

**Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizität zwischen Saponinen und
Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I**

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

Dipl. Pharm. Stefan Böttger

aus Berlin

(2013)

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.12.2009 bis 15.11.2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias F. Melzig am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Fuchs

Datum der Disputation: 10.12.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Saponine	1
1.1.1 Saponine der Caryophyllaceae	4
1.1.1.1 <i>Agrostemma githago</i> L. (Caryophyllaceae)	7
1.1.1.2 Saponinum album	9
1.2 Synergistische Zytotoxizität	10
1.3 Ribosomen inaktivierende Proteine (RIP)	11
1.4 Zielsetzung	14
2 Materialien und Methoden	15
2.1 Geräte	15
2.1.1 Pflanzenextraktion	15
2.1.2 Stoffisolation und Strukturaufklärung	15
2.1.2.1 HPLC	15
2.1.2.2 HPLC-ESI-TOF-MS und ESI-TOF-MS	15
2.1.2.3 NMR	15
2.1.3 Zellkultur	16
2.1.4 Zyto- und Membrantoxizitätsuntersuchungen	16
2.1.5 Oberflächenspannungsmessungen	16
2.1.6 Radioanalytische Untersuchungen	16
2.1.7 Sonstige Geräte, Waagen und Zentrifugen	16
2.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.3 Zelllinien	18
2.3.1 NIH-3T3/HER14	18
2.3.2 ECV-304	18
2.4 Chemikalien, Medien und Puffer	19
2.4.1 Pflanzenextraktion, Stoffisolation und Strukturaufklärung	19
2.4.2 Zellkultur	19
2.4.3 Zyto- und Membrantoxizitätsuntersuchungen	19
2.4.4 Radioanalytische Untersuchungen	20
2.5 Untersuchte Saponine	21

2.6	Untersuchte Pflanzen, Drogen und Saponinum album	22
2.6.1	<i>Gypsophila oldhamiana</i> MIQ. (Caryophyllaceae)	22
2.6.2	<i>Gypsophila pacifica</i> KOM. (Caryophyllaceae)	23
2.6.3	<i>Gypsophila arrostii</i> GUSS. (Caryophyllaceae)	24
2.6.4	<i>Agrostemma githago</i> L. (Caryophyllaceae)	25
2.6.5	<i>Saponaria officinalis</i> L. (Caryophyllaceae)	26
2.6.6	<i>Silene vulgaris</i> (MOENCH) GARCKE (Caryophyllaceae)	26
2.6.7	<i>Vaccaria hispanica</i> (MILL.) RAUSCHERT (Caryophyllaceae)	27
2.6.8	Saponinum album	27
2.7	Phytochemische Methoden der Extraktion, Isolation und Strukturaufklärung	28
2.7.1	Extraktion	28
2.7.2	Isolation	28
2.7.3	Strukturaufklärung	29
2.8	Zell- und membranbiologische Methoden	30
2.8.1	Kultivierung der Zellen	30
2.8.1.1	Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saporin an ECV-304-Zellen	30
2.8.1.2	Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saponinum album an ECV-304-Zellen	31
2.8.1.3	Untersuchungen zur Zytotoxizität von ausgewählten Saponinen und Extrakten an ECV-304-Zellen	31
2.8.1.4	Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saponinen aus <i>Agrostemma githago</i> L. an ECV-304-Zellen	32
2.8.1.5	Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saporin-EGF an NIH-3T3/HER14-Zellen	32
2.8.2	MTT-Assay	33
2.8.3	DNA-Quantifizierung	35
2.8.4	Untersuchungen zur Membrantoxizität / LDH-Assay	36
2.9	Oberflächenspannungsmessungen	38
2.10	Radioanalytische Methoden	39
2.10.1	Gekühlte konzentrationsabhängige ³ H-Cholesterolaufnahme	39
2.10.2	Ungekühlte kompetitive, konzentrationsabhängige ³ H-Cholesterolaufnahme	40
2.10.3	Zeitabhängige ³ H-Cholesterolaufnahme	40
2.10.4	Beeinflussung der ³ H-Cholesterolaufnahme durch Saponine	41
2.10.5	Beeinflussung der ³ H-Cholesterolfreisetzung durch Saponine	41
2.10.6	Beeinflussung des endosomalen ³ H-Cholesterolgehalts durch SA1641	42
2.11	Statistische Methoden	43

3	Ergebnisse	44
3.1	Saponinisolation aus Pflanzen, Drogen und Saponinum album	44
3.1.1	Untersuchung von Extrakten aus Pflanzen und Drogen	44
3.1.2	Saponinisolation aus Saponinum album	49
3.1.3	Saponinisolation aus <i>Agrosetemma githago</i> L.	53
3.2	Zellbiologische Untersuchungen zur Zytotoxizität und zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung	62
3.2.1	Zytotoxizität von Saporin auf ECV-304-Zellen	63
3.2.2	Zytotoxizität von Saponinum album auf ECV-304-Zellen	64
3.2.3	Zytotoxizität ausgewählter Saponine und Extrakte auf ECV-304-Zellen	65
3.2.4	Zytotoxizität isolierter Saponine aus <i>Agrosetemma githago</i> L. auf ECV 304-Zellen	75
3.2.5	Zytotoxizität von Saporin-EGF auf NIH-3T3/HER14-Zellen	76
3.3	Membran- und Oberflächenspannungsuntersuchungen	77
3.4	Radioanalytische Untersuchungen	79
3.4.1	Gekühlte konzentrationsabhängige ³ H-Cholesterolaufnahme	79
3.4.2	Ungekühlte kompetitive konzentrationsabhängige ³ H-Cholesterolaufnahme	79
3.4.3	Zeitabhängige ³ H-Cholesterolaufnahme	80
3.4.4	Beeinflussung der ³ H-Cholesterolaufnahme und –freisetzung durch Saponine	82
3.4.5	Beeinflussung des endosomalen ³ H-Cholesterolgehalts durch SA1641	85
4	Diskussion	87
4.1	Suche nach geeigneten Saponinen	87
4.2	Validierung eines Testsystems zur Testung von Saponinen auf (synergistische) Zytotoxizitätsverstärkung	91
4.3	Testung von Saponinen auf synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I	95
4.3.1	Oleanolsäure als Aglykon	98
4.3.2	Hydroxyoleanolsäurederivate als Aglykon	98
4.3.3	Andere Derivate der Oleanolsäure als Aglykon	99
4.3.4	Gypsogenin als Aglykon	99
4.3.5	Hydroxygypsogeninderivate als Aglykon	101
4.3.6	Sonstige Saponine	103
4.3.7	Schlussfolgerungen aus den Zytotoxizitätsuntersuchungen der Saponine	104
4.4	Untersuchung der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung eines RIP-I/Ligand-Proteinkonjugats an Ligandenrezeptor-positiven Zellen	106
4.5	Untersuchungen zur Oberflächenaktivität von ausgewählten Saponinen	107
4.6	Untersuchungen zur Beeinflussung des Membrancholesterols	113
4.6.1	Entwicklung eines zellbasierten Modells zur Untersuchung der Beeinflussung des Membrancholesterols durch Saponine	114

Inhaltsverzeichnis	IV	
4.6.2	Untersuchung der Saponin abhängigen ³ H-Cholesterolfreisetzung und der Saponin abhängigen Störung der ³ H-Cholesterolaufnahme	115
4.6.3	Untersuchungen zur Beeinflussung des Cholesterolgehalts endosomaler Membranen	117
5	Zusammenfassung / Summary	120
	Literaturverzeichnis	123
	Abbildungsverzeichnis	132
	Tabellenverzeichnis	135
	Publikationsverzeichnis	136
	Danksagung	138
	Lebenslauf	139
	Eidesstattliche Erklärung	140

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
B	bisdesmosidische Saponine
CMC	<i>Critical micell concentration</i> (Kritische Mizellbildungskonzentration)
DAB 7-DDR	Deutsches Arzneibuch 7 der (ehem.) Deutschen Demokratischen Republik
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i> (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppel-strängige Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-TOF-MS	Elektrosprayionisierung-Flugzeitmassenspektrometrie
FBS	fötales bovines Serum
g	Erdbeschleunigung
G	Gypsogenin
GS	Gypsogeninsäure
³ H	Tritium, superschwerer Wasserstoff, radioaktives Wasserstoffisotop
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀ / GI ₅₀	Konzentration bei 50%iger Zytotoxizität / Wachstumshemmung bei Zellen in Kultur
IC ₅₀ (syn.)	Konzentration bei 50%iger Zytotoxizität / Wachstumshemmung bei Zellen in Kultur bei Untersuchung der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
LD ₅₀ (Maus)	für 50 % der behandelten Mäuse tödliche Dosis
LDH	Laktatdehydrogenase
M	monodesmosidische Saponine
MB	mono- und bisdesmosidische Saponine
M _r	relatives Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i> (Molekülgrößenausschlussgrenze bei Dialyse)

n. b.	nicht beschrieben
n. d.	nicht dargestellt
NMR	Kernmagnetresonanz(-spektroskopie)
OC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Oberflächenspannungsverringeringung
Q	Quillajasäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SD	Standardabweichung
t _R	Retentionszeit
Vers.	Version
VK	Variationskoeffizient, relative Standardabweichung

Das Dezimaltrennzeichen ist das Komma.

In der Arbeit wurden aus Gründen der besseren Lesbarkeit Zeichen zur Kennzeichnung von Warenamen weggelassen. Das bedeutet nicht, dass diese Warenamen frei von Rechtsansprüchen Dritter sind.

1 Einleitung

Das Adjektiv synergistisch leitet sich von dem Begriff Synergie ab. Dieser stammt von dem griechischen Wort $\sigmaυνεργια$ (synergia) und bezeichnet das Zusammenwirken von Lebewesen, Stoffen oder Kräften im Sinne einer gegenseitigen Förderung zum gemeinsamen Nutzen. Der griechische Philosoph und Gelehrte Aristoteles beschrieb Synergie mit dem Ausspruch: „Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.“ In der Biologie bezeichnet der Begriff Synergismus auch die überadditive Wirkung zweier gleich gerichteter Effekte (Wikipedia, 2013).

Die synergistische Zytotoxizität zwischen Saponinen und Ribosomen inaktivierenden Proteinen wurde 2003 von Melzig und Hebestreit erstmals wissenschaftlich beschrieben. Dabei verstärken bestimmte Vertreter aus der Gruppe der pflanzlichen Sekundärinhaltsstoffe der Saponine die Zytotoxizität der nur wenig toxischen bzw. nur in hohen Konzentrationen toxischen Ribosomen inaktivierenden Proteine Typ I (RIP-I) auf menschliche und tierische Zellen um den Faktor 10 000 und mehr (Hebestreit et al., 2006). Diese Proteintoxine können, neben dem Vorkommen in Bakterien und Pilzen, ebenfalls pflanzlichen Ursprungs sein (Stirpe, 2013). Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass zumindest in der Pflanzenfamilie der Caryophyllaceae jene Gattungen, welche RIP-I enthalten, auch Saponine enthalten (Böttger & Melzig, 2011).

1.1 Saponine

Saponine sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit einer molekularen Masse zwischen ca. 600 und 2000 Da. Sie werden außerdem von einigen Meereslebewesen und Bakterien produziert. Ihre Molekülstruktur lässt sich in einen hydrophoben Anteil, das Aglykon oder Sapogenin und einen hydrophilen Anteil aus einem oder mehreren miteinander verknüpften Zuckermolekülen unterteilen. Beim Aglykon kann in der Regel zwischen einem steroidal (C₂₇-Körper) oder einem triterpenoiden (C₃₀-Körper) Grundgerüst unterschieden werden. Dabei kann das Aglykon mit nur einem (monodesmosidisch), zwei (bidesmosidisch) oder seltener drei (tridesmosidisch) Zuckerresten verschiedener Größe und Komplexität verbunden sein. Verschiedene Zuckermoleküle können in Reihe oder verzweigt an das Aglykon gebunden sein. Diese Bindung ist entweder glykosidisch und über eine OH-Gruppe oder esterartig über eine Carboxylfunktion des Aglykons. Typischerweise in Saponinen vorkommende Zucker sind: Apiose (Api), Arabinose (Ara), Chinovose (Chi), Fucose (Fuc), Galaktose (Gal), Glucose (Glc), Rhamnose (Rha), Xylose (Xyl) sowie die Zuckersäuren Galakturonsäure (GalA) und Glucuronsäure (GlcA). (Übersichtsarbeit von Vincken et al. (2007))

Das Vorhandensein jener hydrophoben und hydrophilen Anteile im Saponinmolekül begründet deren amphiphiles Verhalten in wässrigen Lösungen. Dieses seifenartige Verhalten gab den Saponinen schließlich auch ihren Namen: latein „sapo“, Seife. Seit der Antike wurden saponinhaltige Pflanzen und Drogen deshalb als Wasch- und Körperpflegemittel eingesetzt und selbst heute finden beispielsweise die getrockneten Arilli der Früchte des Waschnussbaums, *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae) breite Anwendung als Waschmittel und Allzweckreiniger in Indien und zunehmend in Westeuropa und Nordamerika (Rudnicki et al., 1990; Süddeutsche.de, 2013; Yang et al., 2009). Auch die Rote Seifenwurzel, *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae) und die Weiße Seifenwurzel, *Gypsophila paniculata* L. (Caryophyllaceae) verdanken ihre Namen der Verwendung als Seife auf Grund der enthaltenen Saponine.

Saponine sind in der Lage mit Ober- und Grenzflächen zu interagieren. Bei physikalischen Grenzflächen wie etwa zwischen fest und flüssig, sowie zwischen flüssig und flüssig können Saponine eine Lösungsvermittlung bewirken, wie sie etwa bei der Waschwirkung zu beobachten ist. Zwischen flüssig und gasförmig kann eine Abnahme der Oberflächenspannung der Flüssigkeit und unter Zufuhr mechanischer Energie Schaumbildung beobachtet werden. Neben der Lösungsvermittlung und Schaumbildung zeigen Saponine noch eine Reihe weiterer Eigenschaften und Wirkungen, von denen viele auf einer Interaktion mit biologischen Ober- und Grenzflächen wie z. B. Zellmembranen beruhen. Es sei an dieser Stelle die Zytotoxizität einiger Saponine genannt, welche in den meisten Fällen auf einer Interaktion der Saponine mit dem Membrancholesterol und einer Porenbildung in der Zellmembran beruht (Lacaille-Dubois & Wagner, 2000). Infolge dessen diffundieren Na^+ -Ionen und Wassermoleküle in die Zelle, während K^+ -Ionen aus der Zelle herausströmen. Die Membran wird schließlich durch die große Differenz zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Druck zerstört und es kommt zum Austritt zytoplasmatischer Bestandteile (Francis et al., 2002). Ein vergleichbarer Mechanismus liegt auch der hämolytischen Aktivität einiger Saponine zu Grunde. Dabei vermögen die Saponine die Membranen der Erythrozyten zu zerstören, was im *in-vitro* Experiment an einer Klärung der Erythrozytensuspension beobachtet werden kann (Southeeswaran & Kenchington, 1989). Von einigen Saponinen ist ihre Toxizität für Fische durch eine Erhöhung der Permeabilität des Kiemenepithels bekannt (Francis et al., 2002). Auch Vergiftungen von grasendem Vieh durch saponinhaltige Pflanzen sind beschrieben (Mathews, 1933; Williams, 1978). Weiterhin wurden antimykotische (Favel et al., 1994), antivirale (Simões et al., 1999), antimikrobielle (Sharma et al., 2013), molluskizide (Marston et al., 1988), herbizide (Oleszek et al., 1992) und spermizide (Rajasekaran et al., 1993) Eigenschaften für einige Saponine entdeckt.

Neben diesen recht destruktiven Wirkungen lassen sich in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) aber auch einige kurative Wirkungen der Saponine finden. So werden saponinhaltige Drogenzubereitungen insbesondere von *Dianthus*-Arten (Caryophyllaceae) bei zerebro- und kardiovaskulären Erkrankungen (Hu & Lu, 2009), Arrhythmie (Yu et al., 2008), verschiedenen Arten des Schmerzes (Sun, 2008) und bei Atemwegserkrankungen (Tu et al., 2007) eingesetzt (Hikino et al., 1984). Die Samen von *Vaccaria hispanica* (MILL.) RAUSCHERT (Caryophyllaceae) werden als Dekokt bei Dysmenorrhoe und Dysgalaktie verwendet (Acupuncture Today, 2013). Der Wurzeln des asiatischen Ginsengs, *Panax ginseng* C. A. MEYER (Araliaceae) werden als Tonikum und Geriatrikum angewendet (medizinalpflanzen.de, 2008). Die Nutzung saponinhaltiger Arzneien bei Erkrankungen der oberen Atemwege ist auch in der „westlichen“ Medizin bekannt. Auf Grund der expektorierenden Wirkung von Saponinen werden Tees und andere Zubereitungen saponinhaltiger Arzneipflanzen wie etwa der Schlüsselblume, *Primula veris* L. (Primulaceae), des Efeus, *Hedera helix* L. (Araliaceae) oder der Süßholzwurzel, *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) eingesetzt. Auch Lutschtabletten (Aspectonetten N, Krewel Meuselbach, Eitorf) mit *Gypsophila*-Saponinen wurden zu diesem Zweck angeboten. Auch die Anwendung von Zubereitungen der saponinhaltigen Samen der Rosskastanie, *Aesculus hippocastanum* L. (Sapindaceae) bei leichter Veneninsuffizienz ist sehr verbreitet. Saponine von *Gypsophila oldhamiana* Miq. (Caryophyllaceae) besitzen α -Glucosidase und Pankreaslipase inhibierende Eigenschaften und könnten sich damit als Mittel zur Behandlung des Metabolischen Syndroms und des Diabetes mellitus Typ II eignen (Bai et al., 2007; Luo et al., 2008b). Bei Ratten zeigten Saponine von *Herniaria glabra* L. (Caryophyllaceae) eine antihypertensive und diuretische Wirkung (Rhiouani et al., 2001).

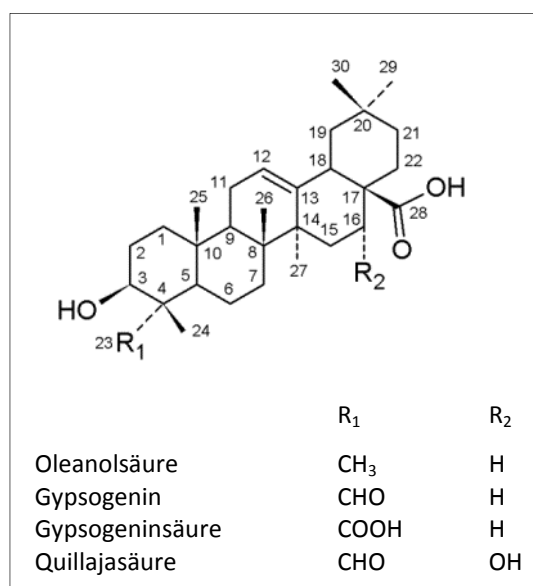


Abb. 1. Strukturformeln häufig vorkommender Aglyka von Oleanan-Typ Triterpensaponinen in den Caryophyllaceae.

1.1.1 Saponine der Caryophyllaceae

Die Pflanzenfamilie Caryophyllaceae umfasst je nach Quelle 88 (The Plant List, 2013) bzw. 104 (Royal Botanic Gardens, KEW, 2013) Gattungen und mehr als 2000 Arten. Dabei handelt es sich meist um krautige Pflanzen von einjährigem als auch ausdauerndem Wuchs. Der Habitus zeigt eine kreuzgegenständige Blattstellung mit sitzenden länglichen Blättern, deutlichen Nodien und zur Blütezeit weißen bis pinkfarbenen radiär symmetrischen Blüten. Pflanzen der Caryophyllaceae enthalten Saponine. In Abhängigkeit von Alter und Wachstumsphase werden Mengen bis zu 20 % der Drogenmasse erreicht (Kolodziejski & Stecka, 1965). Dabei handelt es sich im Allgemeinen um Triterpensaponine, vorwiegend vom Oleanan-Typ (s. Abbildung 1). Vincken et al. (2007) zufolge ist dies das Triterpengrundgerüst, welches am häufigsten im Pflanzenreich vertreten ist. Doch auch das Vorkommen von Steroidsaponinen in einigen Arten der Caryophyllaceae ist beschrieben (Zibareva et al., 2003). Besonders häufig sind jedoch die Triterpene Gypsogenin, Gypsogeninsäure und Quillajasäure als Aglyka der Saponine der Caryophyllaceae vertreten (s. Tabelle 1). So stellt Gypsogenin etwa in der Hälfte aller Arten der Caryophyllaceae, für die Saponine beschrieben das Aglykon dar, Quillajasäure etwa in einem Drittel und Gypsogeninsäure etwa in einem Viertel. Für etwa die Hälfte der als Saponin führend beschriebenen Arten sind bisdesmosidische Saponine angegeben.

Tab. 1. Auflistung der Aglyka und Anzahl der Zuckerreste der (triterpenoiden) Saponine und aller Gattungen der Caryophyllaceae nach Böttger & Melzig (2011). Die Zahl in Klammern hinter der Gattung zeigt die Anzahl diskreter „anerkannter“ Arten innerhalb der Gattung. Alle Artnamen stellen den derzeit „anerkannten“ Namen und Erstbeschreiber dar. Gattungsliste und Artnamen nach The Plant List (2013)

Gattung	Art	Aglykon			
		G	GS	Q	andere
<i>Acanthophyllum</i> (68)	<i>adenophorum</i> FREYN	B			
	<i>pachystegium</i> RECH.F.		M	B	
	<i>squarrosus</i> BOISS.	B		B	
	<i>subglabrum</i> SCHISCHK.		X		
<i>Achyronychia</i> (1)				n. b.	
<i>Agrostemma</i> (2)	<i>brachyloba</i> (FENZL) K.HAMMER				Oleanolsäure, Echinocystsäure
	<i>githago</i> L.	MB		B	
<i>Allochrysa</i> (8)	<i>gypsophiloides</i> (REGEL) SCHISCHK.	B	X	B	
	<i>paniculata</i> (REGEL & HERDER) OVZC. & CZUKAV		M		
<i>Alsinidendron</i> (5)				n. b.	
<i>Ammodenia</i> (1)				n. b.	
<i>Ankyropetalum</i> (3)				n. b.	
<i>Anychia</i> (2)				n. b.	
<i>Arenaria</i> (272)	<i>brevipetala</i> Y.W.TSUI & L.H.ZHOU				X
	<i>filicaulis</i> FENZL ex GRISEB.	M			Camilliagenin A, Snatzkein A
	<i>kansuensis</i> MAXIM.				X
	<i>montana</i> L.				Caulophyllogenin, Echinocystsäure
<i>Bolanthus</i> (18)				n. b.	
<i>Bolbosaponaria</i> (6)				n. b.	
<i>Brachystemma</i> (1)				n. b.	
<i>Bufonia</i> (32)				n. b.	
<i>Cardionema</i> (6)				n. b.	
<i>Cerastium</i> (203)				n. b.	
<i>Cerdia</i> (1)				n. b.	
<i>Chaetonychia</i> (1)				n. b.	
<i>Colobanthus</i> (25)				n. b.	
<i>Cometes</i> (2)	<i>surattensis</i> BURM.F.				X

Dianthus (333)	<i>baratus</i> L.			X	
	<i>caryophyllus</i> L.		MB		
	<i>cruentus</i> GRISEB.				X
	<i>chinensis</i> L.		MB	MB	
	<i>deltoides</i> L.	B	M		
	<i>superbus</i> L.		MB		
Diaphanoptera (6)					n. b.
Dichranthus (1)					n. b.
Drymaria (54)	<i>arenarioides</i> HUMB. & BONPL. ex SCHULT.				X
	<i>cordata</i> (L.) WILLD. ex SCHULT.				Oleanolsäure, acetyliert
Drypis (1)					n. b.
Eremogene (71)	<i>juncea</i> (M.BIEB.) FENZL	B		X	C-3-OH-sulfatierte Gypsogeninsäure
	<i>saxatilis</i> (L.) IKONN.	X			
Gastrocalyx (1)					n. b.
Geocarpon (1)					n. b.
Gymnocarpus (10)					n. b.
Gypsophila (151)	<i>acutifolia</i> STEVEN ex SPRENG.	B			
	<i>altissima</i> L.				X
	<i>aretioides</i> BOISS.				X
	<i>arrostii</i> GUSS.	B	X	B	Hydroxygypsogeninisolomere
	<i>bermejoi</i> G.LÓPEZ	M			C-23-OH-sulfatiertes Hederagenin
	<i>bicolor</i> (FREYN. & SINT.) GROSSH.	X			Gypsogeninderivate
	<i>capillaris</i> (FORSSK.) C.CHR.	M	MB	M	
	<i>capitata</i> M.BIEB.	X			
	<i>elegans</i> M.BIEB.	X			
	<i>eriocalyx</i> BOISS.				X
	<i>glomerata</i> PALL. ex ADAMS	X			
	<i>muralis</i> L.	X			
	<i>oldhamiana</i> MIQ.	MB	X	MB	diverse*
	<i>pacifica</i> KOM.	B	MB	B	Hydroxygypsogeninisolomere
	<i>paniculata</i> L.	B		B	
	<i>patrinii</i> SER.	MB			
	<i>perfoliata</i> L.	B			Oleanan-Typ, sulfatiert
	<i>petraea</i> (BAUMG.) RCHB.	X			
	<i>repens</i> L.	B	MB		Lupan-Typ
	<i>scorzonerifolia</i> SER.	X			
<i>simonii</i> HUB.-MOR.				Gypsogeninester	
<i>viscosa</i> MURRAY	X				
Herniaria (29)	<i>fontanesii</i> J.GAY				Medicagensäure
	<i>glabra</i> L.		X	X	Medicagensäure und -derivate
	<i>hirsuta</i> L.		X	X	Medicagensäure und -derivate
Holosteum (1)					n. b.
Honckenya (1)					n. b.
Illecebrum (1)					n. b.
Ixoca (2)					n. b.
Kuhitangia (2)					n. b.
Lepyrodicilis (3)					n. b.
Loeflingia (4)					n. b.
Lychnis (14)					n. b.
Melandrium (4)					n. b.
Mesostemma (4)					n. b.
Microphyes (2)					n. b.
Minuartia (101)					n. b.
Mniarum (1)					n. b.
Moehringia (30)					n. b.
Moenchia (3)					n. b.
Myosoton (1)					n. b.
Oberna (9)					n. b.
Ortegaia (1)					n. b.
Otites (1)					n. b.
Paronychia (59)	<i>argentea</i> LAM.				Polygalasäure
	<i>chionaea</i> BOISS.		B		
Petrorhagia (18)					n. b.
Philippiella (1)					n. b.
Pleconax (4)					n. b.
Pleioneura (1)					n. b.
Plettkea (1)					n. b.
Pollichia (1)					n. b.
Polycarpaea (11)	<i>corymbosa</i> (L.) LAM.				Cameliagenin A, Barrigenol A ₁

<i>Polycarpon</i> (7)	<i>prostratum</i> (FORSSK.) ASCH. & SCHWEINF.				Saikogeninderivate
	<i>succulentum</i> WEBB & BERTHEL.				Hopan-Typ
<i>Polytepalum</i> (1)					n. b.
<i>Porsildia</i> (1)					n. b.
<i>Psammophiliella</i> (4)					n. b.
<i>Psammosilene</i> (1)					n. b.
<i>Pseudocerastium</i> (1)					n. b.
<i>Pseudosaponaria</i> (1)					n. b.
<i>Pseudostellaria</i> (15)	<i>heterophylla</i> (MIQ.) PAX				X
<i>Pteranthus</i> (1)					n. b.
<i>Pycnophyllopsis</i> (3)					n. b.
<i>Pycnophyllum</i> (22)					n. b.
<i>Reicheella</i> (1)					n. b.
<i>Sabulina</i> (1)					n. b.
<i>Sagina</i> (19)	<i>japonica</i> (Sw.) OHWI				X
<i>Sanctambrosia</i> (1)					n. b.
<i>Saponaria</i> (14)	<i>kotschyi</i> BOISS.				X
	<i>officinalis</i> L.	B	MB	B	Hydroxygypsogeninderivate
<i>Scleranthopsis</i> (1)					n. b.
<i>Scleranthus</i> (4)	<i>annuus</i> L.				X
<i>Scopulophila</i> (2)					n. b.
<i>Silene</i> (424)	<i>alba</i> (MILL.) E.H.L. KRAUSE				X
	<i>baccifera</i> (L.) ROTH				Oleanan-Typ
	<i>brahuica</i> BOISS.				X
	<i>dichotoma</i> EHRH.				X
	<i>dioica</i> (L.) CLAIRV.				X
	<i>firma</i> SIEBOLD & ZUCC.	X	X	X	Oleanan-Typ, Melandrigenin
	<i>flos-cuculi</i> (L.) GREUTER & BURDET	X			Hederagenin
	<i>fortunei</i> Vis.			B	
	<i>jeniseensis</i> WILLD.			B	
	<i>latifolia</i> POIR.	X			
	<i>napuligera</i> FRANCH.			B	
	<i>nutans</i> L.	B			
	<i>succulenta</i> FORSSK.			X	Oleanolsäure
	<i>szechuensis</i> F.N. WILLIAMS			B	
<i>viscaria</i> (L.) JESS.	B				
<i>vulgaris</i> (MOENCH) GARCKE	MB		MB		
<i>Spergula</i> (13)					n. b.
<i>Spergularia</i> (42)	<i>arbuscula</i> (GAY) I.M. JOHNST.				Echinocystsäure, Oleanolsäure
	<i>media</i> (L.) C. PRESL				Oleanan-Typ
	<i>ramosa</i> CAMESS.	B		B	
<i>Stellaria</i> (109)	<i>media</i> (L.) VILL.	X			Hydroxyoleanolsäurederivate
<i>Telephium</i> (1)					n. b.
<i>Thylacospermum</i> (1)					n. b.
<i>Tissa</i> (2)					n. b.
<i>Tytthostemma</i> (1)					n. b.
<i>Vaccaria</i> (1)	<i>hispanica</i> (MILL.) RAUSCHERT	B	MB	B	
<i>Velezia</i> (2)					n. b.
<i>Wilhelmsia</i> (1)					n. b.

B = bisdesmosidische Saponine des jeweiligen Aglykons; G = Gypsogenin; GS = Gypsogeninsäure; M = monodesmosidische Saponine des jeweiligen Aglykons; MB = mono- und bisdesmosidische Saponine des jeweiligen Aglykons; n. b. = Vorkommen triterpenoider Saponine ist nicht beschrieben; Q = Quillajasäure; X = Saponine des jeweiligen Aglykons oder das Aglykon sind enthalten, Informationen über Zuckerverknüpfungen sind nicht gegeben bzw. Saponine sind enthalten, weitere Informationen zum Aglykon und den Zuckerverknüpfungen sind nicht gegeben. * = Echinocystsäure, Hederagenin, Neogypsogenin, Oleanolsäure und Derivate

1.1.1.1 *Agrostemma githago* L. (Caryophyllaceae)

Im Zusammenhang mit der synergistischen Zytotoxizität zwischen Saponinen und Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I (RIP-I) erlangte diese Art eine gewisse Bekanntheit. Es war jedoch lange nicht bekannt, welche Inhaltsstoffe und welcher Wirkmechanismus die Toxizität dieser Pflanze verursachen. Lange wurden die in den Samen enthaltenen Saponine allein dafür verantwortlich gemacht, obwohl es schon Anhaltspunkte für eine kombinierte Toxizität gab (Hebestreit, 2004). Erst 2003 beschrieben Hebestreit und Melzig die Auswirkungen des Zusammenspiels zwischen dem ebenfalls in den Samen enthaltenen RIP-I Agrostin und den Saponinen bezüglich der Zytotoxizität an einem Zellmodell. Noch bis ins 20. Jahrhundert war *Agrostemma githago* oder die Kornrade als Ackerbegleitpflanze sehr verbreitet und wuchs auf vielen Getreidefeldern zwischen dem Halmen. Somit kam es bei der Ernte regelmäßig zu Verunreinigungen des Korns mit den Samen und in der Folge auch zur Kontamination des Mehls. Aus der Vergangenheit sind deshalb zahlreiche Vergiftungen durch *Agrostemma githago* beschrieben. Dabei wurde den Menschen der wahrscheinlich als Fraßschutz der Samen entstandene Toxizitätsmechanismus zum Verhängnis. Erst die Einführung sogenannter Raderechen und die moderne Saatgutaufreinigung änderten dies (heilkraeuter.de, 2013).

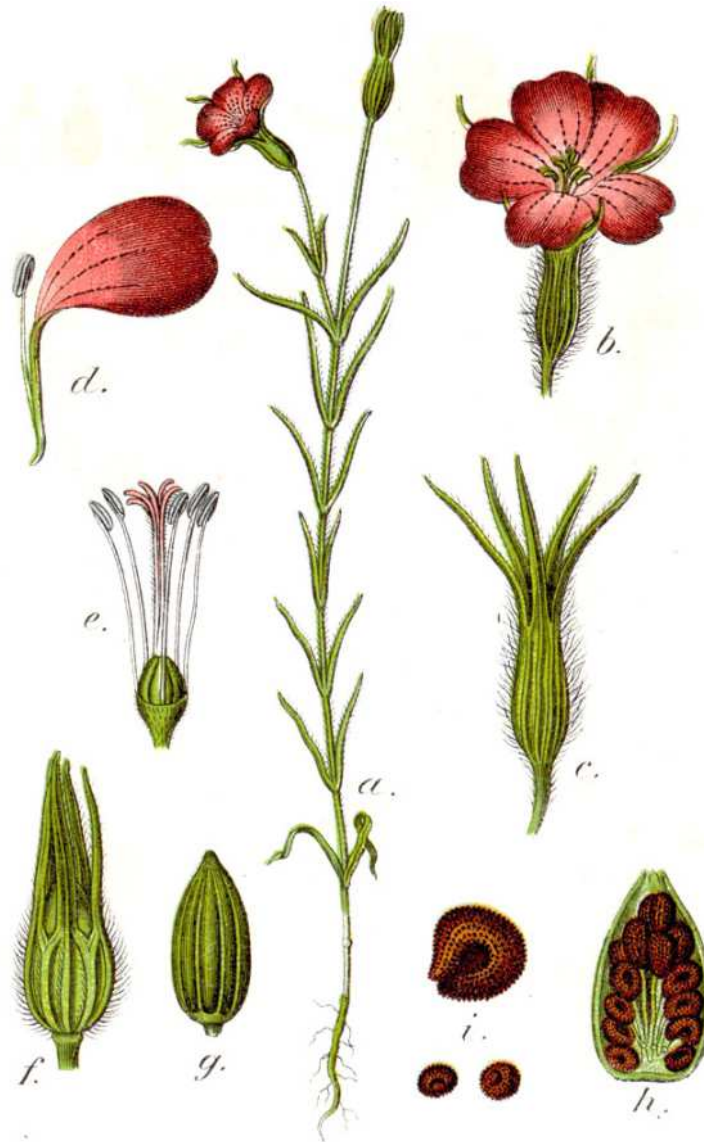


Abb. 2. Botanische Zeichnung von *Agrostemma githago* L. aus dem Bildband „Deutschlands Flora in Abbildungen“ von 1796. (a. Habitus der gesamten Pflanze, b. Blüte, c. Kelch, d. genageltes Kronblatt mit Stabblatt, e. Blütenboden mit Staub- und Fruchtblättern, ohne Kelch- und Kronblätter, f. befruchtete Blüte mit Kelchblättern, g. Samenkapsel ohne Kelchblätter, h. Kapsel mit Samen (Halbschnitt), i. Samen)

Heute ist die Kornrade nur noch selten in freier Natur zu finden und vieler Orts praktisch ausgestorben. Sie steht inzwischen auf der Roten Liste der bedrohten Arten und wurde 2003 zur „Blume des Jahres“ von der „Stiftung Naturschutz Hamburg und Stiftung Loki Schmidt zum Schutze gefährdeter Pflanzen“ gewählt (Stiftung Naturschutz Hamburg, 2006).

1.1.1.2 Saponinum album

Saponinum album ist ein ehemals kommerzielles Saponingemisch aus *Gypsophila arrostii* GUSS. und *G. paniculata* L. (Caryophyllaceae). Es wurde u.a. von der Firma Merck, Darmstadt angeboten und diente als Standard zur Bestimmung der Hämolyseaktivität anderer Saponine und saponinhaltiger Drogen nach DAB 7-DDR. Saponinum album ist reich an Triterpensaponinen (Weng et al., 2011). Hebestreit (2004) und Weng (2009) nutzten für die Erforschung der synergistischen Zytotoxizität von Saponinen und Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I (RIP-I) Saponinum album als Standardsaponin. Wie kein anderes Saponin konnte Saponinum album die Zytotoxizität von RIP-I auf unterschiedliche humane und murine Krebszelllinien verstärken. Weng (2009) gelang mit der Verbindung SA1641 die Isolation und Strukturaufklärung eines mit RIP-I synergistisch zytotoxischen Saponins aus Saponinum album. Auch wenn anschließende Vergleiche der synergistischen Zytotoxizität von SA1641 und Saponinum album eine Überlegenheit des Gemisches ergaben, diente die Struktur von SA1641 trotzdem als Orientierung bei der Suche nach weiteren synergistisch zytotoxizitätsverstärkenden Saponinen. SA1641 entspricht dabei auch allen von Melzig et al. (2005) beschriebenen strukturellen Anforderungen für synergistisch zytotoxisch reagierende Saponine.

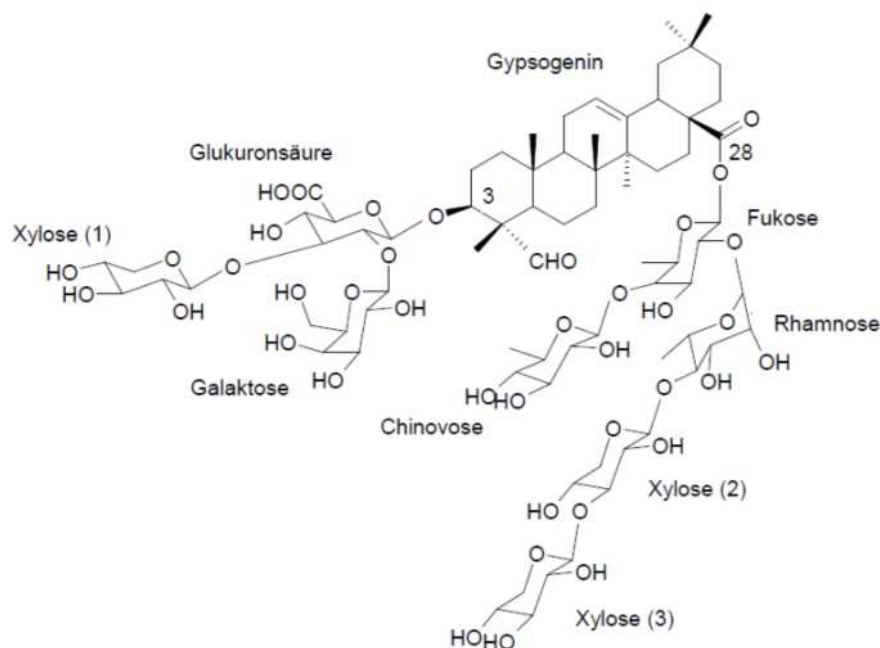


Abb. 3. SA1641 isoliert aus Saponinum album (Weng, 2009).

1.2 Synergistische Zytotoxizität

Die Kenntnis über die Natur und die Verbreitung der Saponine ist wichtig für die weitere Erforschung der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I (RIP-I) durch Saponine. Diese wurde, wie anfangs erwähnt, von Hebestreit & Melzig (2003) erstmals beschrieben. Damals verstärkte ein Saponin aus *Agrostemma githago* L. die Zytotoxizität des sonst nur schwach toxischen und ebenfalls natürlich in der Pflanze vorkommenden RIP-I Agrostin. Dieses Saponin, Agrostemmasaponin 1 war ein bisdesmosidisches Glykosid des Gypsogenins und wurde in nicht zytotoxischer Konzentration eingesetzt. Melzig et al. (2005) beschrieben etwas später erstmals strukturelle Anforderungen an die zytotoxizitätsverstärkenden Saponine. Demnach waren bisdesmosidische Saponine, die auf Position 23 eine Aldehydfunktion, an der C-3-OH-Gruppe einen verzweigten Zuckerrest tragen und an einer Carboxylfunktion an Position 28 mit einem weiteren (verzweigten) Oligosaccharid verestert sind, besonders geeignet, die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung zu ermöglichen. Monodesmosidische Saponine und Saponine, deren Zuckerreste anderes geartet waren, eigneten sich weniger. Dabei wurde auch klar, dass der synergistischen Zytotoxizität ein Mechanismus zu Grunde liegen muss, bei dem die Saponine den Transport der nicht-membranpermeablen RIP-I in das Zellinnere und bis an den Wirkort ermöglichen und dass dies nicht durch unspezifische Porenbildung geschieht. Heisler et al. (2005) konnten mit Saponinum album den zellspezifischen zytotoxischen Effekt eines chimären Toxins um Faktor 3560 bis 385000 verstärken. Das chimäre Toxin bestand aus dem RIP-I Saporin, dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und einem Adapterstück, das Effekte auf Nicht-Zielzellen reduzieren sollte. Bachran et al. (2006) konnten bei weiteren Versuchen mit chimären Toxinen die von Melzig et al. (2005) gestellten strukturellen Anforderungen an zytotoxizitätsverstärkende Saponine bestätigen. Bei der Untersuchung des Mechanismus der synergistischen Zytotoxizität konnten Weng et al. (2009; 2008) eine durch Saponine stimulierte Endozytose zur Aufnahme der RIP-I bzw. der chimären Toxine in die Zellen ausschließen. Dennoch gelangen die Proteintoxine durch Endozytose in das Zellinnere. Weng et al. (2012b) erlangten durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Impedanzmessungen entscheidende Hinweise zur Klärung des der synergistischen Zytotoxizität zur Grunde liegenden Mechanismus. So werden die Proteintoxine, aber auch Saponine zunächst ungerichtet und zufällig endozytiert. Dabei scheinen Saponinmoleküle bereits in die Zellmembran und somit auch in die sich abschnürende Vesikelmembran integriert zu sein. Dies legten bereits Auswaschversuche von Weng (2009) nahe. Die abgeschnürten Vesikel können mit Frühen und Späten Endosomen verschmelzen. Die Aktivität Saurer Phosphatasen in diesen Zellorganellen bewirkt ein Absinken des pH-Wertes in den gebildeten Vesikeln auf 4 bis 5. Auch ein Verschmelzen der Vesikel mit Lysosomen ist möglich, führt dann jedoch zu Degradation der Proteintoxine durch die in Lysosomen vorhandenen Proteasen (Weng, 2009). Durch das Absinken des pH-Wertes kommt es zur pH-abhängigen reversiblen Bindung von Saponinmolekülen an die endozytierten Proteintoxine. Auf

Grund ihrer amphiphilen Eigenschaften und der Fähigkeit zur Interaktion mit Zellmembranen modulieren die Saponine dann die endosomale Freisetzung der Proteintoxine durch die Vesikelmembran in das Zytoplasma. Dort trennen sich die gebundenen Saponine bei einem pH-Wert von etwa 7 wieder vom Proteintoxin (Weng et al., 2012b).

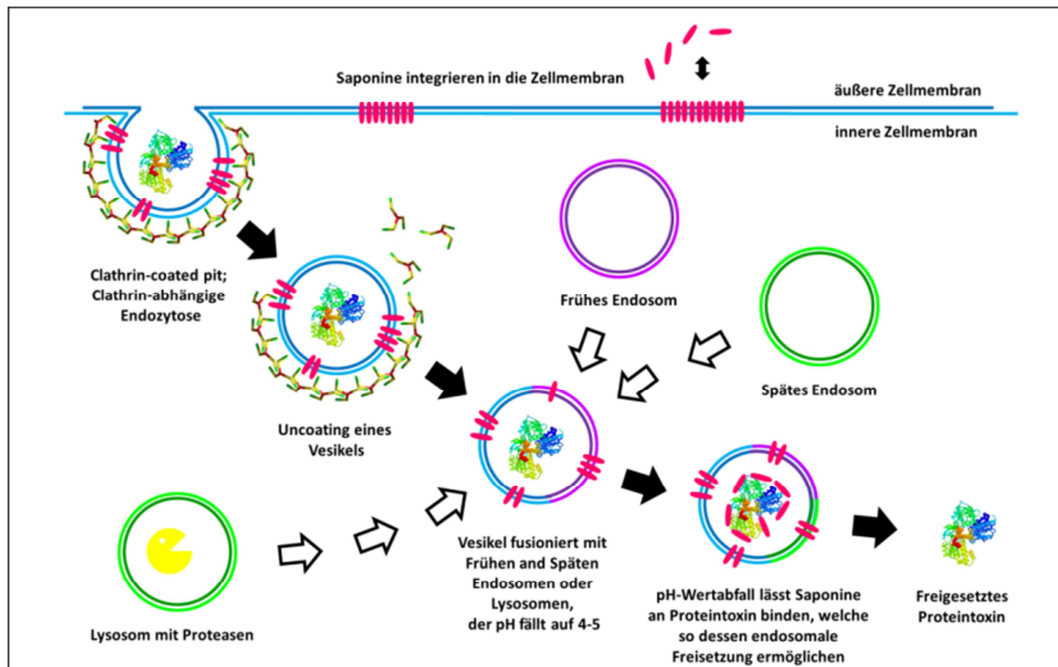


Abb. 4. Darstellung des bekannten Mechanismus der synergistischen Zytotoxizität von Saponinen und RIP-I (nach Weng (2009), modifiziert).

Die bisher in Kombination mit Saponinen verwendeten Proteintoxine waren entweder chimäre Toxine, bei denen die toxische Komponente in dem RIP-I Saporin bestand oder die RIP-I Saporin bzw. Agrostin selbst wurden verwendet. Als Enzyme mit N-Glykosidase-Aktivität spalten diese Ribosomen inaktivierende Proteine das Adenin₄₃₂₄ der rRNA in der 28 S-Untereinheit eukaryotischer Ribosomen ab. Dadurch wird die durch die rRNA katalysierte Proteinbiosynthese in den Ribosomen irreversibel inaktiviert (Barbieri et al., 1993; Endo et al., 1987). Betroffene Zellen sind, sind ausreichend viele Ribosomen derart inaktiviert, nicht mehr in der Lage lebensnotwendige Proteine herzustellen und werden über weitere Schritte in die Apoptose geführt (Bagga et al., 2003). Die exakte Spaltstelle am Adenin₄₃₂₄ bezieht sich zwar auf Ribosomen der Rattenleber, lässt sich jedoch zumindest mechanistisch auf andere Säugetiere übertragen.

1.3 Ribosomen inaktivierende Proteine (RIP)

Die RIP sind Enzyme (Endo et al., 1987). Sie zählen zu den Hydrolasen und darunter zu der Untergruppe der rRNA N-Glykosidasen (EC 3.2.2.22) (Enzyme Structures Database, 2013). Sie sind vor allem in Pflanzen, aber auch in Bakterien und Pilzen zu finden (Stirpe, 2013). Pflanzliche RIP sind

für etwa 75 Arten in 29 Familien beschrieben. Insbesondere Familien der Ordnung Caryophyllales sind für das Vorkommen von RIP bekannt. Aber auch in den Familien Euphorbiaceae (z. B. *Ricinus communis* L., Ricin), Fabaceae (z. B. *Abrus precatorius* L., Abrin) und Santalaceae (z. B. *Viscum album* L., Viscumin) weisen mehrere Arten RIP auf. Bei den Caryophyllaceae wurden für folgende Arten RIP beschrieben (unveröffentlichte Ergebnisse einer Übersichtsarbeit von Joachim Schrot, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin):

Tab. 2. Arten der Caryophyllaceae, für welche das Vorkommen von RIP beschrieben wurde. Alle Artnamen stellen den derzeit „anerkannten“ Namen und Erstbeschreiber nach The Plant List (2013) dar, auch wenn Bezeichnungen einiger Proteintoxine an synonyme Artnamen angelehnt sind und ein Bezug zur jeweiligen Art nicht mehr erkennbar ist.

Art	Name des Proteintoxins	Typ	Saponine
<i>Agrostemma githago</i> L.	Agrostin	RIP-I	MB
<i>Dianthus baratus</i> L.	Dianthin-29	RIP-I	X
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Dianthin-30/ -32	RIP-I	MB
<i>Dianthus chinensis</i> L.	<i>D. chinensis</i> -RIP	RIP-I	MB
<i>Gypsophila elegans</i> M.BIEB.	Gypsophilin	RIP-I	X
<i>Myosoton aquaticum</i> (L.) MOENCH	Stellarin	RIP-I	n. b.
<i>Saponaria ocymoides</i> L.	Ocyomoidin	RIP-I	n. b.
<i>Saponaria officinalis</i> L.	Saporin	RIP-I	MB
<i>Silene chalcadonica</i> (L.) E.H.L.KRAUSE	Lychnin	RIP-I	n. b.
<i>Silene glaucifolia</i> LAG.	Petroglaucin-1/ -2	RIP-I	n. b.
<i>Silene laxipruinosa</i> MAYOL & ROSSELLÓ	Petrograndin	RIP-I	n. b.
<i>Vaccaria hispanica</i> (MILL.) RAUSCHERT	Pyramidatin	RIP-I	MB

MB = mono- und bisdesmosidische Saponine; n. b. = Vorkommen von triterpenoiden Saponinen ist nicht beschrieben; X = nicht näher beschriebene Saponine

In den meisten RIP führenden Arten lässt sich nicht nur ein einziges RIP finden sondern oft mehrere Isoformen und Splicing-Varianten, welche sich unterschiedlich stark in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Nicht alle RIP spalten an Ribosomen der Rattenleber das erwähnte Adenin₄₃₂₄ der rRNA der 28 S-Untereinheit ab. Auch Guanin₄₃₂₃ und Cytidin₄₃₂₂ der rRNA sowie Adeninreste in einigen DNA-Molekülen und anderen Polynukleotiden gehören zu den Zielstrukturen einiger RIP. In anderen eukaryotischen Spezies können sich auf Grund unterschiedlicher Ribosomen Abweichungen von diesen Nukleotidpositionen ergeben. RIP können in drei Gruppen eingeteilt werden: RIP-I bestehen aus einer einzelnen Proteinkette von ca. 30 kDa welche auch die katalytisch aktive Domäne besitzt. RIP-II sind Heterodimere aus einer der katalytisch aktiven Proteinkette der RIP-I äquivalenten und einer Proteinkette, welche über Membranbindedomänen verfügt. Beide Polypeptide sind dabei über Disulfidbrücken miteinander verbunden. RIP-III können als inaktive Vorstufen der RIP-II verstanden werden, bei denen durch die Aktivität von Proteasen Peptidfragmente abgespalten werden müssen um in die aktive Form überführt zu werden. (Übersichtsarbeit von de Virgilio et al. (2010))

RIP-II werden oft auch als Lektine bezeichnet. Der Definition nach sind Lektine Proteine oder Glykoproteine, welche Kohlehydratstrukturen binden und diese aggregieren können (Sharon & Lis, 2013). Dies kann die Agglutination von Zellen bewirken. Eine enzymatische Aktivität besitzen

Lektine nicht zwingend. Das bedeutet umgekehrt, dass Lektine nicht zwangsläufig RIP-II sind. Fraglich ist auch, ob sich RIP-I auch als Lektine bezeichnen lassen. Ihnen fehlt die Kohlehydratstrukturen bindende Domäne welche Lektine definiert (Goldstein & Hayes, 1978).

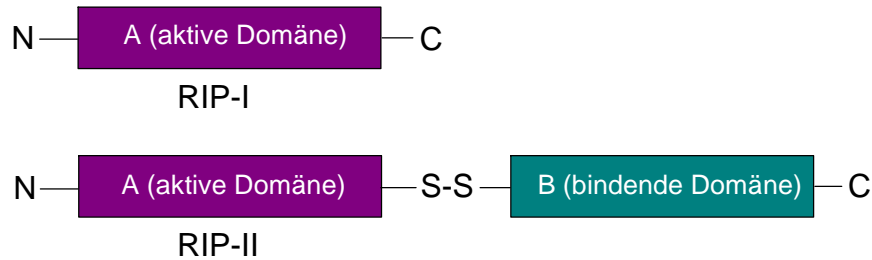


Abb. 5. Schematische Darstellung der Tertiär- bzw. Quartärstruktur von RIP-I und RIP-II nach de Virgilio et al. (2010).

Ungeachtet der strukturellen Unterschiede von RIP-I und RIP-II besitzen die aktiven Domänen die gleiche Funktion: die Inaktivierung von Ribosomen. Sie zeigen auch eine vergleichbar hohe Aktivität (Hebestreit et al., 2006; Polito et al., 2009; Weng et al., 2009). Dieser Teil der Proteintoxine scheint bei den meisten RIP stark konserviert zu sein und unterscheidet sich nur sehr wenig. Die membranbindende Domäne der RIP-II hingegen kann gegen unterschiedliche Epitope der Zellmembran gerichtet sein. Dabei besteht oft eine hohe Affinität zu Galaktoseresten. Nach der Bindung an diese Stellen erfolgt eine Rezeptor vermittelte Endozytose und ein retrograder Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (ER). Dort werden wahrscheinlich A- und B-Domäne hydrolytisch voneinander getrennt. Ein geringer Anteil der Aminosäure Lysin in der aktiven Domäne scheint dann deren endosomale Freisetzung in das Zytoplasma zu begünstigen. Diese inaktiviert schließlich irreversibel die Ribosomen und treibt die Zelle damit in die Apoptose (de Virgilio et al., 2010; Polito et al., 2009; van Damme et al., 2001).

Das Fehlen einer Membranbindedomäne in RIP-I führt bei diesen zu einer unzureichenden Aufnahme in das Zytoplasma. RIP-I werden zwar nicht Rezeptor vermittelt endozytiert, werden aber dennoch spontan in Vesikeln von den Zellen aufgenommen. Ein retrograder Transport zum ER und eine zytoplasmatische Freisetzung bleiben jedoch, abgesehen von der spontanen Lyse einzelner Endosomen, aus (Weng et al., 2012b). Somit gelangt die aktive Domäne der RIP-I nicht an ihre Zielstrukturen, eine Ribosomeninaktivierung bleibt aus. Dies begründet die geringe Zytotoxizität der RIP-I. Erst durch die Kombination mit geeigneten Triterpensaponinen (siehe 1.2) kann durch deren synergistisch die RIP-I-Zytotoxizität verstärkende Wirkung das Defizit der fehlenden Membranbindedomäne bezüglich der Zytotoxizität ausgeglichen werden und eine den RIP-II vergleichbare Zytotoxizität erreicht werden. Weng bezeichnete jene Saponine deshalb auch als „löslichen Membrandomänenersatz“.

1.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Testung von pflanzlichen saponinreichen Extrakten in einem Zellsystem die Eignung dieser Extrakte und der darin enthaltenen Saponine zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I (RIP-I) untersucht werden.

Bei Eignung, sollten nach Möglichkeit die verantwortlichen Inhaltsstoffe (Saponine) aus den Extrakten isoliert, charakterisiert und deren Struktur aufgeklärt werden.

Durch die Testung strukturell unterschiedlicher Reinstoffe (Saponine), sollten Strukturmerkmale, welche eine synergistische Zytotoxizität zwischen Saponinen und RIP-I unterstützen, identifiziert und daraus Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet werden.

Darüber hinaus sollte der Einfluss potentiell synergistisch RIP-I-zytotoxizitätsverstärkender Saponine auf Membranen, insbesondere Zellmembranen unter besonderer Berücksichtigung einer Beeinflussung des Zellmembrancholesterols untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Pflanzenextraktion

Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4, Christ, Osterode

Hackmühle SM2000, Retsch, Haan

Pulvermühle Universalmühle M20, IKA Labortechnik, Staufen

Rotationsverdampfer Rotavapor R114, Büchi, Flawil, Schweiz

Vakuumpumpe CVC24, Vaccubrand, Wertheim

Trockenschrank Modell 800, Memmert, Schwabach

Wasserbad B480, Büchi, Flawil, Schweiz

2.1.2 Stoffisolation und Strukturaufklärung

2.1.2.1 HPLC

Controller CBM-20A, Shimadzu, Duisburg

Detektor SPD-20AV, Shimadzu, Duisburg

Pumpen LC-8A, Shimadzu, Duisburg

Säule LiChroSpher 100 RP-18 endcapped 5 μm (248 x 27 mm), Knauer, Berlin

Säule UltraSep ES Pharm RP18E 7 μm (250 x 8 mm), SepServ, Berlin

2.1.2.2 HPLC-ESI-TOF-MS und ESI-TOF-MS

HPLC Agilent 1100 HPLC System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

Massenspektrometer Agilent 6210 ESI-TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

Säule UltraSep ES Pharm RP18 5 μm (250 x 4 mm), SepServ, Berlin

2.1.2.3 NMR

NMR Spektrometer ECX 400, Jeol, Peabody, MA, USA

NMR Spektrometer AVANCE III 700, Bruker, Fällanden, Schweiz

2.1.3 Zellkultur

Autoklav Varioklav, H+P Labortechnik, Hackermoos

Brutschrank Biosafe plus, Integra Bioscience, Fernwald

Präzisionsheizplatte PZ 28-1, Harry Gestigkeit, Düsseldorf

Sicherheitswerkbank Tecnoflow, Integra Bioscience, Fernwald

Tischmikroskop Wilovert S, Helmut Hund, Wetzlar

Vakuumabsaugsystem A2 104, VWR, Darmstadt

Zählkammer nach Neubauer, Brand, Wertheim

Zellhomogenisator Dounce (7 mL), Carl Roth, Karlsruhe

2.1.4 Zyto- und Membrantoxizitätsuntersuchungen

Mikroplattenreader Tecan Spectra Fluor, Tecan, Berlin

Mikroplattenreader Tecan Infinite F200, Tecan, Berlin

2.1.5 Oberflächenspannungsmessungen

Brenner Bleuet Micro Plus, Campingaz, Hungen-Inheiden

Tensiometer K10, Krüss, Hamburg

Thermostat alpha 6, Lauda, Lauda-Königshofen

2.1.6 Radioanalytische Untersuchungen

Szintillationscounter Wallac 1400 DSA Ver. 2.50, PerkinElmer, Gaithersburg, MD, USA

2.1.7 Sonstige Geräte, Waagen und Zentrifugen

Analysenwaage Sartorius analytic AC210P, Sartorius, Göttingen

Analysenwaage Sartorius BP211D, Sartorius, Göttingen

Analysenwaage Sartorius CP224S-0CE, Sartorius, Göttingen

div. Kolbenhubpipetten, Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge Mikro200R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Magnetrührer IKA Combimag RCH, IKA Labortechnik, Staufen

Mehrkanalpipette Transferpette-8, Brand, Wertheim

pH-Meter SympHony SP70P, VWR, Darmstadt
Reinstwasseranlage Labostar UV 2, Siemens, Barsbüttel
Repetierpipette Multipette plus, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex RK 100, BANDELIN electronic, Berlin
Vakuumpzentrifuge Savant SPD111V, Thermo Scientific, Langenselbold
Vakuumpzentrifuge Vacuum concentrator, Bachofer, Reutlingen
Vortexer MS2 Minishaker, IKA Labortechnik, Staufen
Vortexer Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage Sartorius portable PT1200, Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Biofuge pico, Heraeus instruments, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0, Heraeus instruments, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

Dialysemembran Float-A-Lyzer G2 (100-500 MWCO), Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA, USA
Dialysemembran ZelluTrans-V-Series (1000 MWCO), Carl Roth, Karlsruhe
Flüssigkeitsreservoirs (12 Kanal), VWR, Darmstadt
Flüssigkeitsreservoirs (50 mL, steril), NeoLab, Heidelberg
Kryoröhrchen (2 mL, steril), Greiner bio-one, Frickenhausen
Microplatten 24-Well (transparent, steril), Greiner bio-one, Frickenhausen
Microplatten 96-Well (schwarz, transparenter F-Boden, steril), Greiner bio-one, Frickenhausen
Microplatten 96-Well (transparent, F-Boden, steril), Greiner bio-one, Frickenhausen
NMR-Röhrchen 507-HP-8, Norell, Landisville, NJ, USA
Reaktionsgefäße (PP, 1,5 mL; 2 mL), Carl Roth, Karlsruhe
Repetierspitzen Combitips plus (1 mL; 5 mL; 10 mL), Eppendorf, Hamburg
Soxhlet-Hülsen 48 x 230 mm, NeoLab, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter (steril, 0,22 µm, ø 13 mm, Nylonmembran), Carl Roth, Karlsruhe
Szintillationsröhrchen Polyvials 20, Zinsser Analytic, Frankfurt am Main
Zellkulturflaschen (Gasaustauschfilter, 25 cm²; 75 cm²), Greiner bio-one, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (steril, PP, 15 mL; 50 mL), Greiner bio-one, Frickenhausen

2.3 Zelllinien

2.3.1 NIH-3T3/HER14

Bei NIH-3T3-Zellen (ACC 59) handelt es sich um murine Embryonalzellen (DSMZ, 2013a). Diese können mit dem humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptorgen (EGF-Rezeptorgen) transfiziert werden. Infolge dessen exprimieren die Zellen den humanen EGF-Rezeptor an ihrer Plasmamembran. Derart veränderte NIH-3T3-Zellen werden auch als HER14-Zellen bezeichnet (Fan et al., 1993). Durch Bindung des humanen EGF dimerisiert der Rezeptor und wird aktiviert. Über eine Kaskade wird ein Signal in das Zellinnere geleitet, welches die Zellteilung stimuliert und apoptotische Prozesse blockiert (Oda et al., 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten NIH-3T3/HER14-Zellen wurden von Dr. Alexander Weng, Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin (CBF) zur Verfügung gestellt und für die Versuche zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin-EGF-Proteinkonjugaten durch Saponine verwendet. Die Zellen wachsen adhärent mit einer Verdopplungszeit von ca. 20 h und wurden gemäß den Empfehlungen der DSMZ kultiviert.

2.3.2 ECV-304

Die Zelllinie (ACC 310) wurde 1984 aus der Nabelschnurvene eines neugeborenen japanischen Jungen gewonnen und zunächst als sehr schnell proliferierende Endothelzelllinie beschrieben. Spätere DNA-Analysen zeigten, dass es sich um ein Derivat der humanen Harnblasenkarzinom-Zelllinie T-24 handelt (DSMZ, 2013b). Durch die Natur dieser Zellen als Oberflächengewebe eines Hohlorgans zu fungieren, war zu vermuten, dass diese sich besser als andere Zelllinien für Versuche eignen, welche die Oberflächen von Zellen maßgeblich involvieren. Untersuchungen zur Membran- und Zytotoxizität amphiphiler Substanzen wie Saponine, welche die Lipiddoppelmembran von Zellen beeinflussen können, sind solche Versuche. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit bei nahezu allen zellbiologischen Untersuchungen ECV-304-Zellen verwendet. Die Zellen wachsen adhärent mit einer Verdopplungszeit von zwei Tagen und wurden von der DSMZ bezogen und gemäß den Empfehlungen kultiviert (DSMZ, 2013b).

2.4 Chemikalien, Medien und Puffer

Alle Verdünnungen und wässrigen Lösungen wurden mit doppel-demineralisiertem Wasser hergestellt, das in einer Reinstwasseranlage gewonnen wurde.

2.4.1 Pflanzenextraktion, Stoffisolation und Strukturaufklärung

Ameisensäure, Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniak 25%ig, VEB Labortechnik, Apolda
Ammoniumformiat, Carl Roth, Karlsruhe
Buthanol, Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure 98%ig, Carl Roth, Karlsruhe
Methanol (HPLC Reinheit), Fischer Scientific, Schwerte
Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt
Petroläther (40-60 °C), Th. Geyer, Renningen
Pyridin-d₅, Deutero, Kastellaun
Trifluoressigsäure, Carl Roth, Karlsruhe

2.4.2 Zellkultur

1 M HEPES-Pufferlösung (50x), Biochrom, Berlin
DMEM-Flüssigmedium ohne L-Glutamin (3,7 g/L NaHCO₃, 4,5 g/L D-Glucose), Biochrom, Berlin
DMEM-Flüssigmedium ohne Phenolrot (3,7 g/L NaHCO₃, 4,5 g/L D-Glucose), Biochrom, Berlin
FBS Superior, Biochrom, Berlin
L-Alanyl-L-Glutamin-Lösung (200 mM), Biochrom, Berlin
Medium 199 mit Earle's Salzen, mit stabilem Glutamin (2,2 g/L NaHCO₃), Biochrom, Berlin
PBS-Lösung ohne Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca²⁺, Mg²⁺, Biochrom, Berlin

2.4.3 Zyto- und Membrantoxizitätsuntersuchungen

Agrostin aus Samen von *Agrostemma githago* L., Sigma-Aldrich, Steinheim
beta-Sitosterol, ARCO-Chemikalien, Berlin
Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH), Roche, Mannheim
DMSO, Carl Roth Karlsruhe
EDTA, Fluka, Buchs, Schweiz

Hoechst 33258, Sigma-Aldrich, Steinheim

isotonische NaCl-Lösung (0,9% ig), B.Braun, Melsungen

MTT, Carl Roth, Karlsruhe

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt

Natriumchlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim

Phosphorsäure 65% ig, Carl Roth, Karlsruhe

Salzsäure 36% ig, p. a., Carl Roth, Karlsruhe

Saporin aus Samen von *Saponaria officinalis* L., Sigma-Aldrich, Steinheim

Triton-X 100, Carl Roth, Karlsruhe

doppelt-konzentrierter DNA-Puffer (pH 7,4):

18 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

82 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

4 mM EDTA

4 M NaCl

2.4.4 Radioanalytische Untersuchungen

^3H -Cholesterol (1.85 TBq/mmol, 37 MBq/mL), BioTrend Chemikalien, Köln

Cholestrol, Carl Roth, Karlsruhe

Ethanol 98,8% ig, p. a., Carl Roth, Karlsruhe

Lysosome Isolation Kit, Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumcitrat, Merck, Darmstadt

OptiPhase Supermix Cocktail, Perkin Elmer, Rodgau

p-Nitrophenol, Merck, Darmstadt

p-Nitrophenolphosphat, Carl Roth, Karlsruhe

Soluene-350, Perkin Elmer, Rodgau

Tween 20, AppliChem, Darmstadt

Bestandteile des Lysosome Isolation Kits, Sigma-Aldrich:

5× *Extraction Buffer* (Konzentrat) → 1× *Extraction Buffer* (Verdünnung)

20× *OptiPrep Dilution Buffer* (Konzentrat) → 1× *OptiPrep Dilution Buffer* (Verdünnung)

Optiprep Density Gradient Medium

2,3 M Sucrose-Lösung

2,5 M CaCl_2 -Lösung (Konzentrat) → 250 mM CaCl_2 -Lösung (Verdünnung)

Protease Inhibitor Cocktail-Lösung

2.5 Untersuchte Saponine

alpha-Hederin, Carl Roth, Karlsruhe

beta-Äscin, Merck, Darmstadt

Digitonin, VEB Ysat, Wernigerode

Ginsenosid Rg2, Phytolab, Vestenbergsgreuth

Glycyrrhethinsäure, Merck, Darmstadt

Glycyrrhizin (Ammoniumaquat), Carl Roth, Karlsruhe

Hederacosid C, Carl Roth, Karlsruhe

Primulasäure 1, Isolationsprodukt (Reinheit $\geq 95\%$), Prof. Hiller, HU Berlin

Soyasaponin Bb, Sigma-Aldrich, Steinheim

vom Arbeitskreis Prof. Lacaille-Dubois, Universität Bourgogne, Frankreich: (6)

AEX55, AMA-1, AMR, AS6.2, AS64R, ASJL1

vom Arbeitskreis Prof. Warashina, Universität Shizuoka, Japan: (3)

Teaseedsaponin I, Teaseedsaponin J, Assamsaponin F

von AnalytiCon discovery GmbH, Potsdam: (52)

NP-000472, NP-000474, NP-000498, NP-000502, NP-000712, NP-001531, NP-001976, NP-003006, NP-003881, NP-004184, NP-004355, NP-005233, NP-005236, NP-005446, NP-007471, NP-008340, NP-008419, NP-009259, NP-011187, NP-011198, NP-012006, NP-012034, NP-012048, NP-012298, NP-012672, NP-012978, NP-013105, NP-013544, NP-013545, NP-014590, NP-014627, NP-017674, NP-017675, NP-017676, NP-017677, NP-017705, NP-017706, NP-017749, NP-017750, NP-017751, NP-017773, NP-017774, NP-017775, NP-017777, NP-017778, NP-017779, NP-017810, NP-017888, NP-017889, NP-018108, NP-018109, NP-018110

im Rahmen dieser Arbeit aus Saponinum album isolierte Saponine: (2)

SA1641, SA1657

im Rahmen dieser Arbeit aus Agrostemma githago L. isolierte Saponine: (4)

AG1, AG2, AG3, AG4

2.6 Untersuchte Pflanzen, Drogen und Saponinum album

Die Extrakte der aufgeführten saponinhaltigen Pflanzen und Drogen wurden daraufhin untersucht, ob sie eine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I ermöglichen und für weitere Untersuchungen beispielsweise die Isolation und Testung der Reinstoffe (Saponine) geeignet sind. Ein weiteres Kriterium für die Auswahl war die in ausreichender Menge praktikable Beschaffbarkeit.

2.6.1 *Gypsophila oldhamiana* MIQ. (Caryophyllaceae)

Samen der Pflanzen wurden vom Botanischen Garten Berlin bezogen und im Gewächshaus des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin kultiviert. Nachgewiesene Vorkommen der Art befinden sich in den USA, China und Südkorea (Encyclopedia of Life, 2013a). Der Wuchs ist eher niederliegend. Die kräftigen Sprosse weisen deutliche Nodien auf. Die Blätter sind ca. 8 cm lang und ca. 2 cm breit, länglich, sitzend und dekussiert. Der Blütenstand bildet ein dichasiales Verzweigungsmuster und weist oft mehr als 100 weiße bis schwach rosafarbene Einzelblüten von ca. 10 mm Größe auf. Für diese Arbeit wurden die Wurzeln der Pflanzen verwendet.



Abb. 6. *Gypsophila oldhamiana* MIQ. **A)** Blüten und Blätter **B)** Wurzeln 2 Jahre alter Pflanzen

2.6.2 *Gypsophila pacifica* KOM. (Caryophyllaceae)

Samen der Pflanzen wurden vom Botanischen Garten Berlin bezogen und im Gewächshaus des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin kultiviert. Vorkommen der Art sind in kontinental-klimatischen Regionen Asiens (Encyclopedia of Life, 2013b) nachgewiesen. (Encyclopedia of Life, 2013a). Die Pflanzen erreichen eine Wuchshöhe von etwa 80 cm. Die recht kräftigen Sprosse weisen deutliche Nodien auf und erreichen eine Länge von ca. 80 cm mit ca. 6 cm langen und 2 cm breiten sitzenden, kreuz-gegenständig angeordneten länglichen Blättern. Der Blütenstand bildet ein dichasiales Verzweigungsmuster und weist oft mehr als 100 weiße bis schwach rosafarbene Einzelblüten von ca. 10 mm Größe auf. Für diese Arbeit wurden die Wurzeln der Pflanzen verwendet.



Abb. 7. *Gypsophila pacifica* KOM. **A)** Habitus **B)** Wurzel einer Pflanze. Wurzeln 2 Jahre alter Pflanzen waren oft deutlich länger als 30 cm mit am Schaft fingerdicken Wurzeltrieben.

2.6.3 *Gypsophila arrostii* GUSS. (Caryophyllaceae)

Die verwendeten Wurzeln entstammten Wildsammlungen in den Provinzen Antalya und Denizli der Türkei. Die dort wachsenden Pflanzen werden der endemischen Subspezies *Nebulosa* zugeordnet, so dass der korrekte botanische Name *Gypsophila arrostii* subsp. *nebulosa* (BOISS. & HELDR.) GREUTER & BURDET ist. Auf Grund der Größe und Dicke der Wurzeln wurde ein Alter der Ursprungspflanzen von 5 bis 10 Jahren vermutet. Insbesondere die unterirdischen Pflanzenteile von *G. arrostii* enthalten größere Mengen Saponine (Arslan et al., 2013).

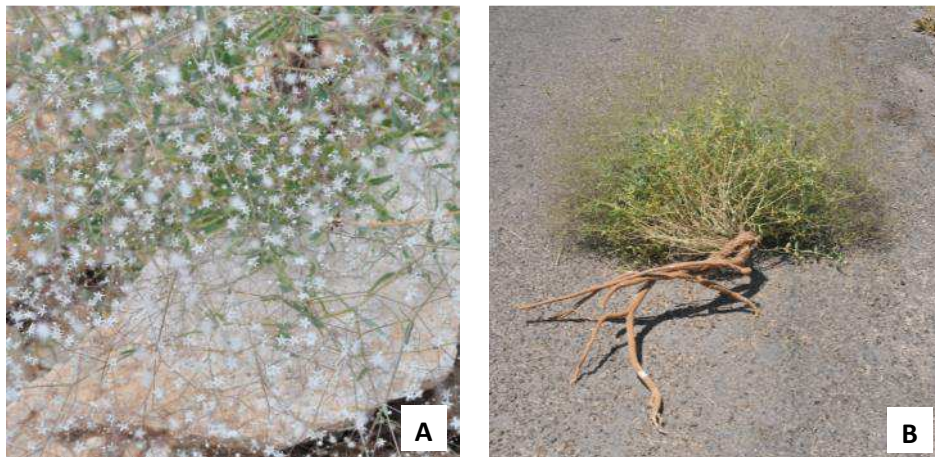


Abb. 8. *Gypsophila arrostii* Guss. **A)** Blüten **B)** Mehrere Jahre alter Wurzelstock einer Pflanze; Länge ca. 75 cm, Durchmesser einzelner Wurzeln am Schaft: ca. 3 cm. (Fotos: Idris Arslan)

2.6.4 *Agrostemma githago* L. (Caryophyllaceae)

Die verwendeten Samen entstammten der Produktion des Instituts für Züchtungsforschung, Quedlinburg. Die schwarzen, 3 mm großen, etwas kantigen Samen sind sowohl für das Vorkommen des RIP-I Agrostin als auch von Saponinen, welche die Zytotoxizität von Agrostin (und Saporin) synergistisch verstärken, bekannt (Hebestreit et al., 2006).

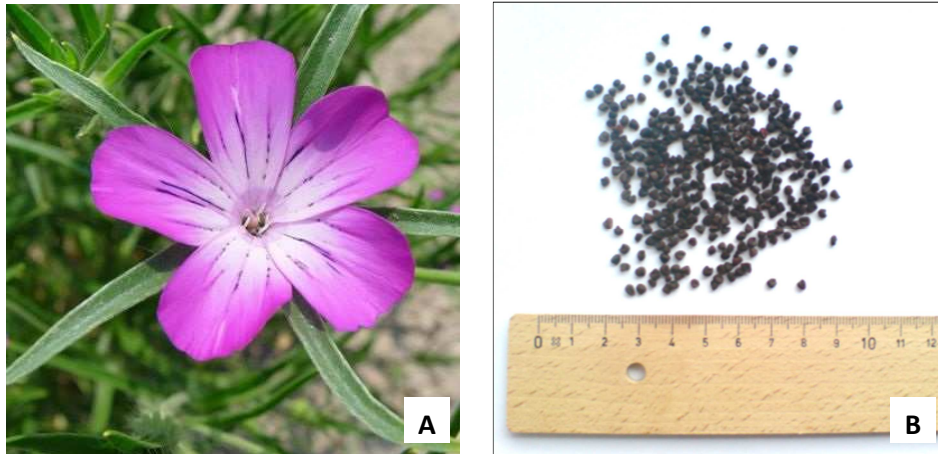


Abb. 9. *Agrostemma githago* L. **A)** Blüte: Typisch sind die schmalen Kelchblätter, welche deutlich länger als die Kronblätter sind. (Foto: Matthias F. Melzig) **B)** Samen

2.6.5 *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae)

Die Samen wurden von Prof. Melzig aus einer Wildsammlung zur Verfügung gestellt. Für Saponine der Wurzeln von *S. officinalis* ist die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung des ebenfalls in der Pflanze vorkommenden RIP-I Saporin bekannt. Insbesondere das Saponin SO1861 erwies sich als besonders potent (Thakur et al., 2013a). Ob derartige Saponine auch in den Samen der Pflanzen vorhanden sind, sollte getestet werden.

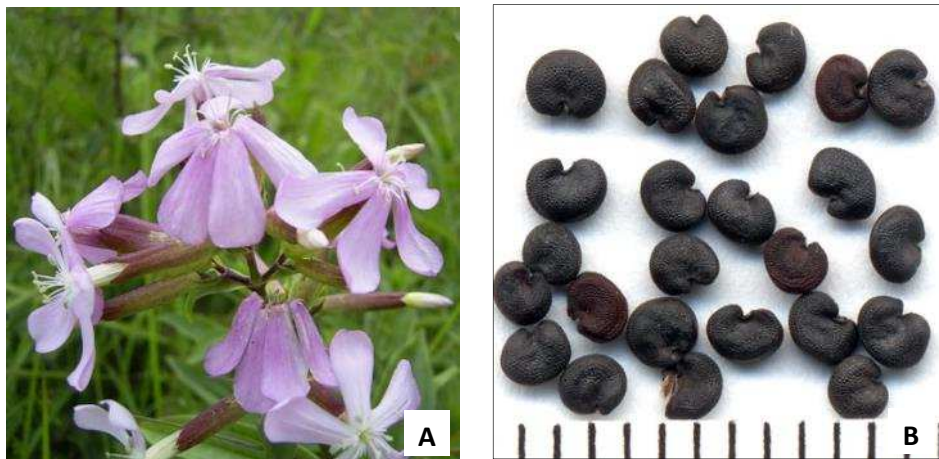


Abb. 10. *Saponaria officinalis* L. **A)** Blüten **B)** Samen; Markierungsabstand = 1 mm. (Foto: botanyjohn.org)

2.6.6 *Silene vulgaris* (MOENCH) GARCKE (Caryophyllaceae)

Die Samen wurden von Prof. Melzig aus einer Wildsammlung zur Verfügung gestellt. Für die Stammpflanze sind einige für die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I geeignet erscheinende bisdesmosidische Saponine beschrieben (Glensk et al., 1999).

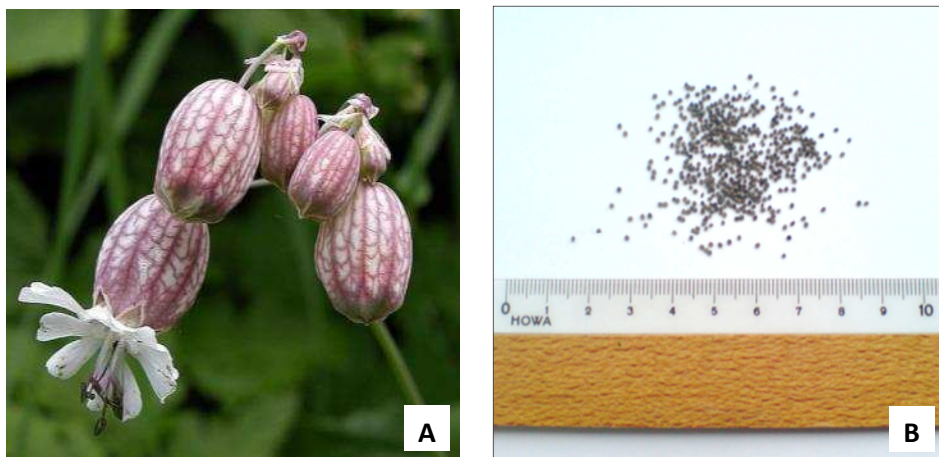


Abb. 11. *Silene vulgaris* L. **A)** Blüten (Foto: wikipedia.org) **B)** Samen

2.6.7 *Vaccaria hispanica* (MILL.) RAUSCHERT (Caryophyllaceae)

Die Samen wurden von Sinophytomed GmbH, Waldsassen bezogen. Weitere oft genutzte Synonyme der Stammpflanze sind *Vaccaria segetalis* GARCKE ex ASCH. und *V. pyramidata* MEDIK. (Caryophyllaceae). Die schwarzen, 2 mm großen, nahezu kugelrunden Samen werden in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) verwendet (Acupuncture Today, 2013). Für die Stammpflanze sind einige für die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I geeignet erscheinende bisdesmosidische Saponine beschrieben.

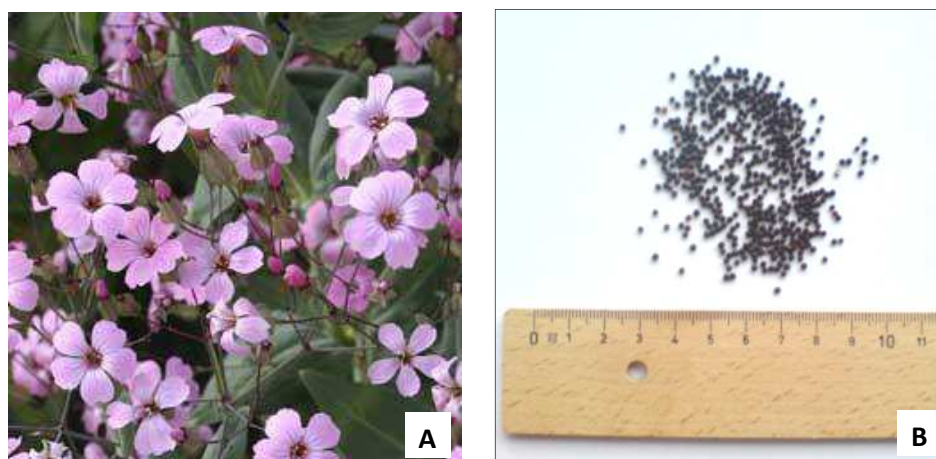


Abb. 12. *Vaccaria hispanica* (MILL.) RAUSCHERT **A**) Blüten (Foto: biosaatgut.eu) **B**) Samen

2.6.8 Saponinum album

Hierbei handelt es sich um einen ehemals kommerziellen, auf eine bestimmte Hämolyseaktivität eingestellten saponinreichen Extrakt aus den Stammpflanzen *Gypsophila arrostii* GUSS. und *G. paniculata* L. (Caryophyllaceae). Die Verwendung beispielsweise als Expektoranz ist heute obsolet. In DAB 7-DDR war Saponinum album jedoch monographiert. Die in Saponinum album enthaltenen Saponine können die Zytotoxizität von RIP-I (Agrostin, Saporin) und chimären Toxinen synergistisch verstärken (Bachran et al., 2009; Hebestreit et al., 2006). Aus diesem Grund wurde Saponinum album in dieser Arbeit oft als Positivkontrollsubstanz bei Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I durch Saponine verwendet. Diesen Zweck erfüllte in einigen Versuchen auch das von Weng (2009) aus Saponinum album isolierte Saponin SA1641.

2.7 Phytochemische Methoden der Extraktion, Isolation und Strukturaufklärung

2.7.1 Extraktion

Samen wurden zunächst zu Pulver zermahlen und anschließend in einer Soxhlet-Apparatur mit Petroläther 24 h lang entfettet. Wurzeln wurden bei 35 °C getrocknet, gehäckselt und zu Pulver zermahlen. Die Extraktion erfolgte zweimal mit Methanol 90% im Verhältnis 100 g Droge pro 500 mL Lösungsmittel unter Rühren bei Raumtemperatur über Nacht. Die methanolischen Extrakte wurden am Rotationsverdampfer bei 40 °C/100 mbar eingengt, mit NaOH bis zur basischen Reaktion versetzt und über Nacht bei 40 °C gerührt. Anschließend wurde der Extrakt auf 4 °C gekühlt und filtriert. Das Filtrat wurde 72 h gegen Aqua dest. dialysiert (MWCO 1000). Das Dialysat wurde in der Vakuumzentrifuge bei 40 °C weiter eingengt und anschließend gefriergetrocknet.

2.7.2 Isolation

Um einen Überblick über die Komplexität der Extrakte zu erhalten und um potenziell saponinhaltige Peaks zu identifizieren, wurden die Extrakte an einem Agilent HPLC-ESI-TOF-MS-System unter Verwendung der Methode a) vermessen (Programm: Agilent Masshunter Qualitative Analysis Vers. B.02.00). Die Isolation von Saponinen aus den gefriergetrockneten Extrakten erfolgte jedoch an einem präparativem Shimadzu HPLC-System (Programm: LC Solution Vers. 1.24 SP1) bei einer Detektionswellenlänge von 210 nm. Dabei wurden zwei Methoden b) und c) entwickelt, wobei sich Methode c) im Verlauf der Arbeit als geeigneter herausstellte da sie eine höhere Trennungsschärfe bot:

- | | |
|-----------------------|---|
| a) Säule: | SepServ UltraSep ES Pharm RP18 5 µm (250 × 4 mm) |
| Fließmittel: | (A) Methanol, (B) H ₂ O (mit 0,1 % Essigsäure) |
| Fließmittelgradient: | 60 % A zu 100 % A in 30 min |
| Flussrate: | 0,5 mL/min |
| Injektionsvolumen: | 20 µL |
| Extraktkonzentration: | 10 mg/mL |
| b) Säule: | Knauer LiChroSpher 100 RP-18 endcapped 5 µm (248 × 27 mm) |
| Fließmittel: | (A) Methanol, (B) H ₂ O (mit 0,05 % TFA) |
| Fließmittelgradient: | 60 % A zu 100 % A in 30 min |
| Flussrate: | 5 mL/min |
| Injektionsvolumen: | 2 mL |
| Extraktkonzentration: | 15 mg/mL |
-

- c) Säule: SepServ UltraSep ES Pharm RP18E 7 μm (250 \times 8 mm)
Fließmittel: (A) Methanol, (B) 0,1 M Ammoniumformiat-Puffer pH 7
Fließmittelgradient: 60 % A zu 100 % A in 30 min
Flussrate: 2 mL/min
Injektionsvolumen: 750 μL
Extraktkonzentration: 10 mg/mL

Die gewonnenen Fraktionen wurden mittels ESI-TOF-MS identifiziert und die Reinheit abgeschätzt. Anschließend wurden die Fraktionen in der Vakuumzentrifuge bei 40 °C bis zur Trockne gebracht und gegebenenfalls mit der jeweils gleichen Methode rechromatographiert um eine für weitere Untersuchungen hinreichende Reinheit zu erlangen.

2.7.3 Strukturaufklärung

Für ^1H -/ ^{13}C -NMR-Analysen wurden ca. 5 mg Substanz in 700 μL Pyridin- d_5 in ein NMR-Röhrchen gegeben und an einem Jeol ECX 400 bzw. Bruker AVANCE III 700 NMR-Spektrometer vermessen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Hilfe von PD Dr. Kristina Jenett-Siems, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin.

2.8 Zell- und membranbiologische Methoden

2.8.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in 25 cm²-Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurde die Kultur gedrittelt. Zum Ablösen wurden die Zellen trypsinisiert. Das Kulturmedium für EVC-304-Zellen bestand aus Medium 199 mit Earle's Salzen und stabilem Glutamin (mit Phenolrot) + 2% HEPES + 10 % FBS und wurde auch für die Versuche verwendet. Das Kulturmedium für NIH-3T3/HER14-Zellen bestand aus DMEM-Flüssigmedium ohne L-Glutamin (mit Phenolrot) + 1 % stabiles Glutamin + 10 % FBS und wurde auch für die Versuche verwendet. Für Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden 5000 Zellen pro Well in transparente (MTT-Assay) oder schwarze (DNA-Quantifizierung) 96-Well-Platten ausgesät und zunächst 24 h anwachsen gelassen. Für Untersuchungen zur Membrantoxizität (LDH-Assay) wurden 2000 ECV-304-Zellen pro Well in transparente 96-Well-Platten ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Außerdem wurde für letztere Versuche ein Phenolrot-freies Kulturmedium verwendet, da der Farbindikator die Bestimmung des umgesetzten Substrats dieser Versuche gestört hätte. Weiterhin empfiehlt der Hersteller des LDH-Assay-Kits einen FBS-Gehalt von maximal 1 % während der Versuche, da Seren selbst unterschiedlich hohe Gehalte von Laktatdehydrogenase aufweisen und somit die Messungen stören würden (Roche, 2011). Als Kulturmedium diente deshalb: DMEM-Flüssigmedium ohne Phenolrot + 1 % stabiles Glutamin + 2 % HEPES + 10 % FBS. Das Versuchsmedium bestand aus: DMEM-Flüssigmedium ohne Phenolrot + 1 % FBS.

2.8.1.1 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saporin an ECV-304-Zellen

Da Saporin als Standard-RIP-I für alle Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung durch die zu testenden Substanzen dienen sollte, musste zunächst eine geeignete Konzentration gefunden werden. Diese sollte einerseits so niedrig wie möglich sein um nicht allein zytotoxisch zu wirken, andererseits hoch genug sein, um in Kombination mit geeigneten Saponinen eine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung zu ermöglichen.

Hierfür wurde das Kulturmedium von den bereits 24 h mit Zellen besiedelten 96-Well-Platten entfernt und gegen 180 µL Medium mit 5 µg/mL SA1641, 1,5 µg/mL Saponinum album oder ohne Zusätze ausgetauscht. Hinzu wurden jeweils 20 µL verschiedener Konzentrationen (1×10^{-13} – 1×10^{-7} M) Saporin in PBS gegeben. Anschließend wurde 72 h im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Eine Auswertung erfolgte mittels MTT-Assay und DNA-Quantifizierung.

2.8.1.2 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saponinum album an ECV-304-Zellen

Da Saponinum album als Positivkontrolle bei allen Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin durch die zu testenden Substanzen und Extrakte dienen sollte, musste zunächst eine geeignete Konzentration gefunden werden. Diese sollte einerseits so niedrig wie möglich sein um nicht selbst zytotoxisch zu wirken, andererseits hoch genug sein um in Kombination mit Saporin dessen Zytotoxizität synergistisch zu verstärken.

Dazu wurde das Kulturmedium von den bereits 24 h mit Zellen besiedelten 96-Well-Platten entfernt und gegen 180 µL Medium mit verschiedenen Konzentrationen (0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 µg/mL) von Saponinum album ausgetauscht. Hinzu wurden jeweils entweder 20 µL 1 nM Saporin in PBS oder nur PBS gegeben. Anschließend wurde 72 h im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampf Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Eine Auswertung erfolgte mittels MTT-Assay und DNA-Quantifizierung.

2.8.1.3 Untersuchungen zur Zytotoxizität von ausgewählten Saponinen und Extrakten an ECV-304-Zellen

Bei den Untersuchungen wurden Extrakte und einzelne Saponine auf ihre Zytotoxizität und die Eigenschaft die Zytotoxizität des RIP-I Saporin synergistisch verstärken zu können untersucht. Saponine beginnend mit der Bezeichnung „NP“ wurden während der Entstehungszeit dieser Arbeit im Rahmen einer Diplomarbeit von Elena Westhof untersucht.

Dazu wurde das Kulturmedium von den bereits 24 h mit Zellen besiedelten 96-Well-Platten entfernt und gegen 180 µL Medium mit verschiedenen Konzentrationen ([#]0,5, 1, 2,5, [#]3,5, 5, 7,5, 10 µg/mL oder 1, 5, 10, 15, 25, 50 µg/mL) der Extrakte oder Saponine ausgetauscht. Hinzu wurden jeweils entweder 20 µL 1 nM Saporin in PBS oder nur PBS gegeben. Anschließend wurde 72 h im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampf Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Eine Auswertung erfolgte mittels MTT-Assay und DNA-Quantifizierung.

[#] = Die Konzentrationen 0,5 µg/mL und 3,5 µg/mL wurden alternativ verwendet.

2.8.1.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saponinen aus *Agrostemma githago* L. an ECV-304-Zellen

So wie auch für Saponinum album unter 2.8.1.2 und für andere Verbindungen und Extrakte unter 2.8.1.3 beschrieben, wurden auch die aus einem Extrakt der Samen von *Agrostemma githago* isolierten Saponine AG1, AG2, AG3 und AG4 auf ihre Zytotoxizität und die Eigenschaft die Zytotoxizität von 1 nM Saporin synergistisch zu verstärken untersucht. Unveröffentlichten Ergebnissen von Thakur et al. und Weng et al. (Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité - Universitätsmedizin Berlin (CBF)) zufolge wird die Zytotoxizität von RIP-I dann besonders stark synergistisch verstärkt, wenn diese mit Saponinen der gleichen Stammpflanze kombiniert werden. Aus diesem Grund wurde die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung der aus *A. githago* isolierten Saponine auch in Kombination mit 1 nM Agrostin, einem RIP-I, das ebenfalls in den Samen von *A. githago* enthalten ist, untersucht. Die Vorgehensweise unterschied sich dabei nicht von Versuchen, bei denen 1 nM Saporin verwendet wurde und wurde unter 2.8.1.3 bereits beschrieben.

2.8.1.5 Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saporin-EGF an NIH-3T3/HER14-Zellen

Saporin-EGF stellt ein künstliches Proteinkonjugat aus dem Ligand des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR), dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), und dem RIP-I Saporin verbunden über ein Zwischenstück dar. Ein solches Konjugat kann insbesondere an Zellen binden, welche den EGFR besonders stark exprimieren wie z. B. einige Tumorzellen. Durch die Expression des EGF-Rezeptors (EGFR) durch die Zellen dieser Zelllinie und die Verwendung an den Liganden des EGFR gekoppelten Saporins sollte dessen synergistische Zytotoxizitätsverstärkung durch geeignete Saponine besonders stark ausfallen. Die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor setzt nach Entkopplung des Saporins dieses bereits in direkter Nähe zur Zellmembran frei, so dass dessen Konzentration an dieser höher als bei Versuchen mit ungebundenem Saporin sein sollte. Somit wird die Wahrscheinlichkeit der Endozytose wesentlich höher sein und sich eine gewisse Richtwirkung der Reaktion gegenüber Zellen ohne EGFR erzielen lassen (Bachran et al., 2006). Nichtsdestotrotz wird auch bei diesem Mechanismus ein Saponin benötigt, welches die Zytotoxizität des in den eingesetzten Konzentrationen weitgehend untoxischen Saporins synergistisch verstärken kann und somit die Eliminierung der Tumorzelle erst ermöglicht. Die verwendeten NIH-3T3/HER14-Zellen exprimieren den EGFR. Die Untersuchung der Zytotoxizität von Saporin-EGF auf NIH-3T3/HER14-Zellen kann also als Variante des Versuchs zur Zytotoxizität von Saporin auf ECV-304-Zellen gesehen werden. Zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung des Saporins aus Saporin-EGF wurden Saponinum album oder SA1641 verwendet und zwar in den gleichen Konzentrationen wie bei den Untersuchungen zur Zytotoxizität von Saporin an ECV-304-Zellen (2.8.1.1).

Dabei wurde das Kulturmedium von den bereits 24 h mit Zellen besiedelten 96-Well-Platten entfernt und gegen 180 μL Medium mit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SA1641, 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Saponinum album oder ohne Zusätze ausgetauscht. Dazu wurden jeweils 20 μL verschiedener Konzentrationen (1×10^{-14} – 1×10^{-9} M) Saporin-EGF in PBS gegeben. Anschließend wurde 72 h im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatmosphäre mit 5 % CO_2 inkubiert. Eine Auswertung erfolgte mittels MTT-Assay und DNA-Quantifizierung.

2.8.2 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein colorimetrischer Assay, welcher auf der Bestimmung der Enzymaktivität viabler Zellen beruht. Lebende, stoffwechselaktive Zellen reduzieren dabei enzymatisch das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) unter Öffnung des Tetrazoliumrings in ein violetteres, wasserunlösliches Formazan (s. Abbildung 13). Mitochondriale Dehydrogenasen sowie NADH- und NADPH-abhängige Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums gelten als dafür verantwortlich (Berridge et al., 2005; Mosmann, 1983). Da nach dem Zelltod die Aktivität dieser Enzyme rasch eingestellt wird, ist die umgesetzte Menge von MTT zum Formazan in etwa proportional zur Anzahl viabler Zellen. Somit kann der MTT-Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität verwendet werden. Dennoch wird der MTT-Assay auch Einflüssen unterliegen, die sich auf die enzymatische Aktivität der beteiligten Enzyme auswirken ohne den Zelltod zu verursachen und deshalb nicht immer richtige Ergebnisse liefern. Deshalb wurde die Zytotoxizität der untersuchten Substanzen in dieser Arbeit durch eine zweite Methode, welche diesen Einflüssen nicht unterliegt bestimmt. Dafür wurde die DNA-Quantifizierung (2.8.3) verwendet.

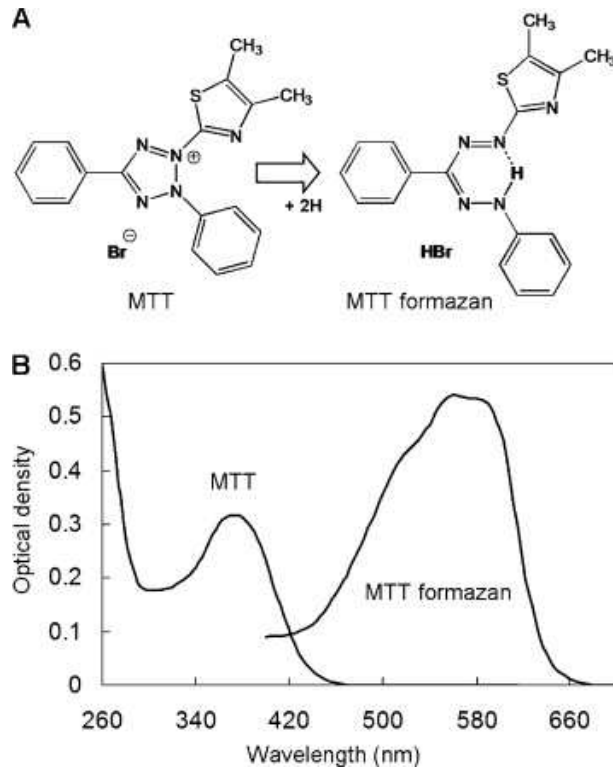


Abb. 13. MTT und Formazan **A)** Strukturformeln von MTT und dem entstehenden Formazan. **B)** Absorptionsspektren von MTT und dem entstehenden Formazan. (Stockert et al., 2012)

Für die Bestimmung der Zytotoxizität mittels MTT-Assay wurde das Medium inklusive gelöster Testsubstanzen von den 96-Well-Platten entfernt. Für den Test wurden 100 μL /Well 0,5 mg/mL MTT in Medium 199 mit Earle's Salzen und stabilem Glutamin (ECV-304) bzw. DMEM-Flüssigmedium ohne L-Glutamin (NIH-3T3/HER14) verwendet. Anschließend wurde 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Medium und nicht umgesetztes MTT wurden wieder entfernt und das gebildete wasserunlösliche Formazan, welches sich am Well-Boden niederschlug mit 100 μL /Well DMSO in Lösung gebracht. Um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs zu gewährleisten, wurden die Platten 5 min geschüttelt. Die Auswertung erfolgte am Microplattenreader (Tecan Spectra Fluor; Programm: XFluor4 Vers. 4.51) bei 580 nm Absorptionswellenlänge und 620 nm Referenzwellenlänge. Zur Berechnung der Zytotoxizität wurde die Absorption von Wells mit Testsubstanzen behandelte Zellen mit der von Wells unbehandelte Zellen verglichen.

2.8.3 DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der DNA beruht auf der Verstärkung der Fluoreszenz sowie der Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge nach Bindung des Farbstoffes Hoechst 33258 in die kleine Furche der dsDNA. Dieser Vorgang ist spezifisch für dsDNA wie sie im Zellkern vorliegt und über einen weiten Konzentrationsbereich linear (Labarca & Paigen, 1980). Da die dsDNA-Menge pro Zelle weitgehend konstant ist, ist das Ausmaß der Fluoreszenz proportional zur Anzahl der vorhandenen Zellen. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung der dsDNA als weiteres Mittel zur Zytotoxizitätsbestimmung genutzt, auch um systematische Fehler des MTT-Assays aufzudecken. Durch die Verwendung adhärent wachsender Zelllinien und einen Waschschrift war es möglich apoptotische und zerstörte Zellen, ebenso wie Zellkerne und freigesetzte DNA von der Wachstumsfläche bzw. aus den Wells zu entfernen. Der Farbstoff erfasste so nur dsDNA verbliebener, viabler Zellen.

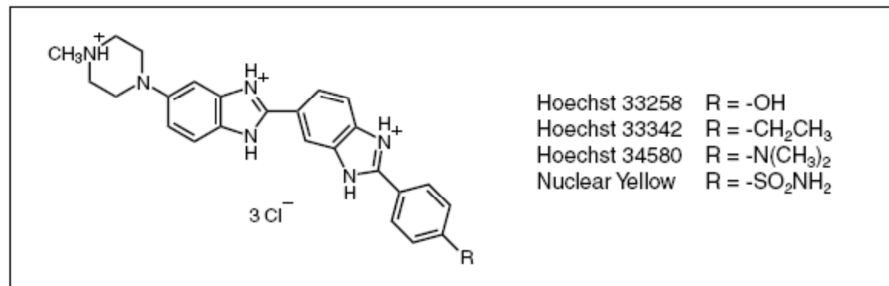


Abb. 14. Strukturformel von Hoechst 33258. (Invitrogen, 2005)

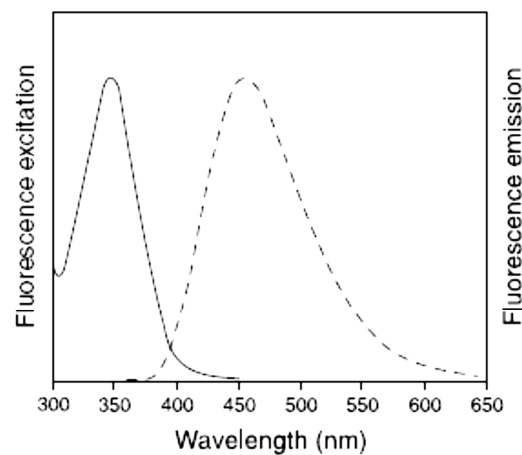


Abb. 15. Exzitations- [—] und Emissionspektrum [- -] von Hoechst 33258 nach Bindung an dsDNA. (Invitrogen, 2005)

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde das Medium inklusive gelöster Testsubstanzen von den 96-Well-Platten entfernt und diese mit 100 μ L/Well isotonischer NaCl-Lösung (0,9 %) gespült. Anschließend wurden 100 μ L/Well sterilisiertes Aqua bidem. zu den Zellen gegeben und diese mit drei Frier-Tau-Zyklen für die Aufnahme des Farbstoffs vorbereitet. Danach wurden 100 μ L/Well

doppelt-konzentrierter DNA-Puffer und 10 μL /Well 0,01 mg/mL Hoechst 33258 in Aqua bidem. dazugegeben. Die Auswertung erfolgte am Microplattenreader (Tecan infinite F200; Programm: i-control Vers. 1.6.19.0) bei 360 nm Exzitationswellenlänge und 465 nm Emissionswellenlänge. Zur Berechnung der Zytotoxizität wurde die Fluoreszenz von Wells mit Testsubstanzen behandelte Zellen mit der von Wells unbehandelte Zellen verglichen.

2.8.4 Untersuchungen zur Membrantoxizität / LDH-Assay

Der LDH-Assay ist ein colorimetrischer Assay, welcher auf der extrazellulären Quantifizierung des natürlichen zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase beruht (Decker & Lohmann-Matthes, 1988; Konjević et al., 1997). Dazu wurde in dieser Arbeit der „Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH)“ (Roche, Mannheim) verwendet. LDH kommt ubiquitär in Zellen vor und kann durch Zellmembranschädigung in das umgebende Medium über gehen. Dort kann das Enzym aus den Reagenzien des Kits zugesetztes NAD^+ zu NADH/H^+ reduzieren, während im selben Schritt Laktat zu Pyruvat oxidiert wird (s. Abbildung 16). In einem zweiten Schritt wird dann ein zugesetztes Tetrazoliumsalz mittels des Enzyms Diaphorase unter Verbrauch der Reduktionsäquivalente NADH/H^+ zu einem intensiv rot gefärbten, wasserlöslichen Formazansalz umgesetzt. Die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes zum Formazansalz ist proportional zum Ausmaß der LDH-Freisetzung, welche wiederum mit dem Ausmaß der Zellmembranperforation korreliert (Clontech, 2007). Der LDH-Assay eignet sich deshalb dazu, die Membrantoxizität von Substanzen zu untersuchen, welche nicht gleichzeitig auch eine Zytotoxizität zur Folge haben muss.

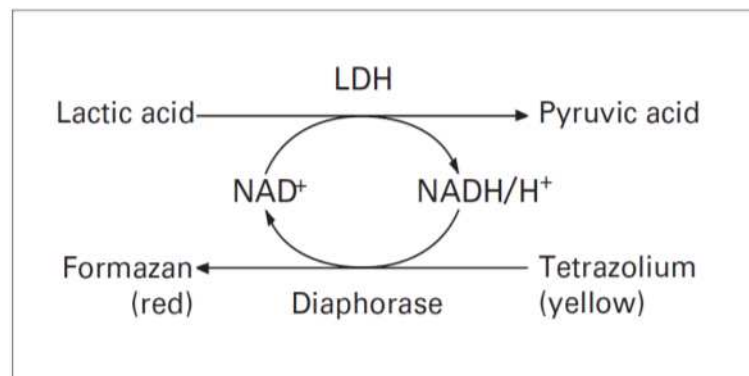


Abb. 16. Schematische Darstellung der Formazanbildung beim LDH-Assay (Clontech, 2007).

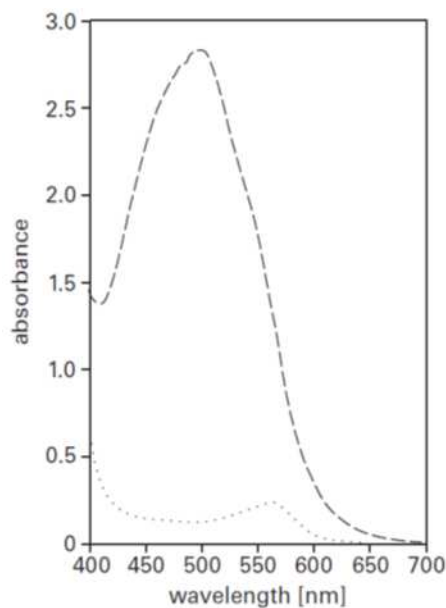


Abb. 17. Absorptionsspektrum [- - -] des entstehenden Formazans des LDH-Assays (Roche, 2011).

Für die Bestimmung der Membrantoxizität wurde das Kulturmedium von den bereits 24 h mit Zellen besiedelten transparenten 96-Well-Platten entfernt und gegen 100 μL /Well der in verschiedenen Konzentrationen im Versuchsmedium gelösten, zu untersuchenden Substanzen ausgetauscht. Anschließend wurde bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um die Membrantoxizität berechnen zu können, mussten außerdem eine sogenannte Low- und eine sogenannte High-Kontrolle mitgeführt werden. Die Low-Kontrolle gab die natürliche, spontane und nicht durch Testsubstanzen induzierte LDH-Freisetzung an. Die High-Kontrolle sollte die maximal mögliche, durch Zellyse verursachte LDH-Freisetzung angeben. Low- und High-Kontrolle bestanden aus jeweils sechs Wells, welche 100 μL /Well des Versuchsmediums ohne Testsubstanzen enthielten. Nach 1 h 45 min wurden 5 μL /Well der *Lysis Solution* des Kits zu den als High-Kontrolle definierten Wells gegeben und weitere 15 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden 100 μL /Well der frisch hergestellten Reaktionslösung des Kits zu allen Wells der 96-Well-Platte hinzugegeben. Diese enthielt das Enzym Diaphorase, NAD^+ , das Tetrazoliumsalz Iodotetrazoliumchlorid (INT) und Natriumlaktat. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur und Schütteln unter Lichtausschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μL /Well der *Stop Solution* des Kits (0,1 M HCl) gestoppt. Die Auswertung erfolgte am Microplattenreader (Tecan Spectra Fluor; Programm: XFluor4 Vers. 4.51) bei 450 nm Absorptionswellenlänge und 620 nm Referenzwellenlänge. Zur Berechnung der Membrantoxizität wurden Wells mit Testsubstanzen behandelte Zellen mit Wells unbehandelte Zellen (Low-Kontrolle), sowie mit Wells lysierter Zellen (High-Kontrolle) verglichen.

2.9 Oberflächenspannungsmessungen

Als amphiphile Substanzen vermögen Saponine auch physikalische Ober- und Grenzflächen zu beeinflussen. Dies kann z. B. die Herabsetzung der Oberflächenspannung wässriger Lösungen sein: Die Einflüsse von Saponinen auf die Oberflächenspannung von wässrigen Lösungen wurden während der Entstehungszeit dieser Arbeit im Rahmen einer Diplomarbeit von Katja Hofmann untersucht.

Dabei wurde ein Wilhelmy-Plattentensionmeter verwendet. Nach der Untersuchung der Einflüsse von Temperatur, pH und Pufferkonzentration auf die Oberflächenspannung wässriger Lösungen wurde der konzentrationsabhängige Einfluss ausgewählter Substanzen auf die Oberflächenspannung bei den pH-Werten 5, 7,4 und 9 bei 20 °C untersucht. Außerdem wurde versucht, die Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) für die untersuchten Substanzen zu bestimmen.

2.10 Radioanalytische Methoden

Um Interaktionen zwischen dem Cholesterol der Zellmembranen und Saponinen zu untersuchen, wurden Versuche mit radioaktivem tritiummarkiertem Cholesterol (^3H -Cholesterol) unternommen. Dabei ließ das ^3H -Cholesterol auf Grund seiner Radioaktivität eine Lokalisierung und Gehaltsbestimmung in verschiedenen Zellkompartimenten zu. Das Ausmaß der gemessenen Radioaktivität ist dabei proportional zum Gehalt an ^3H -Cholesterol. Somit konnte von der Verteilung und dem Gehalt ^3H -Cholesterols auf die Verteilung und den Gehalt natürlichen Cholesterols in biologischen Probenmaterialien geschlossen werden. Anders als fluoreszenzmarkierte Cholesterolderivate verhält sich ^3H -Cholesterol biologisch identisch zu natürlichem nicht-radioaktiven Cholesterol (Meyer et al., 2012).

2.10.1 Gekühlte konzentrationsabhängige ^3H -Cholesterolaufnahme

Dieser Versuch sollte zunächst zeigen, ob die Cholesterolaufnahme in Zellen, sowie die Integration des Cholesterols in die Zellmembran aktiv und durch zelluläre Transportmechanismen gesteuert wird oder passiv und konzentrationsabhängig geschieht. Dazu wurde der Versuch auf Eis durchgeführt. Vorher wurden ECV-304-Zellen 48 h im Brutschrank bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ in gesättigter Wasserdampfathmosphäre mit 5 % CO_2 in 24-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und gegen $100\text{ }\mu\text{L/Well}$ Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen ($2 \times 10^{-10} - 2 \times 10^{-6}\text{ M}$ ($1 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}\text{ Ci}$)) ^3H -Cholesterol ersetzt. Anschließend wurde auf Eis inkubiert. Nach 30 min wurde das Medium wieder entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit $200\text{ }\mu\text{L/Well}$ PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen um freies ^3H -Cholesterol zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit $100\text{ }\mu\text{L/Well}$ 0,1 M NaOH lysiert und $50\text{ }\mu\text{L/Well}$ dieser Lösung zu 2 mL Szintillationsflüssigkeit in Messgefäßen gegeben. Durch sorgfältiges Schütteln wurde eine gute Verteilung der Probe gewährleistet. Jedes Gefäß wurde 2 min vom Szintillationsmessgerät vermessen. Die gemessene Radioaktivität korreliert mit der Menge des in die Zellen aufgenommenen ^3H -Cholesterols.

2.10.2 Ungekühlte kompetitive, konzentrationsabhängige ³H-Cholesterolaufnahme

Dieser Versuch sollte zeigen, ob die Aufnahme des ³H-Cholesterols in Zellen, sowie die Integration in die Zellmembran in Konkurrenz zu der Aufnahme und Integration nicht-markierten Cholesterols stehen. Der Versuch sollte auch zeigen, wie empfindlich die Zellen und ihre Membranen auf zugesetztes Cholesterol reagieren und in welchem Konzentrationsbereich die Aufnahme und Zellmembranintegration von Cholesterol möglichst linear-proportional erfolgen. Dazu wurden ECV-304-Zellen 48 h im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfathmosphäre mit 5 % CO₂ in 24-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und entweder gegen 100 µL/Well Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen (2×10^{-10} – 2×10^{-6} M (1×10^{-9} – 1×10^{-5} Ci)) ³H-Cholesterol, Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen ³H-Cholesterol und zusätzlich jeweils eine 10-fache Konzentration Cholesterol oder Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen ³H-Cholesterol und zusätzlich jeweils eine 100-fache Konzentration Cholesterol ersetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde das Medium wieder entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit 200 µL/Well PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µL/Well 0,1 M NaOH lysiert und 50 µL/Well dieser Lösung zu 2 mL Szintillationsflüssigkeit in Messgefäßen gegeben. Nach sorgfältigem Schütteln wurde jedes Messgefäß 2 min vom Szintillationsmessgerät vermessen. Die gemessene Radioaktivität korreliert mit der Menge des in die Zellen aufgenommenen ³H-Cholesterols.

2.10.3 Zeitabhängige ³H-Cholesterolaufnahme

Dieser Versuch sollte zeigen, ob die Aufnahme des ³H-Cholesterols in Zellen, sowie die Integration in die Zellmembran zeitlich linear erfolgen oder nicht. Dafür wurden ECV-304-Zellen 48 h im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfathmosphäre mit 5 % CO₂ in 24-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und gegen 100 µL/Well Kulturmedium mit 0,5 µM (2,5 µCi) ersetzt. Nach 15, 30, 60, 120, 180 oder 240 min Inkubation bei 37 °C wurde das Medium wieder entfernt. Die Zellen wurden dreimal mit 200 µL/Well PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µL/Well 0,1 M NaOH lysiert und 50 µL/Well dieser Lösung zu 2 mL Szintillationsflüssigkeit in Messgefäßen gegeben. Nach sorgfältigem Schütteln wurde jedes Messgefäß 2 min vom Szintillationsmessgerät vermessen. Die gemessene Radioaktivität korreliert mit der Menge des in die Zellen aufgenommenen ³H-Cholesterols.

2.10.4 Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme durch Saponine

Bei diesen Untersuchungen wurden unterschiedlich membranaktive Saponine auf die Eigenschaft untersucht, die Aufnahme und Zellmembranintegration von zugesetztem ^3H -Cholesterol konzentrationsabhängig zu beeinflussen. Dafür wurden ECV-304-Zellen 48 h im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5 % CO_2 in 24-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und gegen 100 μL /Well Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 100, 200, 400 μM) eines Saponins ersetzt. Dabei wurden je nach Verfügbarkeit, Zytotoxizität und Löslichkeit eines Saponins jedoch nicht alle aufgezählten Konzentrationen untersucht. Anschließend wurde bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h wurde das saponinhaltige Medium entfernt und gegen 100 μL /Well Kulturmedium mit 50 nM (0,25 μCi) ^3H -Cholesterol ersetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C ^3H -Cholesterol enthaltende Medium entfernt und dreimal mit 200 μL /Well PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μL /Well 0,1 M NaOH lysiert und 50 μL /Well dieser Lösung zu 2 mL Szintillationsflüssigkeit in Messgefäßen gegeben. Nach sorgfältigem Schütteln wurde jedes Messgefäß 2 min vom Szintillationsmessgerät vermessen. Die gemessene Radioaktivität korreliert mit der Menge des in die Zellen aufgenommenen ^3H -Cholesterols.

2.10.5 Beeinflussung der ^3H -Cholesterolfreisetzung durch Saponine

Bei diesen Untersuchungen wurden unterschiedlich membranaktive Saponine auf die Eigenschaft untersucht, zuvor aufgenommenes und in die Zellmembran integriertes ^3H -Cholesterol konzentrationsabhängig zu verdrängen. Dafür wurden ECV-304-Zellen 48 h im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampfatosphäre mit 5 % CO_2 in 24-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und gegen 100 μL /Well Kulturmedium mit 50 nM (0,25 μCi) ^3H -Cholesterol ersetzt. Anschließend wurde bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h wurde das ^3H -Cholesterol enthaltende Medium entfernt und gegen 100 μL /Well Medium ohne FBS-Zusatz doch mit verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 100, 200, 400 μM) eines Saponins ersetzt. Dabei wurden je nach Verfügbarkeit, Zytotoxizität und Löslichkeit eines Saponins jedoch nicht alle aufgezählten Konzentrationen untersucht. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde das saponinhaltige Medium entfernt und dreimal mit 200 μL /Well PBS mit 0,1 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μL /Well 0,1 M NaOH lysiert und 50 μL /Well dieser Lösung zu 2 mL Szintillationsflüssigkeit in Messgefäßen gegeben. Nach sorgfältigem Schütteln wurde jedes Messgefäß 2 min vom Szintillationsmessgerät vermessen. Die gemessene Radioaktivität korreliert mit der Menge des in die Zellen aufgenommenen ^3H -Cholesterols.

2.10.6 Beeinflussung des endosomalen ³H-Cholesterolgehalts durch SA1641

Da einige Saponine eine entscheidende Rolle bei der endosomalen Freisetzung von RIP-I und der daraus folgenden synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung der RIP-I spielen (Weng et al., 2012b) und darüber hinaus den Cholesterolgehalt von Zellmembranen deutlich beeinflussen können, sollte in diesem Versuch der Einfluss eines solchen Saponins auf den Cholesterolgehalt von Endosomen untersucht werden. Das Saponin SA1641 ist ein solches Saponin. ³H-Cholesterol wurde als Surrogat für natürliches Cholesterol verwendet. Für eine selektive Messung des endosomalen Cholesterolgehalts war es nötig, die Endosomen aus den Zellen zu extrahieren und von anderen Zellkompartimenten zu isolieren. Hierzu wurde der „Lysosome Isolation Kit“ (Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Eine Unterscheidung zwischen frühen Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen lässt das Verfahren nicht zu. Der Begriff Endosomen wird im Folgenden als Sammelbegriff für alle genannten Kompartimente verwendet. Die Vorgehensweise ist an das Protokoll des Herstellers des Kits angelehnt (Sigma-Aldrich, 2011).

ECV-304-Zellen wurden in 20 75 cm²-Zellkulturflaschen eine Woche im Brutschrank bei 37 °C in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre mit 5 % CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert. Das Kulturmedium wurde entfernt und in 10 Flaschen gegen 5 mL/Flasche Kulturmedium mit 0,1 µM (25 µCi) und in 10 weiteren Flaschen gegen 5 mL/Flasche Kulturmedium mit 0,1 µM (25 µCi) und 5 µM SA1641 ersetzt. Anschließend wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Medien entfernt, mit 5 mL/Flasche PBS gespült und die Zellen mit 3 mL/Flasche trypsiniert. Das Trypsin wurde nach dem Ablösen der Zellen durch Kulturmedium (mit FBS) inaktiviert und jeweils Saponin behandelte und nicht Saponin behandelte Zellen vereinigt. Die Zellsuspensionen wurden 5 min bei 600 × g zentrifugiert, die Überstände verworfen, die Zellpellets in eisgekühltem PBS resuspendiert und erneut 5 min bei 600 × g zentrifugiert. Der Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Den Zellpellets wurde anschließend das 2,7-fache ihrer Volumina, 1× *Extraction Buffer* mit 1 % (V/V) Protease Inhibitor Cocktail des Kits zugegeben, resuspendiert und die Suspensionen in einem Dounce Homogenisator mit Pistill B durch 50 Auf- und Abbewegungen homogenisiert. Die Anzahl der Bewegungen wurde in vorhergehenden Experimenten ohne Radioaktivität mikroskopisch ermittelt. Dazu wurden Proben einer Zellsuspension mit Trypanblau angefärbt. Der Farbstoff färbt zerstörte Zellen blau (Strober, 2001). Auf diese Weise konnte nach ca. 50 Bewegungen des Pistill B im Dounce Homogenisator ein Anteil von ca. 80 % zerstörter Zellen festgestellt werden. Nach dem Homogenisieren wurden die Zellsuspensionen 10 min bei 1000 × g zentrifugiert. Von den Pellets, welche nun nicht homogenisierte Zellen, Zellfragmente und Zellmembranen enthielten, wurden je dreimal 50 µL zur weiteren Untersuchung entnommen. Die Überstände wurden ebenfalls entnommen und erneut 20 min bei 20000 × g zentrifugiert. Die neu entstandenen Überstände wurden entfernt und die Pellets des letzten Zentrifugationsschritts in 0,4 mL 1× *Extraction Buffer* mit 1 % (V/V) Protease Inhibitor Cocktail

resuspendiert. Zur weiteren Aufreinigung dieser ersten Endosomenfraktionen und der Abtrennung von noch vorhandenen Zellkompartimenten, wie Mitochondrien, wurden diese auf eine bestimmte Dichte eingestellt. Dazu wurden je 400 μL Endosomenfraktion, 50 μL 250 mM CaCl_2 -Lösung, 30 μL 2,3 M Sucrose-Lösung, 505 μL OptiPrep und 650 μL $1\times$ OptiPrep Dilution Buffer (= Reagenzien des Kits) gemischt und 15 min bei $5000\times g$ zentrifugiert. Die aufgereinigten Endosomenfraktionen setzten sich dabei an der Oberfläche der Gemische ab. Davon wurden je dreimal 50 μL Proben entnommen. Diese und die zuvor gewonnenen Proben der Zellfragmentfraktion wurden zu je 2 mL Szintillationsflüssigkeit in Messgefäßen gegeben. Nach sorgfältigem Schütteln wurde jedes Messgefäß 2 min vom Szintillationsmessgerät vermessen. Die gemessene Radioaktivität korreliert mit der Menge des in die Endosomen bzw. Zellmembranen aufgenommenen ^3H -Cholesterols.

Ob es sich bei der nach der beschriebenen Methode gewonnenen aufgereinigten Endosomenfraktion tatsächlich um eine endosomenreiche Fraktion handelt, wurde in vorhergehenden Experimenten ohne Radioaktivität ermittelt. Dabei wurde die Aktivität der Sauren Phosphatase, ein Leitenzym in Endo- und Lysosomen, für die gewonnene Fraktion im Vergleich zu anderen Fraktionen und Überständen bestimmt (Tanaka et al., 1990). Dazu wurde die Umsetzung des Substrates p-Nitrophenolphosphat zu p-Nitrophenol durch die Saure Phosphatase photometrisch bei 405 nm Absorptionswellenlänge im Microplattenreader gemessen. Die Durchführung wurde an das Protokoll eines kommerziellen Kits zur Bestimmung der Sauren Phosphatase-Aktivität angelehnt (Sigma-Aldrich, 2009). Hierzu wurden dreimal 50 μL /Well einer Lösung von 2 mg/mL p-Nitrophenolphosphat in Aqua bidem. und 50 μL /Well Probe auf einer transparenten 96-Well-Platte zusammengegeben. Ein Gemisch aus 50 μL /Well p-Nitrophenolphosphat und 50 μL /Well 0,09 M Citratpuffer (pH 4,8) diente bei dem Experiment als Blindwert. Es wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion mit 200 μL /Well 0,5 M NaOH gestoppt. Die Vermessung erfolgte wie beschrieben. Der Blindwert wurde von den Probenwerten subtrahiert. Die gemessene Absorption korreliert mit der Menge an vorhandener Saurer Phosphatase.

2.11 Statistische Methoden

Als Ausreißertest wurden der Ausreißertest nach Dixon angewendet. Da dieser Test Normalverteilung der Daten voraussetzt, wurde zuvor mit dem David-Test auf Normalverteilung geprüft. Zur Bestimmung statistischer Signifikanz von Ergebnissen wurde der U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney eingesetzt. Alle dargestellten Werte bilden den arithmetischen Mittelwert und dessen Standardabweichung, bei normalisierten Daten den Variationskoeffizienten ab.

3 Ergebnisse

3.1 Saponinisolierung aus Pflanzen, Drogen und Saponinum album

Alle hergestellten Extrakte wurden mittels ESI-TOF-MS im negativen Ionisierungsmodus auf das Vorhandensein von Molekülmassensignalen im Bereich m/z 1500 – 1800 untersucht. Saponine in diesem Massenbereich wurden bereits in der Arbeit von Weng (2009) als „Zielsaponine“ bezeichnet und sind, bestimmte Strukturelemente vorausgesetzt, potentiell in der Lage die Zytotoxizität von RIP-I synergistisch zu verstärken. Durch präparative HPLC und ESI-TOF-MS-Untersuchungen wurde anschließend versucht, Fraktionen mit diesen Signalen zu identifizieren und bis zum Reinstoff aufzutrennen. Die Struktur der Reinstoffe wurde durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt.

3.1.1 Untersuchung von Extrakten aus Pflanzen und Drogen

Nicht aus allen untersuchten Materialien gelang es Reinstoffe (Saponine) zu isolieren. Dies war zum einen dem Umstand geschuldet, dass die Extrakte, obwohl das Extraktionsverfahren eine Anreicherung von Saponinen vermuten ließ, sehr komplexe Stoffgemische darstellten und eine Trennung zwischen erwünschten und unerwünschten Komponenten technisch und zeitlich sehr aufwendig war. Dies galt auch für die weitere Separation der strukturell sehr ähnlichen Saponine voneinander. Zum anderen konnten bei einigen Ausgangsmaterialien nach der Extraktion und der massenspektrometrischen Untersuchung nur äußerst wenige Massenpeaks von Inhaltsstoffen im Massenbereich der gewünschten Saponine (m/z 1500 – 1800) identifiziert werden. Eine weitere Auftrennung dieser Extrakte war somit nicht lohnenswert. Alle hergestellten Extrakte wurden jedoch zellbiologisch auf ihre Zytotoxizität und ihr durch das Vorhandensein bestimmter „Zielsaponine“ verursachtes Potential zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin untersucht.

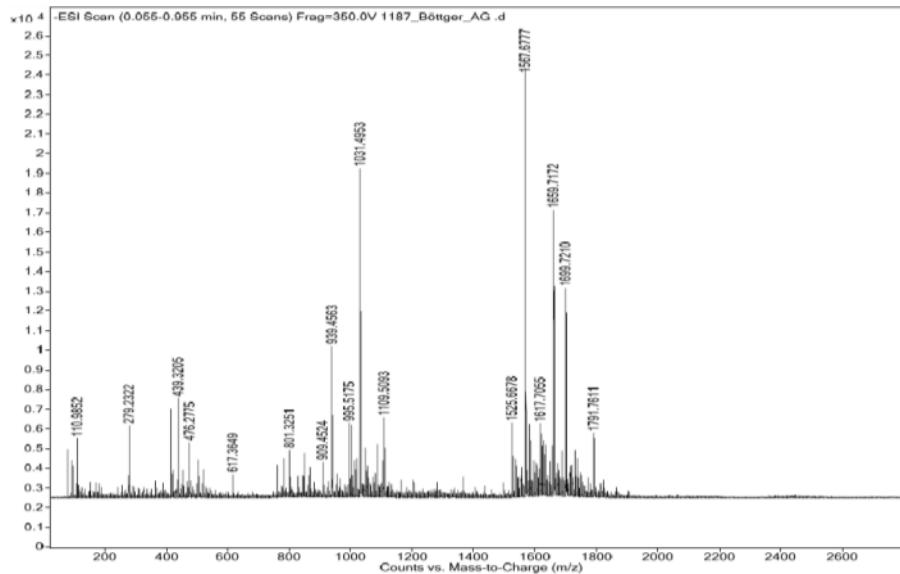


Abb. 18. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Samen von *Agrostemma githago* L. Im Spektrum ist eine ganze Schar Signale im Massenbereich von 1500 – 1800 dargestellt. Wie im Verlauf der Arbeit durch die Isolation der Saponine AG1, AG2, AG3 und AG4 gezeigt werden konnte, enthält der Extrakt tatsächlich sogenannte Zielsaponine.

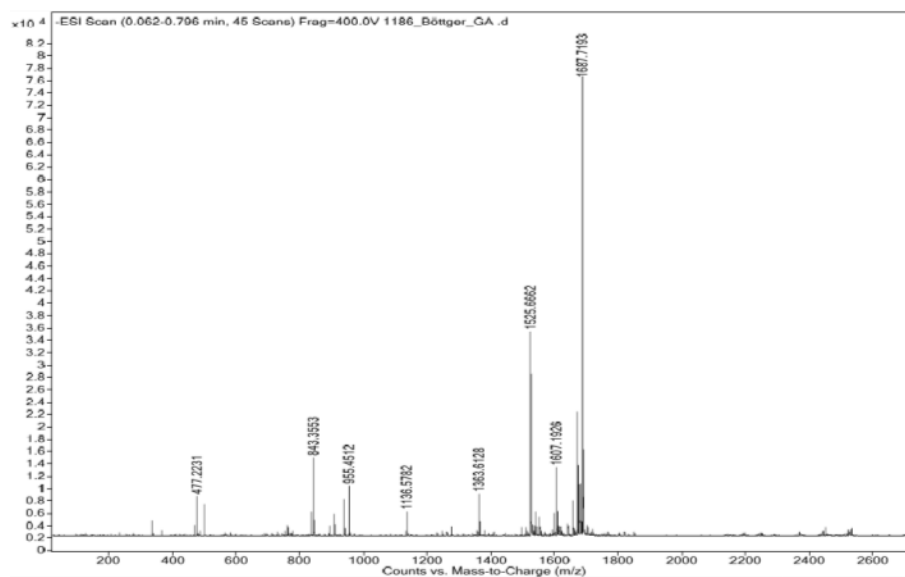


Abb. 19. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Wurzeln von *Gypsophila arrostii* Guss. Im Spektrum sind einige Signale im Massenbereich von 1500 – 1800 dargestellt. Der Extrakt enthält potentiell sogenannte Zielsaponine. In Zellkulturexperimenten konnte für den Extrakt eine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Anwesenheit der „Zielsaponine“.

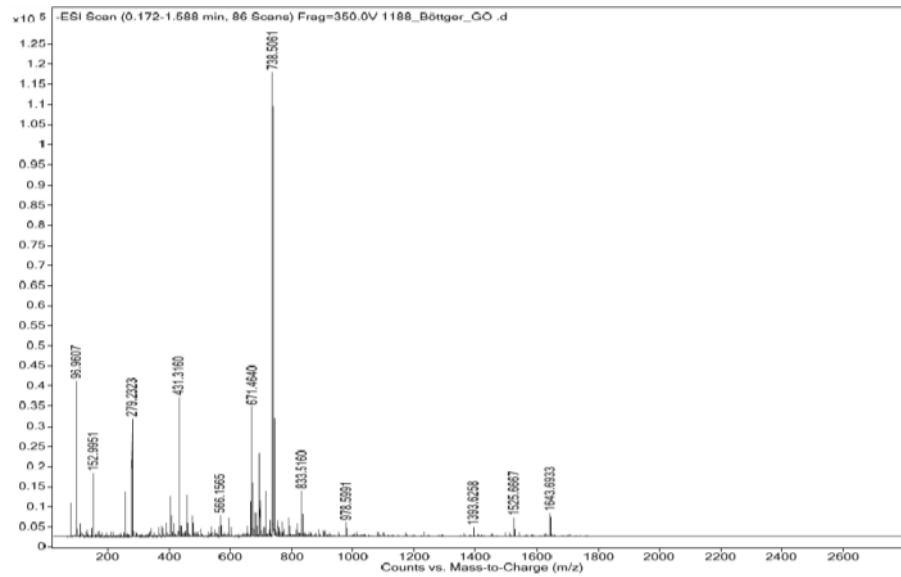


Abb. 20. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Wurzeln von *Gypsophila oldhamiana* Miq. Das Spektrum zeigt nur sehr wenige sehr schwache Signale im Bereich der sogenannten Zielsaponine. In Zellkulturversuchen konnte keine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin nachgewiesen werden.

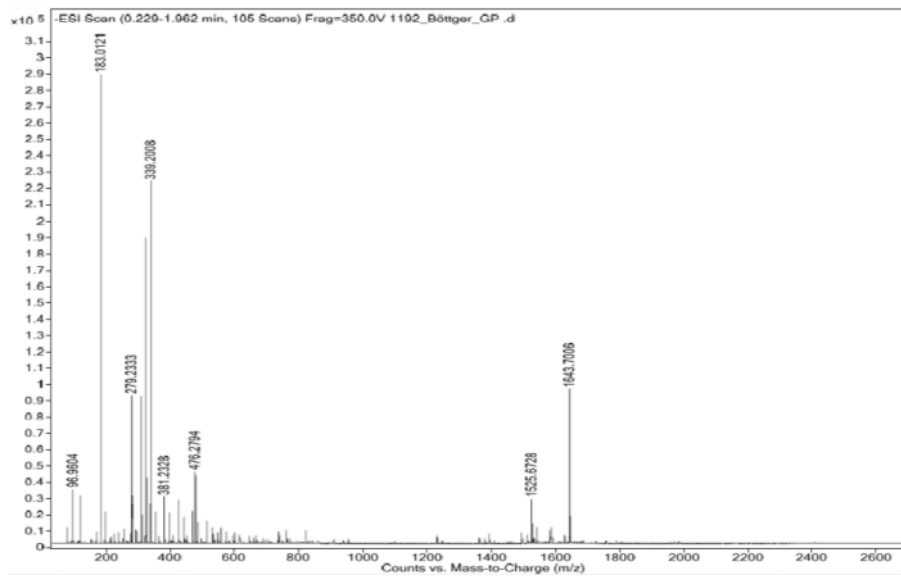


Abb. 21. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Wurzeln von *Gypsophila pacifica* Kom. Das Spektrum zeigt nur sehr wenige Signale im Bereich m/z 1500 – 1800. Im Zellkulturversuch konnte keine Zytotoxizitätsverstärkung in Kombination mit Saporin festgestellt werden. Die Signale 1525,67 und 1643,70 können auch im Extrakt aus *Gypsophila oldhamiana* gefunden werden.

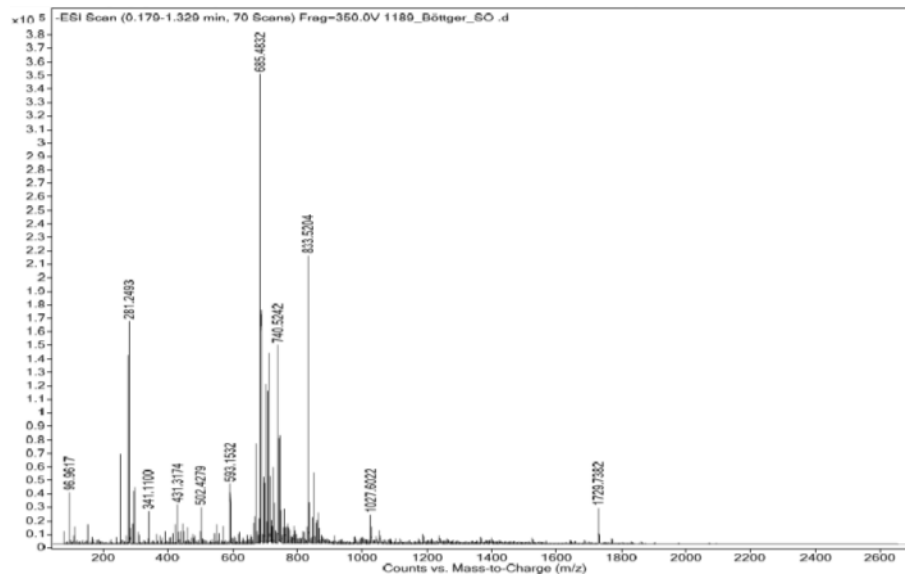


Abb. 22. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Samen von *Saponaria officinalis* L. Das Spektrum weist fast keine Signale im Bereich der „Zielsaponine“ auf. Trotzdem konnte der Extrakt die Zytotoxizität von Saporin in Zellkulturexperimenten synergistisch verstärken, was letztlich doch auf das Vorhandensein geeigneter Saponine schließen lässt.

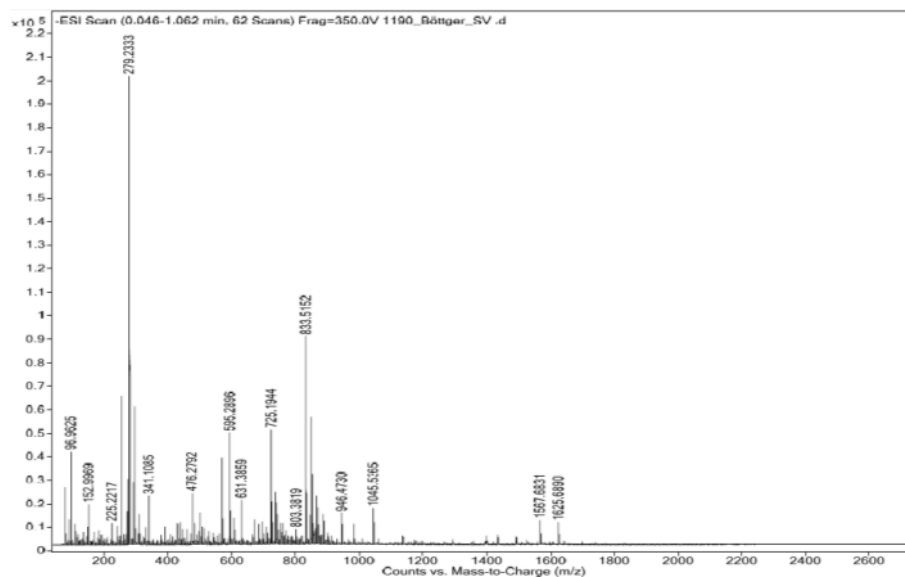


Abb. 23. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Samen von *Silene vulgaris* (MOENCH) GARCKE. Das Spektrum weist fast keine Signale im Bereich der „Zielsaponine“ auf. Dennoch konnte der Extrakt die Zytotoxizität von Saporin in Zellkulturexperimenten synergistisch verstärken, was somit doch auf das Vorhandensein geeigneter Saponine schließen lässt.

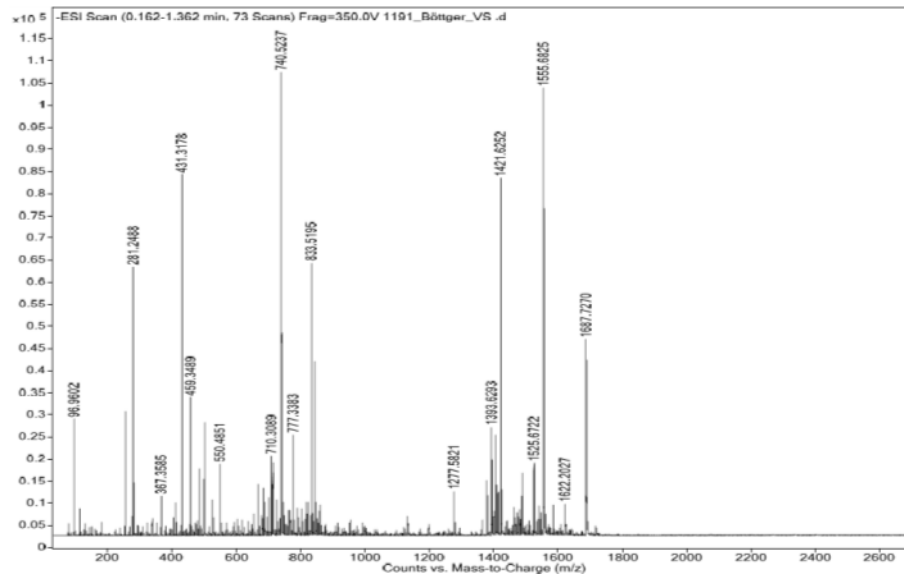


Abb. 24. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Samen von *Vaccaria hispanica* (MILL.) RAUSCHERT. Das Spektrum zeigt viele Signale zwischen m/z 1500 – 1800. In Zellkulturexperimenten konnte durch den Extrakt die Zytotoxizität von Saporin synergistisch verstärkt werden. Die Isolation einzelner Saponine aus dem Extrakt wurde im Rahmen der Arbeit nicht abgeschlossen.

3.1.2 Saponinisolation aus Saponinum album

Die Isolation zweier Reinstoffe (Saponine) gelang aus Saponinum album. Hieraus konnten die Saponine SA1641 (m/z 1641,73 $[M-H]^-$) und SA1657 (m/z 1657,72 $[M-H]^-$) gewonnen werden. Saponinum album ist als kommerzieller saponinreicher Extrakt zwar auf eine bestimmte Hämolyseaktivität eingestellt, jedoch nicht oder nur indirekt auf den Gehalt bestimmter Saponine. Somit unterliegt es als verarbeitetes Naturprodukt deutlichen Schwankungen in seiner Zusammensetzung. Dies wurde besonders deutlich bei der Wahl der Charge zur Isolation von SA1641 und SA1657.

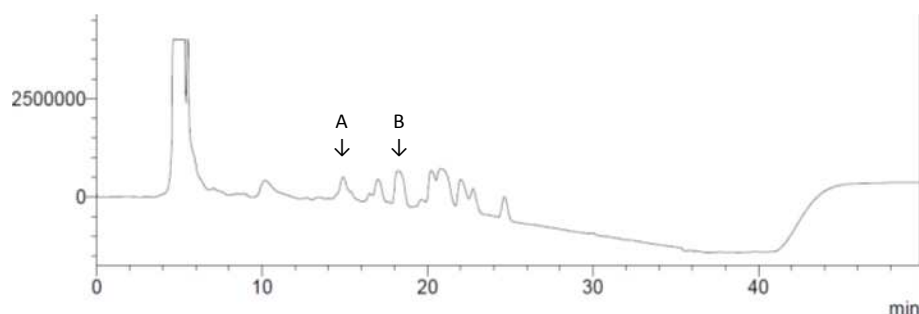


Abb. 25. HPLC-Chromatogramm von Saponinum album (Ch. 9011721). Aufgezeichnet an Shimadzu präparatives HPLC-System mit Methode c) (s. 2.1.2.1). SA1657 (Peak A), $t_R = 14,9$ min; SA1641 (Peak B), $t_R = 18,2$ min

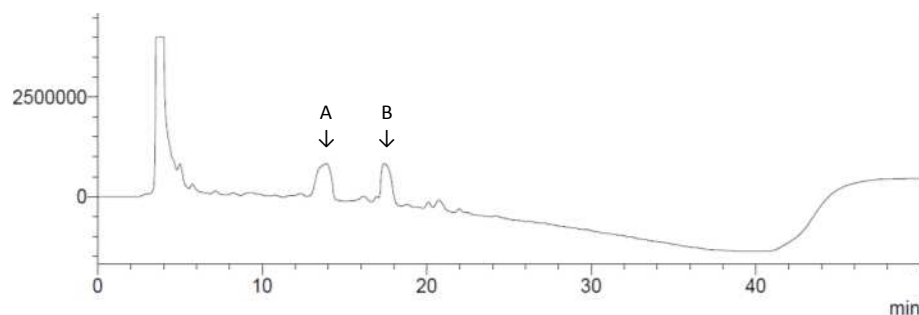


Abb. 26. HPLC-Chromatogramm von Saponinum album (Ch. 8034086). Aufgezeichnet an Shimadzu präparatives HPLC-System mit Methode c) (s. 2.1.2.1). SA1657 (Peak A), $t_R = 13,9$ min; SA1641 (Peak B), $t_R = 17,4$ min

Die Chromatogramme der beiden Chargen von Saponinum album zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Komplexität. Dennoch sind SA1641 und SA1657 in beiden enthalten. Auf Grund der geringeren Zahl an Nebenpeaks und des höheren Gehalts der beiden Substanzen in Charge 8034086 wurde diese zur Isolation der Stoffe genutzt. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit etwa 75 mg SA1641 und etwa 30 mg SA1657 aus Saponinum album isoliert. SA1641 wurde bereits in der Dissertationsschrift von Weng (2009) aus Saponinum album isoliert, strukturell identifiziert und in unterschiedlichen Versuchen getestet. SA1657 wurde im Rahmen dieser Arbeit aus Saponinum album isoliert, die Struktur per NMR-Spektroskopie aufgeklärt und die Substanz in weiteren Untersuchungen getestet.

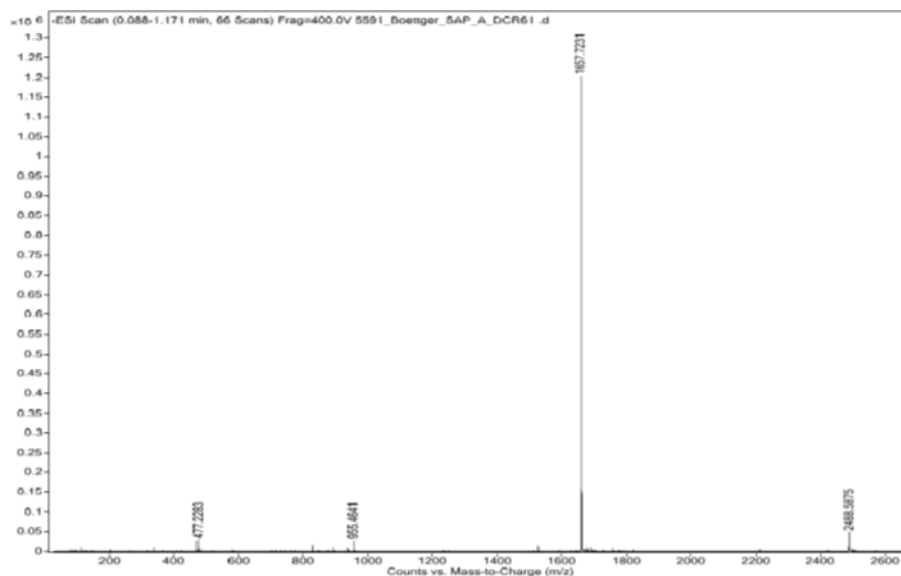


Abb. 27. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von SA1657 (m/z 1657,72), isoliert aus Saponinum album (Ch. 8034086).



Abb. 28. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von SA1641 (m/z 1641,73), isoliert aus Saponinum album (Ch. 8034086).

In Tabelle 3 sind die Daten der NMR-Spektroskopie von SA1657 dargestellt:

Tab. 3. NMR-spektroskopische Daten von SA1657

Strukturelement	C-Atom	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
Quillajasäure	1	0,85; 1,38	38,2
	2	1,84; 2,17	25,3
	3	4,31	85,7
	4	-	55,1
	5	1,38	48,7
	6	1,06; 1,38	20,7
	7	1,55; 1,57	33,0
	8	-	40,3
	9	1,78	47,0
	10	-	36,1
	11	1,88; 1,94	23,7

	12	5,55	122,4
	13	-	144,5
	14	-	42,1
	15	1,99; 2,20	36,4
	16	5,16	74,1
	17	-	48,5
	18	3,38	41,6
	19	1,30; 2,73	47,4
	20	-	31,0
	21	1,30; 2,40	36,0
	22	2,15; 2,36	31,9
	23	9,91	n. d.
	24	1,43	11,1
	25	0,80	15,9
	26	1,05	17,4
	27	1,75	27,1
	28	-	n. d.
	29	0,93	33,3
	30	0,97	24,4
Glukuronsäure	1	4,85	103,7
	2	4,31	78,7
	3	4,32	85,7
	4	4,41	71,7
	5	4,41	77,1
	6	-	n. d.
Galaktose	1	5,50	104,3
	2	4,49	73,8
	3	4,09	75,6
	4	4,57	70,2
	5	3,97	76,7
	6	4,41; 4,54	61,7
Xylose (1)	1	5,32	105,1
	2	4,47	73,0
	3	4,09	74,9
	4	4,24	69,7
	5	3,64; 4,28	n. d.
Fucose	1	5,95	94,7
	2	4,60	74,3
	3	4,18	76,9
	4	3,97	84,2
	5	4,15	70,9
	6	1,56	18,6
Rhamnose	1	6,41	101,2
	2	4,76	71,9
	3	4,67	72,5
	4	4,40	83,6
	5	4,45	68,4
	6	1,62	18,7
Xylose (2)	1	5,19	106,2
	2	4,00	75,1
	3	4,04	87,4
	4	4,15	70,9
	5	3,73; 4,29	67,7
Xylose (3)	1	5,16	106,0
	2	4,05	75,2
	3	4,16	78,2
	4	4,03	69,0
	5	3,44; 4,26	66,9
Chinovose	1	4,99	106,8
	2	4,02	76,0
	3	4,06	78,5
	4	3,64	76,7
	5	3,68	73,4
	6	1,57	17,3

n.d. = nicht dargestellt

Aus den in Tabelle 3 aufgelisteten Daten und nach Vergleich mit Daten massenidentischer, strukturähnlicher Verbindungen in der Literatur (Kim et al., 1992; Okabe et al., 1989; Weng et al., 2010) ließ sich die in Abbildung 29 gezeigte Struktur für SA1657 ableiten.

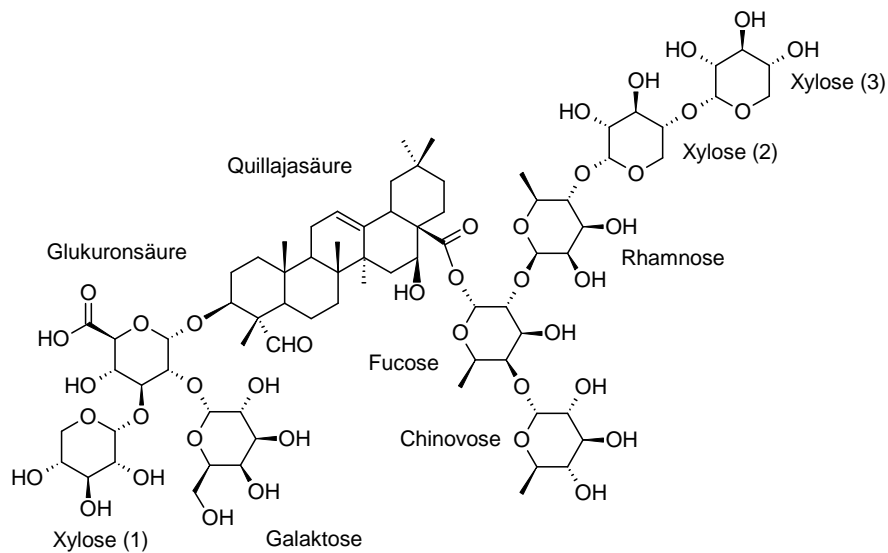


Abb. 29. Struktur von SA1657 isoliert aus *Saponinum album*. Summenformel: $C_{75}H_{118}O_{40}$; relatives Molekulargewicht: 1659,74 g/mol; exakte Masse: 1658,7200

3.1.3 Saponinisolation aus *Agrostemma githago* L.

Die Isolation von vier Saponinen gelang mittels präparativer HPLC aus einem Extrakt aus *Agrostemma githago* L. Samen. Massenspektrometrische Untersuchungen der gewonnenen Fraktionen ließen Rückschlüsse auf die Reinheit zu und zeigten in den meisten Fällen hauptsächlich den Molmassenpeak einer Verbindung pro Fraktion. Diese wurden zunächst als AG1 (m/z 1541,68 $[M-H]^-$), AG2 (m/z 1687,72 $[M-H]^-$), AG3 (m/z 1525,68 $[M-H]^-$) und AG4 (m/z 1657,72 $[M-H]^-$) bezeichnet und sind im Folgenden dargestellt. Die gereinigten Fraktionen wurden NMR-spektroskopischen Untersuchungen unterzogen. Die Daten wurden von PD Dr. Kristina Jenett-Siems, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin ausgewertet und die Strukturen der Substanzen aufgeklärt. Die Substanzen wurden in weiteren Untersuchungen getestet.

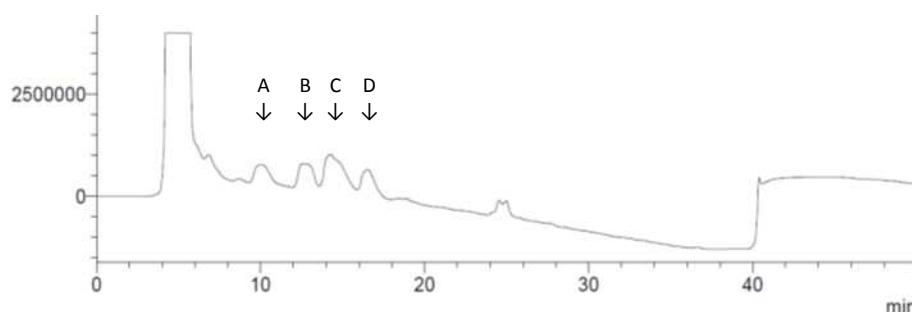


Abb. 30. HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Agrostemma githago* L. Aufgezeichnet an Shimadzu präparatives HPLC-System mit Methode c) (s. 2.1.2.1). AG1 (Peak A), $t_R = 10,0$ min; AG2 (Peak B), $t_R = 12,6$ min; AG3 (Peak C), $t_R = 14,2$ min; AG4 (Peak D), $t_R = 16,5$ min

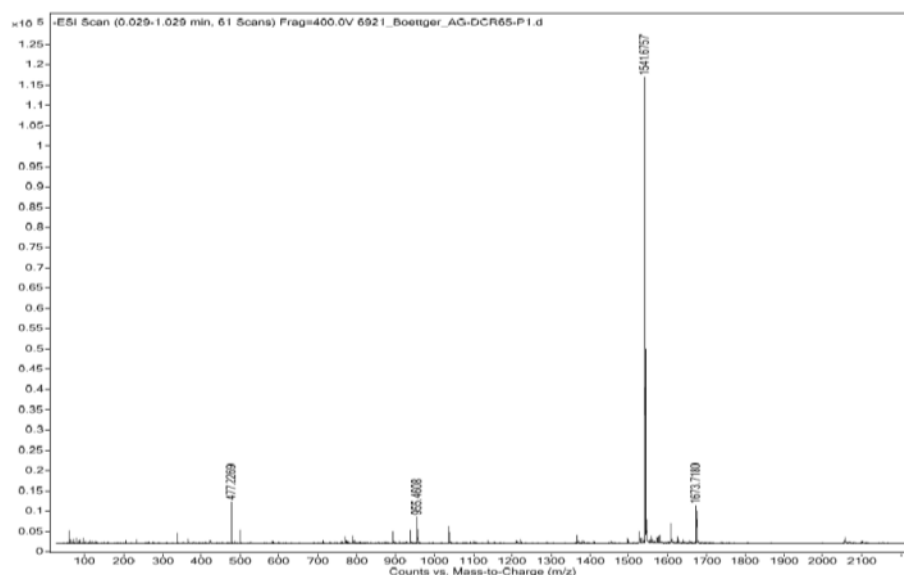


Abb. 31. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von AG1 (m/z 1541,68), isoliert aus einem Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L.

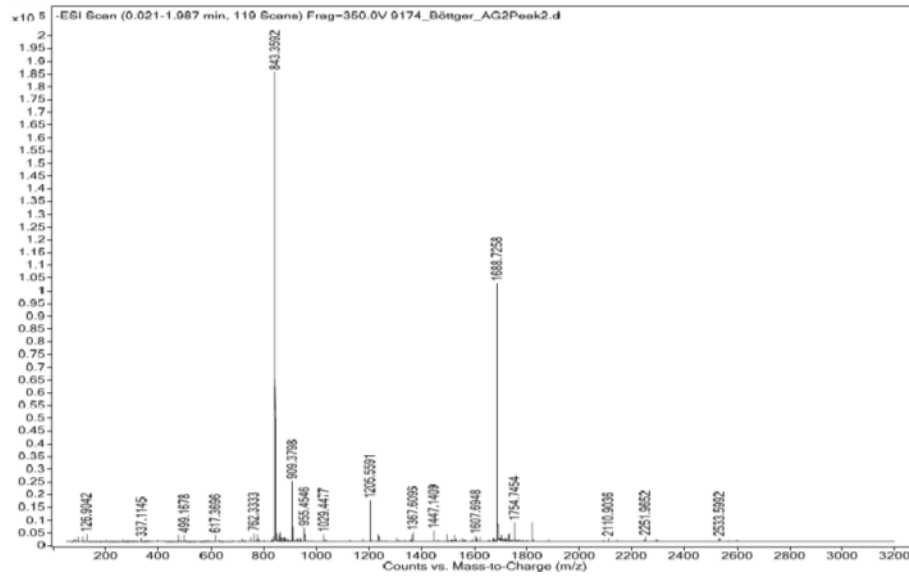


Abb. 32. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von AG2 (m/z 1687,72 und m/z 843,36), isoliert aus einem Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L. Statt m/z 1687,72 wurde von der MS-Spektrensoftware automatisch der Isotopenpeak m/z 1688,72 bezeichnet. Deutlich erkennbar ist die große Anzahl an Begleitmassen was auf eine geringere Reinheit als bei den anderen Fraktionen (AG1, AG3 und AG4) schließen lässt.

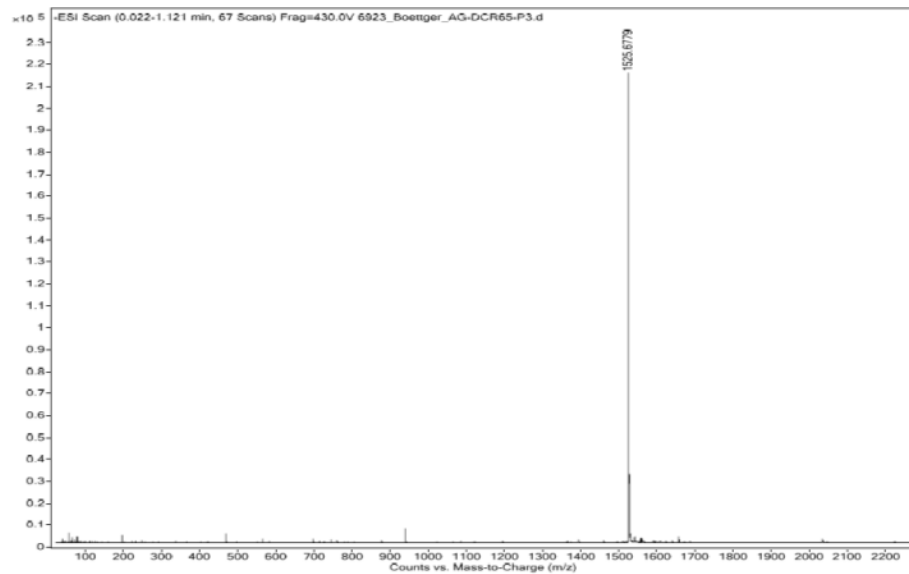


Abb. 33. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von AG3 (m/z 1525,68), isoliert aus einem Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L.

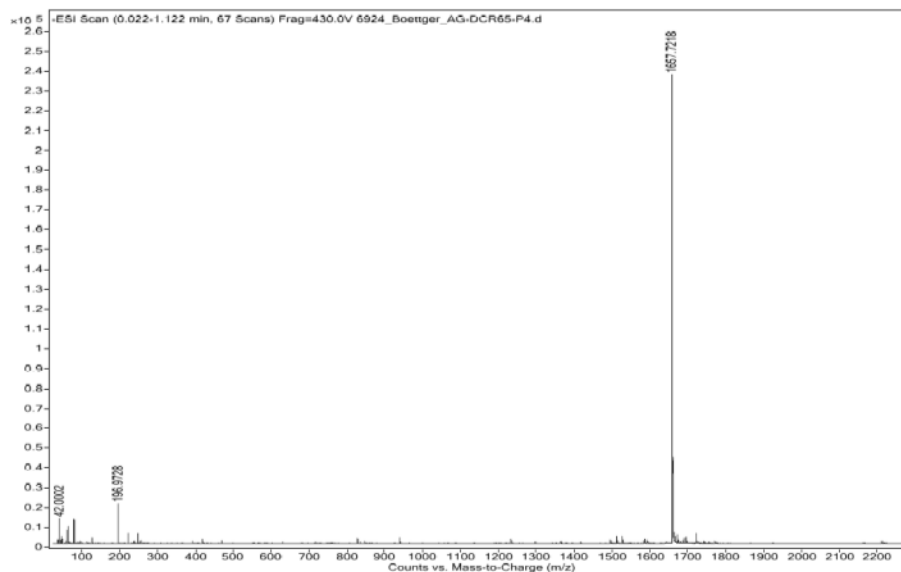


Abb. 34. (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von AG4 (m/z 1657,72), isoliert aus einem Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie von AG1, AG2, AG3 und AG4 und die daraus abgeleiteten Strukturformeln dargestellt:

Tab. 4. NMR-spektroskopische Daten von AG1

Strukturelement	C-Atom	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
Quillajasäure	1	0,88; 1,42	38,0
	2	1,84; 2,17	25,2
	3	4,06	84,2
	4	-	54,9
	5	1,42	48,6
	6	1,15; 1,54	20,3
	7	0,96; 1,56	32,9
	8	-	40,1
	9	1,79	46,8
	10	-	36,0
	11	1,92; 1,98	23,4
	12	5,55	121,8
	13	-	144,3
	14	-	41,9
	15	1,90; 2,27	36,1
	16	5,17	74,0
	17	-	48,6
	18	3,32	41,5
	19	1,31; 2,72	47,4
	20	-	30,5
	21	1,33; 2,40	35,9
	22	2,20; 2,36	31,5
	23	9,98	210,0
	24	1,48	10,9
	25	0,84	15,8
	26	1,11	17,2
	27	1,76	27,0
	28	-	175,7
	29	0,96	32,9
	30	0,98	24,2
Glukuronsäure	1	4,89	103,6
	2	4,36	78,5
	3	4,28	85,8
	4	4,45	71,4
	5	4,53	77,5
	6	-	n. d.

Galaktose	1	5,55	104,6
	2	4,48	73,4
	3	4,15	75,3
	4	4,58	69,9
	5	4,03	76,5
	6	4,43; 4,53	61,6
Xylose (1)	1	5,36	104,8
	2	3,96	75,7
	3	4,11	78,2
	4	4,14	70,4
	5	3,67; 4,28	67,2
Fucose	1	5,95	94,9
	2	4,50	74,4
	3	4,11	75,3
	4	3,95	72,7
	5	3,89	72,2
	6	1,43	16,7
Rhamnose	1	6,04	101,5
	2	5,21	70,9
	3	4,87	82,6
	4	4,56	78,1
	5	4,52	68,1
	6	1,67	18,6
Xylose (2)	1	5,52	104,4
	2	3,99	75,1
	3	4,13	79,2
	4	4,10	71,6
	5	3,41; 4,18	67,0
Glukose	1	5,40	105,4
	2	4,04	75,2
	3	4,14	78,3
	4	4,10	71,6
	5	3,97	78,4
	6	4,23; 4,52	62,6

n. d. = nicht dargestellt

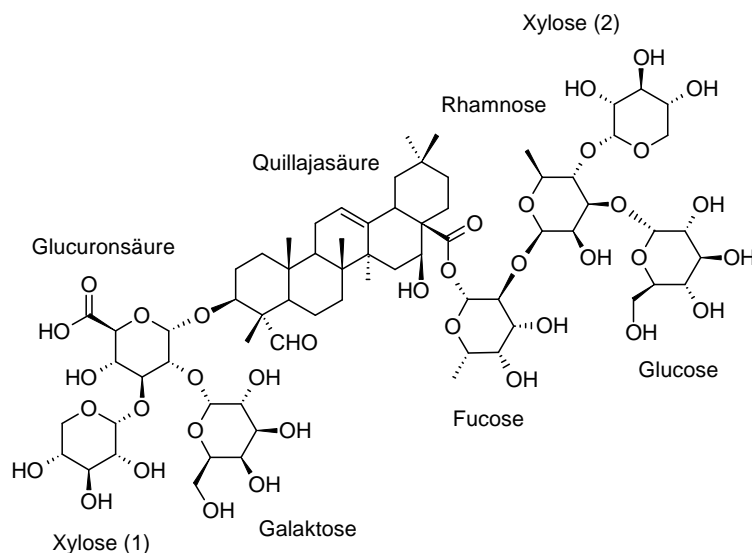


Abb. 35. Struktur von AG1, isoliert aus Samen von *Agrostemma githago* L. Summenformel: $C_{70}H_{110}O_{37}$; relatives Molekulargewicht: 1543,62 g/mol; exakte Masse: 1542,6726

Aus den in Tabelle 4 aufgelisteten Daten und durch Vergleich mit massen- und strukturidentischen Verbindungen in der Literatur (Okabe et al., 1989; Weng et al., 2010) ließ sich die in Abbildung 35 gezeigte Struktur für AG1 ableiten.

Tab. 5. NMR-spektroskopische Daten von AG2

Strukturelement	C-Atom	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
Quillajasäure	1	0,88; 1,42	38,0
	2	1,85; 2,15	26,0
	3	4,07	84,1
	4	-	54,9
	5	1,41	48,7
	6	1,15; 1,54	20,5
	7	0,90; 1,55	32,9
	8	-	39,9
	9	1,80	46,6
	10	-	36,0
	11	1,93; 1,98	23,7
	12	5,53	121,7
	13	-	144,3
	14	-	42,0
	15	1,88; 2,23	36,2
	16	5,13	73,8
	17	-	48,7
	18	3,27	41,5
	19	1,28; 2,71	47,3
	20	-	30,4
	21	1,32; 2,38	36,0
	22	2,18; 2,31	31,5
	23	9,90	209,8
	24	1,47	11,0
	25	0,85	15,7
	26	1,13	17,4
	27	1,75	27,1
	28	-	175,7
	29	0,94	33,0
	30	0,96	24,2
Glukuronsäure	1	4,88	103,2
	2	4,36	78,1
	3	4,28	85,6
	4	4,46	71,4
	5	4,52	78,1
	6	-	n. d.
Galaktose	1	5,54	104,8
	2	4,48	73,4
	3	4,16	75,7
	4	4,53	70,0
	5	4,00	77,9
	6	4,42; 4,54	61,5
Xylose (1)	1	5,36	105,0
	2	3,99	75,4
	3	4,09	78,1
	4	4,15	71,0
	5	3,69; 4,28	67,2
Fucose	1	5,90	94,7
	2	4,48	75,1
	3	4,16	75,7
	4	4,09	83,3
	5	3,92	71,5
	6	1,55	18,3
Rhamnose	1	6,02	101,4
	2	5,12	70,8
	3	4,83	82,3
	4	4,56	78,0
	5	4,53	68,6
	6	1,68	18,8
Xylose (2)	1	5,53	103,9
	2	3,97	75,1
	3	4,14	78,2
	4	4,16	71,5
	5	3,43; 4,20	66,9

Glukose	1	5,42	105,2
	2	4,03	75,4
	3	4,14	78,2
	4	4,09	71,4
	5	4,02	78,2
	6	4,30; 4,52	62,4
Chinovose	1	5,00	106,2
	2	4,01	76,1
	3	4,06	77,9
	4	3,63	76,4
	5	3,65	73,0
	6	1,56	18,3

n. d. = nicht dargestellt

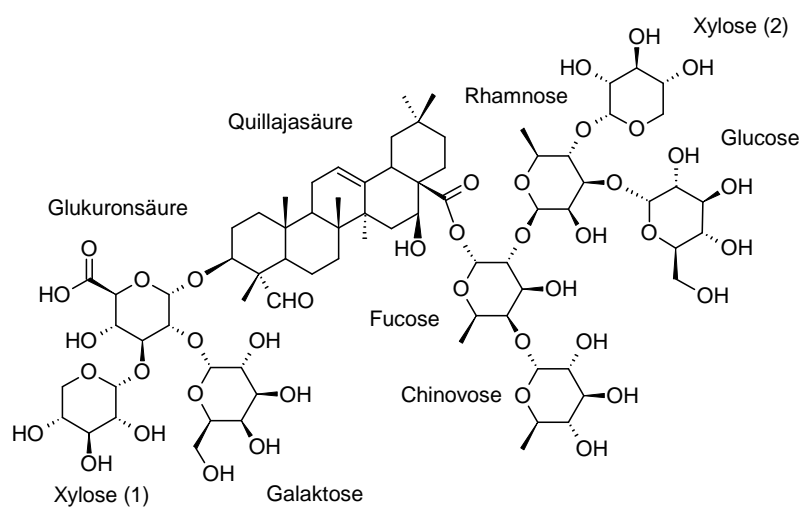


Abb. 36. Struktur von AG2, isoliert aus Samen von *Agrostemma githago* L. Summenformel: $C_{76}H_{120}O_{41}$; relatives Molekulargewicht: 1689,76 g/mol; exakte Masse: 1688,7305

Aus den in Tabelle 5 aufgelisteten Daten und durch Vergleich mit strukturähnlichen Verbindungen in der Literatur (Okabe et al., 1989; Weng et al., 2010) ließ sich die in Abbildung 36 gezeigte Struktur für AG2 ableiten.

Tab. 6. NMR-spektroskopische Daten von AG3

Strukturelement	C-Atom	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
Gypsogenin	1	0,82; 1,33	38,2
	2	1,83; 2,13	25,3
	3	4,06	84,5
	4	-	55,2
	5	1,40	48,8
	6	1,13; 1,53	20,5
	7	1,49; 1,69	31,5
	8	-	40,3
	9	1,66	47,8
	10	-	36,3
	11	1,80; 1,83	23,5
	12	5,36	122,5
	13	-	144,1
	14	-	42,2
	15	1,33; 2,07	28,2
	16	1,83; 2,05	23,1
	17	-	47,9
	18	3,10	42,0
	19	1,20; 1,74	46,4
	20	-	30,8
	21	1,23; 1,33	33,9
	22	1,72; 2,04	32,5
	23	9,94	n. d.
	24	1,49	11,3
	25	0,81	15,8
	26	1,07	17,4
	27	1,23	26,0
	28	-	176,6
	29	0,88	33,2
	30	0,90	23,9
Glukuronsäure	1	4,84	103,9
	2	4,34	78,6
	3	4,27	85,9
	4	4,40	71,9
	5	4,40	77,3
	6	-	n. d.
Galaktose	1	5,54	104,2
	2	4,46	73,7
	3	4,16	75,4
	4	4,56	70,2
	5	4,02	76,7
	6	4,42; 4,52	61,9
Xylose (1)	1	5,35	105,0
	2	3,97	76,0
	3	4,13	78,6
	4	4,17	71,3
	5	3,67; 4,27	67,4
Fucose	1	6,00	95,1
	2	4,47	75,5
	3	4,09	75,5
	4	3,96	72,7
	5	3,86	72,3
	6	1,45	17,0
Rhamnose	1	5,94	102,1
	2	5,24	71,1
	3	4,89	82,5
	4	4,52	78,9
	5	4,49	69,0
	6	1,69	19,0
Xylose (2)	1	5,46	105,3
	2	3,94	76,0
	3	4,09	79,5
	4	4,13	71,0
	5	3,38; 4,18	67,2

Glukose	1	5,43	105,5
	2	4,02	75,5
	3	4,13	78,6
	4	4,08	72,0
	5	3,92	78,5
	6	4,22; 4,53	63,0

n. d. = nicht dargestellt

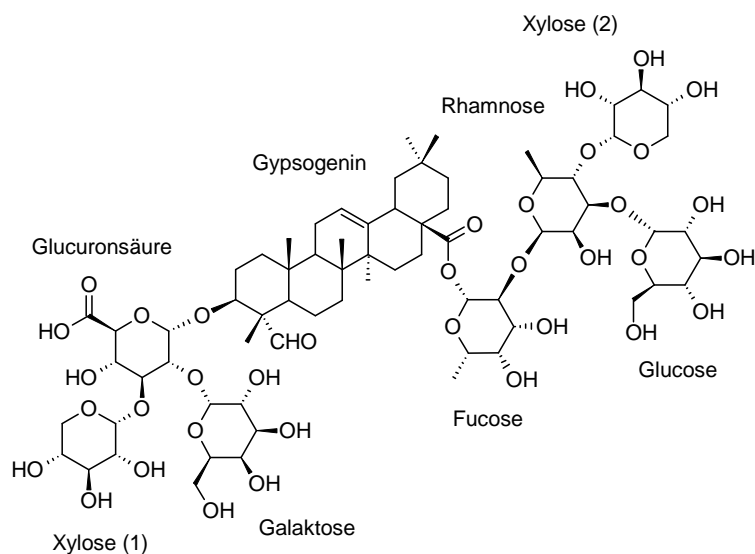


Abb. 37. Struktur von AG3, isoliert aus Samen von *Agrostemma githago* L. Summenformel: $C_{70}H_{110}O_{36}$; relatives Molekulargewicht: 1527,62 g/mol; exakte Masse: 1526,6776

Aus den in Tabelle 6 aufgelisteten Daten und durch Vergleich mit massen- und strukturidentischen Verbindungen in der Literatur (Luo et al., 2008a; Melzig et al., 2005; Weng et al., 2010) ließ sich die in Abbildung 37 gezeigte Struktur für AG3 ableiten.

Tab. 7. NMR-spektroskopische Daten von AG4

Strukturelement	C-Atom	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
Gypsogenin	1	0,80; 1,35	37,9
	2	1,80; 2,10	25,0
	3	4,07	83,7
	4	-	54,9
	5	1,41	48,3
	6	1,20; 1,50	20,5
	7	1,49; 1,69	32,4
	8	-	40,0
	9	1,66	47,7
	10	-	n. d.
	11	1,79; 1,82	23,3
	12	5,37	122,2
	13	-	143,9
	14	-	41,9
	15	1,32; 2,03	27,9
	16	1,82; 2,05	23,2
	17	-	47,6
	18	3,12	41,7
	19	1,20; 1,74	46,1
	20	-	30,5
	21	1,23; 1,33	33,7
	22	1,69; 1,99	32,1
	23	9,95	210,0
	24	1,48	10,8
	25	0,82	15,5
	26	1,07	17,1
	27	1,25	25,8
	28	-	176,1
	29	0,89	32,9
	30	0,88	23,5
Glukuronsäure	1	4,86	103,3
	2	4,34	78,5
	3	4,30	85,6
	4	4,43	71,5
	5	4,48	78,4
	6	-	n. d.
Galaktose	1	5,53	104,1
	2	4,48	73,4
	3	4,16	75,1
	4	4,57	69,9
	5	4,02	76,5
	6	4,41; 4,51	61,6
Xylose (1)	1	5,35	104,8
	2	4,00	75,2
	3	4,13	78,2
	4	4,13	70,6
	5	3,68; 4,26	67,1
Fucose	1	5,97	94,8
	2	4,46	75,4
	3	4,08	75,1
	4	3,92	73,1
	5	3,86	72,0
	6	1,45	16,7
Rhamnose	1	5,91	101,9
	2	5,27	70,6
	3	4,89	82,5
	4	4,52	78,2
	5	4,46	68,5
	6	1,67	18,7
Xylose (2)	1	5,51	104,3
	2	3,98	74,8
	3	4,09	88,3
	4	4,10	69,1
	5	3,41; 4,19	66,2

Xylose (3)	1	5,15	105,8
	2	4,02	75,2
	3	4,13	78,2
	4	4,13	70,6
	5	3,46; 4,18	66,8
Glukose	1	5,35	105,3
	2	4,02	75,1
	3	4,07	77,5
	4	3,95	72,6
	5	3,95	78,0
	6	4,17; 4,53	62,6

n. d. = nicht dargestellt

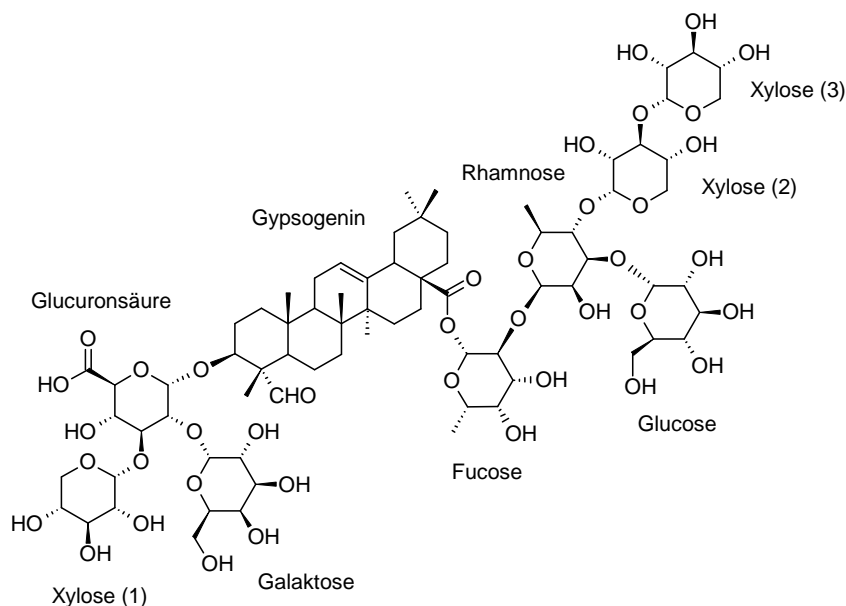


Abb. 38. Struktur von AG4, isoliert aus Samen von *Agrostemma githago* L.
Summenformel: $C_{75}H_{118}O_{40}$; relatives Molekulargewicht: 1659,74 g/mol;
exakte Masse: 1658,7200

Aus den in Tabelle 7 aufgelisteten Daten und durch Vergleich mit massen- und strukturidentischen, sowie strukturähnlichen Verbindungen in der Literatur (Luo et al., 2008a; Weng et al., 2010) ließ sich die in Abbildung 38 gezeigte Struktur für AG4 ableiten.

3.2 Zellbiologische Untersuchungen zur Zytotoxizität und zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung

Alle untersuchten Stoffe und Extrakte wurden auf ihre Zytotoxizität und ihr Potenzial zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I an ECV-304-Zellen untersucht. Zur Quantifizierung der Zytotoxizitäten wurden stets parallel der MTT-Assay und die DNA-Quantifizierung genutzt.

3.2.1 Zytotoxizität von Saporin auf ECV-304-Zellen

Für den Versuch wurde die Zytotoxizität verschiedener Konzentrationen Saporin und deren Kombination mit 1,5 µg/mL Saponinum album oder 5 µg/mL SA1641 an ECV-304-Zellen untersucht.

Die Abbildung 39 zeigt, dass Saporin bis 10 nM zu keiner signifikanten Zytotoxizität führte. Kombinationen aus Saporin und 1,5 µg/mL Saponinum album oder 5 µg/mL SA1641 waren bis 0,01 nM nicht zytotoxisch. Ab 0,1 nM Saporin mit 1,5 µg/mL Saponinum album bzw. ab 1 nM Saporin mit 5 µg/mL SA1641 zeigte sich eine signifikante Zytotoxizität auf die Zellen. Eine weitere Erhöhung der Saporinkonzentration in Kombination mit Saponinum album oder SA1641 führte zwar zu einer weiteren Verminderung der Zellviabilität, zeigte aber auch eine gewisse, wenn auch bis 10 nM nicht signifikante, Verminderung der Zellviabilität für Saporin allein. Aus diesem Grund und aus Gründen des ökonomischen Umgangs mit Saporin wurde für alle weiteren Untersuchungen zur synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I eine Konzentration von 1 nM Saporin gewählt.

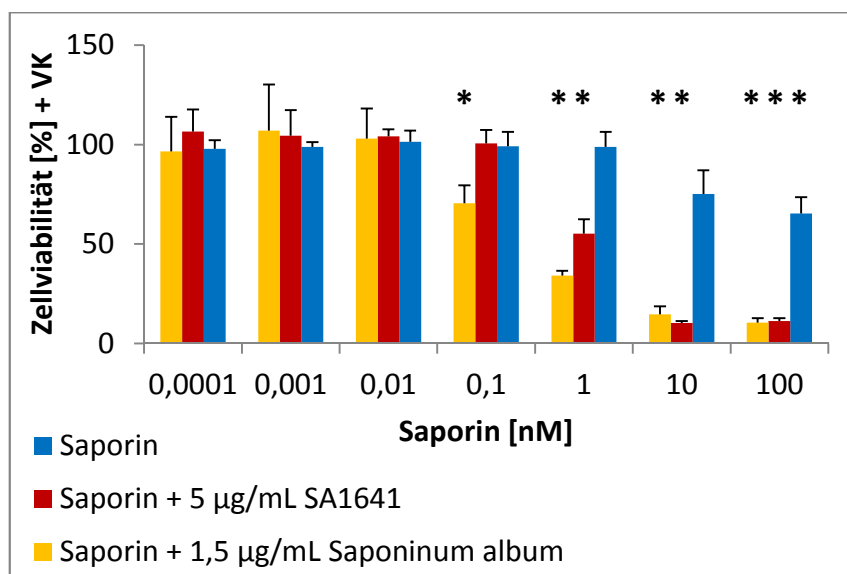


Abb. 39. Zytotoxizität von Saporin auf ECV-304-Zellen, allein und in Kombination mit 5 µg/mL SA1641 bzw. 1,5 µg/mL Saponinum album. Die dargestellte Zytotoxizität wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Eine ebenfalls durchgeführte DNA-Quantifizierung führte zu vergleichbaren Ergebnissen. (* = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (100 %), U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 5\%$) (n = 2; 4 Parallelen)

3.2.2 Zytotoxizität von Saponinum album auf ECV-304-Zellen

Bei den Zytotoxizitätsuntersuchungen von Saponinum album wurde für Saporin die im vorhergehenden Versuch ermittelte Konzentration von 1 nM verwendet. Die Abbildung 40 zeigt, dass Saponinum album auch ohne Kombination mit Saporin ab 5 $\mu\text{g/mL}$ eine bereits signifikante Zytotoxizität auslöst. Ab 2,5 $\mu\text{g/mL}$ zeigt Saponinum album in Kombination mit Saporin eine signifikante Zytotoxizität durch die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin. Für alle Versuche, welche die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin durch eine Testsubstanz zum Ziel hatten, wurde somit eine Kombination aus 2,5 $\mu\text{g/mL}$ Saponinum album und 1 nM Saporin als Positivkontrolle verwendet.

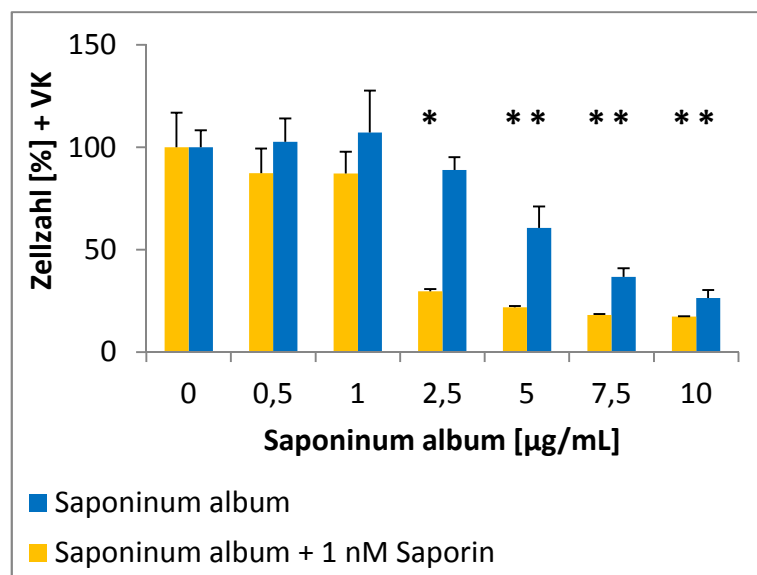


Abb. 40. Zytotoxizität von Saponinum album auf ECV-304-Zellen, allein und in Kombination mit 1 nM Saporin. Die dargestellte Zytotoxizität wurde durch DNA-Quantifikation bestimmt. Ein ebenfalls durchgeführter MTT-Assay ergab vergleichbare Ergebnisse. (* = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (100%), U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 5\%$) (n = 2; 6 Parallelen)

3.2.3 Zytotoxizität ausgewählter Saponine und Extrakte auf ECV-304-Zellen

So wie auch für Saponinum album beschrieben, wurden ausgewählte Saponine und Extrakte von Arten der Pflanzenfamilie Caryophyllaceae sowohl auf ihre Zytotoxizität als auch auf ihr Potential zur synergistischen Verstärkung der Zytotoxizität von 1 nM Saporin an ECV-304-Zellen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 8, 9 und 10 zusammengefasst. Die Tabelle 8 listet die untersuchten Extrakte auf. Die Tabelle 9 führt Saponine auf, welche ein Oleangrundgerüst besitzen und Zuckerreste an einer 3 β -OH-Gruppe und/oder an der OH-Gruppe einer C-28-Carboxylgruppe. Die Tabelle 10 zeigt Saponine welche ein anders geartetes Grundgerüst besitzen und/oder Zuckerreste an mindestens einer anderen Position als den genannten tragen. Die Saponine in den Tabellen 9 und 10 sind nach ihren Aglyka gruppiert. Die folgenden zwei Spalten zeigen die Zuckerreste für jedes Aglykon sortiert nach zunehmender Komplexität und beginnend mit dem Zuckerrest der niedriger nummerierten Position. Die Werte für die Zytotoxizität (IC_{50}) und die synergistische Zytotoxizität ($IC_{50}(\text{syn.})$) sind dargestellt als jene Konzentrationen, bei denen die Zellviabilität (MTT-Assay) bzw. die Zellzahl (DNA-Quantifizierung) nur noch 50 % der Kontrolle betragen. Die IC_{50} bzw. $IC_{50}(\text{syn.})$ wurden bei annähernd linearen Konzentrations-Effekt-Kurven mittels linearer Regression, bei anders verlaufenden Konzentrations-Effekt-Kurven mittels polynomischer Regression im untersuchten Konzentrationsbereich ermittelt. Wurde für die höchste untersuchte Konzentration ein Wert von 50 % nur nahezu erreicht und war ein deutlich konzentrationsabhängig abfallender Trend der Zellviabilität bzw. Zellzahl erkennbar, wurden IC_{50} und/oder $IC_{50}(\text{syn.})$ durch Extrapolation ermittelt. Die Spalte „Mean Ratio“ gibt das mittlere Verhältnis von IC_{50} zu $IC_{50}(\text{syn.})$ an. Da die IC_{50} üblicher Weise größer oder gleich groß wie die $IC_{50}(\text{syn.})$ ist, sollte das Verhältnis beider Größen stets größer oder gleich eins sein. Der Mean Ratio-Wert gibt indirekt Auskunft über das Ausmaß der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung. Je größer der Unterschied zwischen IC_{50} und $IC_{50}(\text{syn.})$ ist, desto größer ist der Unterschied zwischen einer zytotoxischen Konzentration des betreffenden Saponins oder Extraktes und einer Konzentration, welche in Kombination mit RIP-I zwar zu synergistischer Zytotoxizität führt, jedoch nicht zytotoxisch ist ohne die Kombination mit einem RIP-I. Das bedeutet, dass eine betreffende Verbindung oder Extrakt umso effektiver den Transfer eines RIP-I in das Zytoplasma modulieren kann. In zellbiologischen Versuchen wurden Extrakte (Tabelle 8) bis zu einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/mL}$ untersucht, reine Saponine in der Regel bis 10 $\mu\text{g/mL}$ und je nach Verfügbarkeit bis 50 $\mu\text{g/mL}$. Die weiteren Spalten zeigen, sofern für das betreffende Saponin oder den Extrakt durchgeführt, Ergebnisse eines LDH-Assays, von Messungen der konzentrationsabhängigen Oberflächenspannungserniedrigung, Bestimmungen der CMC und ob der ^3H -Cholesterolgehalt von Zellmembranen signifikant erniedrigt wurde. Auf diese Ergebnisse wird unter 3.3 genauer eingegangen.

Tab. 8. Untersuchte Extrakte aus Drogeteilen der angegebenen Stammpflanzen und Saponinum album.

Extrakt	Pflanzenteil	Zellbiologische Untersuchungen					Membranbiologische und physikalische Untersuchungen			Radio.
		Zytotoxizität		synergistische Zytotoxizität		Mean Ratio				
		IC ₅₀ (MTT.)	IC ₅₀ (DNA.)	IC ₅₀ (syn.) (MTT.)	IC ₅₀ (syn.) (DNA.)	IC ₅₀ vs.	IC ₅₀ (LDH.)	OC ₅₀ (pH 7,4)	CMC (pH 7,4)	³ H-Chol.
		[µg/mL]	[µg/mL]	[µg/mL]	[µg/mL]	IC ₅₀ (syn.)	[µg/mL]	µg/mL	µg/mL	
<i>Agrostemma githago</i> L.	S	45,0	> 50,0	4,5	4,4	>10,7	-	-	-	-
<i>Gypsophila arrastii</i> Guss.	W	> 10,0	4,9	0,6	0,8	>11,4	-	-	-	-
<i>Gypsophila oldhamiana</i> MIQ.	W	*50,9	35,0	6,6	12,9	5,2	-	-	-	-
<i>Gypsophila pacifica</i> KOM.	W	45,0	38,0	4,1	5,5	8,9	-	-	-	-
<i>Saponaria officinalis</i> L.	S	20,0	35,0	3,8	5,5	5,8	-	-	-	-
<i>Silene vulgaris</i> (MOENCH) GARCKE	S	26,0	22,0	3,5	7,2	5,2	-	-	-	-
<i>Vaccaria hispanica</i> (MILL.) RAUSCHERT	S	8,7	5,3	8,1	3,1	1,4	-	-	-	-
Saponinum album	W	5,2	4,7	0,8	0,9	5,9	36,5	10	50	✓

* = durch Extrapolation ermittelt; ✓ = ja; ✗ = nein; ³H-Chol. = ³H-Cholesterolgehalt beeinflusst; DNA. = DNA-Quantifizierung; LDH. = LDH-Assay; MTT. = MTT-Assay; Radio. = radioanalytische Untersuchungen; S = Samen; W = Wurzeln

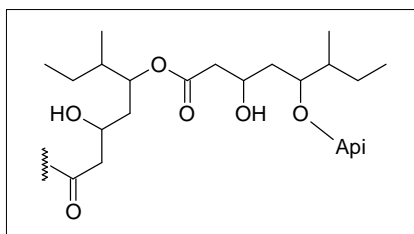


Abb. 41. R_x: Struktur des Restes in den Verbindungen NP-017676 und NP-017677 in Tabelle 9.

Tabelle 9. Saponine mit Oleanangründgerüst, Zuckerverknüpfung an C-3 und C-28

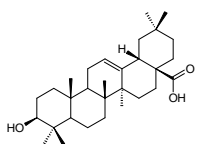
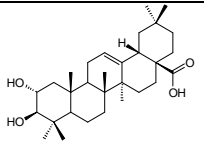
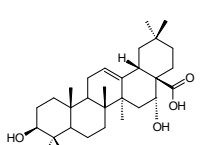
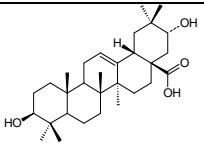
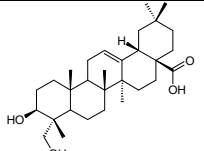
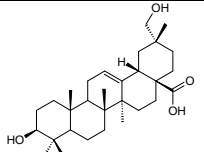
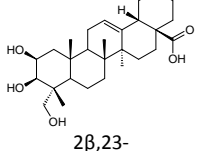
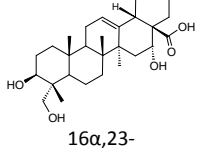
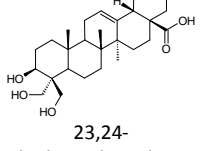
Aglykon	C-3 β -OH-Zuckerrest	C-28-OH-Zuckerrest	Bezeichnung	M _r	Zellbiologische Untersuchungen					Membranbiologische und physikalische Untersuchungen			Radio. ³ H-Chol.	
					Zytotoxizität		synergistische Zytotoxizität		Mean Ratio					
					IC ₅₀ (MTT.)	IC ₅₀ (DNA.)	IC ₅₀ (syn.) (MTT.)	IC ₅₀ (syn.) (DNA.)						
					[g/mol]	[μ g/mL]	[μ g/mL]	[μ g/mL]	[μ g/mL]	IC ₅₀ vs. IC ₅₀ (syn.)	IC ₅₀ (LDH.) [μ M]	OC ₅₀ (pH 7,4) [μ M]		CMC (pH 7,4) [μ M]
 Oleanolsäure	GlcA-	Glc-	NP-000502	794,96	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	GalA-	Glc-	NP-012034	794,96	2,7	3,3	2,5	3,5	1,0	-	-	-	-	
	Glc/Gal-(1 \rightarrow 4)-GlcA-	Glc-	NP-003006	957,10	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	Glc-(1 \rightarrow 4)-GlcA-	Glc-	NP-001976	957,10	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	Ara-(1 \rightarrow 4)-GlcA-	Glc-	NP-011198	927,07	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	Gal-(1 \rightarrow 3)-GlcA-	Glc-	NP-014627	957,10	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	Glc/Gal-(1 \rightarrow 3)-GlcA-	Glc/Gal-	NP-008419	957,10	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	Glc/Gal-(1 \rightarrow 2)-GlcA-	Glc-	NP-008340	957,10	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	Rha/Fuc-(1 \rightarrow 2)-Glc/Gal-(1 \rightarrow 2)-GlcA-	Glc/Gal-	NP-013545	1103,24	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	Glc-(1 \rightarrow 2)-[Glc-(1 \rightarrow 4)]-GlcA-	Glc-	NP-011187	1119,24	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	
	Rha-(1 \rightarrow 3)-[Xyl-(1 \rightarrow 4)]-GlcA-	Api-(1 \rightarrow 6)-Glc-	NP-004355	1205,33	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	×	
	Glc/Gal-(1 \rightarrow 2)-Rha/Fuc-(1 \rightarrow 3)-GlcA-	Glc/Gal-	NP-004184	1103,24	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	×	
Gal-(1 \rightarrow 2)-[Glc-(1 \rightarrow 4)]-GlcA-	Glc-	NP-007471	1119,24	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	×		
Glc/Gal-(1 \rightarrow 3)-[Glc/Gal-(1 \rightarrow 4)]-GlcA-	Glc-	NP-014590	1119,24	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-		
 2 α -Hydroxyoleanolsäure	GlcA-	Glc/Gal-	NP-005236	810,96	7,5	*12,1	7,0	*10,5	1,1	-	-	-	-	
	 16 α -Hydroxyoleanolsäure	Glc-	Rha-(1 \rightarrow 2)-[Xyl-(1 \rightarrow 4)]-Rha-	AMA-1	1043,32	32,8	29,3	*10,1	*10,9	3,0	-	-	-	-
		Glc-	Rha-(1 \rightarrow 2)-[Ara-(1 \rightarrow 3)-Xyl-(1 \rightarrow 4)]-Rha-	AMR	1175,45	31,2	27,3	11,3	10,8	2,6	-	-	-	-
		GlcA-	Glc/Gal-	NP-012006	810,96	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
		Xyl-(1 \rightarrow 4)-GlcA-	Glc-	NP-000474	943,07	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	✓
Api-(1 \rightarrow 3)-[Xyl-(1 \rightarrow 4)]-GlcA-	Glc-	NP-000472	1075,19	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-		
 21-Hydroxyoleanolsäure	GlcA-	Glc-	NP-012298	810,96	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-	

Tabelle 9. (Fortsetzung)

Hydroxyoleanensäurederivate	 Hederagenin (23-Hydroxyoleanoic acid)	GlcA- Rha-(1→2)-Ara-	Glc- -	NP-005446 α-Hederin	810,96 764,98	> 10,0 23,1	> 10,0 27,1	> 10,0 4,7	> 10,0 4,9	1,0 5,2	- 29	- 4	- 13	- ✓
		Rha-(1→2)-Ara-	Rha-(1→4)-Glc- (1→6)-Glc-	Hedera- cosid C	1221,40	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	1,0	> 164	10	82	*
	 29-Hydroxyoleanoic acid	GlcA-	Glc-	NP-012048	810,96	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
	 2β,23-Dihydroxyoleanoic acid	GlcA-	Glc-	NP-000498	826,96	> 10,0	> 10,0	*10,7	> 10,0	1,0	-	-	-	-
	 16α,23-Dihydroxyoleanoic acid	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc- (1→2)-Glc/Gal-(1→2)- Rha/Fuc-(1→2)-GlcA-	Ara/Xyl-	NP-012672	1383,47	> 10,0	> 10,0	5,0	5,7	>1,9	-	-	-	-
	 23,24-Dihydroxyoleanoic acid	GlcA-	Glc/Gal-	NP-005233	826,96	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	*

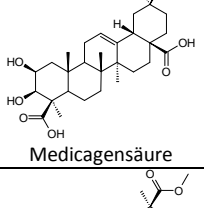
andere Derivate der Oleanolsäure	 2β,16α,23-Trihydroxyoleanolsäure	GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Ara-	NP-013105	1223,30	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
	 Medicagensäure	GlcA-	Rha-(1→2)-Ara-	NP-017750	957,06	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
		GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-α-Ara-	NP-001531	1089,17	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
		GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-β-Ara-	NP-017751	1089,17	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
	 Phytolaccagenin	GlcA-	Glc-	NP-009259	854,97	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	x
 23-Desoxy-phytolaccagenin	GlcA-	Glc-	NP-000712	838,97	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	x	
	Glc/Gal-(1→2)-GlcA-	Glc/Gal-	NP-013544	1001,11	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	x	
Gypsogenin	 Gypsogenin	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-	AG3	1527,62	> 10,0	> 10,0	> 10,0 #> 10,0	> 10,0 #> 10,0	1,0 #1,0	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-	AG4	1659,74	> 10,0	> 10,0	> 10,0 #> 10,0	> 10,0 #> 10,0	1,0 #1,0	-	-	-	-

Tabella 9. (Fortsetzung)

Tabelle 9. (Fortsetzung)

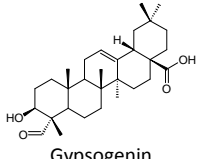
Gypsogenin  Gypsogenin	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 4E-Methoxyzimtsäure)	NP-017777	1525,66	*11,3	*10,2	0,5	0,5	21,5	-	-	-	✓
	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)]-Fuc- (R = 4Z-Methoxyzimtsäure)	NP-017778	1525,66	> 10,0	> 10,0	0,5	0,6	>18,3	-	-	-	✓
	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-[OAc-(→4)]-Fuc-	NP-017774	1569,67	> 10,0	> 10,0	0,6	0,7	>15,5	-	-	-	✓
	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[2 OAc-(→3,4)]-Fuc-	NP-018110 ^c , NP-017772 ^d	1611,67	5,3 ^c > 10,0 ^d	3,8 ^c > 10,0 ^d	0,5 ^c 0,8 ^d	0,6 ^c 0,8 ^d	8,5 ^c > 12,5 ^d	-	-	-	✓ ^c
	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[OAc-(→3)], [R-(→4)]-Fuc- (R = 4E-Methoxyzimtsäure)	NP-018109	1729,80	8,5	9,6	0,5	0,7	15,4	-	-	-	-
	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[OAc-(→4)]-Fuc-	NP-017888	1569,63	> 10,0	*11,3	1,4	1,5	>7,3	-	-	-	✓
	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[OAc-(→4)]-Fuc-	NP-017889	1731,77	7,3	3,6	1,8	1,8	3,0	-	-	-	-
	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→3)-Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→2)-[OAc-(→4)]-Rha/Fuc-(1→4)]-Rha/Fuc-	NP-018108	1685,75	*10,9	*10,5	1,2	1,5	8,0	-	-	-	-
	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Chi-(1→4)]-Fuc-	SA1641 ^a , AE X55 ^b	1643,93	> 10,0 ^a 20,7 ^b	> 10,0 ^a 14,1 ^b	2,0 ^a 2,1 ^b	2,1 ^a 2,2 ^b	> 4,9 ^a 8,5 ^b	-	5 ^a	-	✓ ^a

Tabelle 9. (Fortsetzung)

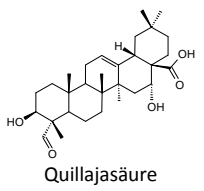
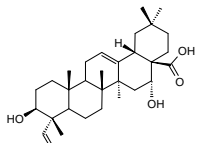
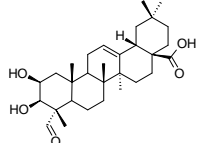
Hydroxygypsogeninderivate	 <p>Quillajasäure</p>	OAc-(→6)-GlcA-	Glc-	NP-017779	838,97	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	-	NP-012978	957,06	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Chi-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-	NP-017675	1659,72	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-	NP-017674	1675,71	> 10,0	> 10,0	5,4	5,9	>1,8	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-	NP-017810	1543,64	> 10,0	*10,3	3,3	3,7	>2,9	-	-	-	✓
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-	AG1	1543,62	> 10,0	> 10,0	5,6 #7,8	*10,7 #*11,8	>1,4 #>1,1	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-	NP-003881	1543,62	> 10,0	*10,4	3,4	4,2	>2,7	-	-	-	✓
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R-(→4)-Fuc-	NP-017676	2152,27	3,0	3,9	0,6	0,7	5,3	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R-(→4)-Fuc-	NP-017677	1972,11	> 10,0	6,7	0,7	0,6	>12,7	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)], [OAc-(→4)]-Fuc-	NP-017706	1701,79	3,5	3,6	0,6	0,7	5,5	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)], [OAc-(→4)]-Fuc-	NP-017705	1863,89	5,6	4,8	1,2	1,2	4,3	-	-	-	-

Tabelle 9. (Fortsetzung)

Hydroxygypsoginderivate	 Quillajasäure	Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	OAc-(→6)-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[OAc-(→3)-Rha-(1→3)]-Fuc-	NP-017773	1773,85	7,3	4,6	1,2	1,3	4,8	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[OAc-(→3)-Rha-(1→3)]-Fuc-	NP-017775	1731,82	*11,0	6,3	1,8	1,9	4,7	-	-	-	-
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Chi-(1→4)]-Fuc-	SA1657	1659,74	> 10,0	> 10,0	2,3	2,1	>4,6	-	-	-	✓
		Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-	Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Chi-(1→4)]-Fuc-	AG2	1689,76	8,8	> 10,0	1,8 [#] _{2,3}	2,2 [#] _{4,2}	>4,7 [#] _{>3,1}	-	-	-	-
	 2β-Hydroxygypsogenin	GlcA-	Glc-	NP-017749	824,97	> 10,0	> 10,0	> 10,0	> 10,0	1,0	-	-	-	-

* = durch Extrapolation ermittelt; [#] = synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von 1 nM Agrostin; ✓ = ja; ✗ = nein; ³H-Chol. = ³H-Cholesterolgehalt beeinflusst; ^a = Werte für SA1641; ^b = Werte für AE X55; ^c = Werte für NP-018110; ^d = Werte für NP-017772; DNA. = DNA-Quantifizierung; LDH. = LDH-Assay; MTT. = MTT-Assay; Radio. = Radioanalytische Untersuchungen; R_x = Rest in der Verbindung NP-017676 und NP-017677, Strukturformel siehe Abb. 41

Tabelle 10. Saponine ohne Oleanangrundgerüst, Zuckerverknüpfungen an anderen Positionen.

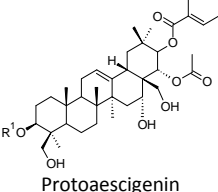
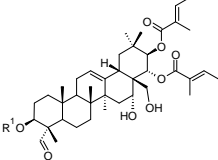
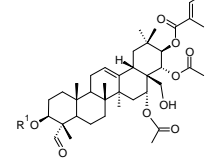
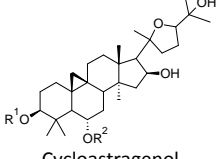
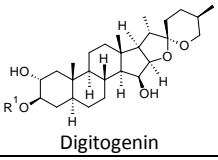
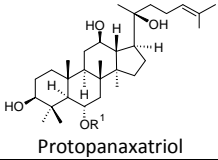
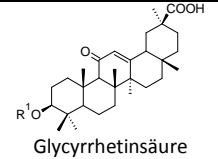
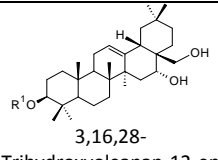
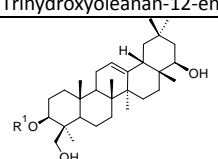
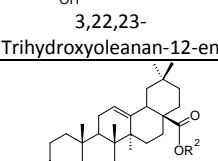
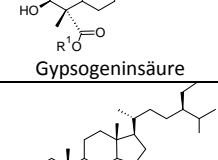
Aglykon	R ¹ -Zuckerrest	R ² -Zuckerrest	Bezeichnung	M _r	Zellbiologische Untersuchungen					Membranbiologische und physikalische Untersuchungen			Radio. ³ H-Chol.
					Zytotoxizität		synergistische Zytotoxizität		Mean Ratio				
					IC ₅₀ (MTT.)	IC ₅₀ (DNA.)	IC ₅₀ (syn.) (MTT.)	IC ₅₀ (syn.) (DNA.)					
					[g/mol]	[µg/mL]	[µg/mL]	[µg/mL]	[µg/mL]	IC ₅₀ vs IC ₅₀ (syn.)	IC ₅₀ (LDH.) [µM]	OC ₅₀ (pH 7,4) [µM]	
 Protoaescigenin	Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-	-	β-Äscin (dargestellte Verbindung: Äscin Ia)	1131,41	> 50,0	*62,6	7,7	7,6	>7,4	34	7	88	✓
	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-	Teaseedsaponin I	1301,49	16,4	12,5	1,7	1,8	8,3	-	-	-	-
	Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-	Teaseedsaponin J	1271,46	25,0	24,1	2,8	1,8	11,2	-	-	-	-
	Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-	-	Assamsaponin F	1303,46	> 50,0	*59,8	16,3	17,4	>3,3	-	-	-	-
	Ara-(1→2)-Xyl-	Glc-	ASJL1	917,14	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	1,0	-	-	-	-
	Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-	-	Digitonin	1229,31	19,1	20,5	13,6	9,3	1,8	15	8	163	-

Tabelle 10. (Fortsetzung)

 Protopanaxatriol	Rha-(1→2)- Glc-	-	Ginsenosid Rg2	785,01	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	1,0	*783	25	> 127	-
 Glycyrrhetinsäure	-	-	Glycyrrhetinsäure	470,70	47,0	46,0	48,0	49,0	1,0	292	16	106	-
	GlcA-(1→2)- GlcA-	-	Glycyrrhizinsäure	822,94	> 50,0	> 50,0	> 50,0	> 50,0	1,0	> 238	128	> 1429	✘
 3,16,28- Trihydroxyoleanan-12-en	Rha-(1→2)- Gal-(1→3)- [Glc-(1→2)]- GlcA-	-	Primulasäure 1	1105,28	16,0	14,0	3,5	2,5	5,1	58	8	90	✓
 3,22,23- Trihydroxyoleanan-12-en	Rha-(1→2)- Gal-(1→2)- GlcA-	-	Soyasaponin Bb	943,12	*9,8	> 10,0	*12,9	> 10,0	1,0	-	-	-	-
 Gypsogeninsäure	Gal-	Glc-(1→3)- [Glc-(1→6)]- Gal-	AS6.2	1135,40	40,0	37,0	1,6	1,6	24,1	-	-	-	-
	-	Glc-(1→3)- [Glc-(1→6)]- Gal-	AS64R	973,24	> 50,0	33,2	5,8	7,6	>6,5	-	-	-	-
 β-Sitosterol	-	-	β-Sitosterol	414,69	29,2	23,1	27,0	24,8	1,0	472	19	241	✘

* = durch Extrapolation ermittelt; ✓ = ja; ✘ = nein; ³H-Chol. = ³H-Cholesterolgehalt beeinflusst; DNA. = DNA-Quantifizierung; LDH. = LDH-Assay; MTT. = MTT-Assay; Radio. = Radioanalytische Untersuchungen

3.2.4 Zytotoxizität isolierter Saponine aus *Agrostemma githago* L. auf ECV 304-Zellen

Die Zytotoxizität der aus dem Extrakt der Samen von *A. githago* isolierten Saponine AG1, AG2, AG3 und AG4 wurde, wie für Saponinum album und für andere ausgewählte Saponine und Extrakte beschrieben, durchgeführt. Dabei wurde neben 1 nM Saporin auch versucht, die Zytotoxizität von 1 nM Agrostin synergistisch zu verstärken. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 9 aufgeführt. Der Vergleich dieser Ergebnisse ergab für AG3 und AG4 keinen Unterschied der synergistischen Zytotoxizität für Kombinationen mit 1 nM Saporin vs. 1 nM Agrostin. AG1 und AG2 zeigten eine leicht stärkere synergistische Zytotoxizität in Kombination mit 1 nM Saporin. Die Abbildung 42 zeigt dies für das potenteste der vier Saponine bezüglich der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung.

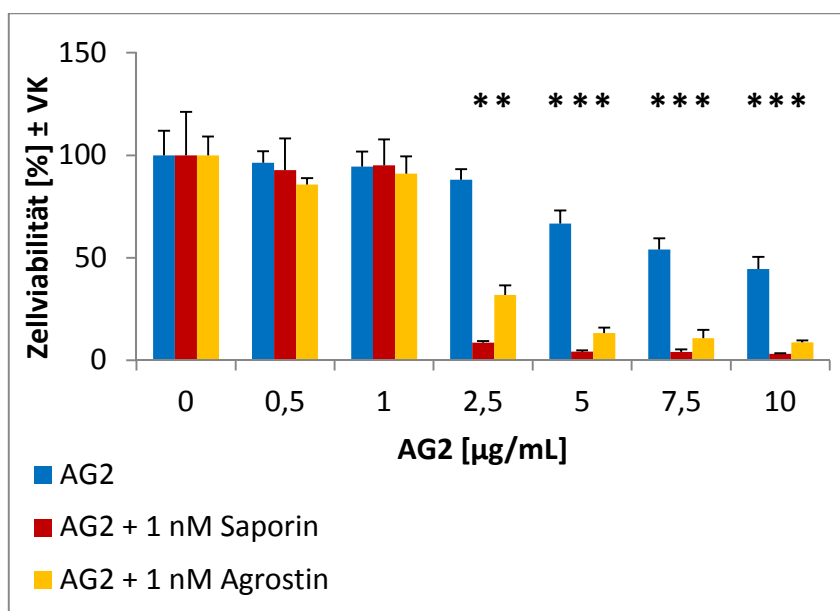


Abb. 42. Zytotoxizität von AG2 auf ECV-304-Zellen, allein und in Kombination mit 1 nM Saporin oder 1 nM Agrostin. Die dargestellte Zytotoxizität wurde durch einen MTT-Assay bestimmt. Eine ebenfalls durchgeführte DNA-Quantifikation ergab vergleichbare Ergebnisse. (* = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (100 %), U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 5\%$) (n = 2; 6 Parallelen)

3.2.5 Zytotoxizität von Saporin-EGF auf NIH-3T3/HER14-Zellen

Die Abbildung 43 zeigt, dass Saporin-EGF bis 1000 pM zu keiner signifikanten Zytotoxizität führte – höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht. Kombinationen aus Saporin-EGF und 1,5 µg/mL Saponinum album oder 5 µg/mL SA1641 zeigten bis 10 pM keine Zytotoxizität. Ab 100 pM Saporin-EGF zeigen sowohl 1,5 µg/mL Saponinum album als auch 5 µg/mL SA1641 eine signifikante Zytotoxizität auf die Zellen. Eine weitere Erhöhung der Saporin-EGF-Konzentration auf 1 nM in Kombination mit 1,5 µg/mL Saponinum album oder 5 µg/mL SA1641 führte bei beiden zu einer maximalen Verminderung der Zellviabilität. Unter Berücksichtigung dessen, dass bei diesem Versuch ein anderes Zellsystem (mit EGFR) verwendet wurde, lässt sich dennoch feststellen, dass Kombinationen aus Saporin-EGF und 5 µg/mL SA1641 bzw. 1,5 µg/mL Saponinum album bereits bei einem Zehntel der Saporinkonzentration (10 nM) des Versuches zur Zytotoxizität von Saporin an den EGFR-negativen ECV-304-Zellen (s. 3.2.1) zu einer maximalen Zytotoxizität führen. Somit kann bei diesem Versuch von einer Effektivitätssteigerung gesprochen werden.

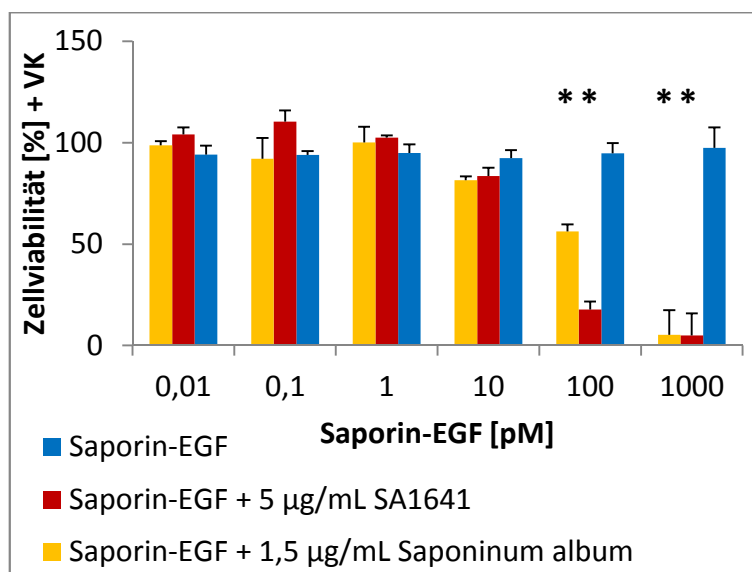


Abb. 43. Zytotoxizität von Saporin-EGF auf NIH-3T3/HER14-Zellen, allein und in Kombination mit 5 µg/mL SA1641 bzw. 1,5 µg/mL Saponinum album. Die dargestellte Zytotoxizität wurde mittels MTT-Assey aus 6 Parallelen ermittelt. Eine ebenfalls durchgeführte DNA-Quantifikation ergab vergleichbare Ergebnisse. * = signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (100 %), U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 5 \%$

3.3 Membran- und Oberflächenspannungsuntersuchungen

Bei den Untersuchungen wurden für die in Tabelle 11 aufgeführten Substanzen Daten über die zellmembranperforierende Wirkung, die Oberflächenspannungserniedrigung einer wässrigen Lösung und die jeweilige Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) ermittelt. Die Daten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Katja Hofmann gewonnen. In dieser Arbeit werden davon nur jene Ergebnisse berücksichtigt, welche bei einem physiologischen pH (7,4) ermittelt wurden. Zur Bestimmung der Zellmembranperforation wurde ein LDH-Assay verwendet. Die dargestellten Werte zeigen die Konzentrationen (IC_{50}), bei denen eine halbmaximale Membranschädigung eintrat. Das ist im Fall des LDH-Assays dann, wenn die Hälfte der maximal freisetzbaren Konzentration des intrazellulären Enzyms Lactatdehydrogenase aller behandelten Zellen extrazellulär erreicht wird. Bei Ginsenosid Rg2 (23 %), Glycyrrhizinsäure (1 %) und Hederacosid C (9 %) wurde ein Wert von 50 % LDH-Freisetzung nicht erreicht. Deshalb ist für Glycyrrhizinsäure und Hederacosid C jeweils die höchste eingesetzte Konzentration angegeben. Für Ginsenosid Rg2 ist eine durch Extrapolation errechnete Konzentration angegeben (gekennzeichnet mit *).

Tab. 11. Membran- und Oberflächenspannungsuntersuchungen.

Substanz	IC_{50} (DNA-Quant.)	IC_{50} (LDH-Assay)	OC_{50} (pH 7,4)	CMC (pH 7,4)
α -Hederin	35 μ M	29 μ M	4 μ M	13 μ M
β -Äscin	52 μ M	34 μ M	7 μ M	88 μ M
β -Sitosterol	61 μ M	472 μ M	19 μ M	241 μ M
Digitonin	13 μ M	15 μ M	8 μ M	163 μ M
Ginsenosid Rg2	> 127 μ M	*783 μ M	25 μ M	> 127 μ M
Glycyrrhetinsäure	101 μ M	292 μ M	16 μ M	106 μ M
Glycyrrhizinsäure	> 119 μ M	> 238 μ M	128 μ M	> 1429 μ M
Hederacosid C	> 164 μ M	> 164 μ M	10 μ M	82 μ M
Primulasäure 1	13 μ M	58 μ M	8 μ M	90 μ M
SA1641	> 6 μ M	-	5 μ M	-
Saponinum album	4,7 μ g/mL	36,5 μ g/mL	10 μ g/mL	50 μ g/mL

* = durch Extrapolation ermittelt

Da der pH-Wert den Einfluss einer Substanz auf die Oberflächenspannung einer Lösung ändern kann, wurden die Messungen der Oberflächenspannung und der Kritischen Mizellbildungskonzentration in 0,1 M Phosphatpuffer mit pH 7,4 durchgeführt. Die Werte zur Beeinflussung der Oberflächenspannung (OC_{50}) geben jeweils die Konzentration an, welche zu einer halbmaximalen Oberflächenspannungserniedrigung führte. Dabei war das Ausmaß der maximalen Erniedrigung der Oberflächenspannung für jede untersuchte Substanz verschieden. Die Kritische Mizellbildungskonzentration gibt die Konzentration einer oberflächenaktiven Substanz an, bei welcher eine weitere Erhöhung der Konzentration nicht in einer weiteren Absenkung der Oberflächenspannung resultiert und die Substanz in Mizellen aggregiert. Häufig ist bei weiterer Erhöhung der Konzentration sogar ein leichter Anstieg der Oberflächenspannung zu beobachten. Die CMC kann somit in etwa als jene Konzentration einer Substanz betrachtet werden, bei welcher die Oberflächenspannung ein Minimum

erreicht. Für Ginsenosid Rg2 und Glycyrrhizinsäure konnte diese Konzentration nicht ermittelt werden, da sich diese Substanzen vor dem Erreichen eines Oberflächenspannungsminimums nicht weiter im Phosphatpuffer lösen ließen. Die angegebenen Konzentrationen sind die jeweils höchsten untersuchten.

3.4 Radioanalytische Untersuchungen

3.4.1 Gekühlte konzentrationsabhängige ^3H -Cholesterolaufnahme

Die Abbildung 44 zeigt eine konzentrationsabhängige Aufnahme von ^3H -Cholesterol in ECV-304-Zellen unter Ausschluss aktiver Transportmechanismen. Diese folgte einen linearen Zusammenhang. Eine berechnete Regressionsgerade hatte ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9870$. Die Konzentration 0,2 nM ist nicht dargestellt, da die erhaltenen Signale im Bereich der Signale der Hintergrundstrahlung (ca. 10 counts per minute) lagen. Signale der Hintergrundstrahlung wurden von allen Ergebnissen abgezogen.

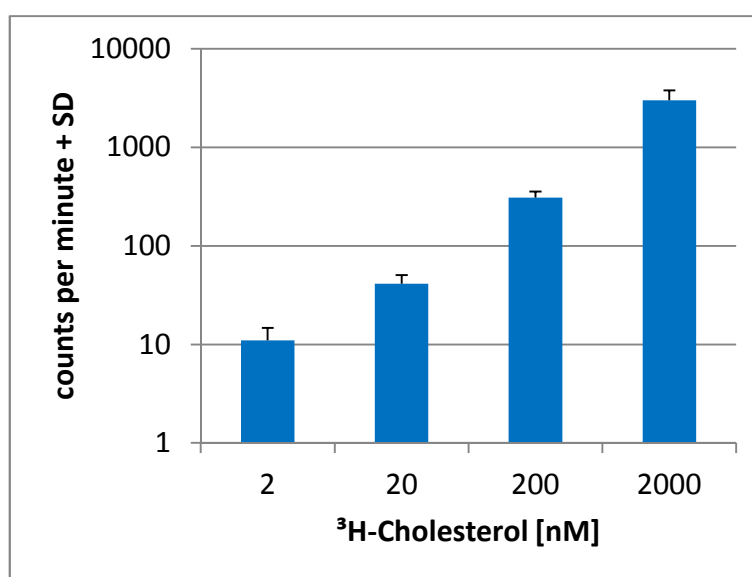


Abb. 44. Konzentrationsabhängige ^3H -Cholesterolaufnahme in ECV-304-Zellen unter Kühlung auf 0°C . Die Aufnahme erfolgt konzentrationsabhängig linear.

3.4.2 Ungekühlte kompetitive konzentrationsabhängige ^3H -Cholesterolaufnahme

Die Abbildung 45 zeigt die konzentrationsabhängige ^3H -Cholesterolaufnahme in ECV-304-Zellen. Aktive Transportmechanismen wurden nicht unterdrückt. Es wurde versucht die passive ^3H -Cholesterolaufnahme durch Zusatz einer jeweils 10-fachen bzw. 100-fachen Konzentration Cholesterol der ^3H -Cholesterolkonzentration zu beeinflussen. Dies war nicht nachweisbar. Der Zusatz von natürlichem Cholesterol hatte keine Auswirkung auf die Aufnahme von ^3H -Cholesterol. Die ^3H -Cholesterolaufnahme folgte trotz Zusatz natürlichen Cholesterols einem linearen Zusammenhang. Daraus lässt sich ableiten, dass selbst 100-fache Mengen der höchsten untersuchten ^3H -Cholesterolkonzentration noch ungehindert von den Zellen aufgenommen werden und keine Sättigung dieses Prozesses zu beobachten ist. Berechnete Regressionsgeraden hatten Bestimmtheitsmaße von $R^2 = 0,9539$ (ohne Cholesterolzusatz), $R^2 = 0,9640$ (10-facher Cholesterolzusatz) und $R^2 = 0,9463$

(100-facher Cholesterolzusatz). Die Konzentration 0,2 nM ist nicht dargestellt, da die erhaltenen Signale im Bereich der Signale der Hintergrundstrahlung (ca. 10 counts per minute) lagen. Signale der Hintergrundstrahlung wurden von allen Ergebnissen abgezogen.

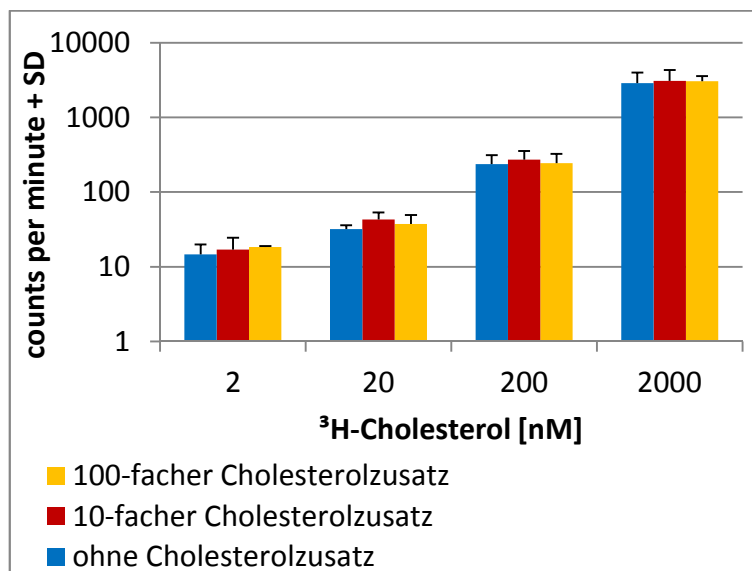


Abb. 45. Kompetitive konzentrationsabhängige ³H-Cholesterolaufnahme ohne Kühlung unter 10-fachem bzw. 100-fachem Zusatz nicht-radioaktiven Cholesterols der Konzentration von ³H-Cholesterol oder ohne Zusatz. (n = 3)

3.4.3 Zeitabhängige ³H-Cholesterolaufnahme

Abbildung 46 zeigt die zeitabhängige ³H-Cholesterolaufnahme in EVC-304-Zellen. Nach einer kurzen Anlaufphase ist ab 30 min ein linearer Zusammenhang zwischen Zeit und aufgenommener ³H-Cholesterolmenge erkennbar. Eine Sättigung dieses Prozesses wurde nicht beobachtet. Eine berechnete Regressionsgerade hatte ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9178$. Bei diesem Versuch wurde auch die ³H-Cholesterolkonzentration im Überstand der Zellkultur untersucht. Diese war im zeitlichen Verlauf konstant und betrug ein Vielfaches der maximal aufgenommenen Menge (s. Abbildung 47). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die zeitabhängige Aufnahme von ³H-Cholesterol in die Membranen der Zellen durch Diffusionsprozesse, wie etwa die Anhaftung an Gefäßoberflächen, und daraus resultierenden Konzentrationsänderungen im Überstand beeinflusst wurde.

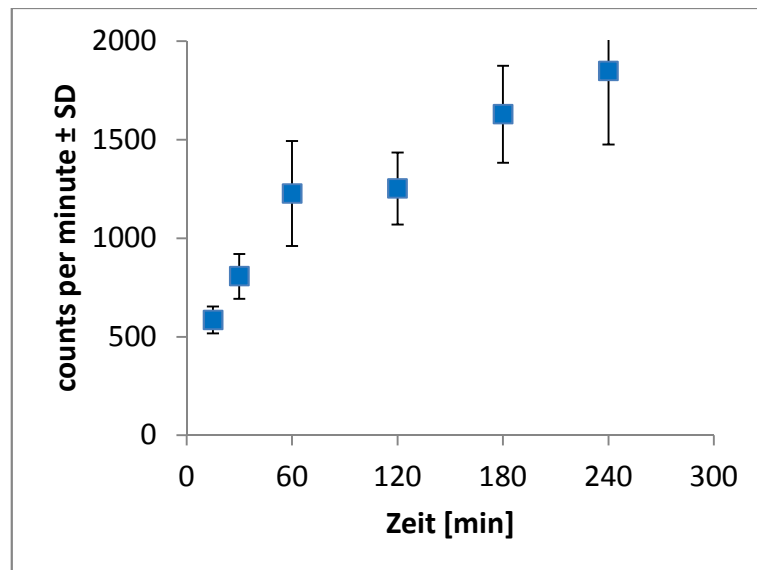


Abb. 46. Zeitabhängige ^3H -Cholesterolaufnahme in ECV-304-Zellen. Ab 30 min nahm der ^3H -Cholesterolgehalt der Zellen im weiteren zeitlichen Verlauf linear zu. Eine Sättigung des Vorgangs wurde nicht beobachtet. (n = 2; 3 Parallelen)

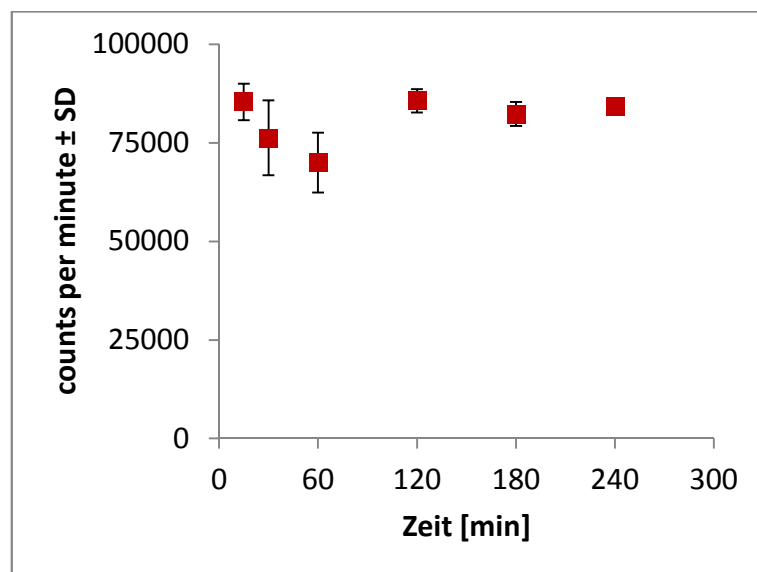


Abb. 47. Zeitabhängige Änderung der ^3H -Cholesterolkonzentration im Zellkultur-medium. Diffusionsprozesse etwa durch die Aufnahme in die Zellen oder Adhäsionsprozesse, wie das Anhaften an Gefäßoberflächen änderten im Versuch die ^3H -Cholesterolkonzentration im überstehenden Medium nicht messbar. (n = 2; 3 Parallelen)

3.4.4 Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme und –freisetzung durch Saponine

Zur Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme in ECV-304-Zellen bzw. deren Zellmembranen und der ^3H -Cholesterolfreisetzung wurden zum einen Saponine verwendet, welche zytotoxisch waren, die Zytotoxizität von Saporin synergistisch verstärkten oder zellmembranperforierenden Eigenschaften zeigten. Diese Saponine wurden in diesen Versuchen allgemein als membranaktive Saponine bezeichnet. Zum anderen wurden für die Versuche Saponine verwendet, welche keine Zytotoxizität oder Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin zeigten und zellmembranperforierende Eigenschaften nur schwach oder/und in höheren Konzentrationen als membranaktive Saponine. Solche Substanzen wurden allgemein als membraninaktive Saponine bezeichnet. Mit Ausnahme der Verbindung NP-000474 führt die Abbildung 48 membranaktive Saponine auf. Das Saponin NP-000474 könnte den in Tabelle 9 aufgeführten Werten folgend als membraninaktives Saponin interpretiert werden, zeigte jedoch eine deutliche Beeinflussung des ^3H -Cholesterolgehalts. Dargestellt ist die maximale untersuchte Konzentration jedes Saponins sowie die dabei nach Substanzzugabe in die Zellen aufgenommene (^3H -Cholesterolaufnahme) bzw. nach Substanzzugabe in den Zellen verbliebene (^3H -Cholesterolfreisetzung) prozentuale Menge ^3H -Cholesterol im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei membranaktiven Saponinen waren diese Werte durchweg niedriger als bei der unbehandelten Kontrolle. Das bedeutet, dass nach Inkubation mit membranaktiven Saponinen die Aufnahme von ^3H -Cholesterol in die Zellen bzw. in deren Zytoplasmamembranen reduziert war. Weiterhin bewirkten membranaktive Saponine eine verstärkte Freisetzung von ^3H -Cholesterol aus zuvor mit ^3H -Cholesterol inkubierten Zellen bzw. Membranen, was wiederum zu einem gegenüber der unbehandelten Kontrolle verminderten zellulären ^3H -Cholesterolgehalt führte. Die verwendeten Konzentrationen der untersuchten Saponine lagen dabei deutlich über jenen Konzentrationen, welche zur Untersuchung der Zytotoxizität eingesetzt wurden. Diese waren auf Grund der vergleichsweise kurzen Inkubationszeit von einer Stunde (gegenüber 72 Stunden bei Untersuchungen zur Zytotoxizität) nötig, um einen Effekt beobachten zu können. Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Zytotoxizität bzw. der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin und der Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme und –freisetzung ist ansatzweise erkennbar. So beeinflussten die Saponine NP-017774, NP-017778, NP-017810, NP-017888 und NP-018110 bereits bei der halben Konzentration im Vergleich zu anderen membranaktiven Saponinen den ^3H -Cholesterolgehalt der Zellen ähnlich stark wie diese oder stärker und wiesen gleichzeitig im Vergleich zu anderen untersuchten Saponinen sehr niedrige Werte für IC_{50} und $\text{IC}_{50}(\text{syn.})$ bei Versuchen zur Zytotoxizität und synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung auf.

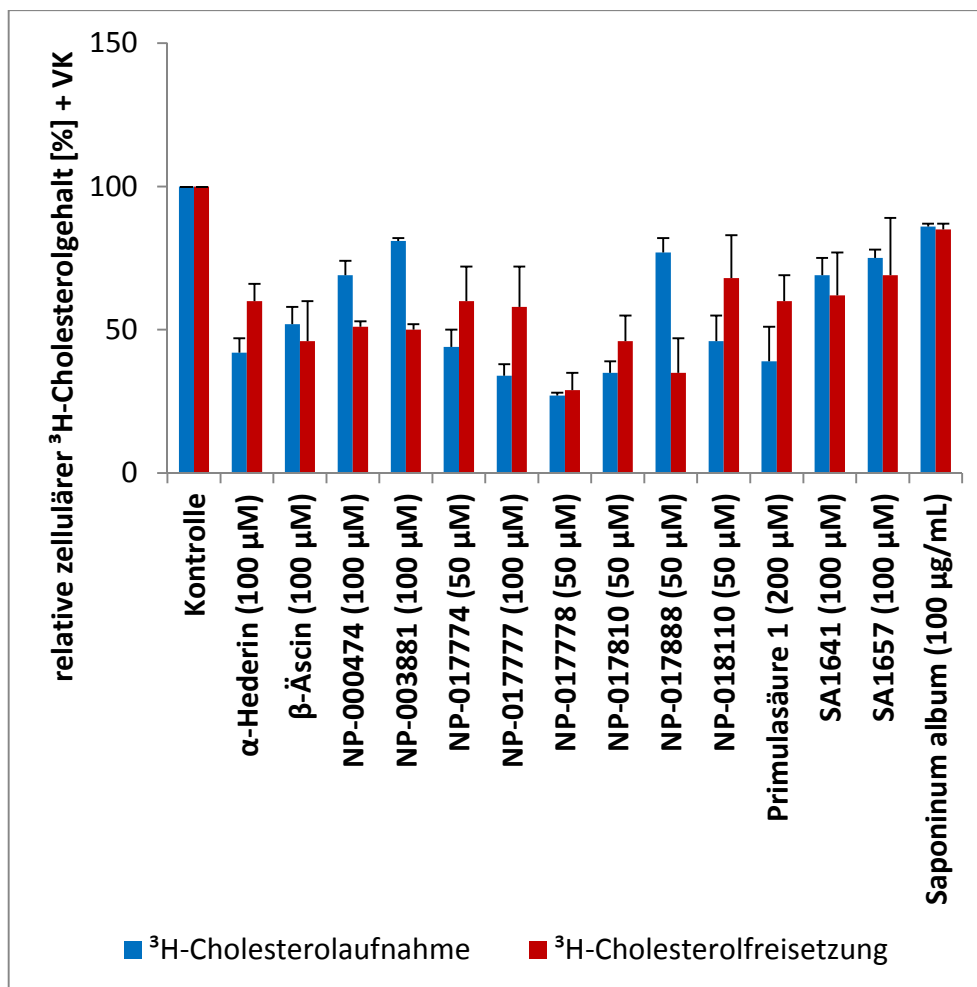


Abb. 48. Beeinflussung der ³H-Cholesterolaufnahme und –freisetzung durch membranaktive Saponine. Alle Unterschiede des relativen zellulären ³H-Cholesterolgehalts sind gegenüber der Kontrolle statistisch signifikant. Dargestellt sind jeweils die maximalen untersuchten Konzentrationen der Substanzen. (n = 2-3; 3 Parallelen)

Die Beeinflussung der ³H-Cholesterolaufnahme und –freisetzung durch membraninaktive Saponine ist in Abbildung 49 dargestellt. Aufgeführt ist ebenfalls die jeweils maximale untersuchte Konzentration jedes Saponins und die dabei nach Substanzzugabe in die Zellen aufgenommene bzw. nach Substanzzugabe in den Zellen verbliebene prozentuale Menge ³H-Cholesterol im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die untersuchten Konzentrationen sind vergleichbar mit denen der Gruppe der membranaktiven Saponine. Nur bei β-Sitosterol, Glycyrrhizinsäure und Hederacosid C wurden höhere Konzentrationen, welche sich an denen der Untersuchungen zur Membrantoxizität (LDH-Assay) orientierten, untersucht. Im Gegensatz zu den membranaktiven Saponinen, beeinflussten membraninaktive Saponine den ³H-Cholesterolgehalt in der Regel nicht oder nicht statistisch signifikant. Bei den Saponinen NP-005233 und NP-009259 wurde nach den Versuchen zur Beeinflussung ³H-Cholesterolfreisetzung ein statistisch signifikant höherer ³H-Cholesterolgehalt in den Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Das bedeutet, dass bei mit diesen Verbindungen behandelten Zellen, die spontane ³H-Cholesterolwiederabgabe (³H-Cholesterolfreisetzung) nach Inkubation mit ³H-Cholesterol in geringerem Ausmaß stattfand als bei

der unbehandelten Kontrolle. Differenzen zwischen den Ausmaßen der saponinabhängigen Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme und der -freisetzung traten auch bei einigen der untersuchten Stoffe dieser Gruppe auf, waren jedoch nicht statistisch signifikant.

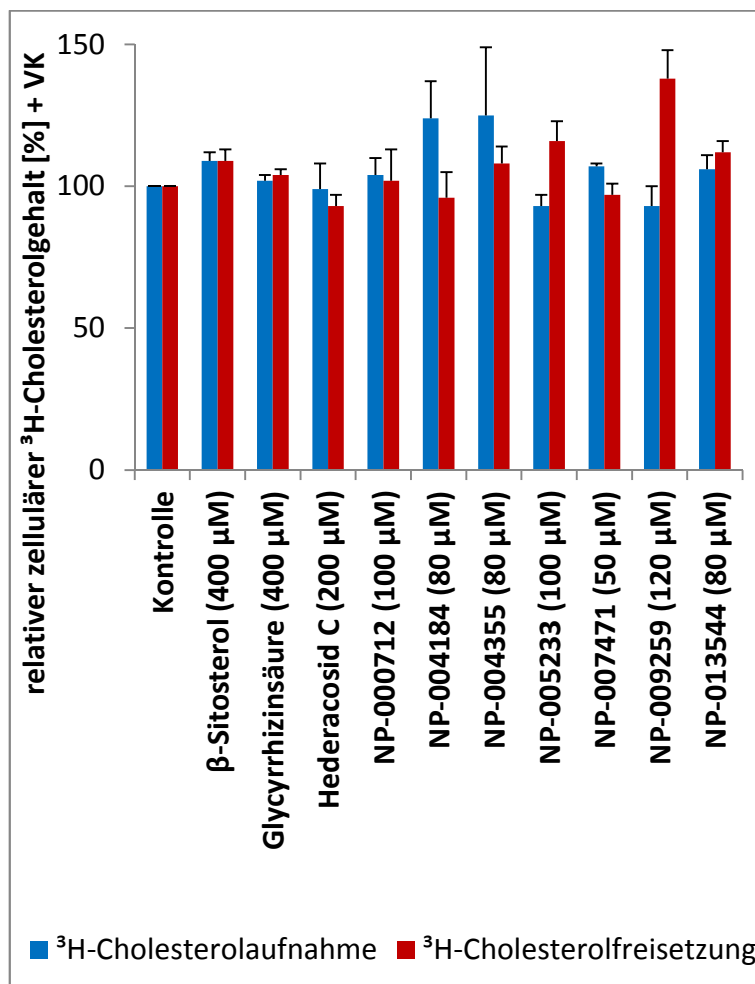


Abb. 49. Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme und -freisetzung durch membraninaktive Saponine. Außer der ^3H -Cholesterolfreisetzung durch NP-005233 und NP-009259 sind alle Unterschiede des relativen zellulären ^3H -Cholesterolgehalts gegenüber der Kontrolle nicht statistisch signifikant. Dargestellt sind jeweils die maximalen untersuchten Konzentrationen der Substanzen. (n = 2-3; 3 Parallelen)

Die Tabelle 12 führt sowohl membranaktive als auch membraninaktive Substanzen auf und zeigt die prozentualen Werte der Beeinflussung des zellulären ^3H -Cholesterolgehalts im Vergleich zur Kontrolle (= 100 %) und den Variationskoeffizient. Neben der Auflistung der bereits in den Abbildungen 48 und 49 dargestellten Werte der beeinflussten ^3H -Cholesterolaufnahme und -freisetzung bei der jeweils maximalen untersuchten Konzentration einer Substanz, sind dort auch jene Werte dargestellt, die bei der Hälfte und einem Viertel der maximalen untersuchten Konzentration gemessen wurden. Geringere Konzentrationen als halbmaximale konnten nur in einigen Fällen untersucht werden und waren in der Regel nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur

Kontrolle. Dennoch zeigen die meisten membranaktiven Substanzen einen konzentrationsabhängigen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration und dem Ausmaß des Einflusses auf den ^3H -Cholesterolgehalt der Zellen. Paradoxerweise scheint dieser in einigen Fällen bei halbmaximaler Konzentration größer als bei der Maximalkonzentration zu sein.

Tab. 12. Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme und -freisetzung durch Saponine. Aufgeführt sind sowohl membranaktive als auch membraninaktive Substanzen und der durch diese bei verschiedenen Konzentrationen beeinflusste ^3H -Cholesterolgehalt prozentual im Vergleich zur Kontrolle \pm Variationskoeffizient. (* = statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle (100 %), U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 5\%$) (n = 2-3; 3 Parallelen)

Substanz	maximale Konz.	^3H -Cholesterolgehalt in % gegenüber Kontrolle bei Maximalkonzentration		^3H -Cholesterolgehalt in % gegenüber Kontrolle bei halbmax. Konzentration		^3H -Cholesterolgehalt in % gegenüber Kontrolle bei viertelmax. Konzentration	
		Beeinfl. d. Aufnahme	Beeinfl. d. Freisetzung	Beeinfl. d. Aufnahme	Beeinfl. d. Freisetzung	Beeinfl. d. Aufnahme	Beeinfl. d. Freisetzung
α -Hederin	100 μM	*45 \pm 2	*60 \pm 6	*47 \pm 10	*69 \pm 5	[#] 87 \pm 7	[#] 100 \pm 17
β -Äscin	100 μM	*52 \pm 6	*46 \pm 14	*64 \pm 4	*60 \pm 7	92 \pm 14	85 \pm 13
β -Sitosterol	400 μM	109 \pm 4	109 \pm 3	104 \pm 7	94 \pm 11	93 \pm 7	93 \pm 11
Glycyrrhizinsäure	400 μM	102 \pm 2	104 \pm 2	106 \pm 3	103 \pm 4	95 \pm 12	95 \pm 16
Hederacosid C	200 μM	99 \pm 9	93 \pm 4	92 \pm 12	*88 \pm 3	84 \pm 7	86 \pm 6
NP-000474	100 μM	*69 \pm 5	*51 \pm 2	94 \pm 1	*85 \pm 3	-	-
NP-000712	100 μM	104 \pm 6	102 \pm 11	102 \pm 4	103 \pm 2	-	-
NP-003881	100 μM	*81 \pm 1	*50 \pm 2	*47 \pm 8	*48 \pm 7	-	-
NP-004184	80 μM	124 \pm 13	96 \pm 9	123 \pm 16	97 \pm 5	-	-
NP-004355	80 μM	125 \pm 24	108 \pm 6	119 \pm 10	111 \pm 5	-	-
NP-005233	100 μM	93 \pm 4	*116 \pm 7	105 \pm 5	109 \pm 8	-	-
NP-007471	50 μM	107 \pm 1	97 \pm 4	95 \pm 5	109 \pm 5	-	-
NP-009259	120 μM	93 \pm 7	*138 \pm 10	98 \pm 8	*131 \pm 6	-	-
NP-013544	80 μM	106 \pm 5	112 \pm 4	103 \pm 1	109 \pm 15	-	-
NP-017774	50 μM	*44 \pm 6	*60 \pm 12	*35 \pm 1	79 \pm 18	-	-
NP-017777	100 μM	*34 \pm 4	*58 \pm 14	*15 \pm 3	*37 \pm 5	-	-
NP-017778	50 μM	*27 \pm 1	*29 \pm 6	*19 \pm 1	*29 \pm 4	-	-
NP-017810	50 μM	*35 \pm 4	*46 \pm 9	*51 \pm 7	*58 \pm 10	-	-
NP-017888	50 μM	*77 \pm 5	*35 \pm 12	*69 \pm 2	*15 \pm 2	-	-
NP-018110	50 μM	*46 \pm 9	*68 \pm 15	*48 \pm 4	*59 \pm 8	-	-
Primulasäure 1	200 μM	*39 \pm 12	*60 \pm 9	*46 \pm 11	*54 \pm 8	*53 \pm 7	*63 \pm 2
SA1641	100 μM	*69 \pm 6	*62 \pm 15	*69 \pm 3	74 \pm 9	*80 \pm 12	95 \pm 15
SA1657	100 μM	*75 \pm 3	*69 \pm 20	*79 \pm 3	*78 \pm 4	*78 \pm 8	84 \pm 13
Saponinum album	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	*78 \pm 10	*85 \pm 2	94 \pm 3	91 \pm 1	86 \pm 6	87 \pm 11

[#] = α -Hederin: 10 μM statt viertelmaximaler Konzentration von 25 μM

3.4.5 Beeinflussung des endosomalen ^3H -Cholesterolgehalts durch SA1641

Neben der Beeinflussung des Cholesterolgehalts der Zytoplasmamembranen von ECV-304-Zellen durch Saponine wurde auch der Einfluss eines membranaktiven Saponins auf den Cholesterolgehalt der Membranen von Endosomen und Lysosomen untersucht. Das Saponin SA1641 zeigte bereits, dass es gegenüber der unbehandelten Kontrolle sowohl die Aufnahme von ^3H -Cholesterol reduziert, als auch vermehrt ^3H -Cholesterol aus mit ^3H -Cholesterol inkubierten Zellen freisetzt. Die dabei eingesetzte Konzentration von 100 μM SA16451 wurde für die Versuche zur Beeinflussung des

Cholesterolgehalts der Endo- und Lysosomenmembranen auf 5 μM SA1641 deutlich reduziert. Dies geschah als Anpassung auf die in diesem Versuch verdoppelte Inkubationszeit von 2 h zum Schutz der Membranen vor Lysis. Darüber hinaus zeigte SA1641 in den Versuchen zur Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme und -freisetzung, dass es bereits bei 50 μM den ^3H -Cholesterolgehalt stets signifikant und bereits bei 25 μM teilweise signifikant verringert, was ebenfalls eine Absenkung der Konzentration von SA1641 unter 25 μM sinnvoll erscheinen ließ. Die Abbildung 50 zeigt die ^3H -Cholesterolgehalte in verschiedenen Zellkompartimenten mit und ohne den Zusatz von 5 μM SA1641. In der Fraktion der Zytoplasmamembranen, welche methodenbedingt auch nicht homogenisierte Zellen und größere Zellfragmente enthielt, ist der Gehalt von ^3H -Cholesterol in Kombination mit 5 μM SA1641 gegenüber dem Vergleich ohne Zusatz von SA1641 signifikant reduziert. SA1641 führte somit zu einer Reduktion der ^3H -Cholesterolaufnahme in die Zytoplasmamembranen. Kein Unterschied wurde im ^3H -Cholesterolgehalt von Endosomen und Lysosomen aus SA1641-inkubierten und aus unbehandelten Zellen festgestellt. SA1641 hatte keinen messbaren Einfluss auf die ^3H -Cholesterolaufnahme in die Membranen von Endo- und Lysosomen.

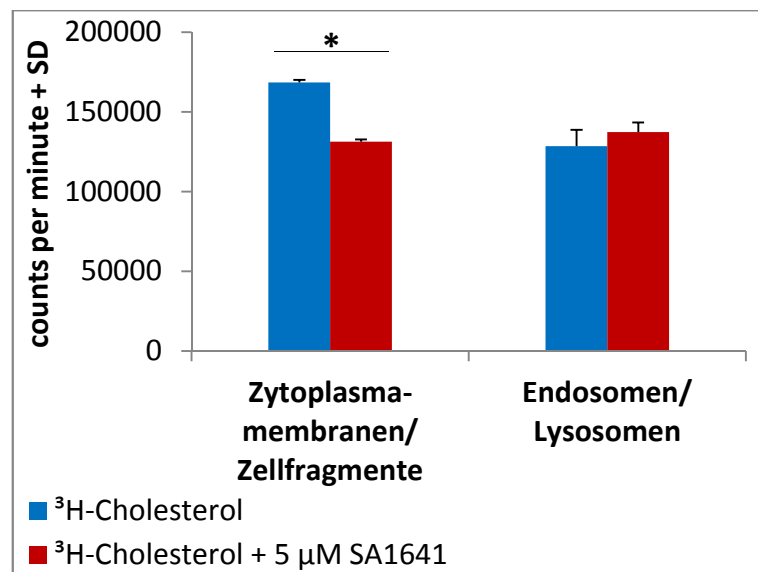


Abb. 50. Vergleich zwischen der Beeinflussung des Cholesterolgehalts von Zytoplasmamembranen und Endosomenmembranen durch SA1641 (nach Böttger & Melzig (2013)). Der Einfluss auf den Cholesterolgehalt von endosomalen Membranen ist statistisch nicht signifikant. Der Cholesterolgehalt der Zytoplasmamembranen ist unter Zugabe von SA1641 signifikant geringer. (* = statistisch signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle (100 %), U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney, $\alpha \leq 5\%$)

4 Diskussion

Seit der ersten Beschreibung der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I (RIP-I) durch Saponine durch Hebestreit & Melzig (2003) wurden zum einen viele Versuche unternommen, den zu Grunde liegenden Mechanismus näher zu beleuchten, zum anderen begann damit die Suche nach geeigneten Saponinen, welche eine möglichst starke Zytotoxizitätsverstärkung ermöglichen. Diese Saponine sollten in gleicher Konzentration eingesetzt außerhalb der Kombination mit RIP-I idealer Weise nicht zytotoxisch sein. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche widmeten sich beiden Forschungsgebieten. So wurden die Wirkungen ausgewählter Saponine auf Zellmembranen, einem der wichtigsten Kompartimente bei der Entstehung der synergistischen Zytotoxizität, untersucht. Weiterhin wurden zahlreiche Saponine und saponinreiche Pflanzenextrakte hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und der synergistischen Verstärkung der Zytotoxizität von RIP-I getestet. Geeignete Pflanzenextrakte wurden anschließend weiteren Untersuchungen zur Identifizierung und Isolation ihrer Inhaltsstoffe unterzogen.

4.1 Suche nach geeigneten Saponinen

Eine natürliche Ressource zu finden, welche die in ihren Eigenschaften als ideal beschriebenen Saponine in wirtschaftlich isolierbaren Mengen enthält, ist ein Kriterium, das letztlich auch über den Erfolg und Misserfolg einer möglichen therapeutischen Anwendung des Prinzips der synergistischen Zytotoxizität entscheidet. Die Untersuchungen von Hebestreit (2004) und Weng (2009) zeigten, dass insbesondere bisdesmosidische Triterpensaponine mit verzweigten Zuckerresten mit Aglyka vom Oleanan-Typ die Zytotoxizität von RIP-I synergistisch verstärken. Dabei stellten die Triterpene Gypsogenin und Quillajasäure bei den meisten untersuchten Saponinen das Aglykon dar. Hebestreit (2003) und Melzig et al. (2005) vermuteten deshalb, dass der in beiden Verbindungen vorhandenen Aldehydfunktion an der Position 23 eine entscheidende Bedeutung zukomme. Neben einigen reinen Saponinen nutzten Bachran et al. (2009), Hebestreit et al. (2006) und Weng et al. (2009) vor allem das Saponingemisch Saponinum album für ihre Untersuchungen. Auch in dieser Arbeit wurde es verwendet. Saponinum album besteht aus saponinreichen Extrakten der Wurzeln von *Gypsophila arrostii* GUSS. und *G. paniculata* L. (Caryophyllaceae) und wurde von Merck, Darmstadt hergestellt und kommerziell angeboten. In den 1990er Jahren stellte Merck jedoch die Produktion ein. Damit wurde Saponinum album, von dessen zahlreich enthaltenen Saponinen acht eine synergistisch zytotoxizitätsverstärkende Wirkung besitzen und von denen bis heute zwei näher charakterisiert werden konnten zu einer endlichen Rohstoffquelle (Weng et al., 2011). Da aber auch die von Hebestreit in einigen Versuchen verwendeten *Agrostemma*-Saponine synergistische Zytotoxizität mit RIP-I zeigten und ihren Ursprung ebenfalls in einer Spezies der Caryophyllaceae hatten, lag es nahe

weitere potente Saponine in dieser Pflanzenfamilie zu suchen. Dazu wurde die zur Verfügung stehende Literatur nach für Spezies der Caryophyllaceae beschriebenen Saponinen durchsucht. Es wurde auch registriert, ob die enthaltenen Saponine mono- oder bisdesmosidisch sind und welcher Art das jeweilige Aglykon ist. Dabei wurde eine klare Häufung des Vorkommens der Triterpene Gypsogenin, Gypsogeninsäure und Quillajasäure festgestellt (s. Tabelle 1). Diese Feststellung lässt zum einen die Vermutung zu, dass diese Teilstrukturen in den Saponinen eine besondere Funktion besitzen. Zum anderen lässt sich festhalten, dass Saponine für die Pflanzen offensichtlich von Nutzen sind. Für keine einzige Art wurde das Fehlen dieser Stoffgruppe beschrieben.

Da auch die in Versuchen zur synergistischen Zytotoxizität zwischen Saponinen und RIP-I verwendeten RIP-I Agrostin (*Agrostemma githago* L.) und Saporin (*Saponaria officinalis* L.) ihren Ursprung in den Caryophyllaceae haben, wurde die Literatur auch nach weiteren für Spezies der Caryophyllaceae beschriebenen RIP durchsucht. Tabelle 2 listet hierzu 12 Arten auf. Für etwa die Hälfte dieser Arten ist auch das Vorkommen bisdesmosidischer Triterpensaponine beschrieben. Es ist jedoch anzunehmen, dass noch wesentlich mehr Arten der Pflanzenfamilie RIP führen. Die Isolation und Identifizierung von RIP-I sind recht aufwendig und das wirtschaftliche Interesse an dieser Substanzklasse, das diese in einen Fokus der Forschung gestellt hätte, war bisher eher gering. Ebenso ist anzunehmen, dass noch wesentlich mehr Arten der Pflanzenfamilie Saponine enthalten, da offensichtlich viele Gattungen in Tabelle 1 nie auf deren Vorkommen hin untersucht wurden. Die Kenntnis des synergistischen Zusammenspiels zwischen vielen der beschriebenen Saponine und den RIP lässt diese Vermutung zu. Auch die Tatsache, dass die beschriebenen RIP ausschließlich RIP-I sind, welche zur toxischen Reaktion auf Saponine angewiesen sind, tut dies. Weng et al. (2012a) entwickelten hierzu die These, es handle sich bei der synergistischen Zytotoxizität um einen pflanzlichen Verteidigungsmechanismus.

Auf Basis der Daten in Tabelle 1 wurden Saponine enthaltende Arten ausgewählt und deren saponinreiche Extrakte in einem Zellmodell auf eine synergistische Zytotoxizität mit RIP untersucht. Alle Extrakte zeigten dabei eine Zytotoxizitätsverstärkung in Kombination mit 1 nM Saporin. Interessant ist das Verhalten des Extraktes aus Samen von *Saponaria officinalis* L. So wurde erstmals ein saponinreicher Extrakt aus den Samen der Pflanze untersucht. Thakur et al. (2013b) hatten bisher eine synergistische Zytotoxizität für saponinreiche Extrakte der Wurzeln sowie einzelner daraus isolierter Saponine beschrieben. Somit ist ein indirekter Nachweis geeigneter Saponine auch in diesen Pflanzenteilen erbracht. Zudem wurden die Saponine des Extraktes mit Saporin kombiniert, jenem RIP-I, das nativ in der gleichen Art vorkommt. Eine besonders starke Zytotoxizitätsverstärkung wurde erwartet, da das Proteintoxin (Saporin) und sein Wirkungsverstärker (*Saponaria*-Saponine) eventuell besonders gut aufeinander „abgestimmt“ wären. Dieser Effekt wurde jedoch nicht beobachtet. Ein Extrakt aus Wurzeln von *Gypsophila arrostii* GUSS. sowie Saponinum album zeigten im Vergleich zu

den anderen Extrakten die niedrigsten zur halbmaximalen synergistischen Zytotoxizität nötigen Konzentrationen ($IC_{50}(\text{syn.})$) als auch Zytotoxizitäten (IC_{50}). Da Saponinum album z. T. aus saponinreichen Fraktionen von *G. arrostii* besteht, ist anzunehmen, dass der hergestellte Extrakt in weiten Teilen mit dem Inhaltsstoffspektrum von Saponinum album übereinstimmt. Wird zur Beurteilung der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung der Mean Ratio-Wert herangezogen, wird sichtbar, dass der Extrakt von *G. arrostii* Saponinum album sogar überlegen ist. Einen ähnlichen Mean Ratio-Wert wie der Extrakt von *G. arrostii* weist auch der Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L. auf. Zwar ist die $IC_{50}(\text{syn.})$ deutlich größer, dafür ist jedoch auch die vom Extrakt selbst ausgehende Zytotoxizität wesentlich geringer, was in einer höheren IC_{50} sichtbar ist.

Es wurde versucht, aus allen Extrakten Einzelkomponenten (Saponine) zu isolieren und deren Struktur aufzuklären. Dies wurde jedoch nur in zwei Fällen für sechs Verbindungen. Gründe, welche dazu führten, dass dies nicht gelang, waren geringer Gehalt an Saponinen (*Gypsophila oldhamiana*, *G. pacifica*), Begleitstoffe im Extrakt, welche eine chromatographische Trennung erschwerten (*Vaccaria hispanica*) sowie zeitliche und andere Gründe (*Gypsophila arrostii*, *Saponaria officinalis*, *Silene vulgaris*). Aus Saponinum album konnte neben der bereits von Weng (2009) beschriebenen Verbindung SA1641 außerdem die Verbindung SA1657 gewonnen werden. Diesen beiden Stoffen sehr ähnliche Verbindungen wurden von Kim et al. (1992) ebenfalls aus Saponinum album isoliert und als MS-1 bzw. MS-2 bezeichnet. So unterscheidet sich MS-1 von SA1641 bzw. MS-2 von SA1657 einzig dadurch, dass der Zuckerrest der C-3-OH-Gruppe in MS-1 und MS-2 eine Arabinose statt einer Xylose wie in SA1641 und SA1657 enthält. Bei Arabinose und Xylose handelt es sich um Diastereomere. Der Unterschied zwischen beiden Verbindungen besteht in der β -Stellung der OH-Gruppe am C-2 und der α -Stellung der OH-Gruppe am C-3 der Arabinose gegenüber der α -Stellung der OH-Gruppe am C-2 und der β -Stellung der OH-Gruppe am C-3 der Xylose. Die Abweichungen der ^{13}C -NMR-Daten der betreffenden C-Atome in den Spektren von SA1641 und SA1657 sind verglichen mit den Werten von MS-1 und MS-2 eigentlich zu groß, als dass es sich hier um die identische Verbindungen handeln könnte. Weitere Vergleiche mit in diesem Bereich identischen Strukturen räumten jedoch nicht alle Zweifel aus. Die Verbindungen Gypsophilasaponin 1-3 (Arslan et al., 2013; Weng et al., 2010), sowie ein Saponin aus *Gypsophila pilulifera* BOISS. & HELDR. (Arslan et al., 2012) tragen an der C-3-OH-Gruppe den für SA1641 und SA1657 identifizierten Zuckerrest. Zwischen den ^{13}C -NMR-Daten dieser Verbindungen und denen von SA1641 und SA1657 gibt es im Bereich der betreffenden C-Atome ähnlich große Abweichungen. Auch eine von Delay et al. (1997) ebenfalls aus Saponinum album isolierte, mit SA1641 identische Verbindung namens SAPO50 zeigt im ^{13}C -NMR-Spektrum für die betreffenden C-Atome ähnlich uneindeutige, aber zu den Daten von SA1641 sehr ähnliche Werte. Durch intramolekulare Kopplungsanalysen konnten in den Zuckerresten von SAPO50 drei Xylosen eindeutig identifiziert werden (Delay et al., 1997). Somit spricht die

deutliche Übereinstimmung der NMR-Daten von SAPO50 und SA1641 dafür, dass es sich bei dem fraglichen Zucker im Zuckerrest an C-3 von SA1641 um Xylose statt Arabinose handelt.

Aus *Agrostemma githago* konnten vier Verbindungen (AG 1-4) isoliert und deren Struktur bestimmt werden. Bei Vergleichen mit strukturanalogen Verbindungen konnte AG1 als Gypsophilasaponin 1 identifiziert werden, welches bereits aus *Gypsophila arrostii* (Arslan et al., 2013), *G. pilulifera* (Arslan et al., 2012) und *G. paniculata* (Weng et al., 2010) bekannt ist. AG3 wurde als Gypsophilasaponin 2 identifiziert und kommt auch in *Arenaria juncea* M.BIEB. (Melzig et al., 2005), *G. arrostii* (Arslan et al., 2013), *G. oldhamniana* (Luo et al., 2008a) und *G. paniculata* (Weng et al., 2010) vor. AG4 wurde als Gypsophilasaponin 3 identifiziert und ist auch Inhaltsstoff in *G. arrostii* (Arslan et al., 2013) und *G. paniculata* (Weng et al., 2010). Die Strukturen aller drei Saponine sind zwar nicht neu, wurden jedoch erstmals für *A. githago* beschrieben. Zumindest AG3 und AG4 weisen eine große Übereinstimmung mit den beiden von Siepmann et al. (1998) bereits für *A. githago* beschriebenen Verbindungen Agrostemmasaponin 1 und Agrostemmasaponin 2 auf. So unterscheiden sich AG3 und AG4 durch das Fehlen einer Acetylgruppe am C-4 der Fucose von Agrostemmasaponin 1 und 2. Die Struktur der Verbindung AG2 ist bisher noch nicht beschrieben worden, auch in keiner anderen Spezies. Die doppelte Verzweigung des Zuckerrestes der C-28-OH-Gruppe soll an dieser Stelle als besonders interessant und im Vergleich zu Verzweigungsmustern der Zuckerreste anderer Saponine selten hervorgehoben werden. AG2 wurde in Anlehnung an die Stammpflanze und mit Rücksicht auf die von Siepmann et al. (1998) beschriebenen Saponine als Agrostemmasaponin 3 benannt. Mit dem von Tschesche & Schulze (1974) für *A. githago* beschriebenen Githagosid sind somit sieben Saponine für die Pflanze beschrieben.

4.2 Validierung eines Testsystems zur Testung von Saponinen auf (synergistische) Zytotoxizitätsverstärkung

Verglichen mit dem hochtoxischen RIP-II Viscumin aus *Viscum album* L. (Santalaceae) erwiesen sich Kombinationen aus geeigneten Saponinen und Saporin *in-vitro* als ähnlich stark toxisch (Weng, 2009). Viscumin (LD₅₀(Maus): 2,4 µg/kg KG), das ebenso toxisch wie das wesentlich bekanntere Ricin (LD₅₀(Maus): 2,7 µg/kg KG) aus *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) ist, zeigte in einem analog zu dem in dieser Arbeit verwendeten Zellmodell mit ECV-304-Zellen eine GI₅₀ von 21,5 pM (XTT-Assay) (Weng, 2009). Eine Kombination aus 4 µg/mL Saponinum album und variablen Konzentrationen von Saporin zeigte im gleichen Zellsystem eine GI₅₀ von 42,5 pM (XTT-Assay) (Weng, 2009). Bachran et al. (2006) erzielten mit 1,5 µg/mL Saponinum album eine GI₅₀ von 500 pM für Saporin an NIH-3T3/HER14-Zellen mit einem fluorimetrischen enzymaktivitätsbasierten Zytotoxizitätsassay (Fluoresceindiacetat-Assay (Nygren et al., 1994)). Hebestreit & Melzig (2003) ermittelten für das RIP-I Agrostin in Kombination mit 3 µg/mL Agrostemmasaponin 1 eine GI₅₀ von 210 pM (umgerechnet von 5,7 ng/mL) (MTT-Assay). Die GI₅₀ gibt jene RIP-Konzentration an, bei welcher ein Wachstum der Zellen um 50 % gehemmt wurde. Auf Grund der geringen verfügbaren Menge, konnten in dieser Arbeit keine GI₅₀-Werte für Agrostin in Kombinationen mit Saponinen oder Extrakten bestimmt werden. Für Saporin wurden in Kombination mit 1,5 µg/mL Saponinum album GI₅₀ von 84 pM (DNA-Quantifizierung) bzw. 485 pM (MTT-Assay) und in Kombination mit 5 µg/mL SA1641 GI₅₀ von 801 pM (DNA-Quantifizierung) bzw. 1317 pM (MTT-Assay) nach den in 2.8.1.2 bzw. 2.8.1.3 beschriebenen Methoden ermittelt. Die Formeln zur Berechnung sind in Abbildung 51 dargestellt. GI₅₀ von Saporin oder Agrostin ohne die Kombination mit Saponinen oder Extrakten wurden nicht bestimmt, sind für Saporin jedoch > 100 nM (s. Abbildung 39). Trotz z. T. großer Schwankungen der ermittelten GI₅₀ und trotzdem die eingesetzte Saponinum album-Konzentration geringer war als bei Weng (2009), konnten GI₅₀ in gleicher Größenordnung wie bei Weng (2009) und Bachran et al. (2006) erreicht werden. Dies zeigt, dass das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell geeignet war, synergistische Zytotoxizitätsverstärkungen von Saponinen und Extrakten zu untersuchen. Die Werte zeigen außerdem die Überlegenheit des Saponingemisches gegenüber der Reinsubstanz bei der synergistischen Verstärkung der RIP-Zytotoxizität.

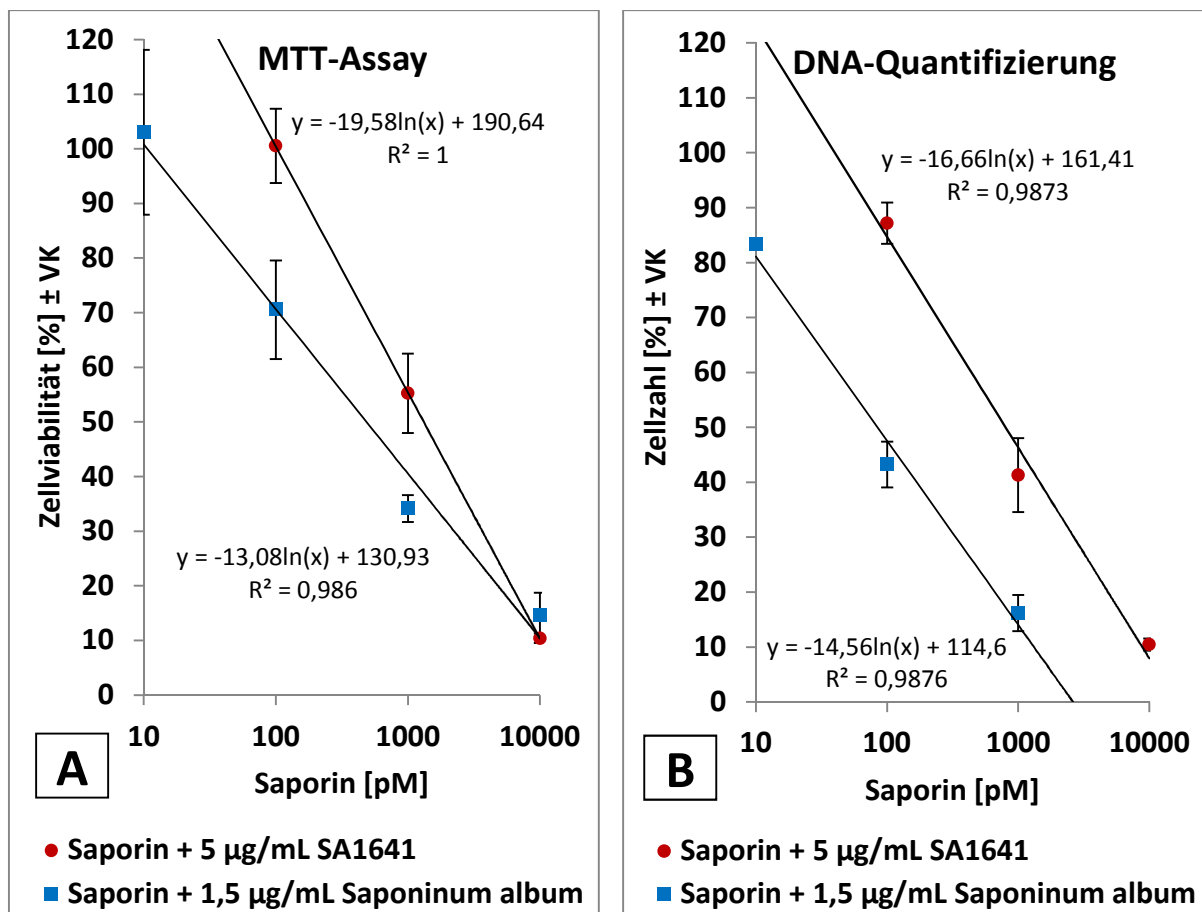


Abb. 51. Vergleich der, mit dem in der Arbeit verwendeten Zellsystem, ermittelten GI_{50} -Werte von Saporin durch zwei verschiedene Auswertungsmethoden. Dies dient dem Vergleich mit den in einem analogen Zellsystem ermittelten GI_{50} -Werten von Saporin und mit Literaturwerten anderer RIP und erlaubt eine Beurteilung der Validität der für weitere Saponine und Extrakte gewonnenen Zytotoxizitätswerte. **A)** Zytotoxizitätsbestimmung mittels MTT-Assay. **B)** Zytotoxizitätsbestimmung mittels DNA-Quantifizierung.

Die in diesem Versuch gewonnenen Ergebnisse, welche unter 3.2.1 und in Abbildung 39 dargestellt sind, dienten vor allem der Weiterentwicklung eines bereits von Weng (2009) genutzten Zellsystems zur Untersuchung der synergistischen Zytotoxizität zwischen Saponinen und Proteintoxinen. In 3.2.1 konnte die benötigte Konzentration des als Standardtoxin verwendeten Saporin von 6 nM bei Weng (2009) auf 1 nM reduziert werden, ohne die Aussagefähigkeit der erzielten Ergebnisse zu schwächen.

Um auch während der Testungen die Validität der erzielten Ergebnisse beurteilen zu können wurde Saponinum album als Positivkontrolle verwendet. Das Saponingemisch stellte den bis dato potentesten Verstärker der RIP-I-Zytotoxizität dar. Da jedoch von dem Gemisch selbst ebenfalls eine Zytotoxizität ausging, musste eine Konzentration gefunden werden, welche eine deutliche synergistische Zytotoxizität in Kombination mit Saporin ermöglicht, außerhalb der Kombination jedoch möglichst wenig toxisch ist. Eine Konzentration von 2,5 µg/mL erfüllte diese Bedingungen (s. 3.2.2 und Abbildung 40) und wurde bei jeder Testung eines Saponins oder Extraktes mitgeführt.

Reine Saponine wurden in der Regel in Konzentrationen von 0,5 - 10 µg/mL getestet. Dieser Konzentrationsbereich war zum einen der oft nur geringen verfügbaren Menge einiger Substanzen geschuldet, sollten die Versuche zwei bis drei Mal durchgeführt werden, zum anderen traten synergistische Zytotoxizitäten meist schon unter 10 µg/mL ein. Extrakte zeigten oft eine geringere Zytotoxizität und standen in ausreichender Menge zur Verfügung. Sie wurden in der Regel in Konzentrationen von 1 - 50 µg/mL getestet. Zur Auswertung der Versuche wurden stets parallel ein MTT-Assay und die DNA-Quantifizierung genutzt. Beide Auswertemethoden erfassen unterschiedliche Größen zur Bestimmung der Zytotoxizität. Der MTT-Assay zeigt lebende stoffwechselaktive Zellen anhand der Umwandlung eines Farbstoffes durch die reduktive enzymatische Aktivität von Mitochondrien und anderen Zellkompartimenten an (Bernas & Dobrucki, 2002; Berridge et al., 2005). Dies birgt jedoch zweierlei Fehlerquellen in sich: So werden z. B. lebende aber ruhende, stark in der Stoffwechselaktivität reduzierte Zellen nicht oder kaum erfasst, was wiederum, verglichen mit sich normal stoffwechselaktiv verhaltenden Zellen einer Kontrolle, in einer falsch zu hoch berechneten Zytotoxizität einer Substanz auf behandelte (ruhende) Zellen zum Ausdruck käme (Scudiero et al., 1988). Andererseits können Zellen mit erhöhter Stoffwechselaktivität verglichen mit sich normal stoffwechselaktiv verhaltenden Zellen einer Kontrolle falsch zu niedrige Zytotoxizitäten vortäuschen (Berridge & Tan, 1993). Auf diese Weise können wenige, aber umso aktivere Zellen eine Dezimierung der Zellzahl kompensieren. Dies kann, steigt die reduktive enzymatische Aktivität unter Einfluss von Testsubstanzen stärker an als ein zytotoxischer Einfluss die Anzahl der Zellen dezimiert, u. U. zu paradoxen Ergebnissen derart führen, dass behandelte Zellen scheinbar in höherer Zahl vorliegen als unbehandelte. Während der Untersuchungen von Saponinen und Extrakten konnte dieser Effekt bei einigen Substanzen beobachtet werden. Dies betraf vor allem Konzentrationen, welche nach DNA-Quantifizierung als nicht oder wenig toxisch identifiziert wurden. Zytotoxizitätswerte höherer, deutlich zytotoxischer Konzentrationen waren wiederum vergleichbar mit Werten, welche mittels DNA-Quantifizierung ermittelt wurden. Somit hatte eine für niedrige (subtoxische) Konzentrationen beobachtbare Aktivitätserhöhung und scheinbare Zellvermehrung keinen oder kaum Einfluss auf die Berechnung von IC₅₀-Werten der Zytotoxizität. IC₅₀-Werte aus MTT-Assays und aus DNA-Quantifizierungen waren meist vergleichbar groß.

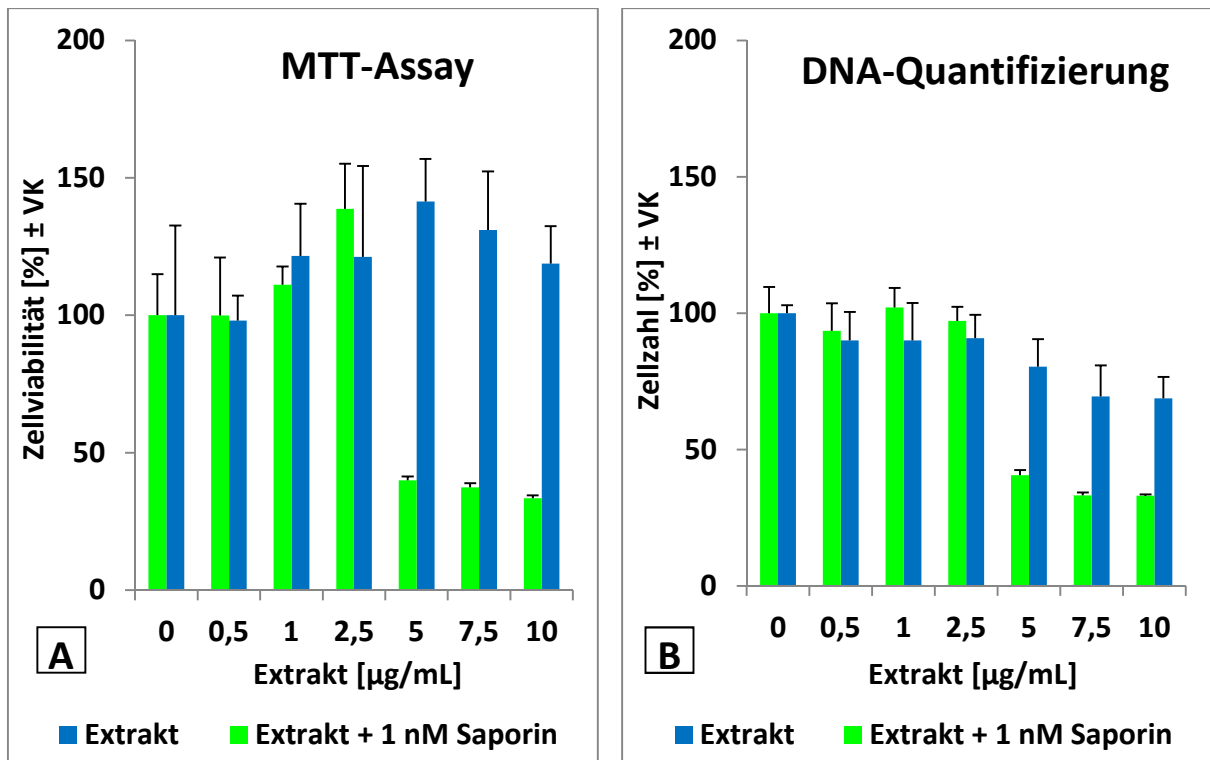


Abb. 52. Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität. Bezogen auf IC_{50} -Werte zur Zytotoxizitätsquantifizierung ergeben beiden Methoden Ergebnisse gleicher Größenordnung. Die abgebildeten Diagramme zeigen Originaldaten des *Agrostemma githago*-Extraktes und stellen den Sachverhalt stellvertretend für andere untersuchte Substanzen und Extrakte dar. **A)** Der MTT-Assay zeigt hier deutlich die beschriebene paradoxe Viabilitätssteigerung unter Einfluss von Testsubstanzen und täuscht einen proliferativen Effekt vor. Dieser nimmt in geringen Konzentrationen konzentrationsabhängig zu, bis die Kapazitäten von zellulären Reparaturmechanismen überschritten werden und der zytotoxische Einfluss der Testsubstanzen bei weiterer Konzentrationserhöhung konzentrationsabhängig überwiegt. **B)** Die DNA-Quantifizierung wird nicht durch Schwankungen in der metabolischen Aktivität der Zellen beeinflusst und zeigt den zytotoxischen Einfluss der Testsubstanzen.

Gründe der enzymatischen Aktivitätssteigerung unter Einfluss von Testsubstanzen können in zellulären Reparaturmechanismen liegen. Insbesondere Konzentrationen von Testsubstanzen, welche zwar destruktiv aber nicht letal sind, könnten derartige Reaktionen hervorrufen. Die dann eingeleiteten energieaufwendigen Reparaturmechanismen können von einer generellen Hochregulierung am Energietransport beteiligter Enzyme begleitet sein. Dass Zellen mit Gegenmaßnahmen auf den Einfluss membranintegritätsstörender Substanzen reagieren, konnten Gilibert-Oriol et al. (2013) für Digitonin und einige Saponine von Oleanan-Typ an ECV-304-Zellen in Impedanzmessungen beobachten. Auch Melzig et al. (2001) berichteten von dosis- und zeitabhängigen Steigerungen der metabolischen Aktivität bei BKEz-7-Zellen infolge kurzzeitiger Inkubation mit Triterpensaponinen. Welche Reparaturmechanismen und Enzymkaskaden dabei angestoßen werden ist jedoch nicht bekannt. Vorstellbar ist, dass diese Prozesse mit einem erhöhten Verbrauch des zellulären Energieüberträgers ATP und dessen Umwandlung in ADP einhergehen. ADP wird in den Mitochondrien durch die ATP-Synthase wieder in ATP umgewandelt. Die ATP-Synthase wird dabei durch einen Protonengradienten angetrieben. Dieser wird wiederum durch die NADH-Dehydrogenase, den Komplex I der zellulären Atmungskette aufgebaut, welche im gleichen Schritt NADH oxidiert und

dabei die Protonen bereitstellt (Efremov et al., 2010). Wird nun mehr ATP verbraucht, wird bis zu einem gewissen Grad auch mehr NADH bereitgestellt werden müssen. Bezogen auf die NADH-abhängige Reduktion von MTT zum Formazan beim MTT-Assay, bedeutet dies, dass ein Mehrangebot von NADH auch in einer vermehrten Reduktion von MTT zum Formazan resultieren könnte.

Zur Kontrolle der Ergebnisse des MTT-Assays und zur Kompensation dessen Fehlerpotentials wurde deshalb die DNA-Quantifizierung als zweite Methode zur Bestimmung der allgemeinen und der synergistischen Zytotoxizität verwendet. Die Quantifizierung der DNA basiert auf der Anlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes an dsDNA (Labarca & Paigen, 1980). Eine Selektion zwischen lebenden und toten Zellen ist jedoch mit der DNA-Quantifizierung allein nicht möglich. Deshalb müssen in einem vorhergehenden Waschschrift lebende und tote Zellen voneinander getrennt werden. Da es sich bei den verwendeten ECV-304- und NIH-3T3/HER14-Zellen um adhärent wachsende Zelllinien handelt (DSMZ, 2013a; DSMZ, 2013b), können zerstörte und apoptotische abgelöste Zellen sowie freigesetzte DNA entfernt werden, während vitale Zellen an der Wachstumsfläche haften bleiben. Die Menge dsDNA pro Zellen ist für die meiste Zeit konstant. Nur während der Zellteilung gibt es starke Abweichungen von dieser Menge. Da jedoch die Zellteilung nur einen sehr kurzen Zeitabschnitt des Zellzyklus darstellt und da nicht alle Zellen einem einheitlichen Zellzyklus unterliegen, ist die dsDNA-Menge, für eine größere Anzahl von Zellen betrachtet, im Durchschnitt konstant (Pabbruwe et al., 2005). Die Bestimmung der DNA-Menge unterliegt, verglichen mit der colorimetrischen Bestimmung des Formazans beim MTT-Assay, nicht diesen Einflüssen enzymatischer Aktivitäten.

4.3 Testung von Saponinen auf synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I

Nach der Validierung des Zellsystems unter Verwendung von ECV-304-Zellen und der Methoden zur Zytotoxizitätsbestimmung mit Saponinum album und SA1641 in Kombinationen mit 1 nM Saporin wurden alle verfügbaren Saponine in diesem System getestet. Dabei wurde zum einen die nicht-kombinierte Zytotoxizität jedes Saponins bestimmt, zum anderen wurde die synergistische Zytotoxizität in Kombination mit dem RIP-I Saporin ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse ließen sich grob in drei Fälle einteilen. Ein Saponin konnte z. B.: im untersuchten Konzentrationsbereich weder allein zytotoxisch noch in Kombination mit Saporin synergistisch zytotoxisch sein; im untersuchten Konzentrationsbereich nicht zytotoxisch aber in Kombination mit Saporin synergistisch zytotoxisch sein; im untersuchten Konzentrationsbereich eine ausgeprägte Zytotoxizität zeigen, welche in Kombination mit Saporin aber auch nicht weiter verstärkt wurde. Alle drei Fälle sind jeweils anhand eines Beispiels in Abbildung 53 dargestellt.

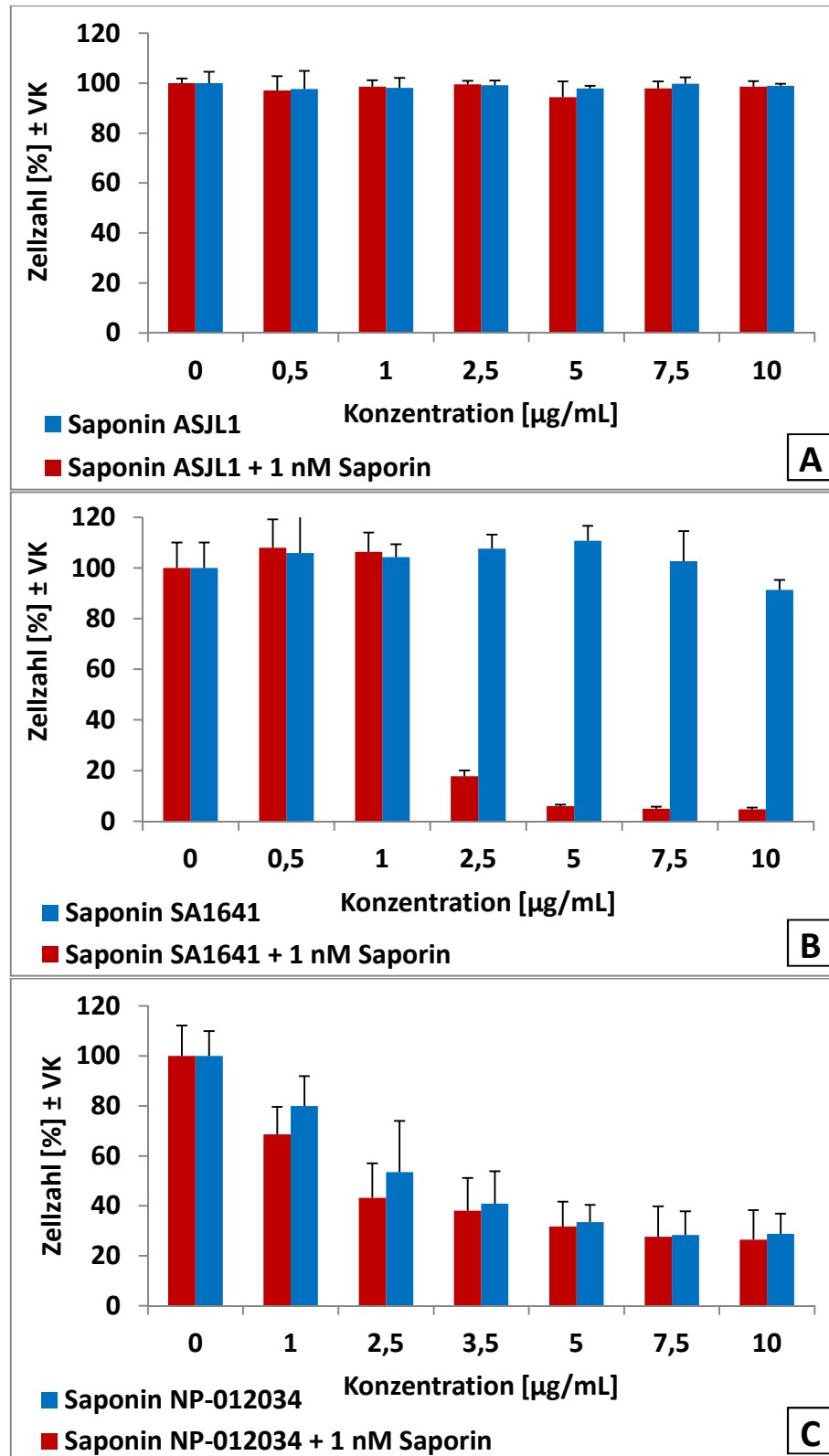


Abb. 53. Auswertung der Zytotoxizitätstestung von Saponinen und der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I durch Saponine. **A)** Im Konzentrationsbereich nicht zytotoxisches, nicht synergistisch RIP-I-zytotoxizitätsverstärkendes Saponin. **B)** Im Konzentrationsbereich nicht zytotoxisches, synergistisch RIP-I-zytotoxizitätsverstärkendes Saponin. **C)** Im Konzentrationsbereich konzentrationsabhängig zytotoxisches Saponin.

Ziel der Untersuchungen war, Verbindungen zu finden, welche eine möglichst starke synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin (gemessen als synergistische Zytotoxizität in Kombination mit Saporin) ermöglichen bei gleichzeitig möglichst geringer Zytotoxizität ohne Saporin. In der Literatur sind bereits einige Strukturmerkmale von Verbindungen beschrieben, die diese Anforderungen zumindest ansatzweise erfüllten.

So erwiesen sich bisher Verbindungen als geeignet, die:

- als bisdesmosidische Saponine ein triterpenoides Grundgerüst besaßen, bei dem die Zuckerreste über eine C-3-OH- sowie über eine C-28-OH-Gruppe gebunden waren (Bachran et al., 2006; Melzig et al., 2005),
- bei denen das C-23 zu einer Aldehydfunktion am C-4 und das C-28 zu einer Carboxylfunktion am C-17 gehörten (Melzig et al., 2005),
- welche am C-3 einen verzweigten Zuckerrest mit mindestens drei Zuckern trugen, welcher über eine Glucuronsäure mit dem Aglykon verbunden war und darüber hinaus die Zucker Xylose bzw. Arabinose und Galaktose enthielt (Bachran et al., 2006; Melzig et al., 2005; Weng, 2009).

Als nicht geeignet zeigten sich Verbindungen, die:

- nur über einen Zuckerrest verfügten (monodesmosidische Saponine) (Melzig et al., 2005),
- bei denen der Zuckerrest am C-3 weniger als drei Zucker zählte (Hebestreit, 2004).

Das Vorhandensein einer C-16-OH-Gruppe wurde von Bachran et al. (2006) als essentiell für eine ausgeprägte synergistische Zytotoxizitätssteigerung von RIP-I erachtet. Dies steht jedoch im Widerspruch zu Ergebnissen von Melzig et al. (2005), bei denen sich diese Beobachtung nicht machen ließ. Eine Verzweigung des Zuckerrestes der C-28-OH-Gruppe stellt Hebestreit (2004) und Melzig et al. (2005) zu folge kein notwendiges Strukturelement dar. Zur Größe des Restes konnten keine Aussagen getroffen werden. Der kürzeste Rest an dieser Position einer Verbindung, welche bei Vorhandensein aller anderen genannten strukturellen Voraussetzungen eine deutliche synergistische Zytotoxizität in Kombination mit Agrostin zeigte, enthielt drei unverzweigte Zucker (Melzig et al., 2005).

Die Tabellen 9 und 10 listen alle untersuchten Verbindungen unabhängig von ihrer strukturellen Eignung, sortiert nach dem Aglykon und der Länge und Komplexität der Zuckerreste auf. Durch die Untersuchungen dieser recht großen Zahl von Substanzen sollte es möglich sein, bekannte strukturelle Anforderungen zu bestätigen und zu präzisieren, neue notwendige Strukturelemente zu identifizieren und falsche Annahmen zu korrigieren.

4.3.1 Oleanolsäure als Aglykon

Insgesamt wurden 14 Saponine mit diesem Aglykon untersucht. Alle bis auf eines (NP-012034) zeigten eine sehr geringe Zytotoxizität sowohl in Kombination mit Saporin als auch ohne. Alle Verbindungen besaßen eine Zuckersäure, die glycosidisch über die C-3-OH-Gruppe mit dem Aglykon verbunden war. Vier dieser Saponine (NP-011187, NP-004355, NP-007471, NP-014590) besaßen einen verzweigten Zuckerrest aus drei Zuckern an der C-3-OH-Gruppe, welcher jedoch bei allen vier Verbindungen eine andere Zusammensetzung aufwies als sich bisher als geeignet erwiesen hatte. Alle anderen Saponine besaßen kürzere oder unverzweigte Zuckerreste an C-3. An der C-28-OH-Gruppe war bei allen Verbindungen nur ein Zucker gebunden, nur eine Verbindung (NP-004355) enthielt hier ein Disaccharid. Die Zytotoxizität der Verbindung NP-012034 stets im Kontrast zur geringen Zytotoxizität aller anderen Verbindungen mit diesem Grundkörper, insbesondere da sie sich von der Verbindung NP-000502 nur durch eine Galakturonsäure statt einer Glucuronsäure an C-3 unterscheidet. Warum das Diastereomer der Glucuronsäure eine derartige Zytotoxizitätssteigerung mit sich bringt ist unklar und konnte auch nicht durch weitere Verbindungen mit dieser Zuckersäure an dieser Position verifiziert werden. Zusammenfassend lässt sich für diese Gruppe Saponine nicht sagen, ob die geringe Zytotoxizität, ebenso wie die fehlende synergistische Zytotoxizitätssteigerung, durch das Aglykon bedingt sind (fehlende Aldehydfunktion an C-4), durch die Kürze der Zuckerreste an C-28 oder durch die Zusammensetzung des verzweigten Zuckerrestes an C-3.

4.3.2 Hydroxyoleanolsäurederivate als Aglykon

Von den 15 getesteten Substanzen dieser Gruppe zeigten vier eine schwache Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin. Allerdings entspricht keine dieser Verbindungen den bisher definierten Anforderungen zur Struktur. Die Verbindungen AMA-1 und AMR besitzen eine C-16 α -Hydroxylgruppe. Sie tragen keine Glucuronsäure und keinen verzweigten Zuckerrest an C-3. Die Zuckerreste an C-28 sind jedoch verzweigt und umfassen drei (AMA-1) bzw. vier (AMR) Zucker. Allerdings wurden beide Verbindungen in einem erweiterten Konzentrationsbereich bis 50 $\mu\text{g/mL}$ getestet, so dass, wären sie wie die meisten anderen Verbindungen bis 10 $\mu\text{g/mL}$ getestet worden, die Zytotoxizitätssteigerung nicht identifiziert worden wäre. Das Saponin α -Hederin besitzt eine Hydroxylgruppe an C-23. Es handelt sich um ein monodesmosidisches Saponin mit einem Rest aus zwei Zuckern an der C-3-OH-Gruppe. Die Zytotoxizitätsverstärkung dieses Saponins ist umso überraschender da das strukturverwandte, bisdesmosidische Saponin Hederacosid C, welches zusätzlich ein unverzweigtes Trisaccharid an der C-28-OH-Gruppe besitzt, selbst bis 50 $\mu\text{g/mL}$ keine Zytotoxizität, wie auch synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin zeigte. Die Verbindung NP-012672 besitzt eine C-16 α - und eine C-23-OH-Gruppe. Sie enthält weiterhin ein lineares Pentasaccharid, welches über eine Glucuronsäure mit dem C-3 verbunden ist und eine Arabinose bzw. Xylose an C-28. Bei den im

untersuchten Konzentrationsbereich nicht zytotoxischen Saponinen enthielt die Verbindung NP-000472 an C-3 einen verzweigten Zuckerrest aus drei Zuckern, welcher über eine Glucuronsäure mit dem Aglykon verbunden ist, sowie eine Glucose an C-28. Sie verhält sich damit ebenso wie jene Verbindungen aus der Gruppe der Saponine mit Oleanolsäure als Aglykon. Auch die Verbindungen NP-005236, NP-012006, NP-000474, NP-012298, NP-005446, NP-012048, NP-00498 und NP-005233 verhalten sich wie ihr Pendant mit Oleanolsäure. Die Verbindung NP-013105 besitzt mit einem linearen Tetrasaccharid einen ähnlich großen Rest an C-28 wie AMR, sowie eine Glucuronsäure an C-3. Die Verbindung zeigte keine Zytotoxizität, wurde jedoch nur bis 10 µg/mL untersucht. Ob sie in höheren Konzentrationen auch eine AMR vergleichbare zytotoxische Reaktion gezeigt hätte ist leider unbekannt. Für die Gruppe der Saponine mit einem Hydroxyoleanolsäurederivat als Aglykon lässt sich zusammenfassen, dass das Aglykon offenbar keinen Einfluss auf die Zytotoxizität besitzt. Es lässt sich außerdem die Vermutung aufstellen, dass Saponine mit verzweigtem Zuckerrest an C-28 zumindest eine schwache Zytotoxizitätssteigerung von Saporin verursachen.

4.3.3 Andere Derivate der Oleanolsäure als Aglykon

Diese Gruppe fasst Saponine mit den Aglyka Medicagensäure, Phytolaccagenin und 23-Desoxy-phytolaccagenin zusammen. Keine der insgesamt sechs untersuchten Verbindungen zeigte bis 10 µg/mL eine zytotoxische Reaktion. Dieses Ergebnis scheint nicht zu überraschen. So besitzt keine der Verbindungen ein verzweigtes Trisaccharid an C-3, das dem oben beschriebenen Aufbau entspricht. Den größten Zuckerrest an C-28 tragen mit einem linearen Trisaccharid die Verbindungen NP-001531 und NP-017751. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verbindungen sich analog zu Verbindungen ähnlicher Anordnung der Zucker und mit den zuvor beschriebenen Aglyka verhalten.

4.3.4 Gypsogenin als Aglykon

Insgesamt wurden 12 Saponine mit diesem Aglykon untersucht. Alle Verbindungen tragen das gleiche verzweigte Trisaccharid an C-3, welches zudem den eingangs formulierten Bedingungen entspricht. Das bedeutet, alle Verbindungen unterscheiden sich einzig in dem Zuckerrest an C-28. Dieser beginnt bei allen Verbindungen mit Fucose an der C-28-OH-Gruppe und setzt sich mit Rhamnose und Xylose fort. Diese Reste können dann um einen weiteren Zucker (Xylose oder Glucose) verlängert sein, an der Fucose oder an der Rhamnose verzweigt sein, sowie weitere Modifikationen in Form von Acetylgruppen oder Methoxylimtsäureresten enthalten.

Die Gruppe enthält einige der am stärksten synergistisch zytotoxischen Substanzen die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die geringste Zytotoxizität als auch geringste synergistische Zytotoxizität zeigten die Verbindungen AG 3 und AG 4 aus *Agrostemma githago*. Dabei wurden diese nicht nur mit 1 nM Saporin sondern in einem gesonderten Versuch auch mit 1 nM Agrostin kombiniert. In keinem Versuch zur Zytotoxizität dieser Verbindungen konnten IC_{50} - bzw. $IC_{50}(\text{syn.})$ -Werte bestimmt werden. Überraschend war in diesem Zusammenhang, dass selbst in Kombination mit Agrostin keine Zytotoxizitätsverstärkung beobachtet werden konnte, wurde doch ein evolutionär entwickeltes Verteidigungssystem in der Kombination vermutet, bei dem die Komponenten außerordentlich gut aufeinander abgestimmt wären und einen maximalen Effekt hervorrufen würden. AG 3 weist an C-28 ein an der Rhamnose mit einem Molekül Glucose verzweigtes Tetrasaccharid auf. Der Rest an C-28 von AG 4 ist um eine Xylose erweitert. Einen ganz ähnlichen Rest, jedoch mit anderer Verzweigungsstelle besitzen SA1641 und AE X55. Die Verbindung AE X55 ist strukturidentisch zu SA1641. Bei diesen Verbindungen tritt die Verzweigungsstelle bereits an der Fucose auf. Der Zucker der Seitenkette ist Chinovose, ein Desoxyzucker. AE X55 und SA1641 zeigten $IC_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ und mit $IC_{50}(\text{syn.})$ von ca. $2 \mu\text{g/mL}$ eine deutliche synergistische Zytotoxizitätsverstärkung. Ganz offensichtlich hat die Stelle der Verzweigung des Zuckerrestes an der C-28-OH-Gruppe einen Einfluss auf die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I. Dennoch zeigten Verbindungen, welche entweder keine Verzweigung des Zuckerrestes durch weitere Zucker vorwiesen, als auch Verbindungen, bei denen sich der Zuckerrest erst am zweiten Zucker verzweigte, mitunter starke synergistische Zytotoxizitätssteigerungen. So besitzen die Saponine NP-017777 und NP-017778 ein lineares Trisaccharid an C-28, sind jedoch mit 4*E*- bzw. 4*Z*-Methoxyzimtsäure am ersten Zucker, der Fucose verestert. Die Verbindungen NP-017774, NP-017772, NP-018110, NP-018109 und NP-017888 sind erst am zweiten Zucker des Restes an C-28 verzweigt und zwar mit Glucose oder dem Diastereomer Galaktose. Diese Verbindungen sind jedoch alle mit einem (NP-017772 bzw. NP-018110 mit zwei) Essigsäureresten an der Fucose verestert. NP-018109 ist zusätzlich mit 4*E*-Methoxyzimtsäure an der Fucose verestert. Die Verbindung NP-017889 besitzt ein an der Fucose mit Essigsäure verestertes unverzweigtes Tetrasaccharid.

Interessant ist der Unterschied in der nicht-kombinierten Zytotoxizität zwischen NP-017774 und NP-017889. NP-017774 besitzt ein Tetrasaccharid an C-28, welches am zweiten Zucker verzweigt ist und welches an der Fucose einen Acetylrest trägt. Die Verbindung zeigte eine moderate nicht-kombinierte Zytotoxizität sowie eine ausgeprägte synergistische Zytotoxizitätsverstärkung. Demgegenüber enthält NP-017889 an dieser Position ein unverzweigtes Tetrasaccharid, welches ebenfalls an der Fucose einen Acetylrest trägt. Die Verbindung zeigte eine deutliche nicht-kombinierte Zytotoxizität sowie eine schwache synergistische Zytotoxizitätsverstärkung. Verglichen mit dem nicht acetylierten Saponin gleichen Aufbaus der Zuckerreste wie NP-017810 gegenüber NP-017774, bringt die Acetylierung der Fucose eine deutliche Steigerung der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von

RIP-I mit sich. Für NP-017889 ist dieser direkte Vergleich leider nicht möglich, da es hierfür keine nicht acetylierte Entsprechung gibt. Eventuell ist die größere Raumnahme des Restes am C-28 von NP-017889 für die höhere Zytotoxizität gegenüber NP-017774 verantwortlich.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass schwach lipophile Verzweigungen wie z. B. Desoxyzucker und / oder lipophile Substituenten wie z. B. Acetylgruppen und p-Methoxyzimtsäurereste im Zuckerrest an der C-28-OH-Gruppe eine beachtlich Steigerung der RIP-I-Zytotoxizität ermöglichen können. Dies geht jedoch in den meisten Fällen auch mit einer signifikanten Zunahme der nicht-kombinierten Zytotoxizität einher. Trotzdem weisen entsprechend hohe Mean Ratio-Werte auf ein eventuell geeignetes therapeutischen Fenster hin, bei dem der Abstand zwischen effektiv (synergistisch) zytotoxischer Konzentration und noch nicht toxischer nicht-kombinierter Konzentration des jeweiligen Saponin groß genug für eine therapeutische Applikation sein könnte.

4.3.5 Hydroxygypsogeninderivate als Aglykon

Zu dieser Gruppe gehören vor allem jene Saponine, die Quillajasäure (16 α -Hydroxygypsogenin) als Aglykon enthalten. Insgesamt wurden 15 Saponine mit diesem Triterpen untersucht und ein Saponin mit 2 β -Hydroxygypsogenin als Aglykon. Dieses Saponin, die Verbindung NP-017749, besitzt eine Glucuronsäure an der C-3-OH-Gruppe und eine Glucose an der C-28-OH-Gruppe. Auch die Verbindung NP-012978 enthält diesen Rest an C-3, jedoch keinen Zucker an C-28 und Quillajasäure als Aglykon. Das Saponin NP-017779 enthält eine acetylierte Glucuronsäure an C-3, eine Glucose an C-28 und ebenfalls Quillajasäure. Alle drei Substanzen (NP-017749, NP-012978, NP-017779) zeigten weder eine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin, noch eine nicht-kombinierte Zytotoxizität und verhielten sich damit analog zu Verbindungen mit gleichen oder ähnlichen Zuckerresten bei anderen Aglyka. Eine Aldehydgruppe an C-4 allein scheint also keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von RIP-I ausüben zu können. Dies bedeutet im Weiteren, dass der Einfluss des Aglykons, beschränkt man die Variabilität auf Oleanan-Grundgerüste, vernachlässigbar gering sein wird.

Alle anderen untersuchten Verbindungen dieser Gruppe besitzen an C-3 das gleiche verzweigte Trisaccharid aus Glucuronsäure und Galaktose sowie Xylose, wie alle Verbindungen aus der Gruppe der Saponine mit Gypsogenin. Die Verbindungen NP-017675, NP-017674, NP-017810 und AG1 besitzen an C-28 verzweigte Tetra- oder Pentasaccharide. Die Verzweigungsstelle ist dabei stets der zweite Zucker der längeren Kette, Rhamnose. Die Verzweigung bildet ein einzelnes Zuckermolekül. Gegenüber der äußerst schwach ausgeprägten Zytotoxizität und Zytotoxizitätssteigerung von Saporin durch AG3 und AG4, zeigten die Saponine dieser Gruppe schwache Zytotoxizitäten und Zytotoxizitätssteigerungen. Warum sich das Verhalten dieser Saponine von dem von AG3 und AG4

unterscheidet ist nicht klar. Wahrscheinlich ist, dass AG3 und AG4 unterdosiert wurden. Als Isolationsprodukte enthielten diese nicht quantifizierbare Mengen Ammoniumformiat, welche Rückstände aus dem Isolationsprozess darstellten. Auch die Verbindung NP-017675 zeigte keinen der beiden Effekte. Das wurde so nicht erwartet, denn Saponine mit Gypsogenin und einem im Zuckerrest des C-28 abzweigenden Desoxyzucker wie Chinovose zeigten deutliche Zytotoxizitätssteigerungen von Saporin. Allerdings zweigte Chinovose bei diesen Saponinen bereits am ersten Zucker des Saccharids, der Fucose ab. Auch andere die Lipophilie des Zuckerrestes erhöhende Gruppen wie Acetylreste oder p-Methoxyzimtsäureresten waren mindestens an dieser Position gebunden. Das zeigt, dass die Position der Verzweigung der Kette eine wichtige Rolle spielt. Eine Verzweigung sollte für eine ausgeprägte Zytotoxizitätssteigerung von RIP-I demnach am ersten Zucker des Restes an C-28 auftreten und muss nicht zwingend durch einen Zucker erfolgen. Desoxyzucker oder andere lipophile Gruppen kommen zur Verzweigung in Frage. Dies zeigte das Saponin SA1657, welches sich damit analog zu der strukturverwandten Verbindung SA1641 mit Gypsogenin verhielt. Auch das Auftreten dieser Gruppen an gewöhnlichen Zuckern wie Rhamnose steigerte Zytotoxizität von RIP-I deutlich. War der abzweigende Zucker jedoch ein gewöhnlicher Zucker ohne derartige Gruppen und auch kein Desoxyzucker, war der synergistisch zytotoxizitätsverstärkende Effekt nur gering, wenngleich eine signifikante, konzentrationsabhängige nicht-kombinierte Zytotoxizität, wie bei Substanz NP-003881 messbar war.

Ab einer gewissen Größe, Komplexität und Lipophilie des Zuckerrestes an C-28 ist eine deutliche Zunahme der nicht-kombinierte Zytotoxizität zu verzeichnen, wie bereits beim Vergleich von NP-017774 und NP-017889 vermutet wurde. So zeigten die Verbindungen NP-017705 (sechs Zucker, doppelt verzweigt, ein Acetylrest), NP-017773 (fünf Zucker, einfach verzweigt, zwei Acetylreste), NP-017776 und NP-017775 (fünf Zucker, einfach verzweigt, ein Acetylrest) sowie AG2 (fünf Zucker, doppelt verzweigt) dies sehr deutlich. Auch Verbindungen mit Gypsogenin NP-017888 und NP-018108 (fünf Zucker, einfach verzweigt, ein Acetylrest), NP-017772 und NP-018110 (vier Zucker, einfach verzweigt, zwei Acetylreste) und NP-018109 (vier Zucker, einfach verzweigt, ein Acetylrest, ein p-Methoxyzimtsäurerest) zeigten dies. Die Verbindungen NP-017677 (vier Zucker, unverzweigt) und NP-017676 (fünf Zucker, einfach verzweigt), welche an der Fucose mit einem langkettigen Rest verestert sind zeigten eine signifikante nicht-kombinierte Zytotoxizität.

AG1 und AG2 zeigten sowohl in Kombination mit 1 nM Saporin als auch in Kombination mit 1 nM Agrostin jeweils eine vergleichbare, mit 1 nM Saporin leicht stärkere synergistische Zytotoxizität. Eine weitere Verstärkung des synergistischen Effektes durch die Kombination mit dem RIP des Ursprungs der gleichen Art, wurde also nicht beobachtet. Eine Bestimmung und ein Vergleich Adenin-Abspaltaktivität der beiden RIP-I, um bezüglich der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung gleiche Bedingungen sicherzustellen, wurden jedoch nicht durchgeführt.

4.3.6 Sonstige Saponine

Diese Gruppe untersuchter Saponine besaß vor allem Aglyka, welche nicht von Oleanan-Typ waren oder/und Zuckerreste, welche an anderen Positionen als der C-3-OH-Gruppe oder der C-28-OH-Gruppe gebunden waren. Dennoch zeigten einige Verbindungen deutliche synergistische Zytotoxizitätsverstärkungen von 1 nM Saporin. Ein Vergleich dieser Verbindungen zeigt, dass dies vor allem Verbindungen sind, die, unabhängig von der Position, über einen Zuckerrest einer bestimmten Mindestgröße verfügen. Diese Mindestgröße scheint ein verzweigtes Trisaccharid zu erfüllen. So zeigten das Saponin AS64R, welches ein verzweigtes Trisaccharid an der C-28-OH-Gruppe besitzt, das Saponin AS6.2, welches zusätzlich ein Molekül Galaktose an der OH-Gruppe der C-23-Carboxylgruppe und β -Äscin, welches ein verzweigtes Trisaccharid an der C-3-OH-Gruppe besitzt eine synergistische Zytotoxizitätssteigerung bei geringer nicht-kombinierter Zytotoxizität. AS64R und AS6.2 enthalten Gypsogeninsäure als Aglykon, β -Äscin Protoaescigenin, ein Triterpen, welches am E-Ring zusätzliche OH-Gruppen besitzt, welche in diesem Fall mit Essigsäure und Angelikasäure verestert sind. Auch die Aglyka der Saponine aus Teesamen, Teaseedsaponin I und J sowie Assamsaponin F sind an diesen OH-Gruppen mit Angelikasäure und Essigsäure verestert. Das Aglykon von Assamsaponin F ist an der C-16 α -Hydroxylgruppe zusätzlich mit Essigsäure verestert. Alle drei Saponine tragen an der C-3-OH-Gruppe ein verzweigtes Tetrasaccharid, welches über eine Glucuronsäure an das Aglykon gebunden ist. Teaseedsaponin I und J verstärkten die Zytotoxizität von Saporin synergistisch bei moderater nicht-kombinierter Zytotoxizität. Assamsaponin F zeige eine verglichen mit anderen Saponinen schwache nicht-kombinierte Zytotoxizität, jedoch auch eine schwache Zytotoxizitätssteigerung in Kombination mit Saporin. Das Aglykon entspricht bis auf dem Acetylrest an C-16 dem Protoaescigenin. Der Austausch eines Angelikasäurerestes am E-Ring gegen einen Acetylrest mag eine geringere Zytotoxizität bedingen. Ein zusätzlicher Acetylrest an C-16 mag jedoch eine Störung bei der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung darstellen.

Auch Primulasäure 1 konnte die Zytotoxizität von Saporin steigern. Auch diese Verbindung enthält ein ähnliches verzweigtes Tetrasaccharid wie Teaseedsaponin I und J. Ihr fehlen jedoch zusätzliche Hydroxylgruppen am E-Ring. Dennoch ist die gemessene Zytotoxizität (kombiniert und nicht-kombiniert) vergleichbar mit jener der beiden Saponine.

Digitonin enthält das Steroid Digitogenin als Aglykon. An einer C-3-OH-Gruppe ist ein verzweigtes Pentasaccharid gebunden, welches keine Uronsäure enthält. Verglichen mit anderen stark zytotoxischen Saponinen zeigte Digitonin eine deutliche aber schwächere nicht-kombinierte Zytotoxizität. Auch eine Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin war messbar, jedoch nur schwach. Eine mögliche Ursache hierfür könnte das Aglykon der Verbindung darstellen, welches sich sehr stark von sich als geeignet herausgestellten Oleanan-Typ Triterpensaponinen unterscheidet.

4.3.7 Schlussfolgerungen aus den Zytotoxizitätsuntersuchungen der Saponine

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass, um eine möglichst starke synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I zu erzielen, bei gleichzeitig möglichst geringer nicht-kombinierter Zytotoxizität, ein Saponin idealerweise folgende Strukturmerkmale aufweist:

- Triterpen von Oleanan-Typ
- Verzweigtes Trisaccharid der Form |Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-|, bei welchem die Glucuronsäure glycosidisch an der C-3-OH-Gruppe des Aglykons gebunden ist
- Verzweigtes Tetrasaccharid, bei dem eine Fucose esterartig an der C-28-OH-Gruppe gebunden ist oder ein unverzweigtes Trisaccharid gleicher Bindung zum Aglykon
- p-Methoxyzimtsäure, ein Desoxyzucker oder ein Acetylrest an der Fucose gebunden
- molekulare Masse > 1500 Da

Die Abbildung 54 soll dies veranschaulichen und führt zum Vergleich auch Strukturmerkmale auf, die sich als ungeeignet erwiesen haben (nach Böttger et al. (2013)).

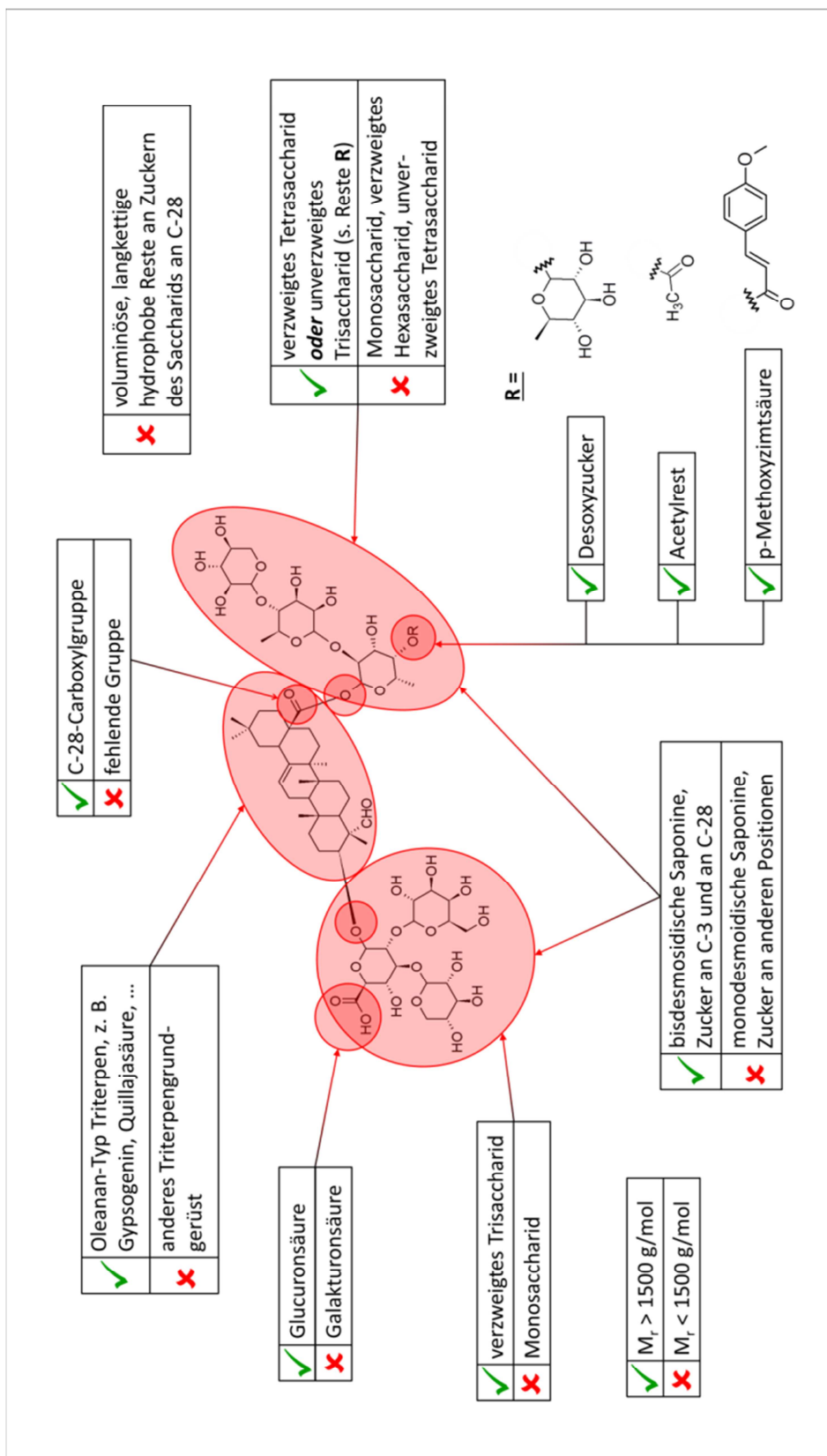


Abb. 54 Darstellung der essentiellen Strukturmerkmale, die eine ausgeprägte synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I ermöglichen, bei geringer nicht kombinierter Zytotoxizität des Saponins. Essentielle Strukturmerkmale sind mit ✓ gekennzeichnet. Diese müssen in ihrer Gesamtheit in der Verbindung vorhanden sein. Mit ✗ gekennzeichnete Strukturelemente verhindern entweder eine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I oder erhöhen die nicht kombinierte Zytotoxizität des Saponins. Ein einzelnes dieser Strukturelemente reicht dazu bereits aus.

4.4 Untersuchung der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung eines RIP-I/Ligand-Proteinkonjugats an Ligandenrezeptor-positiven Zellen

Durch die Koppelung des RIP-I Saporin an den Liganden EGF ist es möglich die Konzentration des RIP-I in der unmittelbaren Umgebung einer Ligandenrezeptor-positiven Zielzelle, nämlich an der Zellmembran, durch die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor deutlich zu erhöhen. Dadurch können Konzentrationen eingesetzt werden, welche für Zielzellen zytotoxisch sind, Nicht-Zielzellen jedoch weitestgehend unbeeinflusst lassen (Heisler et al., 2003). Im Vergleich zur Konzentration nicht an ligandengekoppelten Saporins sollte die für eine zytotoxische Reaktion benötigte Konzentration von Saporin, welches ligandengebunden ist, in einem Zellsystem mit Zielzellen des Liganden deutlich niedriger sein. Wie in 3.2.5 dargelegt, wurde in dem EGF-Rezeptor-positiven NIH-3T3/HER14-Zellsystem tatsächlich nur ein Zehntel der Konzentration von Saporin-EGF, verglichen mit der Konzentration Saporin im ECV-304-Zellsystem, für die Auslösung einer maximalen Zytotoxizität in Kombination mit 1,5 µg/mL Saponinum album bzw. 5 µg/mL SA1641 benötigt. Dies spiegeln auch die jeweils berechneten GI_{50} -Werte wieder. So konnte in Kombination mit 1,5 µg/mL Saponinum album für Saporin an ECV-304-Zellen eine GI_{50} von 485 pM (MTT-Assay) und für Saporin-EGF an NIH-3T3/HER14-Zellen eine GI_{50} von 70 pM (MTT-Assay) bestimmt werden, was einer ca. 10-fach höheren Zytotoxizität entspricht. Bachran et al. (2006) konnten eine wesentlich deutlichere Zytotoxizitätsverstärkung von Saporin-EGF an EGF-Rezeptor-positiven HER14-Zellen ($GI_{50} = 0,18$ pM) gegenüber Saporin an NIH-3T3-Zellen ($GI_{50} = 500$ pM), jeweils in Kombination mit 1,5 µg/mL Saponinum album, verzeichnen. Dies entspricht einer ca. 2800-fach höheren Zytotoxizität. Die Gründe der in dieser Arbeit erzielten geringen Zytotoxizitätsverstärkung mögen vielseitig sein. Probleme mit der eingesetzten Charge Saporin-EGF (geringer Gehalt funktionsfähiger Konjugate) kommen ebenso in Frage, wie der Zustand der verwendeten Zelllinie (geringe Expression des EGFR).

4.5 Untersuchungen zur Oberflächenaktivität von ausgewählten Saponinen

Die Oberflächenaktivität von Saponinen lässt sich in zwei Bereiche gliedern. Zum einen ist der Einfluss auf biologische Membranen wie z. B. Zellmembranen bekannt. Zum anderen üben Saponine auch einen Einfluss auf physikalische Oberflächen wie jene von Flüssigkeiten an der Phasengrenze zur Gasphase (z. B. Wasser zu Luft) aus, was als eine Absenkung der Oberflächenspannung der Flüssigkeit messbar ist. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen diesen Eigenschaften untersucht. Ein Zusammenhang zwischen diesen ist keineswegs selbstverständlich. Bereits beim Einfluss von Saponinen auf biologische Systeme sind große Unterschiede möglich. So ist eine generelle Korrelation zwischen der Saponin typischen Hämolyse und der Zytotoxizität für Steroidsaponine nicht feststellbar (Wang et al., 2007). Während die hämolytische Aktivität vor allem von der Art und Anzahl der Zucker des Saponins abzuhängen scheint, scheint das zytotoxische Potential der Steroidsaponine vor allem von der Art des Aglykons und von der Anzahl der damit verbundenen Zuckerreste abzuhängen (Liu et al., 2013). Dies legt nahe, dass beiden Aktivitäten unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen. Eine Korrelation könnte auch zwischen dem Zellmembran permeabilisierenden Potential und der hämolytischen Aktivität vermutet werden. Doch in Versuchen von Gauthier et al. (2009) konnte eine hämolytische Aktivität nur für Saponine mit Aglyka vom Oleanan-Typ gemessen werden, nicht jedoch für Saponine mit Aglyka von Hopan-Typ. Eine permeabilisierende Wirkung auf Zellmembranen zeigten allerdings alle untersuchten Saponine. Ein Zusammenhang ist also selbst zwischen diesen oberflächenassoziierten Eigenschaften von Saponinen nicht zwingend vorhanden.

Zellmembranen können nach dem Flüssig-Mosaik-Modell von Singer & Nicolson (1972) auch als flüssige oder fließende Oberflächen aufgefasst werden. Diese können sich, unter Vernachlässigung des komplexen Aufbaus von Zellmembranen, ähnlich den Oberflächen von Flüssigkeiten verhalten. Insbesondere die Oberfläche von Wasser bietet einige Parallelen zu diesem Model. So ordnen sich Wassermoleküle im flüssigen Zustand in sehr kurzzeitig bestehenden Clustern an (Mathias & Marx, 2007). Diese sind ähnlich den Bereichen höherer und niedriger Viskosität und Durchlässigkeit in biologischen Membranen. Zum näheren Verständnis der Interaktion von Saponinen mit Membranen kann es also hilfreich sein zu wissen, in welcher Weise ganz unterschiedliche Saponine mit den Oberflächen wässriger Lösungen interagieren. Dabei ist es sinnvoll die gewonnenen Ergebnisse mit anderen bekannten oberflächenassoziierten Eigenschaften, wie etwa der Membrantoxizität bzw. Membranpermeabilisierung dieser Substanzen zu vergleichen. Ein solches vergleichendes Modell könnte aufzeigen, ob die Membranaktivität einiger Saponine einem spezifischen Mechanismus unterliegt, welcher auf die Zusammensetzung biologischer Membranen angewiesen ist, oder ob die Membranaktivität nur physikalischen Gesetzen unterliegt und ungerichtet an jeder Art von Oberfläche auftreten kann.

In dieser Arbeit wurde dazu die Verringerung der Oberflächenspannung wässriger Lösungen durch den Einfluss von verschiedenen Saponinen bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt und diese Ergebnisse mit der membranpermeabilisierenden Wirkung dieser Saponine auf Zellmembranen korreliert. Bei den Versuchen zur Verringerung der Oberflächenspannung wurde auch die Kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) bestimmt. Außerdem wurden die Zytotoxizität der Saponine und die membranpermeabilisierende Wirkung miteinander verglichen. Anschließend wurde versucht, die gewonnenen Erkenntnisse auf die Strukturen der untersuchten Substanzen zu beziehen.

Es wurden Substanzen ausgewählt, welche ein möglichst breites Spektrum der strukturellen Vielfalt von Saponinen abdecken. Dazu zählten: monodesmosidische Triterpensaponine (α -Hederin, β -Äscin, Glycyrrhizinsäure, Primulasäure 1), bisdesmosidische Triterpensaponine (Hederacosid C), Triterpene (Glycyrrhethinsäure), Steroidsaponine (Digitonin, Ginsenosid Rg2) und Steroide (β -Sitosterol).

Zur Bestimmung der Oberflächenspannung wurde ein Tensiometer mit Wilhelmy-Platte verwendet. Die Methode mit Verwendung einer Wilhelmy-Platte besitzt gegenüber der Methode, bei der ein Ring nach Du Noüy verwendet wird eine größere Robustheit. So wird bei der Ringmethode die Flüssigkeitsoberfläche durch die Messung immer wieder gestört. Das macht insbesondere Messungen schwierig, bei denen große Moleküle gelöst sind und bei denen in der Lösung Substanzen gelöst sind, die im Diffusionsgleichgewicht mit der Grenzfläche stehen. Beides kann für Saponine angenommen werden. Weiterhin müssen bei der Plattenmethode bestimmte Parameter der Messlösung, wie z. B. die Dichte oder das Gewicht der hochgezogenen Flüssigkeitlamelle nicht berücksichtigt werden (Krüss, 2013).

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde das gleiche ECV-304-Zellmodell verwendet, in welchem auch die Zytotoxizität aller anderen in dieser Arbeit untersuchten Saponine ermittelt wurde. Eine Auswertung erfolgte mittels MTT-Assay und DNA-Quantifizierung. Die Membrantoxizität wurde durch einen LDH-Assay ebenfalls an ECV-304-Zellen ermittelt. Während die Erfassung der Zytotoxizität durch DNA-Quantifizierung eine Art Langzeitbeobachtung (Inkubationszeit 72 h) darstellte, bei welcher geringere Konzentrationen der untersuchten Substanzen eingesetzt wurden, erfasste die mittels LDH-Assay bestimmte Membrantoxizität, bei welcher sehr viel höhere Konzentrationen der untersuchten Substanzen eingesetzt wurden, vor allem eine akute (Inkubationszeit 2 h) Wirkung. Beim Vergleich von allgemeiner Zytotoxizität und Membrantoxizität sind drei Szenarien denkbar:

1. Zytotoxizität und Membrantoxizität einer Substanz sind vergleichbar stark ausgeprägt.
 2. Eine Substanz zeigt eine ausgeprägte Membrantoxizität aber kaum Zytotoxizität.
 3. Eine Substanz zeigt eine ausgeprägte Zytotoxizität aber kaum Membrantoxizität.
-

Ein Blick in Tabelle 11 zeigt, dass Fall Nr. 1 für die meisten der untersuchten Verbindungen zutreffend ist. Dies lässt wiederum die Vermutung zu, dass die verursachte Zytotoxizität Mechanismen unterliegt, welche maßgeblich durch die Membrantoxizität der Stoffe bedingt sind. So lange ein bestimmter Grad der Membranschädigung nicht überschritten wird, können zelluläre Reparaturmechanismen diesen Schaden beheben und die betreffende Zelle bleibt proliferationsfähig. Wird dieser Grad überschritten, die Zelle irreparabel geschädigt, leitet die Zelle die Apoptose ein. Im Extremfall führt bereits die untersuchte Substanz selbst zur Zellyse. Diese Betrachtungen schließen ein Auftreten des Falls Nr. 2 praktisch aus. Fall Nr. 3 impliziert, dass eine durch eine Substanz ausgelöste Zytotoxizität durch einen anderen Mechanismus verursacht wird als durch die irreparable Membranschädigung. Ein solcher Fall wurde nur für β -Sitosterol beobachtet.

Um nun eine Korrelation zwischen den Einflüssen der untersuchten Saponine auf biologische Oberflächen und auf physikalische Oberflächen zu identifizieren, wurden die gewonnenen Daten in ein Streudiagramm eingetragen (s. Abbildung 55).

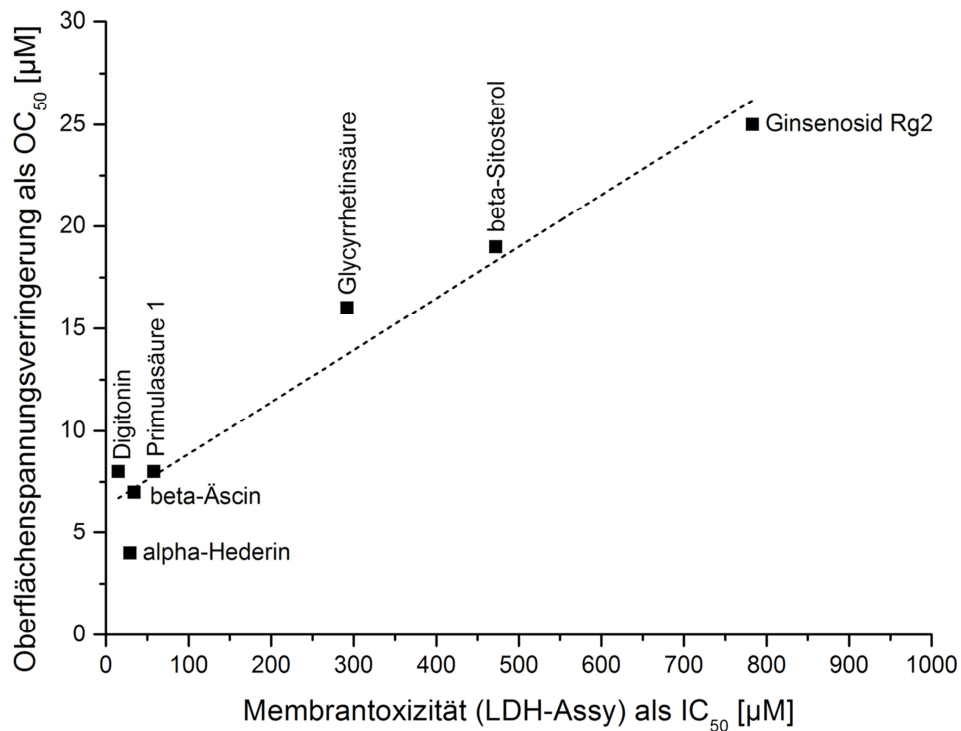


Abb. 55. Streudiagramm zur Korrelation zwischen Membrantoxizität und Oberflächenspannungsverringering (nach Böttger et al. (2012)). Das Streudiagramm trägt für jede Verbindung die Konzentration der halbmaximalen Verringerung der Oberflächenspannung als OC₅₀ gegen die Konzentration der halbmaximalen LDH-Freisetzung als IC₅₀ ab. Die maximale Verringerung der Oberflächenspannung wird bei der Kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) erreicht, wenn eine weitere Erhöhung der Stoffkonzentration nicht in einer weiteren Verringerung der Oberflächenspannung resultiert, sondern in der Bildung von Mizellen. Die maximale LDH-Freisetzung wird durch vollständige Lyse der Zellen erreicht. Sie wird durch eine Kontrollsubstanz bestimmt. Nicht dargestellt sind Glycyrrhizinsäure und Hederacosid C. Beide Verbindungen verursachten derart geringe Membranschäden, dass die Löslichkeitsgrenze erreicht wurde, bevor eine halbmaximale LDH-Freisetzung gemessen werden konnte und somit kein IC₅₀-Wert bestimmbar war. Die dargestellte Regressionsgerade dient der Beurteilung eines Zusammenhangs beider Parameter. Eine Geradengleichung hat die Formel: $y = 25,35 \cdot 10^{-3} x + 6,33$. Regressionskoeffizient $R^2 = 0,9384$.

Das Streudiagramm zeigt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Membrantoxizität, bestimmt als Freisetzung des intrazellulären Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH), und der Verringerung der Oberflächenspannung einer wässrigen Lösung. Das scheint die Vermutung zu bestätigen, dass beide Phänomene durch unspezifische Prozesse ausgelöst werden, welche einzig durch den amphiphilen Charakter der Strukturen der Verbindungen und der damit verbundenen Störung der Ausbildung regelmäßiger Grenzflächen bedingt sind. Andere Untersuchungen zur Interaktion von Saponinen und biologischen Oberflächen deuten neben unspezifischen Prozessen auch auf Vorgänge hin, bei denen das Cholesterin von Zellmembranen und dessen Beeinflussung eine Rolle spielen. 1962 konnten mittels Elektronenmikroskopie erstmals Poren in viralen Membranen durch die Behandlung mit Saponinen beobachtet werden (Dourmashkin et al., 1962). Dabei stellte sich das Vorkommen von Cholesterin in den Membranen als essentiell heraus (Glauert et al., 1962). Schlösser (1969) unternahm

Versuche, in denen die Saponin induzierte Hämolyse durch den Zusatz von Cholesterol verhindert werden konnte. Er schlussfolgerte daraus, dass Cholesterol und Saponine Komplexe bilden und Saponine derartige Komplexe normalerweise dadurch bilden, dass den Membranen der roten Blutkörperchen (und anderer Zellen) Cholesterol entzogen würde und es somit durch den Verlust dieses membranstabilisierenden Moleküls zur Zerstörung der Membran kommt. Durch den Zusatz von freiem Cholesterol komplexieren Saponine mit diesem und sind nicht mehr in der Lage den Membranen der roten Blutkörperchen Cholesterol zu entziehen. Eine Hämolyse bleibt somit aus. Schlösser (1969) beobachtete außerdem, dass vor allem jene Saponine mit Cholesterol komplexierten, die bereits in geringen Konzentrationen (ca. 2,5 µg/mL) zu vollständiger Hämolyse führen. Saponine, die nur in wesentlich höheren Konzentrationen (> 250 µg/mL) Hämolyse auslösten, bildeten dagegen kaum Komplexe mit Cholesterol. Zu ersteren zählen demnach die auch hier untersuchten Saponine α -Hederin, β -Äscin, Digitonin, Primulasäure 1 und einige *Gypsophila*-Saponine, wie sie etwa in *Saponinum album* vorkommen. Diese Beobachtung bestätigt die in dieser Arbeit für diese Substanzen gemessenen niedrigen IC₅₀-Werte im LDH-Assay und deren hohe Membrantoxizität und somit auch Zytotoxizität, welche demzufolge hauptsächlich durch die Interaktion mit dem Cholesterol der Zellmembranen bedingt ist (Mouritsen & Zuckermann, 2004; Nishikawa et al., 1984). Hu et al. (1996) zufolge sind bisdesmosidische Saponine mit Zuckerresten an C-3 und C-28 jedoch auch in der Lage künstliche Membranen, welche kein Cholesterol enthalten zu lysieren, während monodesmosidische Saponine, welche nur mit einem Zuckermolekül an C-3 verbunden, sind diese Membranen nur dann lysieren, wenn sie Cholesterol enthalten. Offenbar genügen bei bisdesmosidischen Saponinen, welche mit mehreren Zuckern ein bestimmtes Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben (Aglykon) Strukturanteilen erreichen die dadurch erzeugten amphiphilen Eigenschaften, um die Ordnung der Membranlipide zu (zer-)stören und so eine Lyse hervorzurufen (Voutquenne et al., 2002). Dies schließt die Komplexierung von Cholesterol aus cholesterolhaltigen Membranen als parallelen membrantoxischen Mechanismus nicht aus. Ein zusätzlicher Mechanismus der die membrantoxischen Einflüsse verstärken kann und somit zu einer Erhöhung des zytotoxischen Potentials einer Substanz beiträgt, ist für einige Steroidsaponine wie Digitonin beschrieben. Demnach sind diese Verbindungen in der Lage, die Na⁺-K⁺-ATPase zu hemmen (de Souza et al., 2004; Kuroda et al., 1995; Liang et al., 1976; Mc Anuff et al., 2005; Mimaki et al., 1998; Silva, 2005). Dieses Transmembranprotein ist für die Aufrechterhaltung der Ladungsgradienten und die Regulierung des Zelldrucks verantwortlich (Hall & Guyton, 2006). Bei einer Hemmung des Enzyms kann es, insbesondere wenn weitere Saponin induzierte Schäden der Zellmembran einen Einstrom von Ionen (z. B. Na⁺) aus dem Extrazellularraum zulassen, zu einem derart starken Anstieg des Zelldrucks kommen, dass die Membran reißt bzw. die Zelle platzt. Durch die Verbindung eines verzweigten Pentasaccharids und dem Aglykon Digitogenin bei Digitonin dürfen für die Substanz ausgeprägte amphiphile membrantoxische Eigenschaften angenommen werden. Zusammen mit einer Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase der Zellmembran kann

somit die starke Zytotoxizität dieses Saponins erklärt werden. Dass die Substanz über ausgeprägte amphiphile Eigenschaften verfügt, zeigen auch die niedrigen OC_{50} -Werte.

Kleinere monodesmosidische Triterpensaponine sind wahrscheinlich nicht in der Lage die Ordnung der Zellmembranlipide durch den Einfluss ihrer amphiphilen Bindungskräfte zu stören und üben eine Membrantoxizität dann nur durch die Interaktion mit dem Membrancholesterol aus. Auch das Aglykon selbst besitzt also einen entscheidenden Einfluss auf die Membrantoxizität und somit auch auf die Zytotoxizität. Abgesehen von einigen Steroidsaponinen, welche einen spezifischen Mechanismus zur Verstärkung der Zytotoxizität unterstützen, besitzen Saponine mit dem Aglykon Oleanolsäure verglichen mit Saponinen mit anderen Aglyka das höchste membran- und zytotoxische Potential (Gauthier et al., 2009; Podolak et al., 2010). Wie die Untersuchungen zur Zytotoxizität der Saponine in Tabelle 9 zeigten, haben leichte Modifikationen dieses Grundgerüsts, welche z. B. die Triterpene Gypsogenin, Quillajasäure, sowie andere hydroxylierte Varianten ergeben, keinen Einfluss auf die Zytotoxizität. Größere Abweichungen von diesen Grundkörpern können dann, fehlen zudem geeignete Zuckerreste, die Membrantoxizität stark abschwächen. Dieser Fall darf den Daten aus Tabelle 10 und Tabelle 11 folgend, welche für Ginsenosid Rg2, Glycyrrhizinsäure sowie für das Aglykon Glycyrrhethinsäure, sehr geringe Membran- und Zytotoxizitätswerte zeigen, angenommen werden. Ebenso darf aus den Strukturen auf mäßige amphiphile Eigenschaften geschlossen werden, welche ebenfalls bei den Untersuchungen zur Oberflächenspannungsverringering bestätigt wurden. Ginsenosid Rg2 ist darüber hinaus im Gegensatz zu anderen Steroidsaponinen nicht in der Lage die Na^+K^+ -ATPase zu hemmen und kann nicht auf diesen zytotoxizitätsverstärkenden Mechanismus zurückgreifen. Ein Glykosid am C-6 ist dafür offenbar hinderlich (Chen et al., 2008).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Saponine, welche ein ausgewogenes Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben Strukturbereichen besitzen, wie es etwa für bisdesmosidische Saponine einer gewissen Größe (geschätzte $M_r > 1000$ Da) und monodesmosidische Saponine mit einer bestimmten Mindestanzahl von Zuckermolekülen (geschätzt min. 3) zutreffen mag, eine Membrantoxizität sowohl durch eine unspezifische Störung der Membranlipide verursachen können, als auch durch die spezifische Komplexierung und den Entzug des stabilisierenden Membrancholesterols. Derartige Saponine besitzen auf Grund ihrer ausgeprägten amphiphilen Eigenschaften auch ein großes Potential zur Verringerung der Oberflächenspannung wässriger Lösungen. Die Art des Aglykons kann sowohl zur Verstärkung als auch zur Abschwächung der beschriebenen Effekte beitragen, wie etwa durch zytotoxizitätsverstärkende Wirkung der Hemmung der Na^+K^+ -ATPase durch bestimmte Steroidsaponine. Kleinere monodesmosidische Saponine und einige Aglyka besitzen zu geringe Tenseideigenschaften um die Zellmembran unspezifisch zu stören. Ihre Membrantoxizität beruht vor allem auf der Komplexierung und dem Entzug des Membrancholesterols. Geringere Tenseideigenschaften bedingen somit auch ein geringes Potential zur Verringerung der

Oberflächenspannung wässriger Lösungen. Somit ist eine Korrelation zwischen der Verringerung der Oberflächenspannung und der Membran- und Zytotoxizität durch die Struktur der Saponine und deren unterschiedliche starke spezifische als auch unspezifische Wechselwirkungen mit den jeweiligen Grenzflächen bedingt.

4.6 Untersuchungen zur Beeinflussung des Membrancholesterols

Die Vermutung, dass die Zytotoxizität der meisten Triterpensaponine auf der Zerstörung der Zellmembran basiert, wurde bereits durch zahlreiche Experimente vieler Gruppen bestätigt. Dabei kommen Wechselwirkungen mit dem Membrancholesterol in Abhängigkeit von der Struktur und der Konzentration des eingesetzten Saponins eine tragende Rolle zu. Vorstellbar ist dabei auch, dass es bereits bevor zytotoxische Effekte messbar werden zu Interaktionen zwischen Saponinen und dem Cholesterol der Zellmembran kommt. Vor dem Hintergrund des bisher bekannten Mechanismus der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I durch subtoxische Konzentrationen von bestimmten Saponinen, kam die Frage auf, ob eine Beeinflussung des Membrancholesterols durch diese Saponine mit dem Auftreten synergistisch verstärkter RIP-I-Zytotoxizität korreliert. Dabei war auch die Frage von Interesse, ob Saponine, welche im gleichen Konzentrationsbereich keine Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I zeigten, auch das Membrancholesterol weniger oder gar nicht beeinflussen.

Die Erkenntnis von Weng et al. (2012b), dass die synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I maßgeblich durch die Saponin abhängige endosomale Freisetzung der Proteintoxine verursacht wird, gibt Grund zu der Annahme, dass Saponine, welche entweder bereits in die Endosomenmembran integriert sind oder welche an das Proteintoxin gebunden sind, mit dem Cholesterol in der endosomalen Membran interagieren. Bei einer solchen Interaktion ist es einerseits denkbar, dass Saponine das Membran stabilisierende Cholesterol aus der Endosomenmembran herauslösen oder andererseits mit dem Cholesterol in der Endosomenmembran Komplexe bilden. In beiden Fällen würde dies zu einer Destabilisierung der Membran und zur Erhöhung der Membranpermeabilität führen (Augustin et al., 2011). Die erhöhte Permeabilität mag für den Durchtritt des Proteintoxins in das Zytoplasma ausreichen. Eventuell bewirken die amphiphilen Eigenschaften der pH-abhängig an das Proteintoxin gebundenen Saponine hierbei auch eine Art „Schmierseifeneffekt“, welcher den Membrandurchtritt zusätzlich erleichtert.

4.6.1 Entwicklung eines zellbasierten Modells zur Untersuchung der Beeinflussung des Membrancholesterols durch Saponine

Um diesen Theorien nachgehen zu können, sollte eine Auswahl von Saponinen, welche in Konzentrationen $< 10 \mu\text{g/mL}$ deutlich die Zytotoxizität von 1 nM Saporin verstärken konnten sowie von Saponinen, welche in diesem Konzentrationsbereich keine zytotoxizitätsverstärkenden Effekte zeigten in einem Modell hinsichtlich der Beeinflussung des Cholesterolgehalts von Zellmembranen untersucht werden. Dieses zellbasierte Modell sollte radioaktiv markiertes Cholesterol verwenden. Radioaktives Cholesterol bietet den Vorteil, dass es sich chemisch und in seinem physiologischen Verhalten nicht von nativem Cholesterol unterscheidet. Radioaktives Cholesterol kann in der Zellmembran die gleiche Stabilisierungsfunktion übernehmen wie natives Cholesterol. Fluoreszenzmarkiertes Cholesterol besitzt an dieser Stelle den Nachteil, dass dieses an ein recht voluminöses Fluorophor gebunden sein muss, welches die Struktur des Gesamtmolekül derart stark verändert (vergrößert), dass die Funktion in der Zellmembran erheblich beeinträchtigt wird (Meyer et al., 2012). Als radioaktives Cholesterol wurde in dieser Arbeit tritiummarkiertes Cholesterol (^3H -Cholesterol) verwendet. Eine Detektion erfolgt durch Szintillation.

Bei der Beeinflussung des Membrancholesterols durch die Saponine, sollten diese das ^3H -Cholesterol in gleichem Maße beeinflussen. Dies setzt wiederum voraus, dass ^3H -Cholesterol in der Zellmembran neben nativem Cholesterol vorhanden ist. Dorthin soll dieses durch passive Diffusion gelangen und dann ebenso wie natives Cholesterol in einem dynamischen Gleichgewicht mit nicht-membrangebundenem Cholesterol (radioaktiv und nativ) im Überstand stehen. Um dies zu gewährleisten wurde das zellbasierte Modell zunächst charakterisiert: Um aktive Transportprozesse, welche etwa das Cholesterol aus dem Überstand als auch aus der Zellmembran in das Zytoplasma befördern, auszuschließen, wurde die zeitabhängige Aufnahme von ^3H -Cholesterol sowohl mit als auch ohne Kühlung auf $0 \text{ }^\circ\text{C}$ untersucht. Sollte Cholesterol einem aktiven Transport unterliegen, würden die das dynamische Gleichgewicht und die spontane Integration von ^3H -Cholesterol in die Membran erheblich stören. Durch eine Kühlung unter $7 \text{ }^\circ\text{C}$ kommen derartige Transportprozesse zum Erliegen (Kostyuk et al., 1972; Ring et al., 1987). Ein Vergleich der Ergebnisse aus 3.4.1, Abbildung 44 (gekühlte ^3H -Cholesterolaufnahme) und 3.4.2, Abbildung 45 (ungekühlte ^3H -Cholesterolaufnahme) zeigt in beiden Fällen einen konzentrationsabhängigen und linearen Zusammenhang, welcher sich auch im Anstieg nahezu gleicht. Wäre Cholesterol mit ungekühlten Versuch aktiv transportiert worden, sollte ein deutlicher Unterschied beim konzentrationsabhängigen Anstieg des zellulären ^3H -Cholesterolgehalts sichtbar sein, wobei der konzentrationsabhängige Anstieg im ungekühlten Versuch größer wäre.

In einem weiteren Versuch wurde die Sättigbarkeit des Diffusionsprozesses überprüft. Ein gesättigtes System wäre insofern von Nachteil, als das der Zusatz von nicht markiertem Cholesterol, etwa durch den Einsatz von Serum enthaltenden Kulturmedien, die Aufnahme von ^3H -Cholesterol verringern würde. In diesem Fall stünden markiertes und natives Cholesterol in Konkurrenz bei der passiven Diffusion in die Membran. Deshalb wurde die passive ^3H -Cholesterolaufnahme unter Zusatz nativen Cholesterols untersucht. Dabei war die Konzentration bis zu 100-fach höher als die Konzentration des radioaktiven Cholesterols. Mit $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ lag die Konzentration des nativen Cholesterols dabei bei einem Zehntel des durchschnittlichen Gesamtcholesterols in Serum. Dieses liegt jedoch zum größten Teil (> 75 %) mit Fettsäuren verestert oder/und an Proteine gebunden und nicht frei vor (Röschlau et al., 1974). Unter dieser Berücksichtigung und der, dass der Serumanteil mit Zellkulturmedium ca. 10 % betrug, stellte eine Cholesterolkonzentration von $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ bereits eine höhere Konzentration dar als durch den Einsatz serenhaltiger Kulturmedien maximal erwartet werden konnte. Die Abbildung 45 zeigt, dass die Aufnahme des ^3H -Cholesterols durch den Zusatz von nativem Cholesterol nicht beeinflusst wurde und konzentrationsabhängig linear verlief.

In einem weiteren Versuch wurde die ^3H -Cholesterolaufnahme in zeitlicher Abhängigkeit untersucht. Diese sollte für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse späterer Versuche möglichst linear sein. Es musste jedoch befürchtet werden, dass die ^3H -Cholesterolkonzentration im Überstand durch die Adsorption von ^3H -Cholesterol an Gefäßoberflächen so stark verringert wird, dass dies zu einer Verschiebung des dynamischen Gleichgewichts führt, welche die Cholesterolaufnahme pro Zeiteinheit zunehmend verringert. Die Ergebnisse aus 3.4.3, Abbildung 46 zeigen, dass die ^3H -Cholesterolaufnahme im zeitlichen Verlauf bis 4 h weitestgehend linear verläuft. Eine Verringerung der ^3H -Cholesterolkonzentration im Überstand konnte innerhalb dieser Zeit nicht festgestellt werden (s. Abbildung 47).

4.6.2 Untersuchung der Saponin abhängigen ^3H -Cholesterolfreisetzung und der Saponin abhängigen Störung der ^3H -Cholesterolaufnahme

Das so charakterisierte Modell erschien geeignet um den Einfluss unterschiedlich stark membranaktiver Saponine auf den Cholesterolgehalt von ECV-304-Zellen zu untersuchen. Somit konnte getestet werden, ob membranaktive Saponine in der Lage sind, Cholesterol aus der Zellmembran herauszulösen. Hierzu wurde zunächst durch die Inkubation der Zellen mit ^3H -Cholesterol dieses spontan in die Zellmembran integriert, bevor es in einem weiteren Schritt durch den Zusatz von Saponinen wieder herausgelöst werden sollte. In einem parallelen Versuch wurde der Einfluss membranaktiver Saponine auf den Cholesterolstoffwechsel der Zellmembran untersucht, indem versucht wurde Saponin abhängig die Cholesterolaufnahme in die Zellmembran zu beeinflussen (zu verringern). Dazu wurden die Zellen erst mit Saponinen inkubiert, welche sich dabei wie von

Augustin et al. (2011) und Weng et al. (2012b) in die Zellmembran integrieren bzw. dort mit nativem Membrancholesterol komplexieren sollten. Anschließend sollte zugegebenes ^3H -Cholesterol bei der Diffusion in die Membran gestört werden. Dies sollte ebenfalls in einem verringerten ^3H -Cholesterolgehalt messbar sein. Durch die Messung des Verhaltens von ^3H -Cholesterols wurde auf das Verhalten nativen Cholesterols rückgeschlossen. Dabei wird das beeinflusste Cholesterol stets als Membrancholesterol betrachtet. Angesichts dessen, dass sich bis zu 80 % des zellulären Cholesterols in der Membran befinden und dessen, dass Saponine vor allem einen Effekt auf dieses Zellkompartiment ausüben, erscheint diese Verallgemeinerung vertretbar (Ikonen, 2008; Mukherjee et al., 1998).

Die Abbildung 48 zeigt Saponine, welche den Cholesterolgehalt der Zellmembran sowohl durch Freisetzung von Cholesterol als auch durch die Störung der Cholesterolaufnahme signifikant gegenüber der Kontrolle reduzierten. Besonders interessant ist, dass es sich dabei mit Ausnahme der Verbindung NP-000474 ausschließlich um Verbindungen handelt, welche die Zytotoxizität von 1 nM Saporin in Konzentrationen $< 10 \mu\text{g/mL}$ synergistisch verstärkten. Dargestellt ist jeweils nur die höchste untersuchte Konzentration. Diese betrug bei den meisten Verbindungen $100 \mu\text{M}$, bei einigen auch nur $50 \mu\text{M}$ und bei Primulasäure $1\ 200 \mu\text{M}$. Sämtliche Konzentrationen orientierten sich an Konzentration, welche auch im LDH-Assay zur Bestimmung der Membrantoxizität gewählt wurden. Auf Grund der kurzen Inkubationszeit von 1 h waren diese vergleichsweise hohen Konzentrationen (vgl.: bei Untersuchungen zur Zytotoxizität betragen die maximalen Saponinkonzentrationen meist $10 \mu\text{g/mL}$; Inkubationszeit 72 h) notwendig um Effekte messen zu können. Die Ergebnisse weiterer untersuchter Konzentration befinden sich in Tabelle 12. Die Beeinflussung der Cholesterolfreisetzung sowie dessen Aufnahme folgte bei allen in Abbildung 48 gezeigten Verbindungen einem konzentrationsabhängigen Zusammenhang. Die Freisetzung von Cholesterol aus der Zytoplasmamembran geschieht sehr wahrscheinlich durch dessen Komplexierung in der Membran (Augustin et al., 2011). Dabei bewirkt die Amphiphilie der Saponine sicherlich eine Abschirmung der van-der-Waals-Kräfte des Cholesterols zu den umgebenden Phospholipiden, mit denen dieses sonst Assoziate bildet und ermöglicht dessen Herauslösung. Ein typisches Saponin-Cholesterol-Verhältnis eines solchen Komplexes ist 5 : 1 oder mehr (Gestetner et al., 1972; Nishikawa et al., 1984). Bildet sich so ein Komplex noch in der Zytoplasmamembran und wird dieser nicht aus der Membran herausgelöst, kann dies, sind noch weitere derartige Komplexe vorhanden, zu Deformationen der Membran bis hin zur Porenbildung führen (Augustin et al., 2011). Die Membran wird permeabel für Ionen und kleinere Moleküle und verliert durch Verdichtung an den Stellen der Komplexe ihren fluiden Charakter (Nishikawa et al., 1984; Yeagle, 1985). Haben sich sehr viele Saponin-Cholesterol-Komplexe gebildet, ist vorstellbar, dass die Zytoplasmamembran einerseits permeabel wird, andererseits aber auch zu rigide zum freies Cholesterol aus der Umgebung aufzunehmen.

Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 49 ausschließlich Verbindungen, welche innerhalb der untersuchten Konzentrationen keine Freisetzung von Cholesterol bewirkten, sowie keine Störungen der Aufnahme freien Cholesterols darstellten. Die eingesetzten Konzentrationen dieser Verbindungen lagen dabei z. T. deutlich über die Konzentration der in Abbildung 48 dargestellten Verbindungen. So zeigte das bisdesmosidische Triterpensaponin Hederacosid C selbst bei 200 μM keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt, Glycyrrhizinsäure selbst bei 400 μM . Interessant ist wieder, dass es sich bei den in der Abbildung 49 aufgeführten Verbindungen um Substanzen handelt, welche keine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von 1 nM Saporin in Konzentrationen bis 10 $\mu\text{g/mL}$ und in einigen Fällen darüber zeigten. Außerdem zeigten die Verbindungen geringere Zytotoxizität bzw. Membrantoxizität als Verbindungen in Abbildung 48.

Das bedeutet, dass bereits in geringen Konzentrationen membrantoxische (membranaktive) und synergistisch RIP-zytotoxizitätsverstärkende Saponine den Cholesterolgehalt der Zytoplasmamembran von Zellen stärker beeinflussen als Saponine, welche eine geringere Membrantoxizität (Membranaktivität) zeigen und die Zytotoxizität von RIP nicht oder nur in weit höheren Konzentrationen verstärken. Eine Verringerung des Cholesterolgehalts geschieht dabei sowohl durch Saponin induzierte Cholesterolfreisetzung als auch durch Saponin abhängige Störung der Integration bzw. Aufnahme freien Cholesterols. Letztere stellt ein Indiz für die von (Weng, 2009) vermutete Membranintegration von Saponinen dar. Die Experimente konnten somit zeigen, dass die Membrantoxizität (Membranaktivität) von Saponinen maßgeblich von deren Vermögen, mit dem Membrancholesterol zu interagieren, bestimmt wird.

4.6.3 Untersuchungen zur Beeinflussung des Cholesterolgehalts endosomaler Membranen

Um eine mögliche Beteiligung der Interaktion zwischen Saponinen und dem Membrancholesterol bei der endosomalen Freisetzung von RIP-I bei der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I durch Saponine zu untersuchen, wurde der Einfluss eines potenten membranaktiven und synergistisch RIP-I-zytotoxizitätsverstärkenden Saponins SA1641 auf den Cholesterolgehalt endosomaler Membranen untersucht. Durch die endozytotische Aufnahme der Proteintoxine, sollten diese in dem resultierenden Vesikel von einer Membran umgeben sein, welche sehr ähnlich, wenn nicht sogar gleich der Zytoplasmamembran aufgebaut ist. Ein Einfluss auf diese Membran und dessen Cholesterol durch SA1641 sollte also ähnlich wie in 3.4.4, Abbildung 48 bzw. Tabelle 12 dargestellt sein und konzentrationsabhängig den Cholesterolgehalt senken. Die Abbildung 50 zeigt jedoch, dass der endosomale Cholesterolgehalt durch SA1641 nicht signifikant beeinflusst wurde. Dies mag mehrere Gründe haben und bedeutet nicht, dass der Einfluss von SA1641 auf das endosomale Cholesterol nicht signifikant ist.

Zytoplasmamembranen enthalten zwischen 35 % und 80 % des gesamten zellulären Cholesterols (Jain & Wagner, 1980; Mukherjee et al., 1998; Yeagle, 1985). Endosomale Membranen hingegen enthalten nur ca. 20 % des Cholesterolgehalts der Zellmembranen. Lysosomale Membranen enthalten noch weniger Cholesterol (Mukherjee et al., 1998). Beide Vesikeltypen nehmen Cholesterol vor allem durch die Rezeptor vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen wie VLDL und LDL auf (Gestetner et al., 1972). Die passive Diffusion, wie sie in den Versuchen 2.10.1 bis 2.10.6 zur Beladung der Membranen mit ^3H -Cholesterol genutzt wurde, spielt eine untergeordnete Rolle. Somit mag der Gehalt an ^3H -Cholesterol in den Endosomen der ECV-304-Zellen in Versuch 2.10.6 zu gering gewesen sein, als dass ein Einfluss von SA1641 darauf messbar gewesen wäre. Auch die Versuchsdurchführung, bei der SA1641 und ^3H -Cholesterol kombiniert appliziert wurden, mag dafür ursächlich sein. So konnte SA1641 das ^3H -Cholesterol bereits im Überstand komplexieren und somit den Gehalt des freien ^3H -Cholesterols zur Integration in Membranen reduzieren.

Dennoch konnte das Experiment zeigen, dass die gewählte Saponinkonzentration prinzipiell geeignet war den Cholesterolgehalt von Membranen zu reduzieren. SA1641 senkte signifikant den Cholesterolgehalt der Zytoplasmamembranen (s. Abbildung 50). Doch auch wenn eine Saponin induzierte Senkung des Cholesterolgehalts endosomaler Membranen und somit eine eventuelle Beteiligung dieses Mechanismus bei der endosomalen Freisetzung von Proteintoxinen nicht messbar war, bedeutet dies nicht, dass eine Beeinflussung des endosomalen Cholesterols nicht essentiell für das Auftreten der Zytotoxizität dieser Stoffe ist. Zum einen ist es möglich, dass der Cholesterolgehalt der Endosomenmembran gar nicht verändert werden muss um eine Durchlässigkeit für Proteintoxine in das Zytoplasma zu ermöglichen. So könnte die ohnehin cholesterolare Endosomenmembran bereits eine gewisse Grundpermeabilität besitzen, welche durch die Bildung von Saponin-Cholesterol-Komplexen innerhalb der Phospholipidschichten nur noch so weit erhöht werden muss, dass große Moleküle wie Proteintoxine durch diese hindurch treten können. Zum anderen wird es genügen, wenn dadurch nur wenige Proteintoxine das Zytoplasma erreichen. Denn als Enzyme mit hoher Wechselzahl wären bereits sehr wenige Ribosomen inaktivierenden Proteine Typ-I wie Saporin in der Lage eine große Anzahl Ribosomen irreversibel zu inaktivieren und somit die ganze Zelle in die Apoptose zu treiben ohne sich dabei zu verbrauchen (Heisler et al., 2002; Weng, 2009). Nach der Apoptose der Zellen wären darüber hinaus alle RIP-I, auch jene, die nicht aus Endosomen freigesetzt wurden, wieder frei und können von weiteren Zellen endozytiert werden, wo sich der Vorgang dann wiederholen kann.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass mit Ribosomen inaktivierenden Proteinen synergistisch zytotoxisch reagierende Saponine:

1. einen strukturellen Aufbau besitzen sollten, der die in 4.3.7, Abbildung 54 dargestellten Elemente aufweist.
 2. sehr wahrscheinlich in die Zytoplasmamembran integrieren und dass dies für eine spätere endosomalen Freisetzung der RIP-I in das Zytoplasma einen essentiellen Mechanismus darstellt. Eine Senkung des Cholesterolgehalts der Zytoplasmamembran mag sich auf weitere Schritte der Zytotoxizitätsentstehung verstärkend auswirken, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.
 3. auch das Cholesterol endosomaler Membranen derart beeinflussen, dass die endosomale Freisetzung der RIP-I erleichtert wird. Hierbei spielt wahrscheinlich weniger die Beeinflussung des Cholesterolgehalts eine Rolle, denn mehr eine effektive Komplexierung des in der Membran ohnehin vermindert vorkommenden Cholesterols.
-

5 Zusammenfassung / Summary

In der vorliegenden Arbeit wurden acht Extrakte und 76 Reinsubstanzen (Saponine und Aglyka) auf ihre Zytotoxizität sowie ihr Vermögen die Zytotoxizität von Ribosomen inaktivierenden Proteinen Typ I (RIP-I) synergistisch zu verstärken, untersucht.

Zusammen mit den Strukturen der untersuchten Substanzen ließen sich Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufstellen. Daraus konnten essentielle Strukturmerkmale, welche eine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I ermöglichen, identifiziert werden. Es konnten dabei auch Strukturmerkmale identifiziert werden, welche eine synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I stören oder verhindern.

Die Isolation der zwei potenten, in Kombination mit RIP-I synergistisch zytotoxischen Saponine SA1641 und SA1657 gelang aus *Saponinum album*. SA1657 konnte dabei als neue Verbindung identifiziert werden.

Aus *Agrostemma githago* L. gelang die Isolation von vier Saponinen. Drei dieser Verbindungen konnten als Gypsophilasaponin 1 – 3 identifiziert werden, welche für diese Stammpflanze bisher noch nicht beschrieben waren. Die Verbindung Agrostemmasaponin 3 stellte sich als neu heraus und konnte im untersuchten Konzentrationsbereich die Zytotoxizität von RIP-I synergistisch verstärken.

Eine erwartete Verstärkung der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung durch die Kombination von Saponinen aus *Agrostemma githago* L. mit dem ebenfalls aus dieser Pflanze stammenden RIP-I Agrostin gegenüber der Kombination mit dem ansonsten in der Arbeit verwendeten RIP-I Saporin aus *Saponaria officinalis* L. konnte nicht festgestellt werden.

Eine lineare Korrelation zwischen der Membrantoxizität von Saponinen und deren Vermögen die Oberflächenspannung wässriger Lösungen zu verringern konnte aufgezeigt werden.

Es wurde ein zellbasiertes Membranmodell entwickelt, mit dem unter Verwendung von radioaktiv markiertem Cholesterol der Einfluss von Saponinen auf den Cholesterolgehalt von Membranen untersucht werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass membranaktive Saponine den Cholesterolgehalt von Zellmembranen konzentrationsabhängig senken können. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass diese Saponine ebenfalls die Aufnahme freien Cholesterols in die Zellmembran behindern können.

Nicht membranaktive Saponine zeigten im gleichen Konzentrationsbereich keinen signifikanten Einfluss auf den Cholesterolgehalt.

Ein Einfluss des membranaktiven und in Kombination mit RIP-I synergistisch zytotoxizitätsverstärkenden Saponins SA1641 auf den Cholesterolgehalt von Endosomen konnte nicht nachgewiesen werden.

In the present work eight extracts and 76 substances (saponins and aglyca) were analyzed for their cytotoxicity and their ability to synergistically enhance the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I).

Referring these results to the structures of the substances, structure-activity-relationships (SAR) were established. This allowed identifying structural features that enable and amplify the cytotoxicity of RIP-I. It also allowed detecting structural features that inhibit the synergistic enhancement of cytotoxicity of RIP-I.

Two potent saponins, SA1641 and SA1657, which synergistically enhance the cytotoxicity of RIP-I were isolated from *Saponinum album*. The structure of SA1657 was elucidated as new substance.

Four saponins were isolated from *Agrostemma githago* L. Although three of these substances, Gypsophilasaponin 1 – 3, were already known from other species, they were described for this species for the first time. The structure of Agrostemmasaponin 3 was elucidated as new substance and synergistically enhanced the cytotoxicity of RIP-I.

A further amplification of the synergistic enhancement of the cytotoxicity of the RIP-I Agrostin that is also present in the species, compared to the synergistic enhancement of the cytotoxicity of the RIP-I Saporin from *Saponaria officinalis* L. by the saponins isolated from *Agrostemma githago* L. was not detected.

A linear correlation between the membrane toxicity of saponins and their characteristic to lower the surface tension of aqueous solutions could be shown.

A cell-based model using radiolabeled cholesterol was developed to analyze the influence of saponins on the cholesterol content of cell membranes.

Results from the model showed, that membrane active saponins lowered the cholesterol content of cell membranes. These saponins also hindered the uptake of free cholesterol into the cell membrane resulting in a decreased cholesterol content compared to a control.

Saponins that are not membrane active did not influence the cholesterol content of cells in the same range of concentration.

An influence of the membrane active saponin SA1641 on the cholesterol content of endosomes was not detectable.

Literaturverzeichnis

- Acupuncture Today (2013). URL: http://www.acupuncturetoday.com/herbcentral/vaccaria_seed.php (24.04.2013)
- Arslan, I., Celik, A., Chol, J. H. (2012). "A cytotoxic triterpenoid saponin from under-ground parts of *Gypsophila pilulifera* Boiss.& Heldr." *Fitoterapia*, 83(4): 699-703.
- Arslan, I., Celik, A., Melzig, M. F. (2013). "Nebulosides A–B, novel triterpene saponins from under-ground parts of *Gypsophila arrostii* Guss. var. *nebulosa*." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(5): 1279-1283.
- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., Bak, S. (2011). "Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins." *Phytochemistry*, 72(6): 435-457.
- Bachran, C., Dürkop, H., Sutherland, M., Bachran, D., Müller, C., Weng, A., Melzig, M. F., Fuchs, H. (2009). "Inhibition of Tumor Growth by Targeted Toxins in Mice is Dramatically Improved by Saponinum Album in a Synergistic Way." *Journal of Immunotherapy*, 32(7): 713-725
710.1097/CJI.1090b1013e3181ad4052.
- Bachran, C., Sutherland, M., Heisler, I., Hebestreit, P., Melzig, M. F., Fuchs, H. (2006). "The Saponin-Mediated Enhanced Uptake of Targeted Saporin-Based Drugs Is Strongly Dependent on the Saponin Structure." *Experimental Biology and Medicine*, 231(4): 412-420.
- Bagga, S., Seth, D., Batra, J. K. (2003). "The Cytotoxic Activity of Ribosome-inactivating Protein Saporin-6 Is Attributed to Its rRNA N-Glycosidase and Internucleosomal DNA Fragmentation Activities." *Journal of Biological Chemistry*, 278(7): 4813-4820.
- Bai, H., Zhong, Y., Xie, Y. Y., Wang, Y. S., Liu, L., Zhou, L., Wang, J., Mu, Y. L., Zuo, C. X. (2007). "A major triterpenoid saponin from *Gypsophila oldhamiana*." *Chemistry and Biodiversity*, 4(5): 955-960.
- Barbieri, L., Battelli, M. G., Stirpe, F. (1993). "Ribosome-inactivating proteins from plants." *Biochimica et biophysica acta*, 1154(3-4): 237-282.
- Bernas, T., Dobrucki, J. (2002). "Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes." *Cytometry*, 47(4): 236-242.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction." *Biotechnology Annual Review*, 11: 127-152.
- Berridge, M. V., Tan, A. S. (1993). "Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2): 474-482.
-

- Böttger, S., Hofmann, K., Melzig, M. F. (2012). "Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation?" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(9): 2822-2828.
- Böttger, S., Melzig, M. F. (2011). "Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family." *Phytochemistry Letters*, 4(2): 59-68.
- Böttger, S., Melzig, M. F. (2013). "The influence of saponins on cell membrane cholesterol." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(22): 7118-7124.
- Böttger, S., Westhof, E., Siems, K., Melzig, M. F. (2013). "Structure–activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I)." *Toxicol*, 73(0): 144-150.
- Chen, R. J. Y., Chung, T.-y., Li, F.-y., Lin, N.-h., Tzen, J. T. C. (2008). "Effect of sugar positions in ginsenosides and their inhibitory potency on Na⁺/K⁺-ATPase activity." *Acta Pharmacol Sin*, 30(1): 61-69.
- Clontech (2007). URL: http://www.clontech.com/DE/Products/Cell_Biology_and_Epigenetics/Cell_Biology_Kits/ibc/GetAttachment.jsp?cItemId=17508&fileId=5877776&sitex=10024:22372:US
- de Souza, A. M., Lara, L. S., Previato, J. O., Lopes, A. G., Caruso-Neves, C., da Silva, B. P., Parente, J. P. (2004). "Modulation of sodium pumps by steroidal saponins." *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 59(5-6): 432-436.
- de Virgilio, M., Lombardi, A., Caliendo, R., Fabbrini, M. S. (2010). "Ribosome-Inactivating Proteins: From Plant Defense to Tumor Attack." *Toxins*, 2(11): 2699-2737.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M.-L. (1988). "A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity." *Journal of Immunological Methods*, 115(1): 61-69.
- Delay, C., Gavin, J., Aumelas, A., Bonnet, P.-A., Roumestand, C. (1997). "Isolation and structure elucidation of a highly haemolytic saponin from the Merck saponin extract using high-field gradient-enhanced NMR techniques." *Carbohydrate Research*, 302(1–2): 67-78.
- Dourmashkin, R. R., Dougherty, R. M., Harris, R. J. C. (1962). "Electron microscopic observations on Rous sarcoma virus and cell membranes." *Nature*, 194(4834): 1116-1119.
- DSMZ (2013a). URL: [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-59.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-59.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192) (23.04.2013)
- DSMZ (2013b). URL: [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-310.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-310.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192) (23.04.2013)
- Efremov, R. G., Baradaran, R., Sazanov, L. A. (2010). "The architecture of respiratory complex I." *Nature*, 465(7297): 441-445.
- Encyclopedia of Life (2013a). URL: http://eol.org/data_objects/21255737 (24.04.2013)
- Encyclopedia of Life (2013b). URL: <http://eol.org/pages/2903749/overview> (24.04.2013)
-

- Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M., Tsurugi, K. (1987). "The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins." *Journal of Biological Chemistry*, 262(12): 5908-5912.
- Enzyme Structures Database (2013). URL: http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.2.2.22 (17.09.2013)
- Fan, Z., Mendelsohn, J., Masui, H., Kumar, R. (1993). "Regulation of epidermal growth factor receptor in NIH3T3/HER14 cells by antireceptor monoclonal antibodies." *Journal of Biological Chemistry*, 268(28): 21073-21079.
- Favel, A., Steinmetz, M. D., Regli, P., Vidal-Ollivier, E., Elias, R., Balansard, G. (1994). "In Vitro Antifungal Activity of Triterpenoid Saponins." *Planta Med*, 60(01): 50-53.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P., Becker, K. (2002). "The biological action of saponins in animal systems: a review." *The British journal of nutrition*, 88(6): 587-605.
- Gauthier, C., Legault, J., Girard-Lalancette, K., Mshvildadze, V., Pichette, A. (2009). "Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(5): 2002-2008.
- Gestetner, B., Assa, Y., Henis, Y., Tencer, Y., Rotman, M., Birk, Y., Bondi, A. (1972). "Interaction of lucerne saponins with sterols." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 270(1): 181-187.
- Gilabert-Oriol, R., Mergel, K., Thakur, M., von Mallinckrodt, B., Melzig, M. F., Fuchs, H., Weng, A. (2013). "Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(8): 2387-2395.
- Glauert, A. M., Dingle, J. T., Lucy, J. A. (1962). "Action of saponin on biological cell membranes." *Nature*, 196(4858): 953-955.
- Glensk, M., Wray, V., Nimtz, M., Schöpke, T. (1999). "Silenosides A–C, Triterpenoid Saponins from *Silene vulgaris*." *Journal of Natural Products*, 62(5): 717-721.
- Goldstein, I. J., Hayes, C. E. (1978). "The Lectins: Carbohydrate-Binding Proteins of Plants and Animals." *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 35: 127-340.
- Hall, J. E., Guyton, A. C. "Textbook of medical physiology" Elsevier Saunders, St. Louis (2006).
- Hebestreit, J. P. (2004). "Untersuchungen zum Synergismus von Saponinen und Toxinen bei *in-vitro* kultivierten Säugetierzellen." *Dissertationsschrift, Humboldt Universität Berlin*.
- Hebestreit, P., Melzig, M. F. (2003). "Cytotoxic Activity of the Seeds from *Agrostemma githago* var. *githago*." *Planta Medica*, 69(10): 921-925.
- Hebestreit, P., Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., Melzig, M. F. (2006). "Enhancement of cytotoxicity of lectins by Saponinum album." *Toxicon*, 47(3): 330-335.
- heilkraeuter.de (2013). URL: <http://www.heilkraeuter.de/lexikon/kornrade.htm> (02.10.2013)
-

- Heisler, I., Keller, J., Tauber, R., Sutherland, M., Fuchs, H. (2002). "A Colorimetric Assay for the Quantitation of Free Adenine Applied to Determine the Enzymatic Activity of Ribosome-Inactivating Proteins." *Analytical Biochemistry*, 302(1): 114-122.
- Heisler, I., Keller, J., Tauber, R., Sutherland, M., Fuchs, H. (2003). "A cleavable adapter to reduce nonspecific cytotoxicity of recombinant immunotoxins." *International Journal of Cancer*, 103(2): 277-282.
- Heisler, I., Sutherland, M., Bachran, C., Hebestreit, P., Schnitger, A., Melzig, M. F., Fuchs, H. (2005). "Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells." *Journal of Controlled Release*, 106(1–2): 123-137.
- Hikino, H., Ohsawa, T., Kiso, Y., Oshima, Y. (1984). "Analgesic and antihepatotoxic actions of dianosides, triterpenoid saponins of *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* Herbs." *Planta Medica*, 50(4): 353-355.
- Hu, J., Lu, Y. (2009). "Study on the situation, problems and countermeasures of low-rent house's financing channels in China." *China Real Estate Finance*, 8: 12-14.
- Hu, M., Konoki, K., Tachibana, K. (1996). "Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins." *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1299(2): 252-258.
- Ikonen, E. (2008). "Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2): 125-138.
- Invitrogen (2005). URL: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp21486.pdf> (31.07.2013)
- Jain, M. K., Wagner, R. C. "Introduction to Biological Membranes" Wiley & Sons, New York (1980).
- Kim, Y. C., Higuchi, R., Komori, T. (1992). "Thermal Degradation of Glycosides. VII. Application of Hydrothermolysis to the Studies on the Constituents of the Merck Saponin." *Liebigs Annalen der Chemie*, 1992(9): 941-946.
- Kolodziejcki, I. J., Stecka, L. (1965). "Occurrence of saponins in various parts of *Gypsophila paniculata* and *Gypsophila altissima*." *Farmacja Polska*, 21: 751-754.
- Konjević, G., Jurišić, V., Spužić, I. (1997). "Corrections to the original lactate dehydrogenase (LDH) release assay for the evaluation of NK cell cytotoxicity." *Journal of Immunological Methods*, 200(1–2): 199-201.
- Kostyuk, P. G., Krishtal, O. A., Pidoplichko, V. I. (1972). "Potential-dependent membrane current during the active transport of ions in snail neurones." *The Journal of Physiology*, 226(2): 373-392.
- Krüss (2013). URL: <http://www.kruss.de/de/theorie/messungen/oberflaechenspannung/plattenmethode.html> (15.10.2013)
-

- Kuroda, M., Mimaki, Y., Kameyama, A., Sashida, Y., Nikaido, T. (1995). "Steroidal saponins from *Allium chinense* and their inhibitory activities on cyclic AMP phosphodiesterase and Na⁺K⁺ ATPase." *Phytochemistry*, 40(4): 1071-1076.
- Labarca, C., Paigen, K. (1980). "A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure." *Analytical Biochemistry*, 102(2): 344-352.
- Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H. (2000). "Bioactive saponins from plants: An update." *Studies in Natural Products Chemistry, Volume 21, Part B*: 633-687.
- Liang, S.-M., Winter, C. G., Pattillo, F. M. (1976). "The measurement of ouabain binding and some related properties of digitonin-treated (Na⁺, K⁺)-ATPase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 452(2): 552-565.
- Liu, Z., Gao, W., Jing, S., Zhang, Y., Man, S., Wang, Y., Zhang, J., Liu, C. (2013). "Correlation among cytotoxicity, hemolytic activity and the composition of steroidal saponins from *Paris L.*" *Journal of Ethnopharmacology*, 149(2): 422-430.
- Luo, J.-G., Liu, J., Kong, L.-Y. (2008a). "New Pentacyclic Triterpenes from *Gypsophila oldhamiana* and Their Biological Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors." *Chemistry & Biodiversity*, 5(5): 751-757.
- Luo, J. G., Ma, L., Kong, L. Y. (2008b). "New triterpenoid saponins with strong α -glucosidase inhibitory activity from the roots of *Gypsophila oldhamiana*." *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(6): 2912-2920.
- Marston, A., Gafner, F., Dossaji, S. F., Hostettmann, K. (1988). "Fungicidal and molluscicidal saponins from *Dolichos kilimandscharicus*." *Phytochemistry*, 27(5): 1325-1326.
- Mathews, F. P. (1933). "Toxicity of *Drymaria pachyphylla* for cattle, sheep and goats." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 36: 255-260.
- Mathias, G., Marx, D. (2007). "Structures and spectral signatures of protonated water networks in bacteriorhodopsin." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17): 6980-6985.
- Mc Anuff, M. A., Harding, W. W., Omoruyi, F. O., Jacobs, H., Morrison, E. Y., Asemota, H. N. (2005). "Hypoglycemic effects of steroidal saponins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*." *Food and Chemical Toxicology*, 43(11): 1667-1672.
- medizinalpflanzen.de (2008). URL: http://www.medizinalpflanzen.de/systematik/6_droge/ginseng.htm (27.09.2013)
- Melzig, M. F., Bader, G., Loose, R. (2001). "Investigations of the Mechanism of Membrane Activity of Selected Triterpenoid Saponins." *Planta Med*, 67(01): 43-48.
- Melzig, M. F., Hebestreit, P., Gaidi, G., Lacaille-Dubois, M. A. (2005). "Structure-Activity-Relationship of Saponins to Enhance Toxic Effects of Agrostin." *Planta Medica*, 71(EFirst): 1088-1090.
- Meyer, T., Scheidt, H. A., Thomas, L., Huster, D. (2012). "Cholesterol-Analoga für die Forschung - nichts ist wie das Original!" *BIOspektrum*, 18(2): 4.
-

- Mimaki, Y., Satou, T., Kuroda, M., Sashida, Y., Hatakeyama, Y. (1998). "New steroidal constituents from the bulbs of *Lilium candidum*." *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 46(11): 1829-1832.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Mouritsen, O. G., Zuckermann, M. J. (2004). "What's so special about cholesterol?" *Lipids*, 39(11): 1101-1113.
- Mukherjee, S., Zha, X., Tabas, I., Maxfield, F. R. (1998). "Cholesterol Distribution in Living Cells: Fluorescence Imaging Using Dehydroergosterol as a Fluorescent Cholesterol Analog." *Biophysical Journal*, 75(4): 1915-1925.
- Nishikawa, M., Nojima, S., Akiyama, T., Sankawa, U., Inoue, K. (1984). "Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol." *Journal of Biochemistry*, 96(4): 1231-1239.
- Nygren, P., Fridborg, H., Csoka, K., Sundström, C., De La Torre, M., Kristensen, J., Bergh, J., Hagberg, H., Glimelius, B., Rastad, J., Tholander, B., Larsson, R. (1994). "Detection of tumor-specific cytotoxic drug activity *in-vitro* using the fluorometric microculture cytotoxicity assay and primary cultures of tumor cells from patients." *International Journal of Cancer*, 56(5): 715-720.
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., Kitano, H. (2005). "A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling." *Mol Syst Biol*, 1.
- Okabe, H., Nagao, T., Hachiyama, S., Yamauchi, T. (1989). "Studies on the Constituents of *Luffa operculata* Cogn. II. Isolation and Structure Elucidation of Saponins in the Herb." *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 37(4): 895-900.
- Oleszek, W., Jurzysta, M., Górski, P. M. (1992). "*Alfalfa* saponins - the allelopathic agents." *Allelopathy*: 151-167.
- Pabbuwe, M., Stewart, K., Chaudhuri, J. (2005). "A Comparison of Colorimetric and DNA Quantification Assays for the Assessment of Meniscal Fibrochondrocyte Proliferation in Microcarrier Culture." *Biotechnology Letters*, 27(19): 1451-1455.
- Podolak, I., Galanty, A., Sobolewska, D. (2010). "Saponins as cytotoxic agents: A review." *Phytochemistry Reviews*, 9(3): 425-474.
- Polito, L., Bortolotti, M., Farini, V., Battelli, M. G., Barbieri, L., Bolognesi, A. (2009). "Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(5): 1055-1061.
- Rajasekaran, M., Nair, A. G. R., Hellstrom, W. J. G., Sikka, S. C. (1993). "Spermicidal activity of an antifungal saponin obtained from the tropical herb *Mollugo pentaphylla*." *Contraception*, 47(4): 401-412.
-

- Rhiouani, H., Lyoussi, B., Settaf, A., Cherrah, Y., Hassar, M. (2001). "Antihypertensive effect of *Herniaria glabra* saponins in the spontaneously hypertensive rat." *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 59(3): 211-214.
- Ring, P., Björkman, U., Ekholm, R. (1987). "Effect of cooling on intracellular transport and secretion of thyroglobulin." *Cell and Tissue Research*, 247(3): 505-513.
- Roche (2011). URL: https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/04744934001_en_05.pdf (26.04.2013)
- Röschlau, P., Bernt, E., Gruber, W. (1974). "Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum." *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 12: 403-407.
- Royal Botanical Gardens, KEW (2013). URL: <http://data.kew.org/cgi-bin/vpfg1992/genlist.pl?CARYOPHYLLACEAE> (09.09.2013)
- Rudnicki, J., Olszewski, R., Jagiello, R., Linkiewicz, K., Maldachowska, E., Wierzbicka, J., Gaik, C. (1990). "Hair shampoo containing natural saponins." *Warszawskie Zakłady Zielarskie*: 6.
- Schlösser, E. (1969). "Interaction of saponins with cholesterol, lecithin, and albumin." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 47(5): 487-490.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. (1988). "Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines." *Cancer Research*, 48(17): 4827-4833.
- Sharma, A., Sati, S. C., Sati, O. P., Sati, M. D., Kothiyal, S. K., Semwal, D. K., Mehta, A. (2013). "A New Triterpenoid Saponin and Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract from *Sapindus mukorossi* Gaertn." *Journal of Chemistry*, 2013: 5.
- Sharon, N., Lis, H. (2013). "Lectins." *Encyclopedia of Biological Chemistry*: 701-705.
- Siepmann, C., Bader, G., Hiller, K., Wray, V., Domke, T., Nimtz, M. (1998). "New Saponins from the Seeds of *Agrostemma githago* var. *githago*." *Planta Med*, 64(02): 159-164.
- Sigma-Aldrich (2009). URL: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/cs0740bul.pdf> (10.05.2013)
- Sigma-Aldrich (2011). URL: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/lysiso1bul.Par.0001.File.tmp/lysiso1bul.pdf> (10.05.2013)
- Silva, G. M. (2005). "A New Steroidal Saponin from *Agave brittoniana* and Its Biphaseic Effect on the Na⁺-ATPase Activity." *Zeitschrift für Naturforschung : Section C*, 60(1): 121.
- Simões, C. M. O., Amoros, M., Girre, L. (1999). "Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins." *Phytotherapy Research*, 13(4): 323-328.
- Singer, S. J., Nicolson, G. L. (1972). "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes." *Science*, 175(4023): 720-731.
-

- Southeeswaran, S., Kenchington, W. (1989). "Hemolysis test for saponins: A caution." *Journal of Chemical Education*, 66(12): 1058.
- Stiftung Naturschutz Hamburg (2006). URL: <http://www.stiftung-naturschutz-hh.de/blume/2003.htm> (02.10.2013)
- Stirpe, F. (2013). "Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins." *Toxicon*, 67: 12-16.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., Villanueva, Á. (2012). "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets." *Acta Histochemica*, 114(8): 785-796.
- Strober, W. "Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability." in "Current Protocols in Immunology" John Wiley & Sons, Hoboken (2001).
- Süddeutsche.de (2013). URL: <http://www.sueddeutsche.de/wirtschaft/waschnuesse-sauberes-gewissen-1.289359> (09.09.2013)
- Sun, X. (2008). "Chinese medical nasal smelling powder for treating pain." *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*: 10.
- Tanaka, Y., Yano, S., Okada, K., Ishikawa, T., Himeno, M., Kato, K. (1990). "Lysosomal acid phosphatase is transported via endosomes to lysosomes." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 166(3): 1176-1182.
- Thakur, M., Mergel, K., Weng, A., von Mallinckrodt, B., Gilabert-Oriol, R., Dürkop, H., Melzig, M. F., Fuchs, H. (2013a). "Targeted tumor therapy by epidermal growth factor appended toxin and purified saponin: An evaluation of toxicity and therapeutic potential in syngeneic tumor bearing mice." *Molecular Oncology*, 7(3): 475-483.
- Thakur, M., Weng, A., Pieper, A., Mergel, K., von Mallinckrodt, B., Gilabert-Oriol, R., Görick, C., Wiesner, B., Eichhorst, J., Melzig, M. F., Fuchs, H. (2013b). "Macromolecular interactions of triterpenoids and targeted toxins: Role of saponins charge." *International Journal of Biological Macromolecules*, 61(0): 285-294.
- The Plant List (2013). URL: <http://www.theplantlist.org/browse/A/Caryophyllaceae/> (05.09.2013)
- Tschesche, R., Schulze, H. (1974). "Triterpene. XXX. Über das Hauptsaponin der Kornrade (*Agrostemma githago* L.)." *Chemische Berichte*, 107(8): 2710-2719.
- Tu, P., Cai, S., Ma, Z., Li, Y., Jiang, Y., Chen, J., Xue, J. (2007). "New formulations of traditional Chinese medicine for treating respiratory diseases." *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*: 13.
- van Damme, E. J. M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandenbussche, F., Desmyter, S., Rougé, P., Peumans, W. J. (2001). "Ribosome-Inactivating Proteins: A Family of Plant Proteins That Do More Than Inactivate Ribosomes." *Critical Reviews in Plant Sciences*, 20(5): 395-465.
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A., Gruppen, H. (2007). "Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom." *Phytochemistry*, 68(3): 275-297.
-

- Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Le Men-Olivier, L. (2002). "Structure-activity relationships of haemolytic saponins." *Pharmaceutical Biology*, 40(4): 253-262.
- Wang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Zhu, S., Li, Y., Li, M., Yu, B. (2007). "Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins." *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(7): 2528-2532.
- Weng, A. (2009). "Untersuchungen zur Wirkung von Saponinen als Verstärker der Penetration von Proteinen im Zellmodell." Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.
- Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H., Krause, E., Stephanowitz, H., Melzig, M. F. (2009). "Enhancement of saporin cytotoxicity by *Gypsophila* saponins--more than stimulation of endocytosis." *Chemico-biological Interactions*, 181(3): 424-429.
- Weng, A., Jenett-Siems, K., Görick, C., Melzig, M. F. (2008). "Enhancement of cytotoxicity of ribosome-inactivating-protein type I by saponinum album is not based on stimulation of phagocytosis." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(7): 925-930.
- Weng, A., Jenett-Siems, K., Schmieder, P., Bachran, D., Bachran, C., Görick, C., Thakur, M., Fuchs, H., Melzig, M. F. (2010). "A convenient method for saponin isolation in tumour therapy." *Journal of Chromatography B*, 878(7-8): 713-718.
- Weng, A., Thakur, M., Beceren-Braun, F., Gilabert-Oriol, R., Böttger, S., Melzig, M. F., Fuchs, H. (2012a). "Synergistic interaction of triterpenoid saponins and plant protein toxins." *Planta Medica*, 78(11): CL36.
- Weng, A., Thakur, M., Schindler, A., Fuchs, H., Melzig, M. F. (2011). "Liquid-chromatographic profiling of Saponinum album (Merck)." *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(10): 744-746.
- Weng, A., Thakur, M., von Mallinckrodt, B., Beceren-Braun, F., Gilabert-Oriol, R., Wiesner, B., Eichhorst, J., Böttger, S., Melzig, M. F., Fuchs, H. (2012b). "Saponins modulate the intracellular trafficking of protein toxins." *Journal of Controlled Release*, 164(1): 74-86.
- Wikipedia (2013). URL: <http://de.wikipedia.org/wiki/Synergie> (27.09.2013)
- Williams, M. C. (1978). "Toxicity of saponins in *Alfombrilla* (*Drymaria arenarioides*)." *Journal of Range Management*, 31: 182-184.
- Yang, D., Xie, C., Yang, H., Dai, Y., Li, X., Ji, D. (2009). "Cosmetics shampoo composition containing tea saponins." *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*: 6.
- Yeagle, P. L. (1985). "Cholesterol and the cell membrane." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 822(3-4): 267-287.
- Yu, D., Li, W., Zhu, H., Jia, J. (2008). "Chinese medical formulation for treating arrhythmia and its preparation." *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*: 11.
- Zibareva, L., Volodin, V., Saatov, Z., Savchenko, T., Whiting, P., Lafont, R., Dinan, L. (2003). "Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae." *Phytochemistry*, 64(2): 499-517.
-

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.** Strukturformeln häufig vorkommender Aglyka von Saponinen in den Caryophyllaceae.
- Abb. 2.** Botanische Zeichnung von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 3.** SA1641, isoliert aus Saponinum album
- Abb. 4.** Darstellung des bekannten Mechanismus der synergistischen Zytotoxizität von Saponinen und RIP-I
- Abb. 5.** Schematische Darstellung der Tertiär- bzw. Quartärstruktur von RIP-I und RIP-II
- Abb. 6.** *Gypsophila oldhamiana* MIQ.
- Abb. 7.** *Gypsophila pacifica* KOM.
- Abb. 8.** *Gypsophila arrostii* GUSS.
- Abb. 9.** *Agrostemma githago* L.
- Abb. 10.** *Saponaria officinalis* L.
- Abb. 11.** *Silene vulgaris* L.
- Abb. 12.** *Vaccaria hispanica* (MILL.) RAUSCHERT
- Abb. 13.** MTT und Formazan
- Abb. 14.** Strukturformel von Hoechst 33258
- Abb. 15.** Excitations- und Emissionsspektrum von Hoechst 33258 nach Bindung an dsDNA
- Abb. 16.** Schematische Darstellung der Formazanbildung beim LDH-Assay
- Abb. 17.** Absorptionsspektrum des entstehenden Formazans des LDH-Assays
- Abb. 18.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 19.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Wurzeln von *Gypsophila arrostii* GUSS.
- Abb. 20.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Wurzeln von *Gypsophila oldhamiana* MIQ.
- Abb. 21.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Wurzeln von *Gypsophila pacifica* KOM.
- Abb. 22.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Samen von *Saponaria officinalis* L.
- Abb. 23.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Samen von *Silene vulgaris* (MOENCH) GARCKE
- Abb. 24.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum eines Extraktes aus Samen von *Vaccaria hispanica* (MILL.) RAUSCHERT
- Abb. 25.** HPLC-Chromatogramm von Saponinum album (Ch. 9011721)
- Abb. 26.** HPLC-Chromatogramm von Saponinum album (Ch. 8034086)
- Abb. 27.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von SA1657 (m/z 1657,72), isoliert aus Saponinum album (Ch. 8034086)
- Abb. 28.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von SA1641 (m/z 1641,73), isoliert aus Saponinum album (Ch. 8034086)
-

- Abb. 29.** Struktur von SA1657, isoliert aus Saponinum album
- Abb. 30.** HPLC-Chromatogramm eines Extraktes aus *Agrostemma githago* L.
- Abb. 31.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von AG1 (m/z 1541,68), isoliert aus einem Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 32.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von AG2 (m/z 1687,72 und m/z 843,36), isoliert aus einem Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 33.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von AG3 (m/z 1525,68), isoliert aus einem Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 34.** (-)-ESI-TOF-MS-Spektrum von AG4 (m/z 1657,72), isoliert aus einem Extrakt aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 35.** Struktur von AG1, isoliert aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 36.** Struktur von AG2, isoliert aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 37.** Struktur von AG3, isoliert aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 38.** Struktur von AG4, isoliert aus Samen von *Agrostemma githago* L.
- Abb. 39.** Zytotoxizität von Saporin auf ECV-304-Zellen, allein und in Kombination mit 5 µg/mL SA1641 bzw. 1,5 µg/mL Saponinum album
- Abb. 40.** Zytotoxizität von Saponinum album auf ECV-304-Zellen, allein und in Kombination mit 1 nM Saporin
- Abb. 41.** R_x: Struktur des Restes in den Verbindungen NP-017676 und NP-017677 in Tabelle 9
- Abb. 42.** Zytotoxizität von AG2 auf ECV-304-Zellen, allein und in Kombination mit 1 nM Saporin oder 1 nM Agrostin
- Abb. 43.** Zytotoxizität von Saporin-EGF auf NIH-3T3/HER14-Zellen, allein und in Kombination mit 5 µg/mL SA1641 bzw. 1,5 µg/mL Saponinum album
- Abb. 44.** Konzentrationsabhängige ³H-Cholesterolaufnahme in ECV-304-Zellen unter Kühlung auf 0 °C
- Abb. 45.** Kompetitive konzentrationsabhängige ³H-Cholesterolaufnahme ohne Kühlung unter 10-fachem bzw. 100-fachem Zusatz nicht-radioaktiven Cholesterols der Konzentration von ³H-Cholesterol oder ohne Zusatz
- Abb. 46.** Zeitabhängige ³H-Cholesterolaufnahme in ECV-304-Zellen
- Abb. 47.** Zeitabhängige Änderung der ³H-Cholesterolkonzentration im Zellkultur-medium
- Abb. 48.** Beeinflussung der ³H-Cholesterolaufnahme und -freisetzung durch membranaktive Saponine
- Abb. 49.** Beeinflussung der ³H-Cholesterolaufnahme und -freisetzung durch membraninaktive Saponine
- Abb. 50.** Vergleich zwischen der Beeinflussung des Cholesterolgehalts von Zytoplasmamembranen und Endosomenmembranen durch SA1641
-

-
- Abb. 51.** Vergleich der, mit dem in der Arbeit verwendeten Zellsystem, ermittelten GI_{50} -Werte von Saporin durch zwei verschiedene Auswertungsmethoden
- Abb. 52.** Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität. Bezogen auf IC_{50} -Werte zur Zytotoxizitätsquantifizierung ergeben beiden Methoden Ergebnisse gleicher Größenordnung
- Abb. 53.** Auswertung der Zytotoxizitätstestung von Saponinen und der synergistischen Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I durch Saponine
- Abb. 54** Darstellung der essentiellen Strukturmerkmale, die eine ausgeprägte synergistische Zytotoxizitätsverstärkung von RIP-I ermöglichen bei geringer nicht kombinierter Zytotoxizität des Saponins
- Abb. 55.** Streudiagramm zur Korrelation zwischen Membrantoxizität und Oberflächenspannungsverringerng
-

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1.** Auflistung der Aglyka und Anzahl der Zuckerreste der (triterpenoiden) Saponine und aller Gattungen der Caryophyllaceae
- Tab. 2.** Arten der Caryophyllaceae, für welche das Vorkommen von RIP beschrieben wurde
- Tab. 3.** NMR-spektroskopische Daten von SA1657
- Tab. 4.** NMR-spektroskopische Daten von AG1
- Tab. 5.** NMR-spektroskopische Daten von AG2
- Tab. 6.** NMR-spektroskopische Daten von AG3
- Tab. 7.** NMR-spektroskopische Daten von AG4
- Tab. 8.** Untersuchte Extrakte aus Drogenteilen der angegebenen Stammpflanzen und Saponinum album
- Tab. 9.** Saponine mit Oleanangrundgerüst, Zuckerverknüpfungen an C-3 und C-28
- Tab. 10.** Saponine ohne Oleanangrundgerüst, Zuckerverknüpfungen an anderen Positionen
- Tab. 11.** Membran- und Oberflächenspannungsuntersuchungen
- Tab. 12.** Beeinflussung der ^3H -Cholesterolaufnahme und -freisetzung durch Saponine
-

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften:

S. Böttger, M. F. Melzig. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. *Phytochemistry Letters* (2011), 4 (2): 59-68.

M. Thakur, A. Weng, D. Bachran, S.B. Riese, **S. Böttger**, M. F. Melzig, H. Fuchs. Electrophoretic isolation of saponin fractions from *Saponinum album* and their evaluation in synergistically enhancing the receptor-specific cytotoxicity of targeted toxins. *Electrophoresis* (2011), 32: 3085-3089.

S. Böttger, K. Hofmann, M. F. Melzig. Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation? *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2012), 20: 2822-2828.

A. Weng, M. Thakur, B. von Mallinckrodt, F. Beceren-Braun, R. Gilibert-Oriol, B. Wiesner, J. Eichhorst, **S. Böttger**, M. F. Melzig, H. Fuchs. Saponins modulate the intracellular trafficking of protein toxins. *Journal of Controlled Release* (2012), 164 (1): 74-86.

L. A. Tapondjou, K. Jenett-Siems, **S. Böttger**, M. F. Melzig. Steroidal saponins from the flowers of *Dioscorea bulbifera* var. *sativa*. *Phytochemistry* (2013), 95: 341-350

S. Böttger, E. Westhof, K. Siems, M. F. Melzig. Structure-activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I). *Toxicon* (2013), 73: 144-150.

S. Böttger, M. F. Melzig. The influence of saponins on cell membrane cholesterol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2013), 21 (22): 7118-7124.

Poster:

S. Böttger, M. F. Melzig. Triterpenoid saponins of the plant-families Caryophyllaceae and Illecebraceae. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG), Landesgruppe Berlin-Brandenburg: „Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor.“ Berlin, 2. Juli 2010

S. Böttger, M. F. Melzig. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research and the 7th Tannin Conference. Berlin, 29. August - 2. September 2010

S. Böttger, M. F. Melzig. New results on saponins and saponin-rich plant-extracts enabling synergistic cytotoxicity with type-I-RIPs / lectins. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Antalya, Türkei, 4. - 9. September 2011

S. Böttger, M. F. Melzig. The synergistic toxicity of saponins and saponin-rich plant-extracts with type-I-RIPs / lectins. Joint Meeting of the Austrian and German Pharmaceutical Societies. Innsbruck, Österreich, 20. - 23. September 2011

K. Hofmann, **S. Böttger**, M. F. Melzig. Investigations on the surface activity of saponins. Joint Meeting of the Austrian and German Pharmaceutical Societies. Innsbruck, Österreich, 20. - 23. September 2011

S. Böttger, E. Westhof, M. F. Melzig. Saponins enabling synergistic cytotoxicity with type-I-RIPs / lectins and the structural requirements. Phytotherapeutika in der aktuellen Forschung: Phytochemie, Pharmakologie und klinische Anwendungen. 3. Young Researcher Meeting. Münster, 2. - 3. März 2012

S. Böttger, E. Westhof, M. F. Melzig. The investigation of structural requirements for saponins to enable synergistic cytotoxicity with type-I-RIP / lectins. ICNPR - International Congress on Natural Products Research - 2012. New York City, New York, USA, 28. Juli - 1. August 2012

S. Böttger, M. F. Melzig. The influence of saponins on the cell membrane-cholesterol. DPhG-Jahrestagung 2012. Greifswald, 11. - 13. Oktober 2012

S. Böttger, E. Westhof, M. F. Melzig. The synergistic cytotoxicity of saponins and lectins / ribosome-inactivating proteins type I. DPhG-Doktorandentagung 2012. Weimar, 14. - 17. November 2012

S. Böttger, K. Jenett-Siems, M. F. Melzig. Four new triterpenoid bisdesmosidic saponins from *Agrostemma githago* L. (corn cockle). 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Münster, 1. - 4. September 2013

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Matthias F. Melzig, der mich durch sein stetes Interesse am Fortschritt der Arbeit und seinen fachlichen Rat in hervorragender Weise betreut hat.

Herrn Prof. Dr. Hendrik Fuchs (Charité Berlin) danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

PD Dr. Kristina Jenett-Siems (FU Berlin) möchte ich für ihre Hilfe bei der Strukturaufklärung und für die Interpretation der NMR-Spektren danken.

Dr. Dr. Thomas Heinze (Charité Berlin) danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit gab, Versuche im Zentralen Radionuklidlabor der Charité durchzuführen.

Dr. Alexander Weng (Charité Berlin) danke ich für die Einführung in die Arbeitstechniken eines Radioaktivlabors und allerlei nützliche Ratschläge und Tipps.

Dr. Regina Schenk (HU Berlin) und ihren Kollegen danke ich für die Anzucht der *Gypsophila*-Spezies.

Der AnalytiCon Discovery GmbH, Prof. Lacaille-Dubois (Universität Bourgogne) und Prof. Warashina (Universität Shizuoka) gilt mein Dank für die Bereitstellung von Saponinen. Insbesondere durch die große Zahl der von AnalytiCon Discovery zur Verfügung gestellten Saponine konnten viele Erkenntnisse dieser Arbeit erst gewonnen werden.

Cornelia Görick (FU Berlin) danke ich ganz herzlich für viele konstruktive Diskussionen und Ratschläge, ihre selbstlose Hilfe bei technischen Problemen an HPLC und HPLC-MS und ihre intensive Zusammenarbeit.

Den ehemaligen Diplomandinnen Katja Hofmann und Elena Westhof danke ich für ihre Unterstützung, ihren Fleiß und die angenehme Zusammenarbeit bei der Generierung von Daten für diese Arbeit.

Den Wahlpflichtstudenten danke ich für ihre Unterstützung bei den oft eintönigen aber wichtigen Arbeitsschritten bei der Herstellung von Extrakten und der Isolation von Saponinen.

Meinen Laborkollegen danke ich für den freundschaftlichen Umgang und die angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie danke ganz herzlich ich für ihr stetes Interesse am Fortschritt der vorliegenden Arbeit, ihren Glauben an mich und die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen.

Meiner Freundin möchte ich für den Rückhalt, den sie mir gibt und für ihre Liebe danken.

Lebenslauf

- Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten. -

Eidesstattliche Erklärung

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

Berlin, den

Stefan Böttger
