auch mit Chloroquin führen zu einem Verlust des starken Anstiegs der Signalintensität. Die HeLa-Zellen haben somit weniger Tf-FITC aufgenommen. Aufgrund der ausbleibenden Ansäuerung wird das Recycling des Transferrinrezeptors gestört, sodass weniger Moleküle auf der Zelloberfläche vorliegen und folglich auch weniger Tf-FITC Moleküle binden können.

Da die Ansäuerung der Endosomen oft ein wichtiger Schritt für die Freisetzung von Liganden ist, wurde untersucht, ob die Inhibition dieses Prozesses Auswirkungen auf die Cytotoxizität von SE und Spn/SE hat. HER14-Zellen wurden vor der Inkubation mit SE oder Spn/SE mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin behandelt und anschließend wurde das Zellüberleben ermittelt (Abb. 3.24).

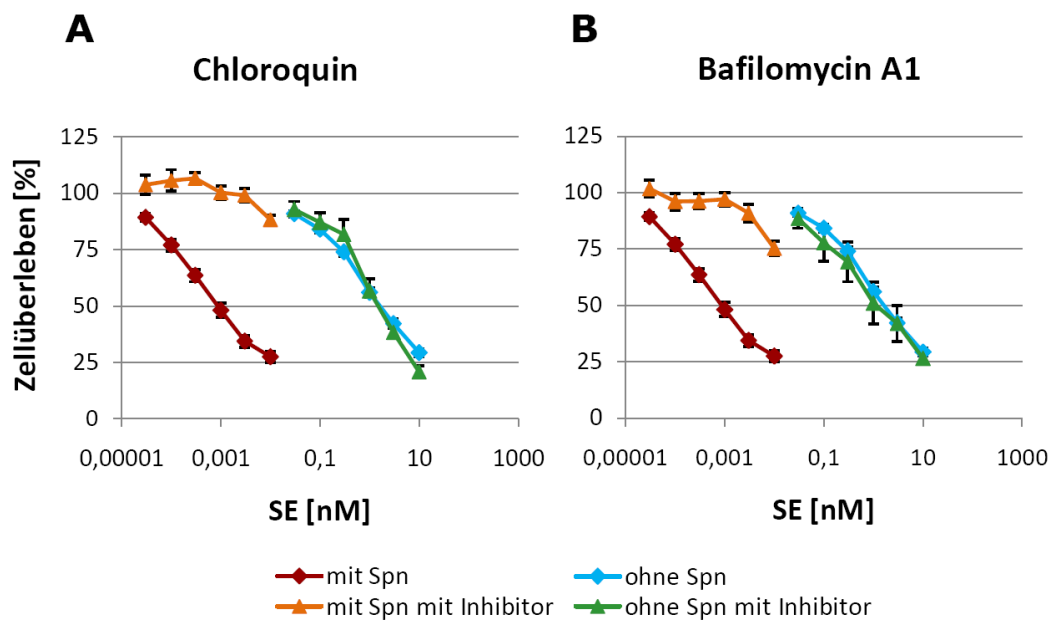


Abbildung 3.24: Cytotoxizität von SE alleine und in Kombination mit Spn auf HER14-Zellen ohne und mit Präinkubation mit Chloroquin (A) oder Bafilomycin A1 (B). Die Zellen wurden für 60 min mit $3\ \mu\text{M}$ Chloroquin oder $3\ \text{nM}$ Bafilomycin A1 präinkubiert. Die Versuche wurden wie in Abb. 3.2 und 3.18 angegeben durchgeführt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 76 (SE o. Spn), 40 (SE m. Spn), 6 (alle Versuche mit Chloroquin), 6 (SE o. Spn, mit Bafilomycin A1) und 4 (SE m. Spn, mit Bafilomycin A1) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Sowohl Chloroquin als auch Bafilomycin A1 haben keinen Einfluss auf die Cytotoxizität von SE alleine. Die Aufnahme von SE erfolgte somit unabhängig von der Ansäuerung der Endosomen. Wie jedoch anhand der Abbildung 3.24 zu erkennen ist, ist dieser Prozess nach der Endocytose notwendig für die von Spn vermittelte Cytotoxizität von SE. Die Behandlung der Zellen mit Bafilomycin A1 oder Chloroquin resultiert hier in einem Verlust der verstärkten toxischen Wirkung von SE, sodass kein SI_{50} -Wert erreicht wird.

Nachdem durch die vorangegangenen Versuche klar geworden ist, dass Spn einen Einfluss auf den intrazellulären Transport ausübt, wurden weitere Untersuchungen zur möglichen Beeinflussung der Freisetzung von Toxinen in das Cytosol durchgeführt.

3.3.3 Einfluss von Spn auf den retrograden Transport

Pseudomonas Exotoxin A ist ein ADP-ribosylierendes Proteintoxin, das nach der Bindung an seinen Rezeptor und der darauf folgenden rezeptorvermittelten Endocytose über das trans-Golgi-Netzwerk bis zum endoplasmatischen Reticulum transportiert wird und von dort in das Cytosol gelangt. Dieser Aufnahmeweg wird als retrograder Transport bezeichnet. Um zu untersuchen, ob Spn möglicherweise einen Einfluss

auf diesen Mechanismus ausübt, wurden HER14-Zellen mit *Pseudomonas* Exotoxin A alleine und in Kombination mit Spn inkubiert (Abb. 3.25).

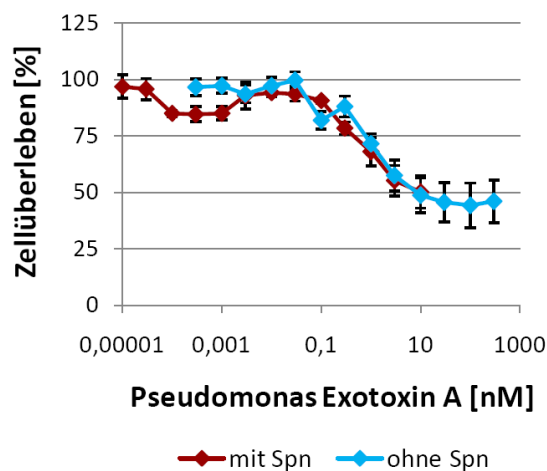


Abbildung 3.25: Cytotoxizität von *Pseudomonas* Exotoxin A alleine und in Kombination mit Spn auf HER14-Zellen. Die Durchführung erfolgte wie in Tab. 5.12 dargestellt. Das Überleben der Zellen wurde durch die Fähigkeit zur Spaltung von Fluoresceindiacetat im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus jeweils 5 unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Wie in der Abbildung (Abb. 3.25) zu sehen ist, zeigt *Pseudomonas* Exotoxin A alleine auf den HER14-Zellen eine starke cytotoxische Wirkung, mit einem SI_{50} -Wert von nur 8,6 nM. Die Vorinkubation der Zellen mit Spn und die anschließende Behandlung mit *Pseudomonas* Exotoxin A hatte jedoch keine Steigerung der Cytotoxizität von *Pseudomonas* Exotoxin A zur Folge. Diese Ergebnisse zeigen, dass Spn keinen Einfluss auf den retrograden Transport ausübt.

3.4 Charakterisierung des durch SE vermittelten Zelltodes

In den bisher dargestellten Untersuchungen konnte die Wirksamkeit des zielgerichteten Toxins SE auf verschiedene Zelllinien (3.1), darunter auch Zervixkarzinomzelllinien, nachgewiesen werden sowie die drastische Steigerung der Cytotoxizität durch Spn auf Zielzellen eindrucksvoll belegt werden (3.1 und 3.3). Zusätzlich wurde nachgewiesen, welche Voraussetzungen für die cytotoxische Wirkung von SE erfüllt sein müssen (3.2.2, 3.3.2). In der Zelle angelangt, inhibiert SE die Proteinbiosynthese und die Zellen sterben. Für den Einsatz von SE oder auf SE basierenden zielgerichteten Toxinen in der Tumorthherapie ist es von großer Bedeutung, den aus der Behandlung mit SE und auch Spn/SE resultierenden Zelltod genauer zu analysieren. Dabei ist zu unterscheiden, ob in den Zellen apoptotische oder nekrotische Prozesse aktiviert werden.

3.4.1 PARP-Spaltung

PARP ist ein DNA-Reparaturenzym, das an DNA-Strangbrüche bindet und dadurch weitere Reparaturenzyme rekrutiert. Während der Apoptose wird PARP durch Proteasen wie die Caspase 3 gespalten. Aus dem 116 kDa großen Protein entstehen dabei ein 89 kDa und ein 24 kDa Fragment. Im Gegensatz dazu kann während der Nekrose ein 50 kDa Fragment nachgewiesen werden. Somit ermöglichen die Spaltprodukte der PARP eine eindeutige Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose. Um zu untersuchen, ob die Inkubation mit SE und Spn/SE zur Spaltung von PARP führt, wurden HeLa-Zellen mit SE und Spn/SE inkubiert und die PARP-Spaltung im Westernblot durch die Analyse von Zelllysaten nachgewiesen (Abb. 3.26). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Staurosporin inkubiert und als Negativkontrolle mit PBS oder DMSO (Lösungsmittel von Staurosporin).

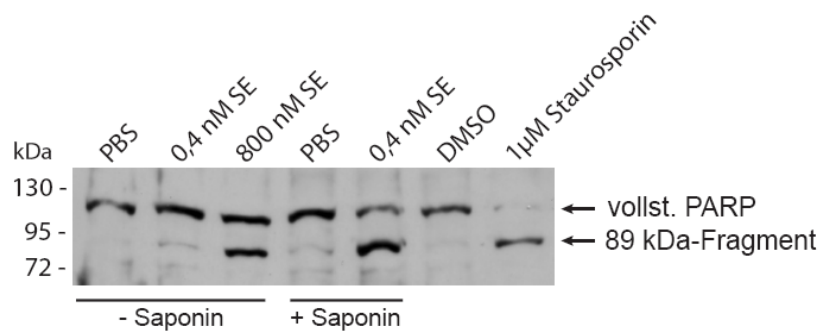


Abbildung 3.26: Nachweis von PARP im Westernblot. HeLa-Zellen wurden für 24 h mit SE und Spn/SE inkubiert und anschließend lysiert. 30 μ g Gesamtprotein wurden für 7 h bei 37 °C inkubiert und auf einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Immunodetektion der PARP erfolgte durch die Antikörper anti-PARP (Tab. 2.2) und RAM* (Tab. 2.3).

In allen Ansätzen ist eine Bande unterhalb von 130 kDa zu erkennen (Abb. 3.26), dabei handelt es sich um das ungespaltene PARP-Protein, das eine Größe von 116 kDa aufweist. In der Spur für die Behandlung der Zellen mit Staurosporin ist diese Bande jedoch sehr schwach. Allerdings ist dort eine starke Bande kurz unterhalb von 95 kDa zu sehen, es handelt sich dabei um das 89-kDa-Fragment, das während der Apoptose gebildet wird. Durch die Behandlung mit Staurosporin kam es demnach zu einer fast vollständigen Spaltung der PARP. Die Inkubation der HeLa-Zellen mit einer hohen SE-Konzentration von 800 nM führt zu einer deutlichen Spaltung von PARP, wie anhand der Bande unterhalb von 95 kDa zu sehen ist. Bei der geringen SE-Konzentration von 0,4 nM ist nur eine sehr schwache Bande für das 89-kDa-Fragment zu sehen. Erst die zusätzliche Inkubation mit Spn führt bei 0,4 nM SE zu einer erhöhten PARP-Spaltung. In den Ansätzen, bei denen die Zellen mit PBS oder DMSO inkubiert wurden, ist keine zusätzliche Bande zu erkennen, die dem 89-kDa-Fragment entspricht.

3.4.2 DNA-Fragmentierung

Während der Apoptose werden Endonucleasen aktiviert, die die DNA zwischen Nucleosomen schneiden, wodurch DNA-Fragmente von etwa 180 bp und einem Vielfachen davon entstehen. Die dabei gebildete DNA-Leiter ist ein Charakteristikum der Apoptose. Um zu untersuchen, ob es zu einer Fragmentierung der DNA durch die Behandlung mit SE und Spn/SE kommt, wurden HER14-Zellen für verschiedene Zeiträume mit aufsteigenden SE-Konzentrationen inkubiert und im Anschluss die Fragmentierung der DNA mit Hilfe eines ELISA nachgewiesen (2.4.7). In der folgenden Abbildung 3.27 sind die Anreicherungsfaktoren für die untersuchten SE-Konzentrationen graphisch dargestellt. Diese geben die Verstärkung des gemessenen Absorptionssignals im Vergleich zu den unbehandelten HER14-Zellen an.

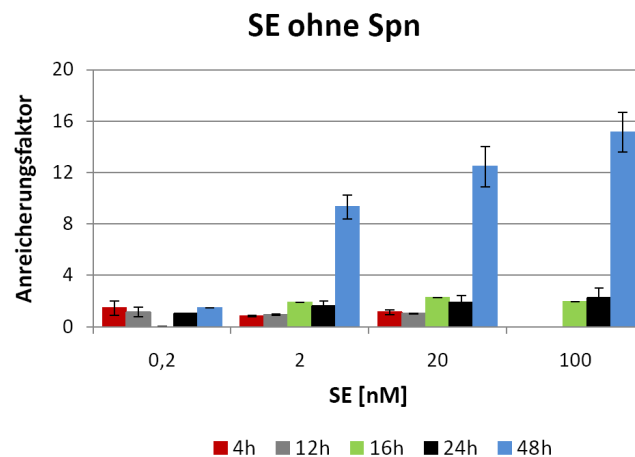


Abbildung 3.27: Nachweis der DNA-Fragmentierung bei HER14-Zellen durch die Behandlung mit SE. HER14-Zellen wurden für 4 h, 12 h, 16 h, 24 h und 48 h mit 0,2 nM, 2 nM, 20 nM und 100 nM SE inkubiert. Der Nachweis der DNA-Fragmentierung erfolgte mit Hilfe eines ELISA (2.4.7), bei dem die histonassoziierte DNA aus Zellysaten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen wird.

Die Inkubation der HER14-Zellen mit SE für 4 h führt auch bei der höchsten untersuchten Konzentration von 20 nM nicht zur Fragmentierung der DNA (Abb. 3.27). Auch bei einer längeren Inkubation für 12 h kann kein Anstieg in der DNA-Fragmentierung detektiert werden. Nach 16 h ist ein sehr geringer Anstieg der Anreicherungsfaktoren zu erkennen der auch durch eine längere Inkubation für 24 h nicht verstärkt wird. Erst nach einer 48-stündigen Inkubation mit SE kommt es zu einer deutlich detektierbaren DNA-Fragmentierung, die abhängig von der eingesetzten SE-Menge ansteigt.

Die Behandlung der HER14-Zellen mit SE resultiert in der Fragmentierung der DNA, diese erfolgt abhängig von der SE-Konzentration und von der Inkubationszeit. Auch in diesen Untersuchungen wurde der Effekt von Spn analysiert. Dazu wurden HER14-Zellen für 24 und 48 h mit Spn/SE inkubiert und die Fragmentierung der DNA

mittels ELISA bestimmt (2.4.7). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung (3.28) dargestellt.

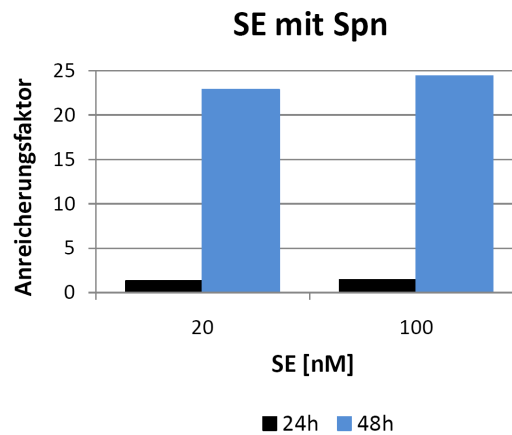


Abbildung 3.28: Nachweis der DNA-Fragmentierung bei HER14-Zellen durch die Behandlung mit Spn/SE. HER14-Zellen wurden für 24 h und 48 h mit 20 nM und 100 nM SE inkubiert. Zuvor erfolgte eine Präinkubation der Zellen mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Spn für 5 min. Der Nachweis der DNA-Fragmentierung erfolgte mit Hilfe eines ELISA (2.4.7), bei dem die histonassoziierte DNA aus Zelllysaten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen wird.

Nach nur 24 h Inkubation mit Spn/SE kann keine DNA-Fragmentierung detektiert werden. Wie schon für SE alleine ergeben sich jedoch nach einer 48-stündigen Inkubation starke Signale für die Fragmentierung der DNA. Die für Spn/SE erhaltenen Anreicherungs-faktoren liegen dabei deutlich oberhalb der Werte, die für SE alleine ermittelt wurden. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die verstärkende Wirkung von Spn auf die Cytotoxizität von SE zurückzuführen.

3.4.3 Untersuchung der Membranintegrität

Ein charakteristischer Prozess während der Nekrose ist der Verlust der Membranintegrität, wodurch der Ionengradient nicht mehr aufrecht erhalten wird und Wasser in die Zellen eindringt. Dies führt letztendlich zum Platzen der Zellen. Durch den Verlust der Membranintegrität können ebenfalls kleine Moleküle von innen nach außen durch die Membran durchtreten. Ein Beispiel dafür ist die Lactatdehydrogenase. Für die Untersuchung, ob die Behandlung mit SE zu einem Verlust der Membranintegrität führt, wurden HER14-Zellen für 24 h, 36 h und 48 h mit SE und Spn/SE inkubiert. Zusätzlich wurden HER14-Zellen nur mit Spn inkubiert, um ausschließen zu können, dass Spn zu einer Permeabilisierung der Zellmembran führt. Die Freisetzung der Lactatdehydrogenase diente als Nachweis der Auswirkungen auf die Membranintegrität (2.4.8). Als Positivkontrolle dienten ebenfalls mit SE, Spn/SE und Spn behandelte Zellen, die zum Versuchsende lysiert wurden. Die gemessenen Werte für die nicht lysierten, aber

mit SE, Spn/SE und Spn behandelten Zellen, wurden auf die durch Lyse der Zellen maximal erreichbare Lactatdehydrogenasefreisetzung bezogen (Tab. 3.10).

Tabelle 3.10: Relative Freisetzung von Lactatdehydrogenase nach der Behandlung von HER14-Zellen mit SE, Spn/SE und 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Spn. Die erhaltenen Werte sind Mittelwerte aus 1 bis 8 unabhängigen Messungen in Doppelbestimmungen. Die durch \pm angeführten Fehler sind die Standardabweichungen vom Mittelwert.

| Art der Behandlung | Dauer der Behandlung | | |
|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | 24 h | 36 h | 48 h |
| PBS | 2,90 % \pm 1,18 % | 3,30 % \pm 0,73 % | 2,22 % \pm 0,65 % |
| SE ohne Spn | 8,14 % \pm 0,43 % | 2,33 % \pm 2,33 % | 1,25 % \pm 0,64 % |
| SE mit Spn | 0,24 % \pm 0,24 % | 1,88 % \pm 1,32 % | 3,27 % \pm 2,78 % |
| Spn | 0 % \pm 0 % | 5,17 % \pm 3,57 % | 0,24 % \pm 0,24 % |

Wie anhand der Tabelle (Tab. 3.10) zu sehen ist, führt die Behandlung der HER14-Zellen auch für 48 h mit SE nicht zu einem Verlust der Membranintegrität, es finden demnach keine nekrotischen Prozesse statt. Auch die Behandlung der Zellen mit Spn führt nicht zur verstärkten Freisetzung von Lactatdehydrogenase. In der eingesetzten Konzentration, die ebenfalls für die Kombination mit SE verwendet wird, kommt es nicht zur Spn-bedingten Porenbildung. Die Freisetzung der Lactatdehydrogenase durch die Kombinationsbehandlung der HER14-Zellen mit SE und Spn liegt im Bereich der unbehandelten Zellen (PBS). Somit führen weder SE oder Spn alleine, noch die Kombination Spn/SE zu einem Verlust der Membranintegrität.

3.4.4 Analyse der Wirkung von SE auf Zellen mit veränderten Apoptoseeigenschaften

Wie anhand der vorherigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, löst die Behandlung von Zellen mit SE oder Spn/SE apoptotische Prozesse in den Zellen aus. Um diese Prozesse genauer zu charakterisieren, standen Zelllinien zur Verfügung, die veränderte Apoptoseeigenschaften aufweisen.

3.4.4.1 MCF-7-Zellen

MCF-7-Zellen exprimieren keine Caspase 3, wodurch die Zellen resistent gegenüber diversen Apoptosestimuli sind. Bei der von Professor Daniel zur Verfügung gestellten Zelllinie MCF-7/C3 wird die Caspase 3 wieder reexprimiert, wodurch die Zellen wieder sensitiv gegenüber diesen Stimuli werden [113]. Sowohl MCF-7-Zellen als auch MCF-7/C3-Zellen wurden für 48 h mit SE und Spn/SE inkubiert. Im Anschluss wurde das

Überleben der Zellen bestimmt (2.4.2) und die Auswirkungen der Behandlung in einer Dosis-Wirkungskurve dargestellt (Abb. 3.29).

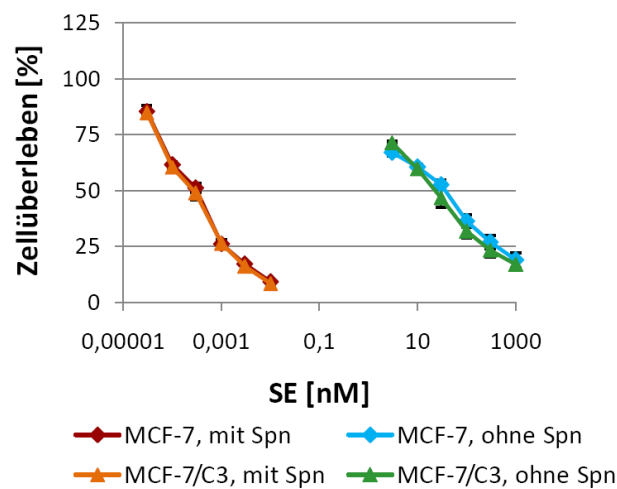


Abbildung 3.29: Cytotoxizität des zielgerichteten Toxins SE alleine und in Kombination mit Spn auf Caspase 3-defizienten MCF-7-Zellen (MCF-7) und Caspase 3-exprimierenden MCF-7-Zellen (MCF-7/C3). Die Inkubation mit SE und Spn/SE erfolgte wie in Tab. 5.13 angegeben. Das Überleben der Zellen wurde durch die Fähigkeit zur Spaltung von Fluoresceindiacetat im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen vom Mittelwert an. Aufgrund der sehr geringen Fehler sind die Fehlerbalken kaum sichtbar.

SE weist eine eindeutig dosisabhängige Cytotoxizität auf den MCF-7-Zellen auf. Die Wirkung von SE wird durch die Kombination mit Spn deutlich gesteigert. Die Reexpression der Caspase 3 in den MCF-7/C3-Zellen führt zu keiner signifikanten Änderung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber SE und Spn/SE (Tab. 5.19). Dieses Ergebnis deutet auf eine Caspase 3-unabhängige Wirkung von SE hin. Die Verstärkung der Cytotoxizität von SE erfolgt sowohl bei den MCF-7- als auch bei den MCF-7/C3-Zellen signifikant.

3.4.4.2 HCT116-Zellen

HCT116 $bax^{-/-}$ und HCT116 $bax^{-/-}/bak^{-/-}$ sind weitere Zelllinien, bei denen die Apoptoseeigenschaften verändert sind. Bei den HCT116 $bax^{-/-}$ Zellen ist das proapoptotische Protein Bax ausgeschaltet und bei den HCT116 $bax^{-/-}/bak^{-/-}$ Zellen zusätzlich zu Bax noch das ebenfalls proapoptotische Protein Bak. Die Zelllinien wurden mit SE und Spn/SE inkubiert und das Zellüberleben nach 48 h bestimmt (Abb. 3.30). Unveränderte HCT116-Zellen wurden als Kontrollzellen eingesetzt, um die Auswirkungen des Verlustes von Bax und Bak zu untersuchen.

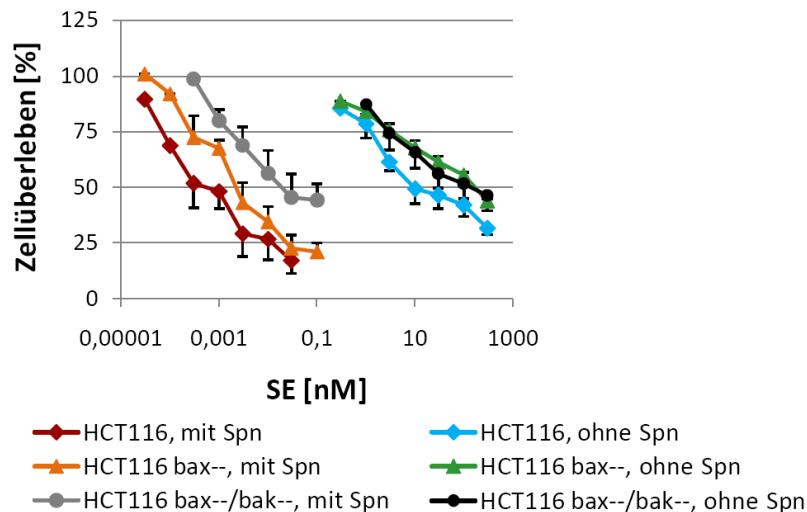


Abbildung 3.30: Cytotoxizität von SE alleine und in Kombination mit Spn auf HCT116-, HCT116 bax^{-/-}- und HCT116 bax^{-/-}/bak^{-/-}-Zellen. Die Durchführung erfolgte wie in der Bildunterschrift zu Abb. 3.29 angegeben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 5 bis 6 (HCT116), 6 bis 7 (HCT116 bax^{-/-}) und 3 (HCT116 bax^{-/-}/bak^{-/-}) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Die Behandlung der unveränderten HCT116-Zellen mit SE führt zu einer starken cytotoxischen Wirkung, mit einem SI₅₀-Wert von 9 nM (Abb. 3.30). Diese Wirkung kann durch die Kombination von SE mit Spn signifikant um das 18 000fache gesteigert werden, mit einem SI₅₀-Wert von 0,0005 nM (Tab. 5.20). Die Wirkung von SE auf den HCT116 bax^{-/-}-Zellen ist im Vergleich zu den HCT116-Zellen mit einem SI₅₀-Wert von 166 nM signifikant verringert. Auf den HCT116 bax^{-/-}/bak^{-/-}-Zellen ist die Wirkung auch verringert (SI₅₀-Wert 136 nM), jedoch ist der Unterschied nicht signifikant. Die SI₅₀-Werte für die HCT116 bax^{-/-}- und die HCT116 bax^{-/-}/bak^{-/-}-Zellen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Cytotoxizität von Spn/SE auf den HCT116 bax^{-/-}- und den HCT116 bax^{-/-}/bak^{-/-}-Zellen unterscheidet sich sowohl untereinander als auch von den HCT116-Zellen signifikant (Tab. 5.20). Für die HCT116 bax^{-/-}-Zellen ergibt sich ein SI₅₀-Wert von 0,002 nM und für die HCT116 bax^{-/-}/bak^{-/-}-Zellen 0,02 nM.

3.5 Analyse der verstärkenden Wirkung einzelner Saponine

Bei dem für die bisherigen Untersuchungen zur Verstärkung der Cytotoxizität von SE eingesetzten Spn handelt es sich um ein Gemisch verschiedener Saponine (*Saponinum album*, 2.1.3). Für einen Einsatz von Saponinen in der Tumorthherapie als verstärkender Faktor von zielgerichteten Toxinen ist es von großer Bedeutung einzelne definierte Saponine einzusetzen. Unserem Kooperationspartner, Herrn Dr. Alexander Weng (Institut

für Pharmazie, FU Berlin), ist es gelungen, aus dem Saponingemisch Spn, ein einzelnes Saponin mittels HPLC zu isolieren [154]. Dieses Saponin wird im Folgenden als Saponin 1641 bezeichnet. Spn ist ein kommerzielles Saponingemisch, das verschiedene Saponine aus der Pflanze *Gypsophila paniculata* (3.5.1) enthält. Aus diesem Grund wurden, ebenfalls von Herrn Dr. Weng, Saponine direkt aus *Gypsophila paniculata* isoliert (3.5.2).

3.5.1 Untersuchung der verstärkenden Wirkung des isolierten Saponins 1641 aus *Saponinum album*

Bevor die Wirkung des Saponins 1641 auf die Cytotoxizität von SE analysiert werden konnte, wurde dessen Eigentoxizität bestimmt. Dazu wurden HER14-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Saponins 1641 inkubiert und das Zellüberleben in einer Dosis-Wirkungskurve dargestellt (Abb. 3.31). Die ermittelte Eigentoxizität von Saponin 1641 wurde zusätzlich noch mit der Eigentoxizität von Spn verglichen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

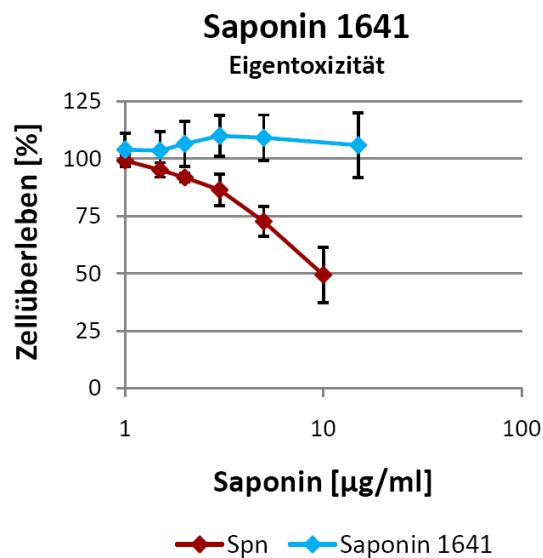


Abbildung 3.31: Eigentoxizität des Saponins 1641 im Vergleich zu dem Saponingemisch Spn. Jeweils 2000 HER14-Zellen wurden für 48 h mit 1 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml (Spn) oder 15 µg/ml (Saponin 1641) inkubiert. Das Überleben der Zellen wurde durch die Fähigkeit zur Spaltung von Fluoresceindiacetat im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus jeweils 4 unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

Saponin 1641 zeigt im Vergleich zum Saponingemisch Spn keine Eigentoxizität (Abb. 3.31). Schon bei einer Konzentration von 10 µg/ml sinkt bei Spn das relative Zellüberleben auf 50%. Bei Saponin 1641 hingegen ist sogar bei einer Konzentration von

15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kein verringertes relatives Zellüberleben festzustellen. Somit kann Saponin 1641 auch in höheren Konzentrationen für die Kombination mit SE eingesetzt werden.

Um zu untersuchen, ob Saponin 1641 ebenfalls wie Spn zu einer Verstärkung der Cytotoxizität von SE führt und in welchem Maße dies erfolgt, wurden HER14-Zellen mit drei verschiedenen Saponin 1641-Konzentrationen präinkubiert und anschließend erfolgte die Inkubation mit SE. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der folgenden Abbildung 3.32 dargestellt.

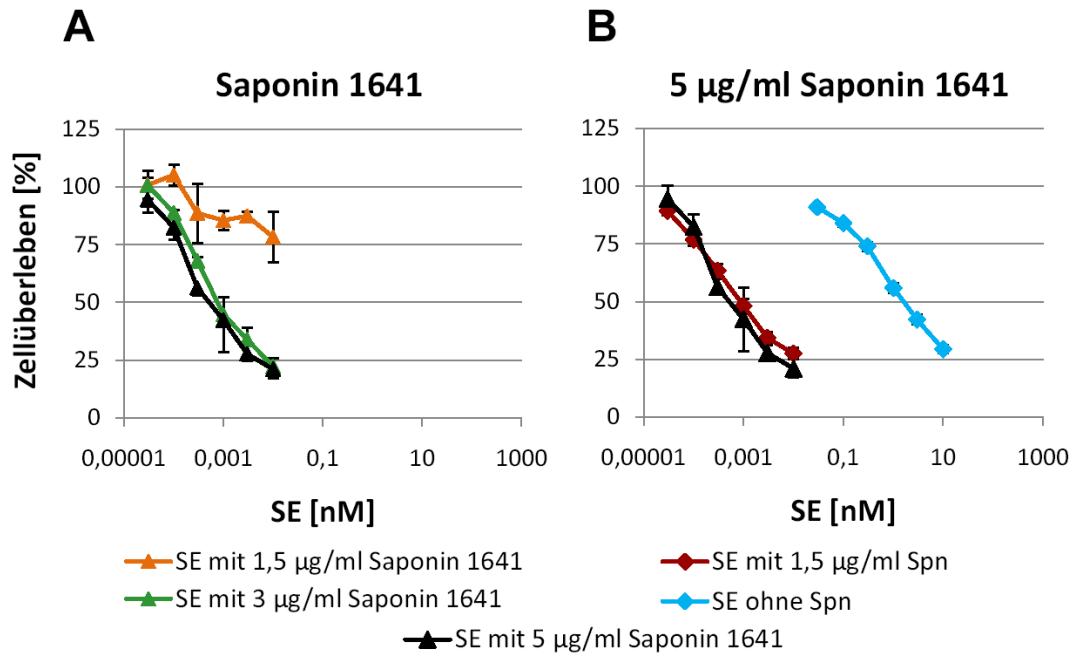


Abbildung 3.32: Verstärkende Wirkung von Saponin 1641 auf die Cytotoxizität von SE. HER14-Zellen wurden 5 min mit 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Saponin 1641 (**A**) präinkubiert. (**B**), Vergleich der verstärkenden Wirkung von Saponin 1641 mit Spn. die Inkubation mit SE erfolgte wie in Abb. 3.2 und Tab. 5.13 angegeben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 (alle Versuche mit Saponin 1641), 76 (HER14, SE o. Spn) und 40 (HER14, SE m. Spn) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

Bei der niedrigsten Konzentration von 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ führt Saponin 1641 zu keiner oder nur einer sehr geringen Verstärkung der Cytotoxizität von SE. Die Erhöhung der Konzentration auf 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ führt zu einer enormen Steigerung der Cytotoxizität von SE. Dies kann durch eine weitere Erhöhung der Saponin 1641-Menge auf 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ jedoch nur geringfügig gesteigert werden. Somit wird von dem isolierten Saponin die doppelte Menge benötigt, die von dem Gemisch notwendig ist, um eine vergleichbare Verstärkung der SE-Cytotoxizität zu erreichen. Gleichzeitig kommt es zu einer Verringerung der Eigentoxizität des Saponins (Abb. 3.31), wodurch der Einsatz einer höheren Konzentration an Saponin 1641 möglich ist und eventuelle Nebenwirkungen vermieden werden können.

3.5.2 Untersuchung der verstärkenden Wirkung der isolierten Saponine aus *Gypsophila paniculata*

Das aus dem Saponingemisch Spn isolierte Saponin 1641 weist eine mit Spn vergleichbare cytotoxizitätssteigernde Wirkung auf und ist gleichzeitig deutlich weniger toxisch als Spn. Jedoch handelt es sich bei Spn um ein käuflich erworbenes Produkt, dessen Produktion eingestellt wurde, wodurch es nicht unbegrenzt vorrätig ist. Für weitere Untersuchungen und auch einen möglichen Einsatz in der Tumorthherapie wird jedoch ein unbegrenzt zur Verfügung stehender Rohstoff benötigt. Daher wurden von unserem Kooperationspartner direkt aus dem Pflanzenextrakt von *Gypsophila paniculata*, aus dem auch das Saponingemisch Spn stammt, drei Saponine isoliert [155]. Diese werden als Gyp 1-10, Gyp 2-10 und Gyp 3-10 bezeichnet. Zunächst wurde deren Eigentoxizität bestimmt. Dazu wurden HER14-Zellen mit drei Saponinkonzentrationen für 48 h inkubiert und anschließend das Zellüberleben gemessen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung für alle drei Saponine dargestellt (Abb. 3.33).

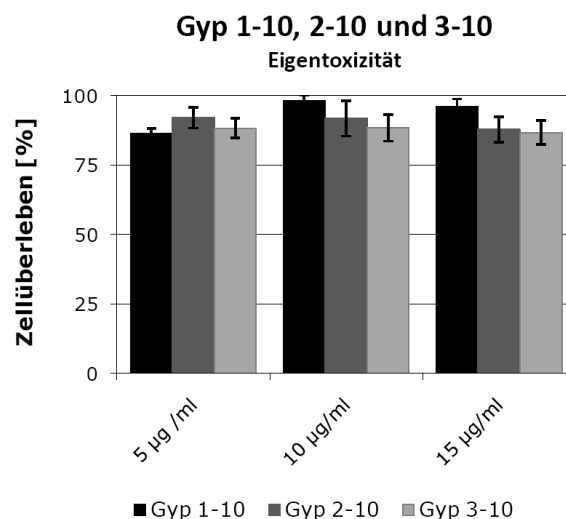


Abbildung 3.33: Eigentoxizität der aus *Gypsophila paniculata* isolierten Saponine Gyp 1-10, Gyp 2-10 und Gyp 3-10. HER14-Zellen (2000) wurden mit 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml Saponin inkubiert. Nach 48 h wurde das Überleben der Zellen durch deren Fähigkeit zur Spaltung von Fluoresceindiacetat im Vergleich zu unbehandelten Zellen ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 bis 9 unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen vom Mittelwert an.

Alle drei Saponine zeigen auch bei einer hohen Konzentration von 15 µg/ml nur eine geringe Eigentoxizität und können auch in höheren Konzentrationen für die Versuche eingesetzt werden.

HER14-Zellen wurden mit Gyp 1-10, Gyp 2-10 oder Gyp 3-10 präinkubiert, um deren Fähigkeiten zur Verstärkung der cytotoxischen Wirkung von SE zu untersuchen (Abb. 3.34).

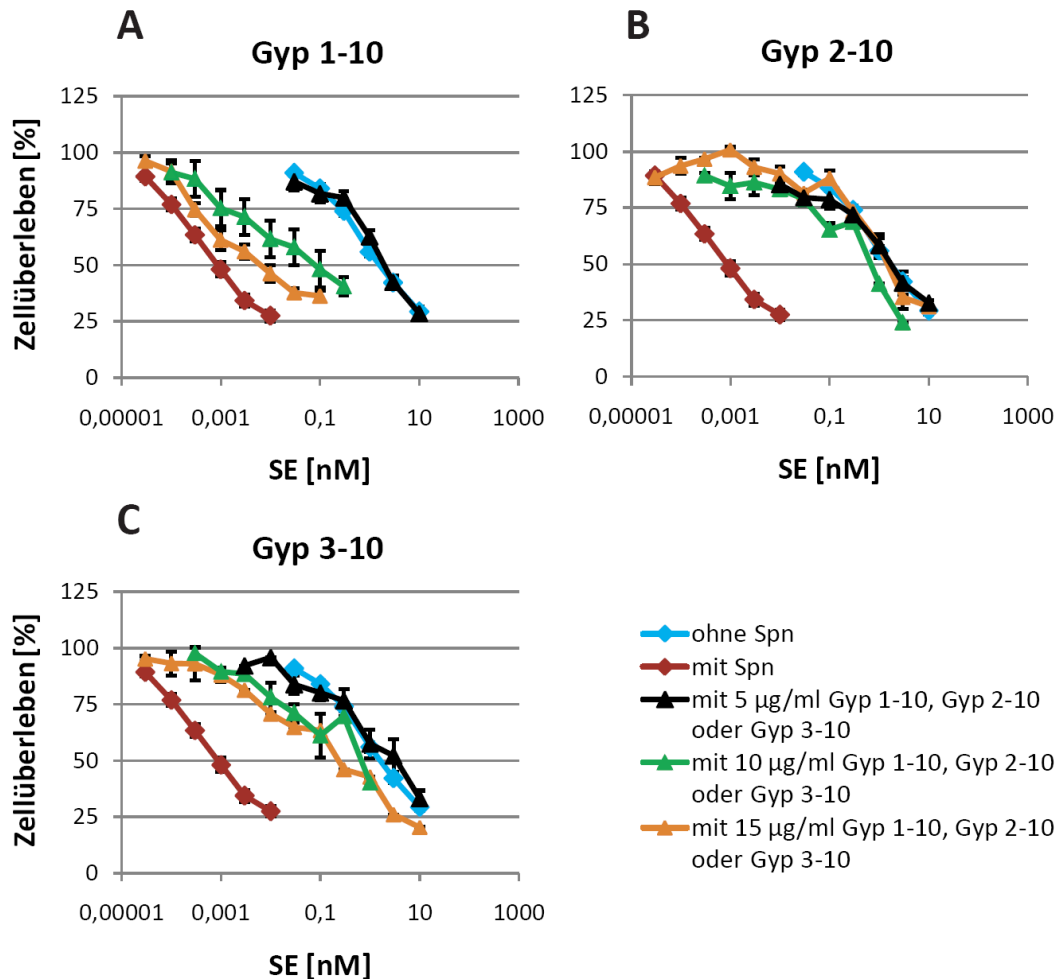


Abbildung 3.34: Verstärkende Wirkung der Saponine Gyp 1-10 (A), Gyp 2-10 (B) und Gyp 3-10 (C) auf die Cytotoxizität von SE. HER14-Zellen (2000) wurden mit 5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml Gyp 1-10, Gyp 2-10 oder Gyp 3-10 präinkubiert. Die Behandlung mit SE erfolgte wie in Abb. 3.2 beschrieben. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 2 bis 8 (Gyp 1-10), 2 bis 4 (Gyp 2-10 und Gyp 3-10) 76 (HER14, SE o. Spn) und 40 (HER14, SE m. Spn) unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

In der niedrigsten Konzentration (5 µg/ml) hat Gyp 1-10 keine verstärkende Wirkung auf die Cytotoxizität von SE (Abb. 3.34). Die Verdopplung der Konzentration von Gyp 1-10 führt zu einer Steigerung der Cytotoxizität von SE um das 21fache, der SI_{50} -Wert verringert sich von 1,9 auf 0,09 nM. Bei der höchsten Konzentration von Gyp 1-10 (15 µg/ml Gyp 1-10), ergibt sich ein SI_{50} -Wert von 0,006 nM. Dies entspricht einer erneuten Steigerung um das 15fache. Insgesamt konnte somit die Cytotoxizität von SE um das 416fache gesteigert werden. Die Inkubation der Zellen mit Gyp 2-10 führt auch bei der höchsten Konzentration zu keiner Steigerung der Cytotoxizität von SE. Auch

durch die Behandlung mit Gyp 3-10 kommt es zu keiner großen Steigerung der toxischen Wirkung von SE. Die höchste Gyp 3-10 Konzentration führt lediglich zu einer 10fachen Steigerung der SE-Cytotoxizität. Es war somit möglich aus dem Pflanzenextrakt von *Gypsophila paniculata* mit dem Saponin Gyp 1-10 ein wirksames Saponin zu isolieren, das zu einer 416fachen Steigerung der Wirkung von SE führt.

Diskussion

4.1 Cytotoxische Wirkung des zielgerichteten Toxins SE und von Saporin auf Zervixkarzinomzelllinien

Die Entwicklung neuartiger Tumorthapeutika, die einen zielgerichteten Transport toxischer Substanzen zu oder auch in die Tumorzellen ermöglichen, führte in den letzten Jahren zur Entwicklung einer Vielzahl solcher zielgerichteter Toxine. Jedoch ist es notwendig die Wirksamkeit solcher neuer Tumorthapeutika zunächst sowohl durch *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Untersuchungen nachzuweisen, bevor ein Einsatz in der Klinik möglich ist. Für das zielgerichtete Toxin SE, das aus dem pflanzlichen Proteintoxin Saporin und dem EGFR Liganden EGF aufgebaut ist, konnte bereits erfolgreich in *In-vitro*-Untersuchungen die enzymatische Aktivität des Saporins nachgewiesen werden. Die Daten wurden jedoch bisher nicht veröffentlicht, basieren aber auf einem von Heisler *et al.* [34] entwickelten colorimetrischen Festphasenassay und einer daraus weiterentwickelten HPLC-Messmethode*. Auch die erfolgreiche Bindung von SE an Zielzellen, die den humanen EGFR exprimieren, konnte gezeigt werden[†]. Eine starke wachstumsinhibierende Wirkung von SE auf Zielzellen wurde für HER14-Zellen nachgewiesen [156]. Dabei handelt es sich um murine Fibroblasten, die den humanen EGFR stabil überexprimieren. Zusätzlich konnten für ein ähnliches zielgerichtetes Toxin bereits viel versprechende Ergebnisse in einem Mausmodell erzielt werden [157]. Obwohl SE auf den HER14-Zellen eine starke cytotoxische Wirkung zeigt und die Zellen somit für den Nachweis der Wirkung von zielgerichteten Toxinen, die durch den EGFR an Zellen binden, geeignet sind, handelt es sich dabei um ein artifizielles System. Es ist daher notwendig, die Wirkung von SE an weiteren Zellmodellen zu analysieren, die den humanen Tumoren ähnlicher sind.

Zervixkarzinome stellen die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen dar [46]. Zum jetzigen Zeitpunkt besteht die Behandlung solcher Karzinome aus der chirurgi-

* *submitted*, Urban *et al.*

[†]unveröffentlicht, Bachran *et al.*

schen Entfernung, der Bestrahlung sowie der Chemotherapie [158]. Allerdings ist eine vollständige Entfernung des Tumorgewebes nicht immer möglich, sodass sich der Tumor anschließend wieder bildet. Weiterhin ist nicht in allen Fällen die chirurgische Entfernung oder die Bestrahlung des Tumors möglich. Der Einsatz von Chemotherapeutika erfolgt meist bei der Behandlung von Metastasen, führt jedoch oft zu starken Nebenwirkungen und es kommt häufig zur Entwicklung von Resistenzen gegenüber den verabreichten Medikamenten [159, 160]. Der Einsatz zielgerichteter Toxine für die Therapie von Zervixkarzinomen erhöht die Spezifität der Medikamente für Tumorzellen und ermöglicht dadurch eine deutliche Verringerung der durch Chemotherapeutika verursachten Nebenwirkungen. In der Literatur werden verschiedene zielgerichtete Ansätze zur Behandlung von Zervixkarzinomen diskutiert. Schon 1991 wurde von Roffler *et al.* ein Fusionsprotein aus *Pseudomonas* Exotoxin A und einem murinen Antikörperfragment gegen ein Proteinepitop auf der Zelloberfläche von Zervixkarzinomen im Mausmodell untersucht [161]. Die Behandlung führte zwar zu einer Inhibition des Zellwachstums, wurde aber von schweren Nebenwirkungen begleitet. Durch den Austausch von *Pseudomonas* Exotoxin A gegen Doxorubicin, einem Zytostatikum, wurde das Tumorstadium ebenfalls stark inhibiert und zusätzlich konnten die Nebenwirkungen deutlich verringert werden [162]. Im Laufe der Jahre wurden weitere zielgerichtete Toxine entwickelt, die gegen Zervixkarzinome gerichtet sind und als toxische Substanzen eine verkürzte Form des *Pseudomonas* Exotoxin A [163] oder auch ein radioaktives Isotop [164] enthalten.

Bei etwa 90 % der Zervixkarzinome ist der EGFR stark überexprimiert. Somit stellen gegen den EGFR gerichtete Tumortheraeutika eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für Zervixkarzinome dar. Bereits im Jahr 2004 wurde in den USA und der Schweiz der humanisierte monoklonale Antikörper Cetuximab für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen zugelassen, die gegenüber der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Irinotecan resistent sind. Cetuximab bindet an den EGFR und blockiert dadurch die natürliche Bindungsstelle für dessen Liganden EGF. Nach der Bindung wird Cetuximab zusammen mit dem EGFR internalisiert, ohne die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors zu aktivieren. Dieser Vorgang führt letztendlich zur Verringerung der Anzahl von EGFR-Molekülen auf der Zelloberfläche [165]. Cetuximab inhibiert bei zahlreichen Tumorerkrankungen die Proliferation der Tumorzellen [166, 167, 168, 169] und in präklinischen Studien wiesen Zervixkarzinome eine hohe Sensitivität für Cetuximab auf. Momentan wird in klinischen Studien der Einsatz von Cetuximab als alleiniges Medikament oder auch in Kombination mit Bestrahlungen als Behandlungsmöglichkeit für Zervixkarzinome untersucht [51].

Das in dem zielgerichteten Toxin SE vorhandene EGF führt zu einer zielgerichteten Bindung an Zellen, die den EGFR überexprimieren. SE könnte somit zu einer erfolg-

reichen Wachstumsinhibition von Zervixkarzinomen führen. Aus diesem Grund wurde die cytotoxische Wirkung von SE auf verschiedene Zervixkarzinomzelllinien untersucht (3.1.2). Dazu wurden drei schon seit langer Zeit kultivierte Zelllinien (CaSki, SiHa und HeLa) untersucht, sowie zwei Zelllinien, die Passagenzahlen unter 50 aufweisen (PHCC1 und PHCC2). Als Positiv- und Negativkontrolle wurden dabei HER14- und NIH-3T3-Zellen eingesetzt (3.1.1). Zusätzlich wurde die Wirkung von SE auf den Zervixkarzinomzellen in Gegenwart von Spn untersucht. Für Saponine konnten mehrfach steigernde Eigenschaften auf Tumorwirkstoffe nachgewiesen werden [29, 30, 79, 87, 89, 170, 171]. Ebenfalls wurde die cytotoxische Wirkung von Saporin auf die untersuchten Zellen analysiert, auch in Gegenwart von Spn.

Die Wirkung von SE variierte teilweise stark auf den untersuchten Zelllinien (Tab. 3.9) [172]. Sowohl bei den HER14-Zellen, die als Positivkontrolle dienten, als auch bei den Zervixkarzinomzellen, führte die Behandlung mit SE zu einer starken Inhibition des Zellwachstums (Abb. 3.2 und Abb. 3.4). Lediglich die Zervixkarzinomzelllinie SiHa war unempfindlich gegenüber der cytotoxischen Wirkung von SE. Auch bei der Negativkontrollzelllinie NIH-3T3 wies SE eine starke cytotoxische Wirkung auf (Tab. 3.9), obwohl die Zellen keinen humanen EGFR exprimieren. Die Behandlung mit Saporin ohne EGF als Ligand führte zu genau derselben Wirkung, sodass NIH-3T3-Zellen unabhängig von dem EGFR eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Saporin besitzen. Bei den HER14- und NIH-3T3-Zellen handelt es sich um gen-identische Zelllinien, da die HER14-Zellen mit dem humanen EGFR transfizierte NIH-3T3-Zellen sind. Somit stellen beide Zelllinien ein optimales Modellsystem für die Expression des EGFR dar. Da die NIH-3T3-Zellen jedoch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Saporin aufweisen, wurde als zusätzliche Negativkontrolle die humane Melanomzelllinie MDA-MB-435S untersucht, da sie laut Anido *et al.* keinen EGFR exprimiert [151]. Im Gegensatz zu den NIH-3T3-Zellen weist SE auf den MDA-MB-435S-Zellen eine sehr geringe cytotoxische Wirkung auf, die sich kaum von der Wirkung von Saporin unterscheidet. Sowohl die Zervixkarzinomzelllinien als auch die HER14-Zellen wiesen deutlich höhere SI_{50} -Werte für Saporin auf als für SE, was eindeutig einer rezeptorabhängigen Cytotoxizität von SE entspricht (Tab. 3.9). Durch die Behandlung der Zellen mit Spn und SE wurde die Cytotoxizität enorm gesteigert, sowohl bei den Zervixkarzinomzellen als auch bei den HER14-Zellen. Dabei lagen die Verstärkungsfaktoren zwischen 9 000 und 2 500 000fach (Tab. 3.9). Die Verstärkungsfaktoren für Spn und Saporin lagen deutlich darunter (19 bis 5 000fach). Auf den NIH-3T3- und MDA-MB-435S-Zellen führt die Kombination mit Spn zwar zu einer Verstärkung der Cytotoxizität von SE, diese ist jedoch deutlich geringer als bei den Zervixkarzinomzellen. Die Behandlung mit Spn resultiert somit in einer spezifischen Verstärkung der durch SE vermittelten Cytotoxizität. Zusätzlich

handelt es sich dabei um einen eindeutig synergistischen Effekt, da sowohl Spn als auch SE für die Kombination in alleine nicht-toxischen Konzentrationen eingesetzt werden.

Wie anhand der Untersuchungen gezeigt werden konnte, führt die Behandlung der hier analysierten Zervixkarzinomzelllinien mit SE größtenteils zu einer starken Wachstumsinhibition der EGFR-exprimierenden Zellen. Die Tumorthherapie mit SE ist somit eine gute Möglichkeit um Tumoren zu eliminieren, die den EGFR exprimieren. Dazu musste jedoch noch geklärt werden, wie stark der Einfluss des EGFR dabei ist. Im Folgenden wird die Korrelation der Expression des EGFR mit der Wirkung von SE diskutiert.

4.2 Analyse des Zusammenhangs zwischen der EGFR-Expression und der Cytotoxizität von SE und Saporin

Im Vergleich mit Zelllinien, die den EGFR nicht exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von SE alleine und auch in Kombination mit Spn abhängig vom Vorhandensein des EGFR ist (3.1.1 und 3.1.2). Die Quantifizierung der Expressionslevel des EGFR bei den untersuchten Zervixkarzinomzellen sollte Aufschluss darüber geben, ob eine Korrelation zwischen der Wirkung von SE und der Menge an EGFR besteht. Dies würde eine Aussage über die Wirksamkeit von SE bei verschiedenen Tumoren ermöglichen.

Die EGFR-Expressionslevel wiesen große Unterschiede auf (Abb. 3.7). Die transfizierten HER14-Zellen zeigten die höchste EGFR-Expression. Für die NIH-3T3-Zellen konnte eine sehr geringe Expression ermittelt werden; da die Zellen jedoch keinen humanen EGFR exprimieren, entspricht dieser Wert dem Messfehler des angewandten ELISAs. Für die humane Negativkontrollzelllinie MDA-MB-435S konnte ebenfalls eine geringe Expression detektiert werden. Diese erklärt auch, warum ein Unterschied in der Cytotoxizität zwischen SE und Saporin besteht. Laut Anido *et al.* liegt bei diesen Zellen keine Expression des humanen EGFR vor [151]. Der Nachweis des EGFR erfolgte bei Anido *et al.* jedoch mittels Westernblot und die Intensität der Banden wurde zur Quantifizierung herangezogen. Der hier verwendete ELISA erscheint demnach sensibler als die von Anido *et al.* angewandte Quantifizierung mittels Westernblot. Die EGFR-Expression der HER14-, CaSki-, PHCC2- und PHCC1-Zellen war signifikant höher als die der MDA-MB-435S-Zellen (Tab. 5.16). HeLa- und SiHa-Zellen zeigten keine signifikant erhöhte Expression (Tab. 5.16).

Für die Zervixkarzinomzellen liegt eine eindeutige Korrelation zwischen der EGFR-Expression und der Sensitivität gegenüber SE vor (Abb. 3.8). SiHa- und HeLa-Zellen

exprimieren annähernd gleiche Mengen an EGFR, trotzdem sind SiHa-Zellen deutlich weniger sensitiv als HeLa-Zellen. Daraus kann geschlossen werden, dass das EGFR-Expressionslevel nicht der einzige Faktor ist, der ausschlaggebend für die Wirkung von SE ist. Andere Faktoren, wie der genetische Hintergrund oder der Grad der Differenzierung, können sich möglicherweise auf die Empfindlichkeit für SE auswirken. Diese Annahme wird zusätzlich noch bestätigt durch die hohe Cytotoxizität von Saporin gegenüber NIH-3T3-Zellen, die keinen humanen EGFR besitzen. Durch die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit einem Überschuss an freiem EGF wird die Cytotoxizität von SE und auch Spn/SE vollständig blockiert [172]. Eine stärkere Expression des EGFR resultiert in den meisten Fällen in einer erhöhten Cytotoxizität von SE. Es konnte erwartungsgemäß keine Korrelation bei der Wirkung von Saporin sowie Spn/Saporin mit der EGFR-Expression der Zervixkarzinomzellen festgestellt werden (Abb. 3.8). Eine interessante Feststellung ist, dass weniger sensitive Zervixkarzinomzelllinien (hoher SI_{50} -Wert für SE alleine) wesentlich größere Verstärkungsfaktoren für die Kombination mit Spn erhalten haben. Die Cytotoxizität für Spn/SE nähert sich bei den Zervixkarzinomzellen einem ähnlichen Wert an (Tab. 3.9). Der verstärkende Effekt von Spn tritt demnach erst in Aktion, nachdem SE an den EGFR gebunden hat und in die Zelle aufgenommen wurde. Dort erzielt Spn offenbar eine solch enorme Wirkung, dass bereits bei einer geringen EGFR-Expression ein maximal zu erreichender SI_{50} -Wert von etwa 100 fM vorliegt. Eine verstärkte Expression des EGFR kann diesen maximalen Wert nicht weiter steigern.

Basierend auf der eindeutigen Korrelation zwischen der EGFR-Expression und der Empfindlichkeit der Zellen für eine SE-Behandlung sollten weitere Tumoren, wie Brustkrebs, Dickdarmkrebs und andere, hinsichtlich der Wirkung von SE und Spn/SE untersucht werden und deren EGFR-Expression analysiert und korreliert werden. Die Voraussage der individuellen Wirksamkeit eines Medikamentes ermöglicht eine gezieltere und effektivere Behandlung von Tumoren. Zusätzlich sollten die Mechanismen aufgeklärt werden, die der verstärkenden Wirkung von Spn zugrunde liegen und die Auswirkungen der Behandlung mit SE und Spn/SE auf die Zellen genauestens untersucht werden.

4.3 Untersuchungen zur Wirkung von Spn

Spn vermittelt eine enorme Steigerung der cytotoxischen Wirkung von SE (Tab. 3.9). Über den Mechanismus, der dieser Verstärkung zugrunde liegt, ist jedoch nicht viel bekannt. Eine Voraussetzung für die Wirkung von Spn ist das Vorhandensein des EGFR (Abb. 3.2 und Abb. 3.3). Die Menge an EGFR ist dabei allerdings nicht von Bedeutung, es besteht keine Korrelation (3.2.2). Selbst die äußerst geringe Expression des EGFR

in MDA-MB-435S-Zellen ist ausreichend, um SE zu internalisieren und die Wirkung durch Spn drastisch zu verstärken (Abb. 3.6). Diese Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass bei einer Tumorbehandlung mit der Kombination aus Spn und SE auch Nicht-Zielzellen, die geringe Mengen an EGFR exprimieren, eliminiert werden könnten. In *In-vivo*-Untersuchungen in einem Mausmodell zur Biodistribution von Spn wurde nachgewiesen, dass innerhalb nur einer Stunde ein Großteil des Spn über den Urin ausgeschieden wird [173]. Das im Körper verbleibende Spn führt zu einer Verstärkung der Wirkung eines auf Saporin basierten zielgerichteten Toxins. Dabei wurden nur geringe, aber reversible Nebenwirkungen beobachtet. Um Nebenwirkungen bei einer Tumorbehandlung mit Spn/SE zu vermeiden, ist daher eine zeitversetzte Gabe von großer Bedeutung. Weiterhin führt Spn nicht zu einer erhöhten EGFR-Expression, um auf diese Weise die Aufnahme zu verstärken.

Bei ECV-304 Zellen wird Saporin in der Gegenwart von Spn über clathrinvermittelte Endocytose aufgenommen [35]. Auch die Aufnahme von EGF erfolgt über clathrinvermittelte Endocytose [94]. Für SE wird ebenfalls vermutet, dass die Aufnahme über clathrinvermittelte Endocytose über das EGF und den EGFR erfolgt. Dynamin 2 ist ein wichtiges Protein für die clathrinvermittelte Endocytose, da es die Abschnürung der gebildeten Vesikel von der Zellmembran ermöglicht. Die stabile Expression eines inaktiven Dynamin 2-Proteins führte bei HeLa-Zellen zu einem vollständigen Verlust des EGFR (Abb. 3.14) und zu einer deutlich geringeren Expression des Transferrinrezeptors (Abb. 3.15). Dadurch konnte die cytotoxische Wirkung von SE und auch Spn/SE deutlich herabgesetzt werden (Abb. 3.11). Die noch zu beobachtende Cytotoxizität von SE und Spn/SE auf den HeLa Δ Dyn-Zellen entsprach vollkommen der durch Saporin vermittelten toxischen Wirkung (Abb. 3.12). Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass EGFR von essentieller Bedeutung für die Wirkung von SE ist, sowohl in Abwesenheit aber auch in Gegenwart von Spn. Ohne den EGFR kann die spezifische Verstärkung der Cytotoxizität von SE durch Spn nicht erfolgen. Interessanterweise wurde die Cytotoxizität von Saporin durch die Expression des inaktiven Dynamin 2-Proteins nicht beeinflusst. Dadurch wird indirekt bestätigt, dass die Aufnahme von Saporin unabhängig vom EGFR und von Dynamin 2 erfolgt. Die Beteiligung von Dynamin 2 an der clathrinvermittelten Endocytose ist sehr gut belegt [105]. Weng *et al.* konnten jedoch zeigen, dass Saporin abhängig von Clathrin aufgenommen wird [35]. Die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien könnte eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die Aufnahme von Saporin sein. Die von Weng *et al.* verwendeten Zelllinien weisen eine erheblich höhere Sensitivität gegenüber Saporin in Kombination mit Spn auf. Bereits 6 pM Saporin sind ausreichend, um den SI_{50} -Wert zu unterschreiten. Im Gegensatz dazu weisen die hier verwendeten Zelllinien alle SI_{50} -Werte im Bereich von 0,1 bis 0,3 nM Saporin auf. Die stärkere Rolle der clathrinvermittelten Endocytose könnte die

Ursache für die erhöhte Sensitivität sein. Ferner ist zu beachten, dass bei den hier vorliegenden Arbeiten die Auswirkung des Verlustes von Dynamin 2 für einen sehr weiten Konzentrationsbereich von Saporin untersucht und nicht nur für eine Konzentration ermittelt wurden, wie in den Arbeiten von Weng *et al.* [35]. Darüber hinaus konnte durch die verwendeten Inhibitoren die cytotoxische Wirkung von Saporin maximal um eine Größenordnung verringert werden. Das deutet darauf hin, dass noch weitere Komponenten für die Aufnahme des Saporins verantwortlich sind. Möglicherweise erfolgt die Aufnahme von Saporin doch im Wesentlichen unabhängig von Clathrin durch andere Mechanismen. Ein potentieller Rezeptor für die Aufnahme von Saporin in die Zelle wird durch die hier vorgestellten Untersuchungen durch den Verlust eines aktiven Dynamin 2-Proteins, im Gegensatz zum EGFR, nicht beeinträchtigt. Jedoch ist bisher nicht eindeutig geklärt, über welchen Rezeptor Saporin in die Zellen gelangt [36, 37]. Wie Boll *et al.* nachweisen konnten, führt eine längere Inaktivierung von Dynamin 2 zu weiteren sekundären Faktoren, die sich auf die Endocytose auswirken können [174]. Für weiterführende Untersuchungen wäre es daher interessant, die Endocytose von SE und Spn/SE bei Zellen zu analysieren, die nur kurzzeitig das inaktive Dynamin 2-Protein exprimieren. Auch die Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems wäre dabei von Vorteil.

Die Inhibition bestimmter Schritte der Endocytose mit Hilfe spezifischer Inhibitoren gibt weitere Aufschlüsse über die Aufnahme von SE, auch in Gegenwart von Spn. Weiterhin werden sekundäre Effekte, wie sie bei der Expression des inaktiven Dynamin 2-Proteins auftraten, zumindest teilweise vermieden. Verschiedene Aspekte der Endocytose wurden mit Hilfe von vier inhibitorisch wirkenden Substanzen untersucht. Chlorpromazin inhibiert die clathrinvermittelte Endocytose [175], wohingegen Latrunculin A die Polymerisierung von Aktinmolekülen blockiert. Aktin ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das wichtig für die Organisation des Cytoskeletts ist. Bei Hefezellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass Aktin auch wichtig für die Endocytose ist. Die Behandlung der Hefezellen mit Latrunculin A führte zu einer Inhibierung der Vesikelinternalisierung [176, 177]. Bei Säugetierzellen wird Aktin für die Endocytose nicht zwingend benötigt, kann diese aber erleichtern [178]. Die Ansäuerung der Endosomen nach der Abschnürung von der Zellmembran ist für die rezeptorvermittelte Endocytose oft von großer Bedeutung, da so die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor gelöst wird und somit der Rezeptor recycelt werden kann. Verantwortlich für das Sinken des pH-Wertes ist dabei eine vakuäre H^+ -ATPase. Bafilomycin A1 inhibiert die Protonenpumpe, wohingegen Chloroquin direkt zu einem Anstieg des pH-Wertes führt.

Die Substanzen wurden in nicht-toxischen Konzentrationen eingesetzt (Abb. 3.16, Abb. 3.19 und Abb. 3.22) und ihre blockierende Wirkung auf die Endocytose von

Transferrin erfolgreich in der Durchflusszytometrie nachgewiesen (Abb. 3.17, Abb. 3.20 und Abb. 3.23). Mit Eisen beladenes Transferrin bindet an den Transferrinrezeptor und wird durch clathrinvermittelte Endocytose internalisiert. Im Anschluss erfolgt die Ansäuerung der Endosomen, wodurch das Eisen abdissoziiert. Transferrin selbst bleibt jedoch mit dem Rezeptor verbunden. Durch die Behandlung mit Bafilomycin A1 wird die Internalisierung des Transferrinrezeptors zwar nicht direkt beeinflusst, aber das Recycling des Rezeptors wird blockiert [179]. Durch die Präinkubation mit Chloroquin und Bafilomycin A1 standen letztendlich immer weniger Moleküle auf der Zelloberfläche zur Verfügung. Die Cytotoxizität von SE konnte durch keine der untersuchten Substanzen aufgehoben werden (Abb. 3.18, Abb. 3.21 und Abb. 3.24). SE bindet an den EGFR, wird dann aber über einen clathrinunabhängigen Mechanismus von den Zellen aufgenommen. Möglicherweise kann EGFR über einen anderen Aufnahmeweg internalisiert werden, der durch die Bindung von SE aktiviert wird. Diese Annahme wird durch Untersuchungen zum EGFR unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass eine hohe Ligandenkonzentration zu einem Umschalten von clathrinabhängiger zu clathrinunabhängiger Endocytose führt [180]. Aktin kann bei der Einstülpung der Membran für die Vesikelbildung und auch der Abschnürung des Vesikels von der Zellmembran beteiligt sein, dies ist jedoch nicht der Fall bei dem Endocytoseweg, der für die Aufnahme von SE verwendet wird. Bei der Aufnahme von EGF führt die Ansäuerung der Endosomen nicht zur Ablösung von dem Rezeptor, sondern beide Proteine werden anschließend degradiert [40]. Die Ansäuerung der Endosomen ist jedoch ohne Bedeutung für die Cytotoxizität von SE. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für SE wird bei der Kombination mit Spn die SE-Endocytose durch alle vier inhibitorisch wirkenden Substanzen wesentlich blockiert. Es kam zu einem starken Verlust der Cytotoxizität von SE (Abb. 3.18, Abb. 3.21 und Abb. 3.24). Die Aufnahme von SE erfolgt nun abhängig von Clathrin, möglicherweise vermittelt durch EGF und ist ebenfalls abhängig von Aktin. Ob Aktin hierbei an der Einstülpung und Abschnürung beteiligt ist oder an dem Vesikeltransport entlang des Cytoskeletts, kann jedoch nicht unterschieden werden. Die Ansäuerung der Endosomen ist notwendig für die verstärkende Wirkung von Spn. Eventuell wird Spn durch die Abnahme des pH-Wertes aktiviert und ermöglicht so den Transport von SE in das Cytosol. Für eine Freisetzung des Toxins aus dem Endosomen sprechen auch die Daten aus der Untersuchung von radioaktiv markiertem Saporin in Kombination mit Spn [181]. Dort konnte gezeigt werden, dass durch Spn die Menge des radioaktiven Saporins im Cytosol deutlich erhöht wird, während die Endocytose- und Exocytoseraten unbeeinflusst blieben.

Da einige andere zielgerichtete Toxine nach der Endocytose durch retrograden Transport in das Cytosol der Zielzellen gelangen, stellte sich nach den vorangegangenen Untersuchungen die Frage, ob Spn möglicherweise auch zum retrograden Transport

von SE ins Cytosol führt. Saporin gelangt jedoch nicht mittels retrograden Transports ins Cytosol [38]. *Pseudomonas* Exotoxin A ist ein typisches retrograd transportiertes Proteintoxin, das nach der Endocytose über das trans-Golgi-Netzwerk bis zum Endoplasmatischen Reticulum transportiert wird und dort in das Cytosol übertritt [182]. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Spn keinen Einfluss auf den retrograden Transport ausübt, da die Cytotoxizität von *Pseudomonas* Exotoxin A in keiner Weise durch Spn beeinflusst wurde (Abb. 3.25).

Nach allen Untersuchungen zur Wirkung von Spn zeigt sich, dass die Aufnahme von SE in Gegenwart von Spn intrazellulär durch einen völlig anderen Mechanismus wirkt. In beiden Fällen ist jedoch die extrazelluläre Bindung an EGFR zur Initiation elementar. Ein weiteres Ergebnis, das die unterschiedliche Aufnahme von SE und Spn/SE bestätigt, ist die Kinetik der Cytotoxizität [183],*. Schon nach 30 min Inkubation mit SE ist ein leichter cytotoxischer Effekt erkennbar, der nach 6 h weiter gesteigert wird. Für die Kombination mit Spn zeigt sich nach 30 min keine cytotoxische Wirkung, nach 6 h ist eine leichte Cytotoxizität zu beobachten. Sowohl für SE als auch für Spn/SE sind 24 h Inkubation ausreichend, um eine mit 48 h vergleichbare Cytotoxizität zu erreichen. Diese Verzögerung in der Kinetik der durch Spn vermittelten Cytotoxizität spiegelt möglicherweise die unterschiedlichen Aufnahmemechanismen wieder.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse lässt sich folgende Hypothese formulieren: SE bindet sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Spn an den EGFR und wird zusammen mit diesem internalisiert. Jedoch können einige SE-Moleküle unabhängig von der EGFR-vermittelten Internalisierung in die Zelle gelangen und inhibieren die Proteinbiosynthese, was zum Zelltod führt. Wie SE in die Zelle gelangt, ist noch nicht bekannt. Möglicherweise können die SE-Moleküle direkt über die Zellmembran bei der Bildung der *clathrin coated pits* in die Zelle gelangen oder durch andere clathrinunabhängige Mechanismen. Ein Großteil der SE-Moleküle wird jedoch zusammen mit dem EGFR internalisiert, hat aber keine Möglichkeit aus den Endosomen in das Cytosol zu gelangen. Bei der Kombination mit Spn wird deutlich weniger SE eingesetzt. Die wenigen Moleküle, die dann ohne EGFR-Internalisierung in die Zelle gelangen reichen nicht aus um diese zu töten. Möglicherweise liegt Spn in der Endosomenmembran vor und vermittelt dort den Durchtritt der internalisierten SE-Moleküle in das Cytosol. Weng *et al.* konnte für Saporin alleine in Kombination mit Spn eine größere Menge Saporin im Cytosol nachweisen als ohne Spn [181]. Dabei wurde eine durch Spn vermittelte Steigerung des Durchtritts von Saporin durch die Endosomenmembran vermutet. In der folgenden Abbildung (4.35) ist diese Hypothese schematisch dargestellt.

* *submitted*, Bachran *et al.*

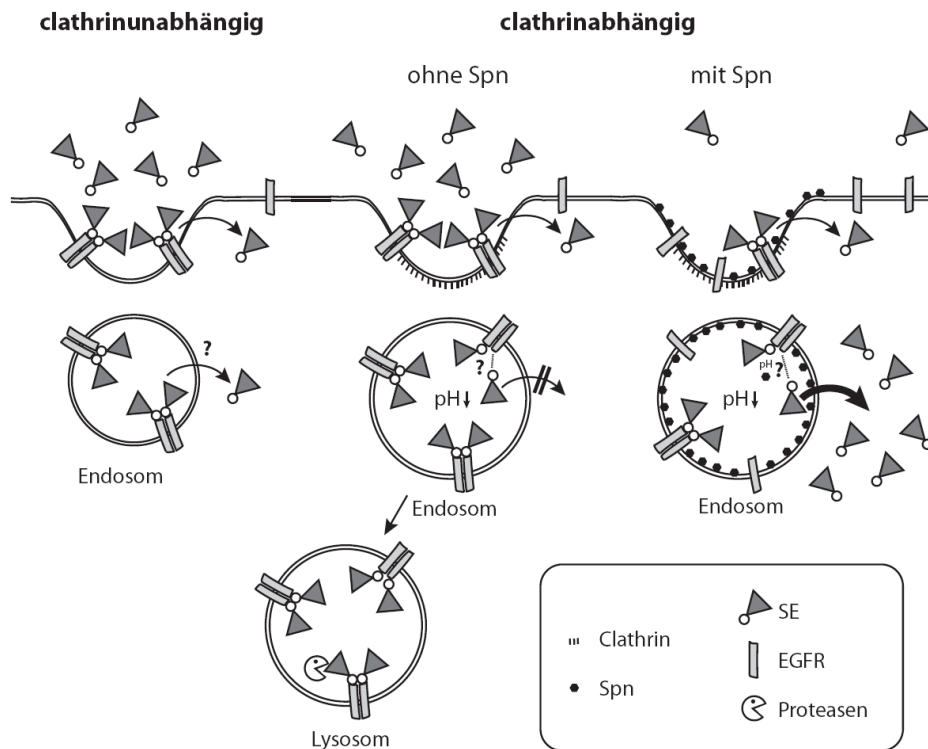


Abbildung 4.35: Schematische Darstellung des vorgestellten Modells zur zellulären Aufnahme von SE in Ab- und Anwesenheit von Spn.

4.4 Charakterisierung des durch SE vermittelten Zelltodes

Für die Verwendung von zielgerichteten Toxinen in der Tumorthherapie ist es notwendig, die durch die Behandlung in den Zellen aktivierten Mechanismen genauer zu analysieren. Es werden verschiedene Formen des Zelltodes unterschieden. Schon seit längerem bekannt sind die Apoptose und die Nekrose. Eine dritte Form stellt die Autophagie dar, jedoch ist es noch vollkommen unklar, ob der Zelltod mit Autophagie assoziiert ist oder durch Autophagie induziert wird. Bei der Nekrose kommt es letztendlich zum Zerplatzen der Zelle, wodurch sämtlicher Zellinhalt freigesetzt wird, was zu erheblichen Nebenwirkungen führen kann. Durch die Aktivierung von apoptotischen Prozessen werden Nebenwirkungen einer Behandlung minimiert und eine Freisetzung des Medikamentes aus den Tumorzellen verhindert. Bei der Apoptose schrumpfen die Zellen ohne zu Platzen. Es gibt zwei Signalwege bei der Apoptose, die abhängig von dem Apoptosestimulus aktiviert werden können. Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung der Liganden an sogenannte Todesrezeptoren ausgelöst, was zur Aktivierung der Caspase 8 führt. Der intrinsische oder auch mitochondriale Signalweg kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, dazu gehören unter anderem Schädigungen der DNA oder ein Übermaß an reaktiven Sauerstoffspezies. Im Gegensatz zu dem extrinsischen Si-

gnalweg ist ein Merkmal des intrinsischen Signalweges die Aktivierung der Caspase 9. Beide Caspasen führen letztendlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7.

In früheren Untersuchungen konnten für den durch Saporin und auf Saporin basierenden Immunotoxinen vermittelten Zelltod einige Eigenschaften der Apoptose nachgewiesen werden. Dazu gehörten die Kondensierung des Chromatins, die Blasen- oder Vesikelbildung und die Fragmentierung der DNA [184, 185]. Vor kurzem wurde von Skirwal *et al.* eine Beteiligung der Caspasen an der durch Saporin ausgelösten Apoptose nachgewiesen [186]. Interessanterweise ist die N-Glykosidaseaktivität von Saporin bei der Auslösung der Apoptose nicht von Bedeutung, wie mit Hilfe verschiedener Mutanten nachgewiesen werden konnte [186]. Dieses Ergebnis konnte auch durch Polito *et al.* bestätigt werden [187]. Sie konnten nachweisen, dass der Zelltod und die Inhibition der Proteinbiosynthese zeitversetzt erfolgen. Saporin scheint neben der rRNA noch weitere Strukturen in der Zelle beeinflussen zu können. Durch die Verwendung von Caspaseinhibitoren und Necrostatin-1, einem Inhibitor des nicht-apoptotischen Zelltodes, konnte der Zelltod um 96 h verzögert werden. Die eingesetzten Inhibitoren hatten keinen Einfluss auf die durch Saporin vermittelte Inhibition der Proteinbiosynthese, der dadurch ausgelöste Zelltod verläuft demnach deutlich langsamer. Saporin löst sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Signalweg der Apoptose aus, wobei letzterer von größerer Bedeutung ist [187]. Ein weiterer, durchaus interessanter Aspekt ist, dass die Fragmentierung der DNA vor der Aktivierung der Caspasen erfolgt.

Der durch SE vermittelte Zelltod weist auf apoptotische Prozesse in den untersuchten HeLa- und HER14-Zellen hin. Die Behandlung mit SE führte eindeutig zur Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP (Abb. 3.26) und zur Fragmentierung der DNA (Abb. 3.27). Nekrotische Prozesse werden hingegen nicht aktiviert. Dies konnte durch das Fortbestehen der Membranintegrität, auch nach einer längeren Inkubation mit SE, nachgewiesen werden (Tab. 3.10). Diese Ergebnisse stimmen vollkommen mit den gängigen Untersuchungen zu dem durch Saporin ausgelösten Zelltod überein [184, 185, 186, 187]. Durch die Kombination mit Spn wurde die durch SE ausgelöste Art des Zelltodes in keiner Weise verändert. Vielmehr löste SE schon bei einer deutlich geringeren Konzentration eine starke apoptotische Antwort in den Zellen aus (Abb. 3.26 und Abb. 3.27). Die Membranintegrität wurde durch die Inkubation mit Spn nicht verändert, in der eingesetzten Konzentration von 1,5 µg/ml bewirkte Spn keine Porenbildung (Tab. 3.10). Mit Hilfe der MCF-7/C3-Zellen zeigt sich deutlich, dass der durch SE und Spn/SE vermittelte Zelltod unabhängig von der Aktivierung der Caspase 3 erfolgt (Abb. 3.29). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den bereits erläuterten Eigenschaften des durch Saporin hervorgerufenen Zelltodes [186]. Ob es sich dabei um den von Polito *et al.* gezeigten langsamen Zelltod handelt, der durch die Inhibition der Proteinbiosynthese hervorgerufen wird, ist fragwürdig [187]. Die apoptotischen Effekte, die

durch SE oder Spn/SE ausgelöst werden, sind eindeutig bereits nach 48 h zu detektieren und nicht erst nach 96 h. An dem durch SE ausgelösten Zelltod scheint jedoch auch der intrinsische Apoptose-Signalweges zu einem kleinen Anteil beteiligt zu sein. Durch das Ausschalten der proapoptotischen Proteine Bax und Bak wird die cytotoxische Wirkung von SE und Spn/SE verringert (Abb. 3.30). Das bedeutet, dass sowohl Bax als auch Bak zu unterschiedlichen Anteilen an der durch SE und Spn/SE ausgelösten Apoptose beteiligt sind. Beide Proteine sind beim Voranschreiten der intrinsischen Apoptose essentiell für die steigende Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran. Bei der Inkubation von SE alleine ist zwischen den Zellen ohne Bax und den Zellen ohne Bax/Bak kein Unterschied in der Wirkung zu erkennen. Das Ausschalten beider Proteine führt bei der Kombination Spn/SE zu einem starken Verlust der Cytotoxizität. Demnach sind sowohl Bax als auch Bak an dem durch Spn/SE vermittelten Zelltod beteiligt. Der Verlust nur eines der Proteine (Bax) hat hingegen nur geringe Auswirkungen auf die Empfindlichkeit der HCT116-Zellen für Spn/SE. Möglicherweise unterscheidet sich der durch SE ausgelöste Zelltod von dem, der durch Spn/SE ausgelöst wird. Wie auch schon für Saporin nachgewiesen werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass SE in der Zelle verschiedene Arten des Zelltodes auslöst. In embryonalen Fibroblasten von Bax und Bak Doppelknockoutmäusen wiesen Shimizu *et al.* einen nicht-apoptotischen Zelltod nach, der im engen Zusammenhang mit Autophagie steht und caspaseunabhängig verläuft [143]. Mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren der Autophagie konnte der Zelltod blockiert werden. Die Behandlung von Zellen mit einem zielgerichteten Toxin, bestehend aus Diphtherietoxin und EGF, induzierte einen caspaseunabhängigen Zelltod mit PARP-Spaltung [188].

Die Behandlung der untersuchten Zellen mit SE und Spn/SE führt zu einem Absterben der Zellen, bei dem bestimmte Eigenschaften der Apoptose auftreten. Gleichzeitig wurden keine nekrotischen Prozesse ausgelöst. Jedoch wird der Zelltod eindeutig unabhängig von der Caspase 3 ausgelöst, was wiederum gegen apoptotische Prozesse spricht. Möglicherweise steht der durch die Behandlung mit SE und Spn/SE ausgelöste Zelltod im Zusammenhang mit Autophagie oder es werden sogar verschiedene Signalwege aktiviert. Viele Tumoren haben Mechanismen entwickelt, wodurch sie resistent gegenüber den Apoptosesignalen sind, sodass die Autophagie einen möglichen Ansatz bildet, um diese Mechanismen zu umgehen und den Zelltod zu bewirken. Allerdings ist der mit Autophagie im Zusammenhang stehende Zelltod bisher noch nicht weitreichend untersucht. Dennoch ist es notwendig, die Mechanismen, die zum Zelltod durch die Inkubation mit SE und Spn/SE führen, genaustens zu untersuchen. Mögliche Ansätze wären der Nachweis von Cytochrom c, das bei dem intrinsischen Signalweg der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt wird, sowie Untersuchungen zur Autophagie.

4.5 Analyse der verstärkenden Wirkung einzelner Saponine

Saponine unterscheiden sich hinsichtlich des Aglycons sowie der daran assoziierten Zuckerketten und weiterer funktioneller Gruppen. Die einzelnen Komponenten führen dabei zu unterschiedlichen biologischen Funktionen [60, 79]. Das für die bisherigen Versuche verwendete Spn ist ein Saponingemisch (*Saponinum album*) aus *Gypsophila paniculata*. Für den Einsatz von Saponinen als verstärkendes Agens in der Tumorthherapie ist es jedoch notwendig ein einzelnes Saponin einzusetzen, sodass die Wirkung nicht abhängig von der Zusammensetzung des Saponingemischs variiert. Für die Identifizierung eines geeigneten Saponins wurden vier isoliert vorliegende Saponine hinsichtlich ihrer Wirkung auf SE untersucht. Das Saponin 1641 wurde direkt aus dem gekauften Saponingemisch *Saponinum album* isoliert [154] und die Saponine Gyp 1-10, Gyp 2-10 und Gyp 3-10 aus Pflanzenextrakten von *Gypsophila paniculata*.

Das isolierte Saponin aus Spn führte zu einer mit Spn vergleichbaren Steigerung der Cytotoxizität von SE (Abb.3.32) und wies gleichzeitig eine deutlich geringere Eigentoxizität als Spn auf (Abb.3.31). Auch die direkt aus dem *Gypsophila paniculata*-Pflanzenextrakt isolierten Saponine zeigten deutlich geringere Eigentoxizitäten als Spn (Abb.3.33), jedoch führte nur Gyp 1-10 zu einer ähnlichen Verstärkung der SE-Cytotoxizität wie Spn (Abb.3.34). Die vier isolierten Saponine sind alle aus einem triterpenoiden Aglycon aufgebaut und weisen am C4-Atom eine Aldehydgruppe auf. Das Saponin 1641 zeigt jedoch einen anderen Aufbau der assoziierten Zuckerketten und unterscheidet sich dadurch von Gyp 2-10, das keinen Einfluss auf die Cytotoxizität von SE zeigte. Demnach kann die verstärkende Wirkung der Saponine nicht alleine auf die Aldehydgruppe zurückgeführt werden. Dennoch könnte die Aldehydgruppe eine Bedeutung für die Wirkung der Saponine haben. Für das Saponin QS-21 konnten Soltysik *et al.* zeigen, dass dessen adjuvante Funktion durch die chemische Modifikation der Aldehydgruppe verloren geht [189]. Die Bedeutung der Aldehydgruppe für die verstärkende Wirkung zielgerichteter Toxine zeigte sich auch in einer Untersuchung verschiedener Saponine in Kombination mit saporinbasierten zielgerichteten Toxinen. Nur die Saponine mit einer Aldehydgruppe an der triterpenoidalen Struktur konnten die Wirkung der Toxine drastisch verstärken [72]. Neben der Aldehydgruppe ist die Zusammensetzung der Zuckerketten von großer Bedeutung. Das Saponin 1641 weist gegenüber den direkt aus *Gypsophila paniculata* isolierten Saponinen einen deutlich unterschiedlichen Aufbau der Zuckerketten auf und vermittelt die stärkste Steigerung der SE-Cytotoxizität. Armah *et al.* [190] und Melzig *et al.* [191] konnten in ihren Untersuchungen die Notwendigkeit der Zuckerketten für die Funktion der untersuchten Saponine nachweisen. Durch eine zusätzliche Xylose in der am C28-assozierten

Zuckerkette konnte Gyp 3-10 im Vergleich zu Gyp 2-10 die Wirkung von SE leicht steigern. Aber erst die zusätzliche Hydroxygruppe am C16-Atom bei Gyp 1-10 führte zu einer enormen Steigerung der SE-Cytotoxizität. Auch die Fähigkeit zur spezifischen Verstärkung der Cytotoxizität ist abhängig von dem Aufbau der Saponine [72]. Die Ergebnisse zeigen, dass die zusätzlichen funktionellen Gruppen am Aglycon und ganz besonders die Zusammensetzung der assoziierten Zuckerketten für die Funktionalität der Saponine von großer Bedeutung sind.

Das Saponin 1641 stellt ein ideales Saponin für den Einsatz in der Kombination mit SE für die Tumorthherapie dar. Es führt zu einer enormen Steigerung der Cytotoxizität von SE, wobei es sich um einen klar synergistischen Effekt handelt, da beide Substanzen alleine bei den in der Kombination eingesetzten Konzentrationen nicht-toxisch für die Zellen sind. Durch den deutlich geringeren Einsatz von SE wird auch das Risiko für Nebenwirkungen drastisch gesenkt und zusätzlich werden die Kosten verringert. Jedoch wurde das Saponin 1641 aus dem gekauften Saponingemisch isoliert, dessen Produktion eingestellt wurde. Aus diesem Grund wurden auch die Saponine aus dem Pflanzenextrakt isoliert. Gyp 1-10 weist sehr gute verstärkende Eigenschaften auf und ist bei den eingesetzten Konzentrationen nicht oder nur in sehr geringem Maße toxisch. Dennoch ist es sinnvoll noch weitere Saponine zu isolieren und ihre Eigenschaften zu untersuchen. Das in SE vorliegende Saporin stammt aus der Pflanze *Saponaria officinalis*. Möglicherweise vermitteln die dort vorhandenen Saponine eine viel größere Verstärkung der Cytotoxizität von SE. Die Isolierung von Saponinen aus *Saponaria officinalis* könnte daher zu einer weiteren Verbesserung der Kombinationsbehandlung führen.

Mit den innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Studien konnte die Wirksamkeit der Kombinationsbehandlung aus Spn und einem auf Saporin basierten zielgerichteten Toxin zur Elimination von Zervixkarzinomzellen eindeutig nachgewiesen werden. Mit den gewonnenen Erkenntnissen zur Wirkungsweise von SE und den molekularen Mechanismen, die der verstärkenden Wirkung von Spn zugrunde liegen, sind die grundlegenden Voraussetzungen für den Einsatz dieser hier detailliert beschriebenen Kombinationsbehandlung in der Tumorthherapie geschaffen. Der Nachweis der Wirksamkeit isolierter Saponine für die drastische Verstärkung der tumorspezifischen Wachstumsinhibition bekräftigt die positiven Aussichten eines Einsatzes isolierter Saponine als verstärkendes Agens für Saporin basierte zielgerichtete Toxine und möglicherweise auch weitere zielgerichtete Toxine.

Anhang

5.1 Parameter für Cytotoxizitätsassays

In den folgenden drei Tabellen (5.11, 5.12 und 5.13) sind für die einzelnen Cytotoxizitätsassays, die in der Arbeit dargestellt sind, die verwendete Zelllinie, die eingesetzte Zellzahl, das verwendete Toxin und die davon eingesetzten Endkonzentrationen aufgelistet. In allen Versuchen, in denen SE, Saporin oder *Pseudomonas* Exotoxin A mit Spn kombiniert wurden, wurde Spn in einer Endkonzentration von $1,5 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt und für 5 min auf den Zellen präinkubiert. Die Zellen wurden für 48 h mit den Ansätzen inkubiert.

5.1.1 Cytotoxische Wirkung von SE und Saporin auf verschiedene Zelllinien

Tabelle 5.11: Zusammenfassung der Parameter für die Cytotoxizitätsassays zu dem Abschnitt 3.1.

| Abbildung | Zelllinie | Zellzahl | Toxin | Konzentration [nM] | | |
|-----------|-------------|----------|---------|--------------------|---|------|
| 3.2 | HER14 | 2 000 | SE | 0,00003 | – | 10 |
| | NIH-3T3 | 2 000 | SE | 0,01 | – | 100 |
| 3.3 | HER14 | 2 000 | SE | 0,00003 | – | 10 |
| | NIH-3T3 | 2 000 | SE | 0,01 | – | 100 |
| | HER14 | 2 000 | Saporin | 0,003 | – | 300 |
| | NIH-3T3 | 2 000 | Saporin | 0,003 | – | 300 |
| 3.4 | CaSki | 10 000 | SE | 0,3 | – | 100 |
| | SiHa | 10 000 | SE | 0,3 | – | 300 |
| | HeLa | 10 000 | SE | 0,3 | – | 300 |
| | PHCC1 | 5 000 | SE | 0,3 | – | 300 |
| | PHCC2 | 5 000 | SE | 0,3 | – | 100 |
| 3.5 | CaSki | 10 000 | Saporin | 1 | – | 1000 |
| | SiHa | 10 000 | Saporin | 1 | – | 1000 |
| | HeLa | 10 000 | Saporin | 1 | – | 1000 |
| | PHCC1 | 5 000 | Saporin | 1 | – | 1000 |
| | PHCC2 | 5 000 | Saporin | 3 | – | 1000 |
| 3.6 | MDA-MB-435S | 10 000 | SE | 0,0003 | – | 300 |
| | | 10 000 | Saporin | 0,03 | – | 1000 |

5.1.2 Untersuchungen zur Wirkung von SE

Tabelle 5.12: Zusammenfassung der Parameter für die in der Arbeit aufgeführten Cytotoxizitätsassays für den Abschnitt 3.3.

| Abbildung | Zelllinie | Zellzahl | Toxin | Konzentration [nM] | | |
|------------------|-------------------|----------|-------------------------------|--------------------|---|------|
| 3.11 | HeLa | 10 000 | SE | 0,00001 | – | 1000 |
| | HeLa Δ Dyn | 10 000 | SE | 0,00001 | – | 1000 |
| 3.12 | HeLa | 10 000 | Saporin | 0,001 | – | 1000 |
| | HeLa Δ Dyn | 10 000 | SE | 0,00001 | – | 1000 |
| 3.13 | HeLa | 10 000 | Saporin | 0,001 | – | 1000 |
| | HeLa Δ Dyn | 10 000 | Saporin | 0,003 | – | 300 |
| 3.18, 3.21, 3.24 | HER14 | 2 000 | SE | 0,00003 | – | 10 |
| 3.25 | HER14 | 2 000 | <i>Pseudomonas</i> Exotoxin A | 0,00001 | – | 300 |

5.1.3 SE vermittelter Zelltod und isolierte Saponine

Tabelle 5.13: Zusammenfassung der Parameter für die in der Arbeit dargestellten Cytotoxizitätsassays in den Abschnitten 3.4 und 3.5.

| Abbildung | Zelllinie | Zellzahl | Toxin | Konzentration [nM] | | |
|------------|-----------|----------|-------|--------------------|---|-------|
| 3.29 | MCF-7 | 5 000 | SE | 0,00003 | – | 1 000 |
| 3.30 | HCT-116 | 5 000 | SE | 0,00003 | – | 300 |
| 3.32, 3.34 | HER14 | 2 000 | SE | 0,00003 | – | 10 |

5.1.4 Eigentoxizität der inhibitorischen Substanzen

Tabelle 5.14: Zusammenfassung der Inkubationsbedingungen für die in der Arbeit untersuchten inhibitorischen Substanzen in den Abschnitten 3.3.2.2, 3.3.2.3 und 3.3.2.4.

| inhibitorische Substanz | Inkubationszeiträume | Konzentration |
|-------------------------|----------------------|---------------------------|
| Chlorpromazin | 30 min | 10 μ M – 35 μ M |
| | 60 min | |
| | 24 h | |
| | 48 h | |
| Latrunculin A | 40 min | 40 nM – 65 nM |
| | 60 min | |
| | 48 h | |
| Chloroquin | 60 min | 0,1 μ M – 100 μ M |
| | 48 h | |
| Bafilomycin A1 | 60 min | 0,3 nM – 1 μ M |
| | 48 h | |

5.2 Statistische Auswertungen

Tabelle 5.15: Statistische Analyse der Signifikanz. Vergleich der SI_{50} -Werte für SE, Spn/SE, Saporin und Spn/Saporin für HER14-, NIH-3T3-, CaSki-, SiHa-, HeLa-, PHCC1- und PHCC2-Zellen. $p \leq 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

| Zelllinie | Vergleich der SI_{50} -Werte für | p-Wert | Beurteilung |
|-----------|------------------------------------|--------|-------------------|
| HER14 | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,000 | signifikant |
| | Saporin ohne Spn - Saporin mit Spn | 0,021 | signifikant |
| | SE ohne Spn - Saporin ohne Spn | 0,002 | signifikant |
| | SE mit Spn - Saporin mit Spn | 0,002 | signifikant |
| NIH-3T3 | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,032 | signifikant |
| | Saporin ohne Spn - Saporin mit Spn | 0,021 | signifikant |
| | SE ohne Spn - Saporin ohne Spn | 1,000 | nicht signifikant |
| | SE mit Spn - Saporin mit Spn | 1,000 | nicht signifikant |
| CaSki | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,009 | signifikant |
| | SE mit Spn - Saporin mit Spn | 0,025 | signifikant |
| SiHa | SE mit Spn - Saporin mit Spn | 0,010 | signifikant |
| HeLa | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,000 | signifikant |
| | Saporin ohne Spn - Saporin mit Spn | 0,001 | signifikant |
| | SE ohne Spn - Saporin ohne Spn | 0,003 | signifikant |
| | SE mit Spn - Saporin mit Spn | 0,000 | signifikant |
| PHCC1 | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,000 | signifikant |
| | Saporin ohne Spn - Saporin mit Spn | 0,006 | signifikant |
| | SE ohne Spn - Saporin ohne Spn | 0,003 | signifikant |
| | SE mit Spn - Saporin mit Spn | 0,002 | signifikant |
| PHCC2 | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,000 | signifikant |
| | Saporin ohne Spn - Saporin mit Spn | 0,011 | signifikant |
| | SE ohne Spn - Saporin ohne Spn | 0,011 | signifikant |
| | SE mit Spn - Saporin mit Spn | 0,005 | signifikant |

Für die CaSki-Zellen konnte im Bezug auf die Behandlung mit Saporin kein SI_{50} -Wert ermittelt werden und für die SiHa-Zellen war die Ermittlung des SI_{50} -Wertes für die Behandlung mit SE und Saporin nicht möglich. Daher wurde für diese Behandlungen keine statistische Analyse durchgeführt.

Tabelle 5.16: Statistische Analyse der Signifikanz. Vergleich der EGFR-Expression für NIH-3T3-, SiHa-, HeLa-, PHCC1-, PHCC2-, CaSki- und HER14-Zellen im Bezug auf die EGFR-Expression der Kontrollzellen MDA-MB-435S. $p \leq 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

| Zelllinie | p-Wert | Beurteilung |
|-----------|--------|-------------------|
| NIH-3T3 | 0,30 | nicht signifikant |
| SiHa | 0,36 | nicht signifikant |
| HeLa | 0,11 | nicht signifikant |
| PHCC1 | 0,05 | signifikant |
| PHCC2 | 0,03 | signifikant |
| CaSki | 0,03 | signifikant |
| HER14 | 0,03 | signifikant |

Tabelle 5.17: Statistische Analyse der Signifikanz. Vergleich der SI_{50} -Werte für HeLa Δ Dyn-Zellen. $p \leq 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

| Zelllinie | Vergleich der SI_{50} -Werte für | p-Wert | Beurteilung |
|-------------------|------------------------------------|--------|-------------------|
| HeLa Δ Dyn | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,009 | signifikant |
| | Saporin ohne Spn - Saporin mit Spn | 0,004 | signifikant |
| | SE ohne Spn - Saporin ohne Spn | 0,465 | nicht signifikant |
| | SE mit Spn - Saporin mit Spn | 0,715 | nicht signifikant |

Tabelle 5.18: Statistische Analyse der Signifikanz. Vergleich der SI_{50} -Werte für HeLa und HeLa Δ Dyn-Zellen. $p \leq 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

| Testvariable | Vergleich der SI_{50} -Werte für | p-Wert | Beurteilung |
|------------------|-------------------------------------|--------|-------------------|
| SE ohne Spn | HeLa - HeLa Δ Dyn | 0,035 | signifikant |
| SE mit Spn | HeLa - HeLa Δ Dyn | 0,002 | signifikant |
| Saporin ohne Spn | HeLa - HeLa Δ Dyn | 0,093 | nicht signifikant |
| Saporin mit Spn | HeLa - HeLa Δ Dyn | 0,637 | nicht signifikant |
| ohne Spn | HeLa Saporin - HeLa Δ Dyn SE | 0,079 | nicht signifikant |
| mit Spn | HeLa Saporin - HeLa Δ Dyn SE | 0,162 | nicht signifikant |

Tabelle 5.19: Statistische Analyse der Signifikanz. Vergleich der SI_{50} -Werte für MCF-7- und MCF-7/C3-Zellen. $p \leq 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

| Testvariable | Vergleich der SI_{50} -Werte für | p-Wert | Beurteilung |
|--------------|------------------------------------|--------|-------------------|
| MCF-7 | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,050 | signifikant |
| MCF-7/C3 | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,050 | signifikant |
| SE ohne Spn | MCF-7 - MCF-7/C3 | 0,513 | nicht signifikant |
| SE mit Spn | MCF-7 - MCF-7/C3 | 0,827 | nicht signifikant |

Tabelle 5.20: Statistische Analyse der Signifikanz. Vergleich der SI_{50} -Werte für HCT116-, HCT116 bax^{--} - und HCT116 bax^{--}/bak^{--} -Zellen. $p \leq 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

| Testvariable | Vergleich der SI_{50} -Werte für | p-Wert | Beurteilung |
|----------------------------|---|--------|-------------------|
| HCT116 | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,004 | signifikant |
| HCT116 bax^{--} | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,002 | signifikant |
| HCT116 bax^{--}/bak^{--} | SE ohne Spn - SE mit Spn | 0,050 | signifikant |
| SE ohne Spn | HCT116 - HCT116 bax^{--} | 0,032 | signifikant |
| SE mit Spn | HCT116 - HCT116 bax^{--} | 0,032 | signifikant |
| SE ohne Spn | HCT116 - HCT116 bax^{--}/bak^{--} | 0,071 | nicht signifikant |
| SE mit Spn | HCT116 - HCT116 bax^{--}/bak^{--} | 0,039 | signifikant |
| SE ohne Spn | HCT116 bax^{--} - HCT116 bax^{--}/bak^{--} | 0,732 | nicht signifikant |
| SE mit Spn | HCT116 bax^{--} - HCT116 bax^{--}/bak^{--} | 0,030 | signifikant |

Zusammenfassung

Die noch immer üblichen Methoden zur Tumorthherapie sind die chirurgische Entfernung, die Strahlen- und Chemotherapie. Durch die Verwendung monoklonaler Antikörper und zielgerichteter Toxine wird die spezifische Eliminierung von Tumorzellen deutlich verbessert und dadurch Nebenwirkungen verringert. Zervixkarzinome stellen die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen dar und bei 90% der Tumoren wurde eine Überexpression des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) nachgewiesen. Somit ist der EGFR ein ideales Ziel für die zielgerichtete Bekämpfung der Tumorzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das zielgerichtete Toxin SE in seiner Wirkung auf Zervixkarzinomzellen eingehend charakterisiert. SE ist ein Fusionsprotein aus dem pflanzlichen Proteintoxin Saporin und dem humanen *epidermal growth factor*, dem Liganden des EGFR. In früheren Untersuchungen wurde eine enorme Verstärkung der Cytotoxizität von SE durch das Saponingemisch *Saponinum album* (Spn) aus *Gypsophila paniculata* nachgewiesen.

SE führte auf fast allen untersuchten Zervixkarzinomzellen zu einer starken Wachstumsinhibition (SI_{50} -Werte: 5 bis 80 nM), die zusätzlich durch Spn enorm gesteigert werden konnte (bis zu 76 000fach). Dabei handelt es sich um einen eindeutig synergistischen Effekt, da sowohl SE als auch Spn in den eingesetzten Konzentrationen für sich alleine nicht toxisch waren. Da das Proteintoxin Saporin nur eine geringe cytotoxische Wirkung hatte (SI_{50} -Werte: 338 bis >1 000 nM), ist der nachgewiesene Effekt eindeutig abhängig von dem EGFR. Dies wurde ebenfalls durch eine klare Korrelation zwischen dem EGFR-Expressionslevel und der Wirkung von SE bestätigt. Spn führt zu keiner verstärkten Expression des EGFR, vielmehr ist die cytotoxizitätssteigernde Wirkung von Spn unabhängig von dem EGFR-Expressionslevel. Dennoch ist die Expression des EGFR Voraussetzung für die Wirkung von Spn, da dieses erst nach der Internalisierung von SE seine Aktivität ausübt.

Um den Aufnahmeweg von SE zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen hergestellt, die ein nicht funktionelles Dynamin 2-Protein stabil exprimieren. Dynamin 2 ist essentiell für die clathrinabhängige Endocytose, über die der EGFR internalisiert wird. Die Expression des nicht funktionellen Dynamin 2-Proteins führte wiederum zum Verlust der

cytotoxischen Wirkung von SE und SE in Kombination mit Spn, jedoch kam es auch zu einem vollständigen Verlust des EGFR.

Die Aufnahme einiger Proteintoxine erfolgt über den retrograden Transport. Es konnte jedoch eindeutig ausgeschlossen werden, dass Spn einen Einfluss auf den retrograden Transport ausübt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass SE in Kombination mit Spn über diesen Mechanismus in die Zellen gelangt. Interessanterweise konnten in Inhibitionsstudien deutliche Unterschiede in der Aufnahme von SE in Ab- und Anwesenheit von Spn nachgewiesen werden. Die Aufnahme von SE erfolgt unabhängig von Clathrin und Aktin. Auch die Ansäuerung der Endosomen ist nicht notwendig für die SE-vermittelte Toxizität. Durch die zusätzliche Behandlung mit Spn erfolgt die Aufnahme von SE über andere Mechanismen, da die Aufnahme nun von Clathrin und Aktin abhängig ist und die Ansäuerung der Endosomen benötigt. Diese Erkenntnisse führen zu der Hypothese, dass einige SE-Moleküle nach der Bindung an den EGFR unabhängig von dessen Internalisierung in die Zellen gelangen können und dort den Zelltod vermitteln, während der Großteil zusammen mit dem EGFR internalisiert wird ohne in das Cytosol zu gelangen. Bei der Kombination mit Spn wird deutlich weniger SE eingesetzt, sodass die wenigen Moleküle, die dann ohne EGFR-Internalisierung in die Zelle gelangen, nicht in der Lage sind die Zelle zu töten. Ein Teil der SE-Moleküle folgt dann in Kombination mit Spn dem clathrinabhängigen Weg und erreicht effektiv das Cytosol. Möglicherweise liegt Spn in der Endosomenmembran vor und vermittelt dort den Durchtritt der internalisierten SE-Moleküle in das Cytosol.

Bislang war nicht bekannt welche Form des Zelltodes durch SE ausgelöst wird. Dieses Wissen ist jedoch wichtig für einen Einsatz in der Therapie, da durch die Aktivierung der Nekrose starke Nebenwirkungen auftreten können. SE führte in den Zellen zur Aktivierung von Prozessen, die der Apoptose zuzuordnen sind, wie die Spaltung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 und die Fragmentierung der DNA. Nekrotische Prozesse konnten eindeutig ausgeschlossen werden, da der typische Verlust der Membranintegrität nicht erfolgte. Interessanterweise wurde der Zelltod unabhängig von der Caspase 3 ausgelöst, was auf einen mit Autophagie assoziierten Zelltod hinweisen könnte. Zu einem gewissen Maße sind Proteine des intrinsischen Signalweges der Apoptose beteiligt (*Bcl-2-associated x protein* und *Bcl-2 homologous antagonist/killer*), was auf die Aktivierung verschiedener Signalwege hindeutet.

Die Verwendung eines Saponingemischs in der Tumorthherapie ist nicht möglich, da schon leichte Veränderungen in der Zusammensetzung den Therapieerfolg beeinflussen könnten. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit isolierte Saponine untersucht und für zwei Saponine hervorragende Eigenschaften bei der Verstärkung der Cytotoxizität von SE nachgewiesen. Für die Wirkung der Saponine sind strukturelle Eigenschaften von besonderer Bedeutung. Die Aufklärung der relevanten Strukturen für die

verstärkende Eigenschaft der Saponine ist für deren Einsatz in der Tumorthherapie von besonderer Bedeutung.

Durch die hier vorgestellten Arbeiten zur Wirkungsweise des zielgerichteten Toxins SE und der Kombination mit Spn konnte das Verständnis für den molekularen Mechanismus, der insbesondere der durch Spn erfolgenden Verstärkung zugrunde liegt, wesentlich verbessert werden. Durch die sehr erfolgreiche Analyse der isolierten Saponine stehen nun geeignete Methoden für präklinische Studien zur Verfügung.

Summary

Surgical removal, radiation therapy and chemotherapy are still the most common methods in cancer therapies. The use of monoclonal antibodies and targeted toxins significantly improves the specific elimination of cancer cells and therefore decreases side effects. Cervical cancer is the second most common cancer in women. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in 90 % of the cervical carcinomas. Therefore targeting the EGFR is a promising approach for the targeted elimination of tumor cells.

This work contains a detailed study on the impact of the targeted toxin SE on human cervical carcinoma cell lines. SE consists of the plant protein toxin saporin and the human epidermal growth factor, the ligand of EGFR. Preceding studies revealed a strong enhancement of the cytotoxicity of SE by the saponin composite *Saponinum album* (Spn) from *Gypsophila paniculata*.

The treatment with SE resulted in a strong growth inhibition on nearly all of the tested cervical carcinoma cell lines (SI₅₀-values: 5 to 80 nM) and was dramatically enhanced by the combined application of Spn (up to 76 000-fold). This effect is clearly synergistic; both SE and Spn alone are non-toxic at the applied concentrations. Since the protein toxin saporin is scarcely cytotoxic (SI₅₀-values: 338 to >1000 nM), the demonstrated effect is clearly dependent on EGFR. This was confirmed by a clear correlation between the expression level of EGFR and the impact of SE. Spn by itself does not increase the expression of EGFR and therefore the enhancing property of Spn is independent of the EGFR expression level. However, if the EGFR is expressed at all Spn mediates a stronger enhancement.

To analyze the uptake mechanism of SE, HeLa cells stably expressing a non-functional dynamin 2 protein were generated. Dynamin 2 is essential for the clathrin-mediated endocytosis, which is responsible for the internalization of EGFR. The expression of the non-functional dynamin 2 protein resulted in a loss of SE-mediated cytotoxicity alone and in combination with Spn. However, the expression also resulted in the complete loss of EGFR.

Some protein toxins follow a retrograde transport route for uptake into cells. However, it was clearly excluded that Spn has an influence on the retrograde transport. It is

therefore unlikely that SE is transported into cells via this mechanism when combined with Spn. Interestingly, inhibition studies revealed a clear difference in the uptake of SE in presence or absence of Spn. The uptake of SE occurs independently of the presence of clathrin and actin, neither is an acidification of the endosomes necessary for the SE-mediated cytotoxicity. Upon combination with Spn, SE is delivered by other mechanisms, because the uptake is dependent of clathrin and actin and requires the acidification of the endosomes. These findings lead to the hypothesis that after binding to the EGFR, some SE molecules can enter, and thereby kill cells, independent of the internalization route of EGFR. The majority, however, is internalized bound to EGFR and never reaches the cytosol. In combination with Spn, less SE is used and therefore the few molecules that enter the cell independent of internalization via the EGFR are not sufficient to kill the cell. Upon combination with Spn, some of the SE molecules follow the clathrin-dependent route and effectively translocate into the cytosol. A possible explanation is Spn embedded in the endosomal membrane that mediates the transfer of the internalized SE molecules into the cytosol.

To date, it was not known which cell death mechanism is activated by SE. This knowledge, however, would be relevant for the use of SE in therapies, because the activation of necrosis will cause strong side effects. The treatment with SE resulted in apoptotic processes, demonstrated by the cleavage of Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 and the fragmentation of DNA. Necrotic processes were excluded due to the absence of the typical loss of membrane integrity. Interestingly, cell death was independent of caspase 3 activation, which indicates a cell death mechanism potentially linked to autophagy. At least two proteins of the intrinsic signaling pathway are involved (Bcl-2-associated x protein and Bcl-2 homologous antagonist/killer), indicating an activation of different signaling pathways.

The use of a saponin composite in tumor therapies is not advisable, because slight changes in composition may have a large impact on the success of the therapy. Therefore, purified saponins were studied in this work and two different saponins revealed excellent enhancing properties on the cytotoxicity of SE. Structural properties are very important for the function of saponins and the clarification of the relevant structures for the enhancing property of saponins is of utmost importance for their application in therapies.

This study on the mechanism of action of the targeted toxin SE and the combination of SE and Spn considerably contributes to the understanding of the molecular mechanism that is mainly based on the enhancement caused by Spn. The successful analysis of the isolated saponins offers promising data for preclinical studies.

Literaturverzeichnis

- [1] Deutsche Krebshilfe. www.krebshilfe.de/krebszahlen.html, 2008.
- [2] G. Danaei, S. Vander Hoorn, A. D. Lopez, C. J. Murray, and M. Ezzati. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 366:1784–1793, Nov 2005.
- [3] R. Injac and B. Strukelj. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 7:497–516, Dec 2008.
- [4] K. Barabas, R. Milner, D. Lurie, and C. Adin. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol*, 6:1–18, Mar 2008.
- [5] M. J. Edelman. Novel taxane formulations and microtubule-binding agents in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 10 Suppl 1:S30–34, Mar 2009.
- [6] S. L. Wethington, J. D. Wright, and T. J. Herzog. Key role of topoisomerase I inhibitors in the treatment of recurrent and refractory epithelial ovarian carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8:819–831, May 2008.
- [7] J. M. Davies and R. M. Goldberg. First-line therapeutic strategies in metastatic colorectal cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 22:1470–1479, Nov 2008.
- [8] P. Carter. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer*, 1:118–129, Nov 2001.
- [9] D. Cunningham, Y. Humblet, S. Siena, D. Khayat, H. Bleiberg, A. Santoro, D. Bets, M. Mueser, A. Harstrick, C. Verslype, I. Chau, and E. Van Cutsem. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 351:337–345, Jul 2004.
- [10] L. B. Saltz, N. J. Meropol, P. J. Loehrer, M. N. Needle, J. Kopit, and R. J. Mayer. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Oncol.*, 22:1201–1208, Apr 2004.
- [11] E. Martinelli, R. De Palma, M. Orditura, F. De Vita, and F. Ciardiello. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin. Exp. Immunol.*, 158:1–9, Oct 2009.
- [12] D. R. Anderson, A. Grillo-López, C. Varns, K. S. Chambers, and N. Hanna. Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin’s B-cell lymphoma. *Biochem. Soc. Trans.*, 25:705–708, May 1997.

- [13] D. G. Maloney, A. J. Grillo-López, C. A. White, D. Bodkin, R. J. Schilder, J. A. Neidhart, N. Janakiraman, K. A. Foon, T. M. Liles, B. K. Dallaire, K. Wey, I. Royston, T. Davis, and R. Levy. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90:2188–2195, Sep 1997.
- [14] F. J. Esteva, V. Valero, D. Booser, L. T. Guerra, J. L. Murray, L. Pusztai, M. Cristofanilli, B. Arun, B. Esmaeli, H. A. Fritsche, N. Sneige, T. L. Smith, and G. N. Hortobagyi. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 20:1800–1808, Apr 2002.
- [15] R. Nahta and F. J. Esteva. In vitro effects of trastuzumab and vinorelbine in trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 53:186–190, Feb 2004.
- [16] D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, 344:783–792, Mar 2001.
- [17] N. Ferrara, K. J. Hillan, H. P. Gerber, and W. Novotny. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 3:391–400, May 2004.
- [18] N. Ferrara. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 3:795–803, Oct 2002.
- [19] G. Klement, S. Baruchel, J. Rak, S. Man, K. Clark, D. J. Hicklin, P. Bohlen, and R. S. Kerbel. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *J. Clin. Invest.*, 105:15–24, Apr 2000.
- [20] R. J. Kreitman. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 11:570–578, Oct 1999.
- [21] S. Jaracz, J. Chen, L. V. Kuznetsova, and I. Ojima. Recent advances in tumor-targeting anti-cancer drug conjugates. *Bioorg. Med. Chem.*, 13:5043–5054, Sep 2005.
- [22] H. Fuchs and C. Bachran. Targeted tumor therapies at a glance. *Curr Drug Targets*, 10:89–93, Feb 2009.
- [23] R. M. Macklis. Radioimmunotherapy as a therapeutic option for Non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Radiat Oncol*, 17:176–183, Jul 2007.
- [24] A. Otte, C. van de Wiele, and R. A. Dierckx. Radiolabeled immunotherapy in non-Hodgkin's lymphoma treatment: the next step. *Nucl Med Commun*, 30:5–15, Jan 2009.
- [25] P. R. Hamann, L. M. Hinman, I. Hollander, C. F. Beyer, D. Lindh, R. Holcomb, W. Hallett, H. R. Tsou, J. Upešlacis, D. Shochat, A. Mountain, D. A. Flowers, and I. Bernstein. Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. *Bioconjug. Chem.*, 13:47–58, 2002.
- [26] F. M. Foss. DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK): a new fusion protein technology. *Clin Lymphoma*, 1 Suppl 1:27–31, Nov 2000.
- [27] G. Manoukian and F. Hagemester. Denileukin diftitox: a novel immunotoxin. *Expert Opin Biol Ther*, 9:1445–1451, Nov 2009.

- [28] L. Polito, M. Bortolotti, V. Farini, M. Pedrazzi, P. L. Tazzari, and A. Bolognesi. ATG-saporin-S6 immunotoxin: a new potent and selective drug to eliminate activated lymphocytes and lymphoma cells. *Br. J. Haematol.*, 147:710–718, Dec 2009.
- [29] C. Bachran, I. Heisler, D. Bachran, K. Dassler, J. Ervens, M. F. Melzig, and H. Fuchs. Chimeric toxins inhibit growth of primary oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Biol. Ther.*, 7:237–242, Feb 2008.
- [30] C. Bachran, H. Dürkop, M. Sutherland, D. Bachran, C. Müller, A. Weng, M. F. Melzig, and H. Fuchs. Inhibition of tumor growth by targeted toxins in mice is dramatically improved by saponinum album in a synergistic way. *J. Immunother.*, 32:713–725, Sep 2009.
- [31] I. Barthelemy, D. Martineau, M. Ong, R. Matsunami, N. Ling, L. Benatti, U. Cavallaro, M. Soria, and D. A. Lappi. The expression of saporin, a ribosome-inactivating protein from the plant *Saponaria officinalis*, in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 268:6541–6548, Mar 1993.
- [32] F. Stirpe, S. Bailey, S. P. Miller, and J. W. Bodley. Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acids Res.*, 16:1349–1357, Feb 1988.
- [33] L. Barbieri, J. M. Ferreras, A. Barraco, P. Ricci, and F. Stirpe. Some ribosome-inactivating proteins depurinate ribosomal RNA at multiple sites. *Biochem. J.*, 286 (Pt 1):1–4, Aug 1992.
- [34] I. Heisler, J. Keller, R. Tauber, M. Sutherland, and H. Fuchs. A colorimetric assay for the quantitation of free adenine applied to determine the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins. *Anal. Biochem.*, 302:114–122, Mar 2002.
- [35] A. Weng, C. Bachran, H. Fuchs, and M. F. Melzig. Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type I ribosome-inactivating protein. *Chem. Biol. Interact.*, 176:204–211, Nov 2008.
- [36] U. Cavallaro, A. Nykjaer, M. Nielsen, and M. R. Soria. Alpha 2-macroglobulin receptor mediates binding and cytotoxicity of plant ribosome-inactivating proteins. *Eur. J. Biochem.*, 232:165–171, Aug 1995.
- [37] S. Bagga, M. V. Hosur, and J. K. Batra. Cytotoxicity of ribosome-inactivating protein saporin is not mediated through alpha2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett.*, 541:16–20, Apr 2003.
- [38] R. Vago, C. J. Marsden, J. M. Lord, R. Ippoliti, D. J. Flavell, S. U. Flavell, A. Ceriotti, and M. S. Fabbrini. Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells. *FEBS J.*, 272:4983–4995, Oct 2005.
- [39] L. Zhang, S. D. Moffatt-Bruce, A. A. Gaughan, J. J. Wang, A. Rajab, and G. A. Hadley. An anti-CD103 immunotoxin promotes long-term survival of pancreatic islet allografts. *Am. J. Transplant.*, 9:2012–2023, Sep 2009.
- [40] A. Wells. EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31:637–643, Jun 1999.
- [41] A. C. Dreux, D. J. Lamb, H. Modjtahedi, and G. A. Ferns. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 186:38–53, May 2006.
- [42] G. Carpenter and S. Cohen. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 265:7709–7712, May 1990.

- [43] E. Mishani, G. Abourbeh, M. Eiblmaier, and C. J. Anderson. Imaging of EGFR and EGFR tyrosine kinase overexpression in tumors by nuclear medicine modalities. *Curr. Pharm. Des.*, 14:2983–2998, 2008.
- [44] E. K. Rowinsky, G. H. Schwartz, J. A. Gollob, J. A. Thompson, N. J. Vogelzang, R. Figlin, R. Bukowski, N. Haas, P. Lockbaum, Y. P. Li, R. Arends, K. A. Foon, G. Schwab, and J. Dutcher. Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.*, 22:3003–3015, Aug 2004.
- [45] G. Damasus-Awatai and T. Freeman-Wang. Human papilloma virus and cervical screening. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 15:473–477, Dec 2003.
- [46] S. Ackermann, M. W. Beckmann, F. Thiel, and T. Bogenrieder. Topotecan in cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 17:1215–1223, 2007.
- [47] J. M. Tovar, O. V. Bazaldua, L. Vargas, and E. Reile. Human papillomavirus, cervical cancer, and the vaccines. *Postgrad Med*, 120:79–84, Jul 2008.
- [48] J. M. Tovar and O. V. Bazaldua. New quadrivalent HPV vaccine developments. *Postgrad Med*, 120:14–16, Nov 2008.
- [49] D. Subramanya and P. D. Grivas. HPV and cervical cancer: updates on an established relationship. *Postgrad Med*, 120:7–13, Nov 2008.
- [50] J. Fujimoto. Novel strategy of anti-angiogenic therapy for uterine cervical carcinomas. *Anti-cancer Res.*, 29:2665–2669, Jul 2009.
- [51] J. M. del Campo, A. Prat, A. Gil-Moreno, J. Pérez, and M. Parera. Update on novel therapeutic agents for cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 110:S72–76, Sep 2008.
- [52] W. F. Cheng, C. A. Chen, C. N. Lee, L. H. Wei, F. J. Hsieh, and C. Y. Hsieh. Vascular endothelial growth factor and prognosis of cervical carcinoma. *Obstet Gynecol*, 96:721–726, Nov 2000.
- [53] J. D. Wright, D. Viviano, M. A. Powell, R. K. Gibb, D. G. Mutch, P. W. Grigsby, and J. S. Rader. Bevacizumab combination therapy in heavily pretreated, recurrent cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 103:489–493, Nov 2006.
- [54] S. P. Mathur, R. S. Mathur, and R. C. Young. Cervical epidermal growth factor-receptor (EGFR) and serum insulin-like growth factor II (IGF-II) levels are potential markers for cervical cancer. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 44:222–230, Oct 2000.
- [55] P. M. Harari. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr. Relat. Cancer*, 11:689–708, Dec 2004.
- [56] A. M. Kersemaekers, G. J. Fleuren, G. G. Kenter, L. J. Van den Broek, S. M. Uljee, J. Hermans, and M. J. Van de Vijver. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 5:577–586, Mar 1999.
- [57] G. E. Kim, Y. B. Kim, N. H. Cho, H. C. Chung, H. R. Pyo, J. D. Lee, T. K. Park, W. S. Koom, M. Chun, and C. O. Suh. Synchronous coexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in carcinomas of the uterine cervix: a potential predictor of poor survival. *Clin. Cancer Res.*, 10:1366–1374, Feb 2004.

- [58] Y. Andersson, O. Engebraaten, and Ø. Fodstad. Synergistic anti-cancer effects of immunotoxin and cyclosporin in vitro and in vivo. *Br. J. Cancer*, 101:1307–1315, Oct 2009.
- [59] O. Güçlü-Ustündağ and G. Mazza. Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47:231–258, 2007.
- [60] C. Bachran, S. Bachran, M. Sutherland, D. Bachran, and H. Fuchs. Saponins in tumor therapy. *Mini Rev Med Chem*, 8:575–584, Jun 2008.
- [61] E. Wina, S. Muetzel, and K. Becker. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production—a review. *J. Agric. Food Chem.*, 53:8093–8105, Oct 2005.
- [62] P. Seeman. Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. *J. Cell Biol.*, 32:55–70, Jan 1967.
- [63] E. Baumann, G. Stoya, A. Völkner, W. Richter, C. Lemke, and W. Linss. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochem.*, 102:21–35, Feb 2000.
- [64] J. G. Hall, M. S. Birbeck, D. Robertson, J. Peppard, and E. Orlans. The use of detergents and immunoperoxidase reagents for the ultrastructural demonstration of internal immunoglobulin in lymph cells. *J. Immunol. Methods*, 19:351–359, 1978.
- [65] A. D. Bangham, R. W. Horne, A. M. Glauert, J. T. Dingle, and J. A. Lucy. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*, 196:952–955, Dec 1962.
- [66] B. H. Lee, S. M. Jeong, T. S. Ha, C. S. Park, J. H. Lee, J. H. Kim, D. H. Kim, J. S. Han, H. C. Kim, S. R. Ko, and S. Y. Nah. Ginsenosides regulate ligand-gated ion channels from the outside. *Mol. Cells*, 18:115–121, Aug 2004.
- [67] H. Gögelein and A. Hüby. Interaction of saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 773:32–38, Jun 1984.
- [68] M. Hu, K. Konoki, and K. Tachibana. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1299:252–258, Jan 1996.
- [69] R. Segal and I. Milo-Goldzweig. The susceptibility of cholesterol-depleted erythrocytes to saponin and saponin hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 512:223–226, Sep 1978.
- [70] G. M. Woldemichael and M. Wink. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *J. Agric. Food Chem.*, 49:2327–2332, May 2001.
- [71] S. Apers, S. Baronikova, J. B. Sindambiwe, M. Witvrouw, E. De Clercq, D. Vanden Berghe, E. Van Marck, A. Vlietinck, and L. Pieters. Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. *Planta Med.*, 67:528–532, Aug 2001.
- [72] C. Bachran, M. Sutherland, I. Heisler, P. Hebestreit, M. F. Melzig, and H. Fuchs. The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 231:412–420, Apr 2006.
- [73] W. Wang, Y. Zhao, E. R. Rayburn, D. L. Hill, H. Wang, and R. Zhang. In vitro anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 59:589–601, Apr 2007.

- [74] M. T. Sanders, L. E. Brown, G. Deliyannis, and M. J. Pearse. ISCOM-based vaccines: the second decade. *Immunol. Cell Biol.*, 83:119–128, Apr 2005.
- [75] Z. I. Rajput, S. H. Hu, C. W. Xiao, and A. G. Arijo. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B*, 8:153–161, Mar 2007.
- [76] P. Ebbesen, K. Dalsgaard, and M. Madsen. Prolonged survival of AKR mice treated with the saponin adjuvant Quil A. *Acta Pathol Microbiol Scand A*, 84:358–360, Jul 1976.
- [77] K. Okita, Q. Li, T. Murakamio, and M. Takahashi. Anti-growth effects with components of Sho-saiko-to (TJ-9) on cultured human hepatoma cells. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2:169–175, Mar 1993.
- [78] L. J. Yu, R. D. Ma, Y. Q. Wang, H. Nishino, J. Takayasu, W. Z. He, M. Chang, J. Zhen, W. S. Liu, and S. X. Fan. Potent anti-tumorigenic effect of tubeimoside 1 isolated from the bulb of *Bolbostemma paniculatum* (Maxim) Franquet. *Int. J. Cancer*, 50:635–638, Feb 1992.
- [79] H. Fuchs, D. Bachran, H. Panjideh, N. Schellmann, A. Weng, M. F. Melzig, M. Sutherland, and C. Bachran. Saponins as tool for improved targeted tumor therapies. *Curr Drug Targets*, 10:140–151, Feb 2009.
- [80] R. T. Wu, H. C. Chiang, W. C. Fu, K. Y. Chien, Y. M. Chung, and L. Y. Horng. Formosanin-C, an immunomodulator with antitumor activity. *Int. J. Immunopharmacol.*, 12:777–786, 1990.
- [81] Y. Kikuchi, H. Sasa, T. Kita, J. Hirata, T. Tode, and I. Nagata. Inhibition of human ovarian cancer cell proliferation in vitro by ginsenoside Rh2 and adjuvant effects to cisplatin in vivo. *Anticancer Drugs*, 2:63–67, Feb 1991.
- [82] G. Gaidi, M. Correia, B. Chauffert, J. L. Beltramo, H. Wagner, and M. A. Lacaille-Dubois. Saponins-mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxicity in human colon cancer cells. *Planta Med.*, 68:70–72, Jan 2002.
- [83] W. W. Jia, X. Bu, D. Philips, H. Yan, G. Liu, X. Chen, J. A. Bush, and G. Li. Rh2, a compound extracted from ginseng, hypersensitizes multidrug-resistant tumor cells to chemotherapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 82:431–437, Jul 2004.
- [84] M. Haddad, I. A. Khan, and M. A. Lacaille-Dubois. Two new prosapogenins from *Albizia adianthifolia*. *Pharmazie*, 57:705–708, Oct 2002.
- [85] M. Elbandy, T. Miyamoto, B. Chauffert, C. Delaude, and M. A. Lacaille-Dubois. Novel acylated triterpene glycosides from *Muraltia heisteria*. *J. Nat. Prod.*, 65:193–197, Feb 2002.
- [86] H. Myszka, D. Bednarczyk, M. Najder, and W. Kaca. Synthesis and induction of apoptosis in B cell chronic leukemia by diosgenyl 2-amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside hydrochloride and its derivatives. *Carbohydr. Res.*, 338:133–141, Jan 2003.
- [87] F. D. Chen, M. C. Wu, H. E. Wang, J. J. Hwang, C. Y. Hong, Y. T. Huang, S. H. Yen, and Y. H. Ou. Sensitization of a tumor, but not normal tissue, to the cytotoxic effect of ionizing radiation using *Panax notoginseng* extract. *Am. J. Chin. Med.*, 29:517–524, 2001.
- [88] P. Hebestreit and M. F. Melzig. Cytotoxic activity of the seeds from *Agrostemma githago* var. *githago*. *Planta Med.*, 69:921–925, Oct 2003.
- [89] I. Heisler, M. Sutherland, C. Bachran, P. Hebestreit, A. Schnitger, M. F. Melzig, and H. Fuchs. Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells. *J Control Release*, 106:123–137, Aug 2005.

-
- [90] S. J. Royle. The cellular functions of clathrin. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63:1823–1832, Aug 2006.
- [91] S. Mayor and R. E. Pagano. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8:603–612, Aug 2007.
- [92] A. Ciechanover, A. L. Schwartz, A. Dautry-Varsat, and H. F. Lodish. Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *J. Biol. Chem.*, 258:9681–9689, Aug 1983.
- [93] A. Dautry-Varsat. Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. *Biochimie*, 68:375–381, Mar 1986.
- [94] I. H. Pastan and M. C. Willingham. Receptor-mediated endocytosis of hormones in cultured cells. *Annu. Rev. Physiol.*, 43:239–250, 1981.
- [95] E. Ungewickell and D. Branton. Assembly units of clathrin coats. *Nature*, 289:420–422, Jan 1981.
- [96] T. Kirchhausen and S. C. Harrison. Protein organization in clathrin trimers. *Cell*, 23:755–761, Mar 1981.
- [97] T. Kirchhausen, S. C. Harrison, and J. Heuser. Configuration of clathrin trimers: evidence from electron microscopy. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, 94:199–208, Mar 1986.
- [98] E. M. Schmid, M. G. Ford, A. Burtsey, G. J. Praefcke, S. Y. Peak-Chew, I. G. Mills, A. Benmerah, and H. T. McMahon. Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly. *PLoS Biol.*, 4:e262, Sep 2006.
- [99] K. Takei, P. S. McPherson, S. L. Schmid, and P. De Camilli. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature*, 374:186–190, Mar 1995.
- [100] Y. Altschuler, S. M. Barbas, L. J. Terlecky, K. Tang, S. Hardy, K. E. Mostov, and S. L. Schmid. Redundant and distinct functions for dynamin-1 and dynamin-2 isoforms. *J. Cell Biol.*, 143:1871–1881, Dec 1998.
- [101] A. Roux, K. Uyhazi, A. Frost, and P. De Camilli. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*, 441:528–531, May 2006.
- [102] A. M. van der Blik, T. E. Redelmeier, H. Damke, E. J. Tisdale, E. M. Meyerowitz, and S. L. Schmid. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biol.*, 122:553–563, Aug 1993.
- [103] H. Damke, T. Baba, D. E. Warnock, and S. L. Schmid. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.*, 127:915–934, Nov 1994.
- [104] K. G. Rothberg, J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, and R. G. Anderson. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 68:673–682, Feb 1992.
- [105] G. J. Doherty and H. T. McMahon. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 78:857–902, 2009.
- [106] C. Lamaze, A. Dujancourt, T. Baba, C. G. Lo, A. Benmerah, and A. Dautry-Varsat. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell*, 7:661–671, Mar 2001.

- [107] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26:239–257, Aug 1972.
- [108] N. I. Walker, B. V. Harmon, G. C. Gobé, and J. F. Kerr. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*, 13:18–54, 1988.
- [109] P. Meier, A. Finch, and G. Evan. Apoptosis in development. *Nature*, 407:796–801, Oct 2000.
- [110] J. C. Rathmell and C. B. Thompson. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell*, 109 Suppl:97–107, Apr 2002.
- [111] J. V. McCarthy. Apoptosis and development. *Essays Biochem.*, 39:11–24, 2003.
- [112] D. Rossi and G. Gaidano. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*, 88:212–218, Feb 2003.
- [113] P. T. Daniel, T. Wieder, I. Sturm, and K. Schulze-Osthoff. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia*, 15:1022–1032, Jul 2001.
- [114] K. M. Boatright and G. S. Salvesen. Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15:725–731, Dec 2003.
- [115] S. J. Riedl and G. S. Salvesen. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8:405–413, May 2007.
- [116] R. S. Hotchkiss, A. Strasser, J. E. McDunn, and P. E. Swanson. Cell death. *N. Engl. J. Med.*, 361:1570–1583, Oct 2009.
- [117] J. C. Goldstein, C. Muñoz-Pinedo, J. E. Ricci, S. R. Adams, A. Kelekar, M. Schuler, R. Y. Tsien, and D. R. Green. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ.*, 12:453–462, May 2005.
- [118] L. P. Billen, A. Shamas-Din, and D. W. Andrews. Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene*, 27 Suppl 1:93–104, Dec 2008.
- [119] E. Lomonosova and G. Chinnadurai. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27 Suppl 1:2–19, Dec 2008.
- [120] J. Yu and L. Zhang. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 Suppl 1:71–83, Dec 2008.
- [121] H. Kim, M. Rafiuddin-Shah, H. C. Tu, J. R. Jeffers, G. P. Zambetti, J. J. Hsieh, and E. H. Cheng. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat. Cell Biol.*, 8:1348–1358, Dec 2006.
- [122] Q. Bao and Y. Shi. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.*, 14:56–65, Jan 2007.
- [123] D. J. Fawthrop, A. R. Boobis, and D. S. Davies. Mechanisms of cell death. *Arch. Toxicol.*, 65:437–444, 1991.
- [124] A. Lawen. Apoptosis-an introduction. *Bioessays*, 25:888–896, Sep 2003.
- [125] N. Festjens, T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757:1371–1387, 2006.

- [126] P. Golstein and G. Kroemer. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.*, 32:37–43, Jan 2007.
- [127] W. X. Zong and C. B. Thompson. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*, 20:1–15, Jan 2006.
- [128] M. Leist, B. Single, A. F. Castoldi, S. Kühnle, and P. Nicotera. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*, 185:1481–1486, Apr 1997.
- [129] D. J. McConkey and S. Orrenius. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.*, 59:775–783, Jun 1996.
- [130] L. J. Marnett. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21:361–370, Mar 2000.
- [131] A. J. Watson, J. N. Askew, and R. S. Benson. Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition prevents necrosis induced by H₂O₂ but not apoptosis. *Gastroenterology*, 109:472–482, Aug 1995.
- [132] S. W. Yu, H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson, and V. L. Dawson. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297:259–263, Jul 2002.
- [133] M. Endres, Z. Q. Wang, S. Namura, C. Waeber, and M. A. Moskowitz. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 17:1143–1151, Nov 1997.
- [134] P. Waring. Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch. Biochem. Biophys.*, 434:33–42, Feb 2005.
- [135] P. G. Clarke. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.*, 181:195–213, 1990.
- [136] A. M. Cuervo. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.*, 14:70–77, Feb 2004.
- [137] B. Levine and D. J. Klionsky. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*, 6:463–477, Apr 2004.
- [138] A. Longatti and S. A. Tooze. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ.*, 16:956–965, Jul 2009.
- [139] N. Mizushima. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.*, 12 Suppl 2:1535–1541, Nov 2005.
- [140] D. J. Klionsky. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell. Sci.*, 118:7–18, Jan 2005.
- [141] Y. Tsujimoto and S. Shimizu. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ.*, 12 Suppl 2:1528–1534, Nov 2005.
- [142] B. Levine and J. Yuan. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.*, 115:2679–2688, Oct 2005.
- [143] S. Shimizu, T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C. B. Thompson, and Y. Tsujimoto. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.*, 6:1221–1228, Dec 2004.

- [144] J. J. Lum, D. E. Bauer, M. Kong, M. H. Harris, C. Li, T. Lindsten, and C. B. Thompson. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120:237–248, Jan 2005.
- [145] Z. Yue, S. Jin, C. Yang, A. J. Levine, and N. Heintz. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:15077–15082, Dec 2003.
- [146] L. Yu, A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E. H. Baehrecke, and M. J. Leonardo. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, 304:1500–1502, Jun 2004.
- [147] D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557–580, Jun 1983.
- [148] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, Aug 1970.
- [149] X. D. Zhang, S. K. Gillespie, and P. Hersey. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol. Cancer Ther.*, 3:187–197, Feb 2004.
- [150] A. M. Pearson, K. Baksa, M. Rämets, M. Protas, M. McKee, D. Brown, and R. A. Ezekowitz. Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.*, 5:815–824, Aug 2003.
- [151] J. Anido, P. Matar, J. Albanell, M. Guzmán, F. Rojo, J. Arribas, S. Averbuch, and J. Baselga. ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 9:1274–1283, Apr 2003.
- [152] L. H. Wang, K. G. Rothberg, and R. G. Anderson. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.*, 123:1107–1117, Dec 1993.
- [153] A. Sofer and A. H. Futerman. Cationic amphiphilic drugs inhibit the internalization of cholera toxin to the Golgi apparatus and the subsequent elevation of cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, 270:12117–12122, May 1995.
- [154] A. Weng, D. Bachran, C. Görick, C. Bachran, H. Fuchs, and 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.*, 75:1421–1422, Oct 2009.
- [155] A. Weng. Untersuchungen zur Wirkung von Saponinen als Verstärker der Penetration von Proteinen im Zellmodell. Dissertation, 2009.
- [156] I. Heisler, J. Keller, R. Tauber, M. Sutherland, and H. Fuchs. A cleavable adapter to reduce nonspecific cytotoxicity of recombinant immunotoxins. *Int. J. Cancer*, 103:277–282, Jan 2003.
- [157] H. Fuchs, C. Bachran, T. Li, I. Heisler, H. Dürkop, and M. Sutherland. A cleavable molecular adapter reduces side effects and concomitantly enhances efficacy in tumor treatment by targeted toxins in mice. *J Control Release*, 117:342–350, Feb 2007.
- [158] I. Cadron, T. Van Gorp, F. Amant, K. Leunen, P. Neven, and I. Vergote. Chemotherapy for recurrent cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 107:S113–118, Oct 2007.

- [159] P. Heffeter, U. Jungwirth, M. Jakupec, C. Hartinger, M. Galanski, L. Elbling, M. Micksche, B. Keppler, and W. Berger. Resistance against novel anticancer metal compounds: differences and similarities. *Drug Resist. Updat.*, 11:1–16, 2008.
- [160] P. Borst, S. Rottenberg, and J. Jonkers. How do real tumors become resistant to cisplatin? *Cell Cycle*, 7:1353–1359, May 2008.
- [161] S. R. Roffler, M. H. Yu, B. M. Chen, E. Tung, and M. Y. Yeh. Therapy of human cervical carcinoma with monoclonal antibody-Pseudomonas exotoxin conjugates. *Cancer Res.*, 51:4001–4007, Aug 1991.
- [162] M. Y. Yeh, S. R. Roffler, and M. H. Yu. Doxorubicin: monoclonal antibody conjugate for therapy of human cervical carcinoma. *Int. J. Cancer*, 51:274–282, May 1992.
- [163] R. Hassan, M. R. Lerner, D. Benbrook, S. A. Lightfoot, D. J. Brackett, Q. C. Wang, and I. Pastan. Antitumor activity of SS(dsFv)PE38 and SS1(dsFv)PE38, recombinant antimesothelin immunotoxins against human gynecologic cancers grown in organotypic culture in vitro. *Clin. Cancer Res.*, 8:3520–3526, Nov 2002.
- [164] C. H. Chang, L. C. Tsai, S. T. Chen, C. C. Yuan, M. W. Hung, B. T. Hsieh, P. L. Chao, T. H. Tsai, and T. W. Lee. Radioimmunotherapy and apoptotic induction on CK19-overexpressing human cervical carcinoma cells with Re-188-mAbCx-99. *Anticancer Res.*, 25:2719–2728, 2005.
- [165] E. S. Kim, F. R. Khuri, and R. S. Herbst. Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr Opin Oncol*, 13:506–513, Nov 2001.
- [166] N. I. Goldstein, M. Prewett, K. Zuklys, P. Rockwell, and J. Mendelsohn. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res.*, 1:1311–1318, Nov 1995.
- [167] M. Prewett, P. Rockwell, R. F. Rockwell, N. A. Giorgio, J. Mendelsohn, H. I. Scher, and N. I. Goldstein. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 19:419–427, Nov 1996.
- [168] M. Prewett, M. Rothman, H. Waksal, M. Feldman, N. H. Bander, and D. J. Hicklin. Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res.*, 4:2957–2966, Dec 1998.
- [169] R. S. Herbst and W. K. Hong. IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer. *Semin. Oncol.*, 29:18–30, Oct 2002.
- [170] P. Hebestreit, A. Weng, C. Bachran, H. Fuchs, and M. F. Melzig. Enhancement of cytotoxicity of lectins by Saponinum album. *Toxicon*, 47:330–335, Mar 2006.
- [171] A. Weng, M. F. Melzig, C. Bachran, and H. Fuchs. Enhancement of saporin toxicity against U937 cells by Gypsophila saponins. *J Immunotoxicol*, 5:287–292, Jul 2008.
- [172] D. Bachran, S. Schneider, C. Bachran, R. Urban, A. Weng, M. F. Melzig, C. Hoffmann, A. M. Kaufmann, and H. Fuchs. Epidermal growth factor receptor expression affects the efficacy of the combined application of saponin and a targeted toxin on human cervical carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, epub ahead, 2009.
- [173] C. Bachran, A. Weng, D. Bachran, S. Riese, N. Schellmann, M. Melzig, and H. Fuchs. The distribution of saponins in vivo affects their synergy with chimeric toxins against tumours expressing human epidermal growth factor receptors in mice. *Br J Pharmacol*, epub ahead, Dec 2009.

- [174] W. Boll, M. Ehrlich, R. J. Collier, and T. Kirchhausen. Effects of dynamin inactivation on pathways of anthrax toxin uptake. *Eur. J. Cell Biol.*, 83:281–288, Jul 2004.
- [175] P. A. Orlandi and P. H. Fishman. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.*, 141:905–915, May 1998.
- [176] E. Smythe and K. R. Ayscough. Actin regulation in endocytosis. *J. Cell. Sci.*, 119:4589–4598, Nov 2006.
- [177] A. S. Robertson, E. Smythe, and K. R. Ayscough. Functions of actin in endocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66:2049–2065, Jul 2009.
- [178] L. M. Fujimoto, R. Roth, J. E. Heuser, and S. L. Schmid. Actin assembly plays a variable, but not obligatory role in receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Traffic*, 1:161–171, Feb 2000.
- [179] L. S. Johnson, K. W. Dunn, B. Pytowski, and T. E. McGraw. Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor’s internalization motif. *Mol. Biol. Cell*, 4:1251–1266, Dec 1993.
- [180] H. Schmidt-Glenewinkel, I. Vacheva, D. Hoeller, I. Dikic, and R. Eils. An ultrasensitive sorting mechanism for EGF receptor endocytosis. *BMC Syst Biol*, 2:32, 2008.
- [181] A. Weng, C. Bachran, H. Fuchs, E. Krause, H. Stephanowitz, and M. F. Melzig. Enhancement of saporin cytotoxicity by Gypsophila saponins—more than stimulation of endocytosis. *Chem. Biol. Interact.*, 181:424–429, Oct 2009.
- [182] R. A. Spooner, D. C. Smith, A. J. Easton, L. M. Roberts, and J. M. Lord. Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Virol. J.*, 3:26, 2006.
- [183] S. Schneider. Verschiedene Liganden des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors als Komponente chimärer Toxine in der gerichteten Tumorthherapie. Diplomarbeit, 2009.
- [184] G. Bergamaschi, V. Perfetti, L. Tonon, A. Novella, C. Lucotti, M. Danova, M. J. Glennie, G. Merlini, and M. Cazzola. Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis. *Br. J. Haematol.*, 93:789–794, Jun 1996.
- [185] A. Bolognesi, P. L. Tazzari, F. Olivieri, L. Polito, B. Falini, and F. Stirpe. Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. *Int. J. Cancer*, 68:349–355, Nov 1996.
- [186] D. Sikriwal, P. Ghosh, and J. K. Batra. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40:2880–2888, 2008.
- [187] L. Polito, M. Bortolotti, V. Farini, M. G. Battelli, L. Barbieri, and A. Bolognesi. Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41:1055–1061, May 2009.
- [188] J. Thorburn, H. Horita, J. Redzic, K. Hansen, A. E. Frankel, and A. Thorburn. Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death Differ.*, 16:175–183, Jan 2009.

- [189] S. Soltysik, J. Y. Wu, J. Recchia, D. A. Wheeler, M. J. Newman, R. T. Coughlin, and C. R. Kensil. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine*, 13:1403–1410, 1995.
- [190] C. N. Armah, A. R. Mackie, C. Roy, K. Price, A. E. Osbourn, P. Bowyer, and S. Ladha. The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophys. J.*, 76:281–290, Jan 1999.
- [191] M. F. Melzig, P. Hebestreit, G. Gaidi, and M. A. Lacaille-Dubois. Structure-activity-relationship of saponins to enhance toxic effects of agrostin. *Planta Med.*, 71:1088–1090, Nov 2005.

Lebenslauf

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

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten (in Fachzeitschriften)

D. Bachran, S. Schneider, C. Bachran, R. Urban, A. Weng, M. F. Melzig, H. Fuchs
The endocytic uptake pathways of targeted toxins are influenced by synergistically acting Gypsophila saponins.

Mol. Cell. Biol. (2009), *submitted*

R. Urban, C. Bachran, D. Mewis, M. J. Dörfel, N. Schellmann, **D. Bachran**, H. Fuchs
Quantitation of saporin- and ricin-mediated adenine release.

Anal. Bioanal. Chem. (2009), *submitted*

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

A convenient method for saponin isolation in tumour therapy.

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 878(7-8):713-8 (2010)

D. Bachran, S. Schneider, C. Bachran, R. Urban, A. Weng, M. F. Melzig, C. Hoffmann, A. M. Kaufmann, H. Fuchs

Epidermal growth factor receptor expression affects the efficacy of the combined application of saponin and a targeted toxin on human cervical carcinoma cells.

Int. J. Cancer (2010), *epub ahead*

C. Bachran, A. Weng, **D. Bachran**, S. Riese, N. Schellmann, A. Weng, M. F. Melzig, H. Fuchs

The distribution of saponins in vivo affects their synergy with chimeric toxins against tumours expressing human epidermal growth factor receptors in mice.

Br J Pharmacol. 159(2):345-52 (2010)

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 dramatically improved by Saponinum album in a synergistic way.

J Immunother. 32(7):713-25 (2009)

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. 75(13):1421-2 (2009)

C. Bachran, R. Urban, **D. Bachran**, R. Tauber, H. Fuchs
Der Nachweis von Diphtherietoxinaktivität durch einen hoch sensitiven colorimetrischen Festphasen-assay.
Klinische Chemie Mitteilungen (4-5):106-14 (2008)

C. Bachran, I. Heisler, **D. Bachran**, K. Dassler, M. F. Melzig, J. Ervens, H. Fuchs
Chimeric toxins inhibit growth of primary oral squamous cell carcinoma cells.
Cancer Biol Ther. 7(2):234-239 (2008)

C. Bachran, M. Sutherland, **D. Bachran**, H. Fuchs
Quantification of diphtheria toxin-mediated ADP-ribosylation in a solid phase assay.
Clin Chem. 53(9): 1676-83 (2007)

Übersichtsartikel (in Fachzeitschriften)

H. Fuchs, **D. Bachran**, H. Panjideh, N. Schellmann, A. Weng, M. F. Melzig, M. Sutherland, C. Bachran
Saponins as tool for improved targeted tumor therapies.
Curr Drug Targets 10(2):140-51 (2009)

C. Bachran, S. Bachran, M. Sutherland, **D. Bachran**, H. Fuchs
Saponins in tumor therapy.
Mini Rev Med Chem. 8(6): 575-584 (2008)

C. Bachran, M. Sutherland, **D. Bachran**, H. Fuchs.
Patents on immunotoxins and chimeric toxins for the treatment of cancer.
Recent Patents on Drug Delivery and Formulation 1(2): 105-115 (2007)

Publikationen in Buchform

D. Bachran

Etablierung eines Systems zur Herstellung rekombinanter Herpesviren durch Red/ET-Rekombination.
Diplom in Biologie, Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin 2006

Auszeichnungen

D. Bachran

1. Platz im Speed Lecture Award

Saponin und chimäre Toxine im Einsatz gegen Krebs

7. BIONNALE der Biotechnologie in Berlin-Brandenburg (BioTOP), 28.-30.04.2009, Berlin, Deutschland

28.04.2009

Vorträge (Vortragender unterstrichen)

D. Bachran, C. Bachran, R. Urban, U. Hagen, R. Tauber, H. Fuchs

Korrelation zwischen der EGFR-Expression bei Zervixkarzinomzellen und der Wirkung der Kombinationsbehandlung mit Saponin und einem chimären Toxin.

6. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 07.-10.10.2009, Leipzig, Deutschland

09.10.2009, Postervorstellung im Rahmen einer moderierten Posterführung

H. Fuchs, **D. Bachran**, H. Dürkop, M. Sutherland, A. Weng, R. Urban, S. Schneider, C. Müller, M. F. Melzig, C. Bachran

Saponins as tool for drastically improved targeted tumor therapy.

4th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology: The 2nd Targeted Tumor Therapies, 01.-03.04.2009, Berlin, Deutschland

03.04.2009

C. Bachran, H. Panjideh, R. Urban, M. F. Melzig, **D. Bachran**, H. Fuchs

Combined application of saponins and chimeric toxins for tumor treatment in mice.

The 2nd Midnight Sun Meeting on Drug Transport and Drug Delivery, 25.-27.07.2008, Tromsø, Norwegen

26.07.2008

H. Fuchs, **D. Bachran**, T. Li, G. Drywa, I. Heisler, H. Dürkop, M. Sutherland, C. Bachran

A molecular adapter containing cell penetrating and cleavable peptides increases efficacy of targeted toxins in mice and reduces side effects.

2nd Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules, 19.-21.09.2007, Grenoble, Frankreich

21.09.2007

Abstracts (in Fachzeitschriften)

D. Bachran, C. Bachran, R. Urban, U. Hagen, R. Tauber, H. Fuchs

The relation between epidermal growth factor receptor expression on tumor cells and growth inhibition by saponin and chimeric toxins.

Clin. Chem. Lab. Med. 47(9):A60 O11 (2009)

R. Urban, C. Bachran, **D. Bachran**, R. Tauber, H. Fuchs
Adenine quantification by HPLC.
Clin. Chem. Lab. Med. 46(9):A173 A096 (2008)

D. Bachran, C. Bachran, R. Tauber, H. Fuchs
Induction of apoptosis by chimeric toxins containing saporin.
Clin. Chem. Lab. Med. 44(9):A144 P75 (2006)

C. Bachran, **D. Bachran**, R. Tauber, M. F. Melzig, H. Fuchs
The saponin-mediated specific drug uptake varies on different tumor cell lines.
Clin. Chem. Lab. Med. 44(9):A145 P78 (2006)

Abstracts (in Tagungsbänden)

A. Weng, C. Bachran, **D. Bachran**, H. Fuchs, K. Jenett-Siems, M. F. Melzig
In vitro characterisation of $^3\text{[H]}$ Gypsophila saponins.
In: International conference on Saponins, new trends in saponins. Nancy, France, 9-11 July, 2009.

D. Bachran, S. Schneider, R. Urban, A. Weng, M. F. Melzig, C. Bachran, H. Fuchs
Combination of saponin and a chimeric toxin induces apoptosis.
In: 4th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology: The 2nd Targeted Tumor Therapies (Fabisch-Stiftung, H. Fuchs, Herausgeber), Page 64, Berlin, Deutschland 2009

H. Fuchs, **D. Bachran**, H. Dürkop, M. Sutherland, A. Weng, R. Urban, S. Schneider, C. Müller, M. F. Melzig, C. Bachran.
Saponins as tool for drastically improved targeted tumor therapy.
In: 2nd Targeted Tumor Therapies (Fabisch Foundation, H. Fuchs, Hrsg.), Seite 38, M-22, Berlin 2009

C. Bachran, H. Panjideh, R. Urban, M. F. Melzig, **D. Bachran**, H. Fuchs
Combined application of saponins and chimeric toxins for tumor treatment in mice.
In: The 2nd Midnight Sun Meeting on Drug Transport and Drug Delivery (University of Tromsø, Herausgeber), Page 30, Tromsø, Norwegen 2008

D. Bachran, C. Bachran, M. F. Melzig, A. M. Kaufmann, R. Tauber, H. Fuchs
The impact of saponin and chimeric toxins on primary cervical carcinoma cells.
In: The 2nd Midnight Sun Meeting on Drug Transport and Drug Delivery (University of Tromsø, Herausgeber), Page 48, Tromsø, Norwegen 2008

D. Bachran, C. Bachran, M. F. Melzig, R. Tauber, H. Fuchs
Saponins Mediate Drastically Enhanced Growth Inhibition of Chimeric Toxins on Cervix Carcinoma Cells
In: 3rd Mildred Scheel Cancer Conference Königswinter, Deutschland 2008

H. Fuchs, **D. Bachran**, T. Li, G. Drywa, I. Heisler, H. Dürkop, M. Sutherland, C. Bachran
 A molecular adapter containing cell penetrating and cleavable peptides increases efficacy of targeted toxins in mice and reduces side effects.

In: 2nd Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules (HumProTher, UJF Grenoble, CRBM-CNRS Montpellier, Herausgeber), Seite 26, Grenoble, Frankreich 2007

C. Bachran, **D. Bachran**, M. F. Melzig, H. Fuchs

EGF receptor-specific tumor therapy in a mouse model.

In: Targets, drugs and carriers, Symposium of the Forschergruppe 463, Berlin, Deutschland 2007

D. Bachran, C. Bachran, M. F. Melzig, R. Tauber, H. Fuchs

The cytotoxicity of two chimeric toxins with different toxic moieties is drastically enhanced by saponin.

In: Frontiers in Medicinal Chemistry (Gesellschaft Deutscher Chemiker, Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, Herausgeber), Seite 95, Berlin, Deutschland 2007

C. Bachran, **D. Bachran**, M. F. Melzig, H. Fuchs

Plant glycosides and chimeric toxins drastically enhance the impact of a targeted therapy on cervix carcinoma cells in a synergistic effect.

In: 2. Wissenschaftliches Symposium der Kommission Translationale Forschung der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, Herausgeber), Seite 69, Bergisch Gladbach, Deutschland 2007

C. Bachran, **D. Bachran**, M. F. Melzig, H. Fuchs

Tumor therapy with protein drugs is drastically enhanced by glycosides in vivo.

In: International Symposium in Polymer Therapeutics ISPT-07 (Freie Universität Berlin, Herausgeber), Seite 51, Berlin, Deutschland 2007

D. Bachran, C. Bachran, M. F. Melzig, R. Tauber, H. Fuchs

Relevance of saponin structure for enhanced specific uptake of chimeric toxins.

In: The 3rd Glycan Forum in Berlin (Charité, BioTOP Berlin Brandenburg, Herausgeber), Seite 18, Berlin, Deutschland 2007

Danksagung

Einleitend bedanke ich mich sehr bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Hendrik Fuchs und Herrn Prof. Rupert Mutzel für die Begutachtung meiner Dissertation.

Hendrik danke ich auch dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Arbeitsgruppe diese interessante Arbeit anzufertigen. Weiterhin möchte ich mich bei Hendrik für seinen erfolgreichen Einsatz bei der Beantragung und Beschaffung von Geldmitteln für meine Arbeit bedanken. Danke, dass du keine Bedenken hattest zwei Geschwister so eng zusammen arbeiten zu lassen – auch wenn es dir am Anfang kleine organisatorische Schwierigkeiten bereitet hat. Aber insbesondere auch deine hilfreichen Kommentare und Anregungen haben sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Vielen Dank auch, dass du so eine angenehme Arbeitsatmosphäre schaffst. Natürlich will ich hier auch nicht die jährliche Nikolaus-Motivase und die vorweihnachtlichen Dienstagsseminare vergessen zu erwähnen.

Da meine Arbeit nicht ohne finanzielle Mittel möglich gewesen wäre, bedanke ich mich bei der Wilhelm-Sander-Stiftung für die Finanzierung der ersten sieben Monate. Ein großer Dank gilt ebenso der Sonnenfeld-Stiftung, die mich für zwei weitere Jahre finanziert hat und mir dadurch ein zügiges und konzentriertes Arbeiten ermöglicht hat. Auch für die Zustimmung zur Vergabe eines hilfreichen NaFöG-Abschlußstipendiums bedanke ich mich ganz herzlich.

Bei Herrn Prof. Matthias Melzig und Herrn Dr. Alexander Weng bedanke ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Saponine, die essentiell notwendig zur Durchführung meiner Arbeit waren.

Während der vergangenen Jahre am ZLP habe ich viele Mitarbeiter kommen und gehen sehen. Bei einigen fiel es mir schwer Abschied zu nehmen, aber ich konnte mich auch immer wieder auf neue Gesichter freuen. Ich bedanke mich bei all unseren vielen Azubis und unseren TAs für ihr Interesse an unserer Arbeit und für die Bereicherung unseres Laboralltags. Für die lehrreiche, spannende, angenehme und oft auch lustige Zeit im Labor und außerhalb bedanke ich mich sehr bei meinem Labor, der AG Dervedde und der AG Huber. Vielen Dank Claudia, Dirk, Figen, Franziska, Hossein, Jörg, Julie, Kai, Katrin, Konrad, Luise, Maria, Max, Nicole, Patricia, Romy, Sebastian, Sonni, Stefanie,

Steffi, Sven, Thomas, Tobi und Ulli. Ich werde die Zeit am ZLP mit euch immer in guter Erinnerung behalten.

Sebastian, vielen Dank für deine immerwährende Hilfsbereitschaft im Labor und im Privaten. Ich freue mich, dass wir so gut zusammen gearbeitet haben.

Auch bei meiner Laborfreundin Romy bedanke ich mich ganz herzlich. Ich werde wohl nie vergessen, wie ruhig und schüchtern du warst, als du bei uns angefangen hast. Und was ist daraus geworden! Ich bin sehr froh, dass du zu uns gekommen bist und wir so lange nebeneinander arbeiten konnten.

Bei Steffi bedanke ich mich auch sehr für ihre lustige und freche Art. Zu Anfang noch ganz lieb und dann flogen die grünen Handtücher. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit dir zusammenzuarbeiten. Vielen Dank für deine Hilfsbereitschaft in allen Dingen. Ein ganz großes Dankeschön geht an meinen Bruder Christopher. Er hat mich auf die Idee gebracht zusammen mit ihm zu arbeiten und bei Hendrik meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich habe diese Entscheidung nie bereut. Es hat mir immer sehr viel Spaß gemacht mit dir zusammen zu arbeiten und uns als „eingespieltes Geschwisterteam“ zu zeigen. Ich konnte viel von dir lernen. Du hast mir damit einen sehr guten Start ins echte Forscherleben ermöglicht. Vielen Dank.

Daniel und Karsten danke ich für ihr eifriges Korrigieren. Es war für mich sehr interessant zu sehen, was für Kritik und Vorschläge von Fachfremden kommt. Weiterhin bedanke ich mich bei Daniel und Felina für die Bereitstellung von ein wenig Hardware, die mir zur rechten Zeit schnell weiter geholfen hat.

Mama und Papa, bei euch Beiden muss ich mich für so Vieles bedanken. Ich bin sehr froh, dass ihr es mir ermöglicht habt zu studieren und meine Doktorarbeit anzufertigen. Danke, dass ihr mich darin bestärkt habt. Auch für euer fleißiges und schnelles Korrigieren danke ich euch. Vielen Dank für eure Unterstützung.

Joop, danke dass du für mich da bist.

Zum Schluss bedanke ich mich noch bei Nicole und Joop für die Inspiration, meine Arbeit mit \LaTeX zu schreiben. Auch wenn es manchmal etwas länger gedauert hat eine Lösung zu finden, hat es mir doch auch sehr viel Spaß gemacht das Internet nach Einstellungen für meine gewünschte Formatierung zu durchsuchen. Joop, vielen Dank für die Hilfe bei meinen Problemchen mit \LaTeX .