

3 Ergebnisse

3.1 Colorimetrischer Festphasenassay zum Nachweis von ADP-Ribosylierungsaktivität

Für die Entwicklung eines sensitiven und quantifizierbaren Assays für *In-vivo*-Untersuchungen von chimären Toxinen mit ADP-ribosylierenden Toxinen wie Diphtheriatoxin und *Pseudomonas* Exotoxin sollte ein colorimetrisches Festphasensystem zur Detektion entwickelt werden. Der bisher beschriebene Nachweis wird im Westernblot mit radioaktivem oder biotinyliertem NAD⁺ durchgeführt. Bei der Reaktion wird ADP-Ribose aus NAD⁺ auf EF2 übertragen und inaktiviert die Proteinbiosynthese (1.4.2.1).

3.1.1 Aufreinigung von EF2 und ^{H6}EF2

Um die ADP-Ribosylierung durch DT untersuchen zu können, musste der EF2, das Substrat für die Übertragung von ADP-Ribose durch Diphtheriatoxin und *Pseudomonas* Exotoxin, aufgereinigt werden. Die Aufreinigung wurde nach zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Die erste Methode beinhaltet eine Anreicherung des EF2 aus Weizenkeimlingen (2.3.4), wobei EF2 nach dieser Methode durch starke Proteinverunreinigungen nur einen geringen Anteil in der Lösung ausmacht (Abb. 3.1). Diese Probe war dennoch für den ADP-Ribosylierungsassay *in vitro* mit Detektion im Westernblot sehr gut geeignet, da durch die Spezifität der Reaktion eine eindeutige ADP-Ribosylierung am EF2 durch Diphtheriatoxin erfolgt. Die zweite Methode wurde durchgeführt, um möglichst reinen EF2 zu erhalten. Die hohe Reinheit des EF2 ist im Gegensatz zum Westernblot für die Durchführung im colorimetrischen Festphasenassay unerlässlich. Da die Aufreinigungen des EF2 aus den angereicherten Fraktionen der ersten Methode durch Gelfiltration oder Anionenaustauscher keinen Erfolg erbrachten, wurde der EF2 durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (2.3.3.1). Dazu wurde der Hefestamm TKY675 verwendet (2.1.7), der keinen endogenen EF2 exprimiert, sondern nur His-tag markierten EF2. Dadurch konnte ^{H6}EF2 in guter Qualität für den Festphasenassay aufgereinigt werden (Abb. 3.1).

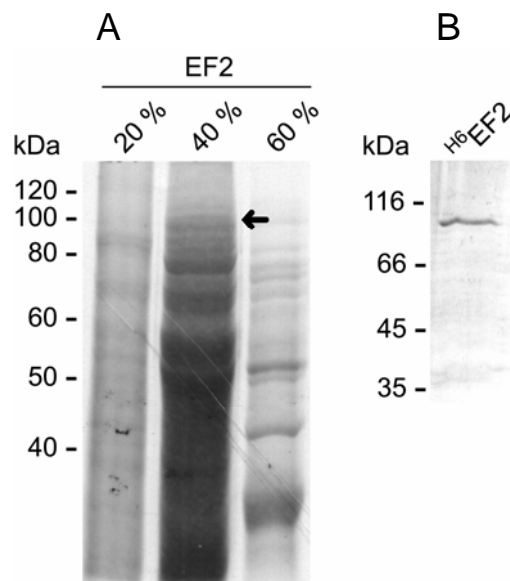


Abb. 3.1: Aufreinigung von EF2 und $^{63}\text{EF2}$. Die Proteine wurden in ihrer aufgereinigten Form nach der Dialyse durch ein 10 %iges SDS-Gel mit anschließender Coomassiefärbung analysiert. **(A)** Die drei unterschiedlichen Fraktionen der Ammoniumsulfatfällung (20 %, 40 % und 60 %) nach der Anreicherung von EF2 aus Weizenkeimlingen. Der Pfeil zeigt auf die durch Westernblot (Abb. 3.2) bestätigte EF2-Bande. **(B)** Durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigter $^{63}\text{EF2}$.

Die Aufreinigung von EF2 aus Weizenkeimlingen lieferte nach der fraktionellen Ammoniumsulfatfällung drei verschiedene Fraktionen, die jedoch alle noch sehr viele unterschiedliche Proteine beinhalten. Die Position, an der EF2 zu erkennen ist, ist mit einem Pfeil markiert (Abb. 3.1 A). EF2 hat eine molekulare Masse von 100 kDa. Eine einzelne Bande ist jedoch in diesem Bereich in keiner der drei Fraktionen erkennbar. Anschließende Aktivitätsuntersuchungen haben jedoch gezeigt, dass EF2 fast ausschließlich in der Fraktion enthalten ist, die mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt wurde. In dieser Fraktion ist jedoch auch der Großteil anderer Proteine der Präparation vorhanden. Die Aufreinigung von reinem $^{63}\text{EF2}$ mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie war sehr erfolgreich. Auf dem Coomassiegel ist nur eine einzige deutliche Bande bei 100 kDa zu erkennen.

Der EF2 in der angereicherten Fraktion aus Weizenkeimlingen konnte nach der abschließenden Dialyse problemlos über lange Zeiträume in Puffer 2 (2.3.4) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Der durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigte $^{63}\text{EF2}$ erwies sich als leicht degradierbar. In allen Puffern der Elution musste zwingend PMSF zugesetzt sein, anderenfalls wurde das Protein innerhalb weniger Tage fast vollständig degradiert. Das Aufkonzentrieren von $^{63}\text{EF2}$ mit Amicon-Säulen war auch nicht möglich, da das Protein offensichtlich zu stark mit den Filtermembranen interagiert und damit der Verlust an Protein sehr groß war. Daher wurde $^{63}\text{EF2}$ durch Dialyse gegen Polyethylenglycol 20 000 aufkonzentriert (2.3.8). Der Zusatz von Dithiothreitol zu allen Puffern war ebenfalls essentiell, um die Aktivität von $^{63}\text{EF2}$ zu erhalten. Lediglich bei der

Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde 2-Mercaptoethanol verwendet. Schließlich konnte der aufgereinigte $^{\text{H}6}\text{EF2}$ auch nicht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden, da das zu erheblichen Proteinverlusten durch Präzipitation beim Auftauen führte. Daher wurde das Protein immer bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, wobei nach etwa drei Wochen dennoch ein Aktivitätsverlust des Proteins feststellbar war.

3.1.2 Nachweis der ADP-Ribosylierung *in vitro* an EF2 und $^{\text{H}6}\text{EF2}$

Als positive Kontrolle für die ADP-Ribosylierung *in vitro* (2.4.1) wurde der angereicherte EF2 aus Weizenkeimlingen verwendet (durch 40 % Ammoniumsulfat gefällte Fraktion). Die *In-vitro*-ADP-Ribosylierung von $^{\text{H}6}\text{EF2}$ im Westernblot (2.4.1 und 2.3.7) diente der Bestätigung, dass die ADP-Ribosylierung auch mit $^{\text{H}6}\text{EF2}$ durchzuführen war (Abb. 3.2).

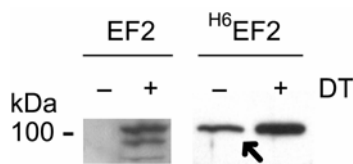


Abb. 3.2: *In-vitro*-ADP-Ribosylierung von EF2 und $^{\text{H}6}\text{EF2}$ durch DT. EF2 und $^{\text{H}6}\text{EF2}$ wurden mit 1 ng DT zusammen mit biotinyliertem NAD^+ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Westernblot und Immunodetektion mit GABiotin und RAG der markierte EF2 nachgewiesen. Der Pfeil zeigt auf den EF2, der auch ohne Inkubation mit DT im Westernblot und anschließender Immunodetektion nachgewiesen wurde. Die Analyse erfolgte auf einem 10 %igem SDS-Gel.

Bei dem aus Weizenkeimlingen aufgereinigten EF2 (Abb. 3.2 links) ist die Bande des ADP-ribosylierten EF2 deutlich zu erkennen. In der Spur daneben wurde eine Kontrolle aufgetragen, in der ein Ansatz ohne DT durchgeführt wurde. In dieser Probe sind keine Banden zu erkennen. Der hohe Grad an Verunreinigungen durch andere Proteine stört bei der spezifischen Reaktion der ADP-Ribosylierung durch DT offensichtlich nicht. In dem Ansatz von EF2 mit DT wurden noch zwei weitere etwas kleinere Proteine markiert. Bei diesen Proteinen handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte von EF2, die jedoch immer noch ADP-ribosyliert werden können. Der sehr sauber aufgereinigte $^{\text{H}6}\text{EF2}$ (Abb. 3.2 rechts) konnte ebenfalls erfolgreich ADP-ribosyliert werden. Allerdings wurde bei dieser Probe auch die Kontrolle ohne DT markiert (Pfeil), wenn auch deutlich geringer. Untersuchungen zur Beseitigung dieser unspezifischen Biotinylierung sind in Abschnitt 3.1.4 beschrieben.

Nach erfolgreichem Nachweis der ADP-Ribosylierung des $^{\text{H}6}\text{EF2}$ im Westernblot konnte das System zum Nachweis der DT-Enzymaktivität auch auf den colorimetrischen Festphasenassay übertragen werden.

3.1.3 Colorimetrischer Festphasenassay zur Messung der ADP-Ribosylierung von $^{\text{H}6}\text{EF}2$

Der colorimetrische Festphasenassay zum Detektieren von DT-Aktivität wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an DT durchgeführt (2.4.3.2). Außerdem wurden noch Kontrollen ohne NAD^+ , ohne DT und ohne die beiden Reagenzien durchgeführt (Abb. 3.3).

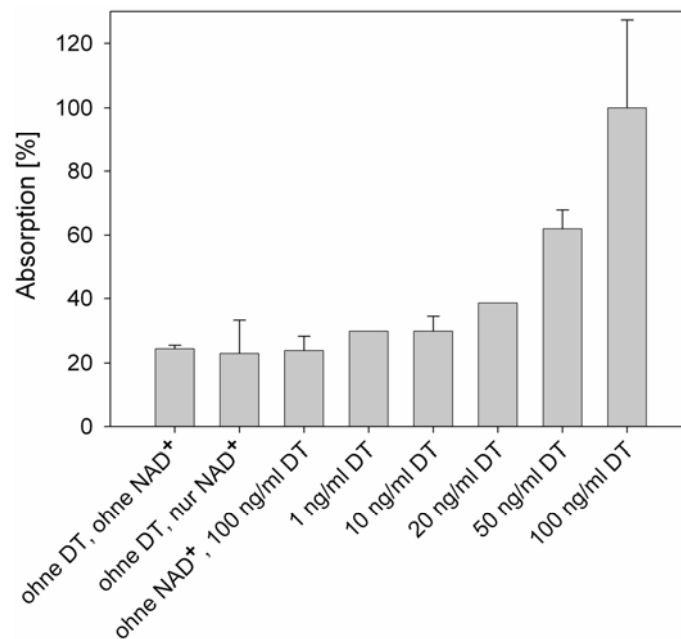


Abb. 3.3: Colorimetrischer Festphasenassay zur Messung der ADP-Ribosylierung durch DT. $^{\text{H}6}\text{EF}2$ wurde in einem Festphasenassay durch unterschiedliche DT-Konzentrationen ADP-ribosyliert. Als ADP-Ribosequelle diente biotinyliertes NAD^+ . Der biotinylierte ADP-Ribose tragende EF2 wurde durch GABiotin und RAG mit nachfolgender colorimetrischer Substratumsetzung am Mikroplatten-Photometer detektiert. Alle Reaktionen wurden 120 min bei 37 °C inkubiert. Die Antikörperkontrolle wurde ohne DT und ohne NAD^+ inkubiert, die folgenden beiden Proben jeweils entweder ohne DT oder ohne NAD^+ . Für den Aktivitätsassay wurden 1–100 ng/ml DT verwendet. Die hier gezeigten Daten sind die Mittelwerte aus zwei Messungen jeweils in Dreifachbestimmung. Um Variationen in der Dauer der Farbentwicklung zu berücksichtigen, sind die Messwerte als prozentualer Wert in Bezug auf den maximalen Wert eines Versuches dargestellt.

Anhand der Abb. 3.3 kann eindeutig die konzentrationsabhängige ADP-Ribosylierung an $^{\text{H}6}\text{EF}2$ nachgewiesen werden. Die Spezifität der Reaktion, die bereits im *In-vitro*-ADP-Ribosylierungsassay auf Westernblotbasis (3.1.2) eindeutig gezeigt wurde, wird hier durch die gezeigten Kontrollen verdeutlicht. Während alle Kontrollen etwa eine Absorption von 0,1 ergaben, kann man ab 20 ng/ml DT eine konzentrationsabhängige Erhöhung des Signals durch die an $^{\text{H}6}\text{EF}2$ erfolgte ADP-Ribosylierung erkennen. Bei 100 ng/ml liegt bereits etwa ein vierfach höheres Signal vor. Konzentrationen von 1 und 10 ng/ml DT sind jedoch nicht detektierbar, da ihre Absorption im Bereich der Hintergrundwerte der Kontrollen liegt. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen, müsste die bereits im Westernblot (3.1.2) für $^{\text{H}6}\text{EF}2$ detektierte schwache Markierung in Abwesenheit von DT

verringert werden. Dann könnten auch geringere Toxinmengen und entsprechend kleinere Signale festgestellt werden.

3.1.4 Optimierung der ADP-Ribosylierung an $^{\text{H}6}\text{EF2}$ *in vitro*

Um den Hintergrund durch die toxinunabhängige Markierung des $^{\text{H}6}\text{EF2}$ zu verhindern, wurden zwei Ideen verfolgt. Einerseits wurde dem Ansatz ein 10facher Überschuss an GTP gegenüber dem markierten NAD^+ zugesetzt, andererseits wurde die gleiche Menge oder ein 10facher Überschuss an BSA gegenüber $^{\text{H}6}\text{EF2}$ hinzugefügt (2.4.1). Da GTP an EF2 bindet, sollte dadurch eine möglicherweise unspezifisch auftretende Bindung von markiertem NAD^+ an $^{\text{H}6}\text{EF2}$ verhindert werden. BSA sollte dagegen als Akzeptor für unspezifische Bindungen auf Proteinebene fungieren (Abb. 3.4).

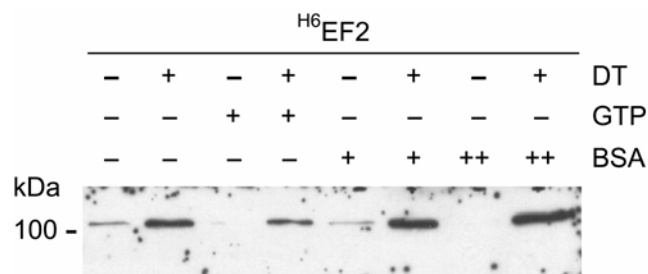


Abb. 3.4: *In-vitro*-ADP-Ribosylierung von $^{\text{H}6}\text{EF2}$ durch DT in Gegenwart von GTP und BSA. Verschiedene Ansätze mit $^{\text{H}6}\text{EF2}$ und biotinyliertem NAD^+ wurden mit und ohne 1 ng DT in Gegenwart von GTP und BSA bei 37 °C für 2 h inkubiert. Die Ansätze wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend der markierte EF2 durch einen Westernblot und Immunodetektion mit GABiotin und RAG nachgewiesen. Die Analyse erfolgte auf einem 10 %igem SDS-Gel.

Die in Abb. 3.4 dargestellte Optimierung der ADP-Ribosylierung von $^{\text{H}6}\text{EF2}$ zeigte in der ersten Spur zunächst wieder die von DT unabhängige Markierung. Der Zusatz von einem 10fachen Überschuss von GTP gegenüber 6-Biotin-17- NAD^+ konnte zwar die unspezifisch auftretende Bande ohne Inkubation mit DT verhindern, schwächte allerdings gleichzeitig die Bande des durch DT ADP-ribosylierten $^{\text{H}6}\text{EF2}$ deutlich ab, so dass der Zusatz von GTP anscheinend die gesamte Effektivität der Reaktion verringert und sich nicht auf die unspezifische Reaktion ohne DT beschränkt hat. Der Zusatz der gleichen Menge BSA wie $^{\text{H}6}\text{EF2}$ verringerte das Signal der unspezifischen Reaktion teilweise; der Zusatz der 10fachen Menge an BSA (++ in der Abb. 3.4) gegenüber $^{\text{H}6}\text{EF2}$ konnte die Bande des unabhängig von DT markierten $^{\text{H}6}\text{EF2}$ vollständig inhibieren. Gleichzeitig blieb dabei im Gegensatz zur Inkubation mit GTP das Signal der DT vermittelten Markierung unverändert. Damit zeigte sich der Zusatz eines 10fachen BSA Überschusses als effektivste Methode zur Unterdrückung der von DT unabhängigen Markierung von $^{\text{H}6}\text{EF2}$ bei Erhaltung der DT spezifischen Reaktion und wurde daher im Folgenden auch auf den Nachweis der ADP-Ribosylierung im colorimetrischen Festphasenassay angewendet werden.

3.1.5 Optimierter colorimetrischer Festphasenassay zur Messung der ADP-Ribosylierung von $^{\text{H}6}\text{EF2}$

Nach der gelungenen Beseitigung der unspezifischen Markierung von $^{\text{H}6}\text{EF2}$ durch einen 10fachen Überschuss an BSA wurde diese Optimierung auf den Festphasenassay übertragen. Dafür wurden einheitlich 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA in jeder Vertiefung eingesetzt und zusätzlich das markierte NAD^+ als Letztes zu den Ansätzen dazu gegeben, um potentielle unspezifische Reaktionen möglichst zu verhindern. Die Ergebnisse des optimierten Festphasenassays sind in Abb. 3.5 dargestellt.

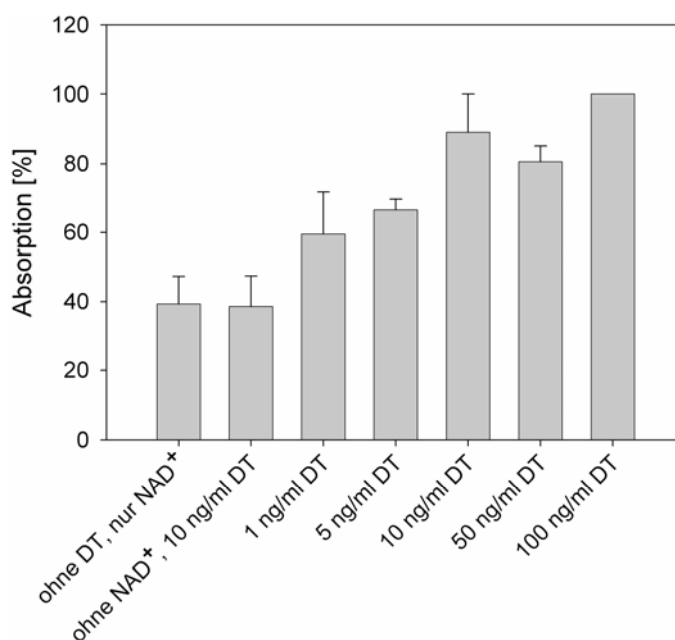


Abb. 3.5: Optimierter colorimetrischer Festphasenassay zur Messung der ADP-Ribosylierung durch DT. $^{\text{H}6}\text{EF2}$ wurde in einem Festphasenassay durch unterschiedliche DT-Konzentrationen ADP-ribosyliert. Als ADP-Ribosequelle diente biotinyliertes NAD^+ , das jedoch als Letztes dem Ansatz zugesetzt wurde. Der biotinylierte ADP-Ribose tragende EF2 wurde durch GABiotin RAG mit nachfolgender colorimetrischer Substratumsetzung am Mikroplatten-Photometer detektiert. Alle Reaktionen wurden 120 min bei 37 °C inkubiert. Die Optimierung wurde durch den Zusatz von 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA zu jedem Ansatz und die Zugabe von NAD^+ als letztes Reagens erreicht. Die Kontrollen wurden jeweils entweder ohne DT oder ohne NAD^+ inkubiert. Für den Aktivitätsassay wurden 1–100 ng/ml DT verwendet. Die hier gezeigten Daten sind die Mittelwerte aus drei Messungen jeweils in Dreifachbestimmung. Um Variationen in der Dauer der Farbentwicklung zu berücksichtigen, sind die Messwerte als prozentualer Wert in Bezug auf den maximalen Wert eines Versuches dargestellt.

Die Optimierung des Festphasenassays durch den Zusatz von BSA und das später zugegebene NAD^+ war sehr erfolgreich. Die Hintergrundwerte wurden ungefähr auf die Hälfte der Werte ohne Optimierung verringert. Wie man in Abb. 3.5 deutlich sieht, ist eine DT-Konzentration von 1 ng/ μl unter den verbesserten Bedingungen eindeutig zu detektieren. Die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion ist in der Graphik ebenfalls sehr gut zu erkennen. Der im Vergleich zur Abb. 3.3 etwa doppelt so hohe Wert für die Kontrollen ist durch die Verwendung einer älteren $^{\text{H}6}\text{EF2}$ -Charge in den hier gezeigten Versuchen zu begründen. Durch den einhergehenden Aktivitätsverlust des $^{\text{H}6}\text{EF2}$ mussten

die Proben für die Farbentwicklung länger inkubieren, wodurch auch eine relative Verschiebung der Signalintensitäten zustande kam. Der erniedrigte Wert bei 50 ng/ml könnte durch eine ab 10 ng/ml DT einsetzende Sättigung der Signale und eine gleichzeitige Streuung um diesen Sättigungswert begründet sein.

3.2 Chimäre Toxine gegen Interleukin-2 Rezeptor

Nachdem mit dem colorimetrischen Festphasenassay ein gutes Instrument zur spezifischen und quantifizierbaren Messung der Enzymaktivität von ADP-ribosylierenden Toxinen entwickelt wurde, konnte anschließend das Ziel verfolgt werden, neue chimäre Toxine gegen tumorspezifische Zielstrukturen zu entwickeln. Als tumorspezifisches Antigen wurde der IL2R gewählt (1.4.1.1).

3.2.1 Klonierung der chimären Toxine

Ziel dieser Klonierung war die Erstellung neuer chimärer Toxine zur Tumorthherapie, die Liganden enthalten, welche spezifisch an den IL2R binden sollen. Dazu wurden einerseits ein 35 Aminosäuren langes N-terminales Peptid von IL2 und vollständiges IL2 (130 Aminosäuren) verwendet und andererseits ein *single chain Fv*-Fragment eines Antikörpers gegen die α -Untereinheit des IL2R eingesetzt. Das IL2-Peptid enthält Sequenzen, für die in der Literatur eine Bindung an IL2R beschrieben wurde [46, 52, 231]. Die neuen Liganden wurden durch PCR (2.1.1.1) erstellt und dann an bestehende Konstrukte ohne Ligand durch Ligationen (2.2.10) angefügt. Zur Erläuterung sind die Klonierungen schematisch dargestellt (Abb. 3.6).

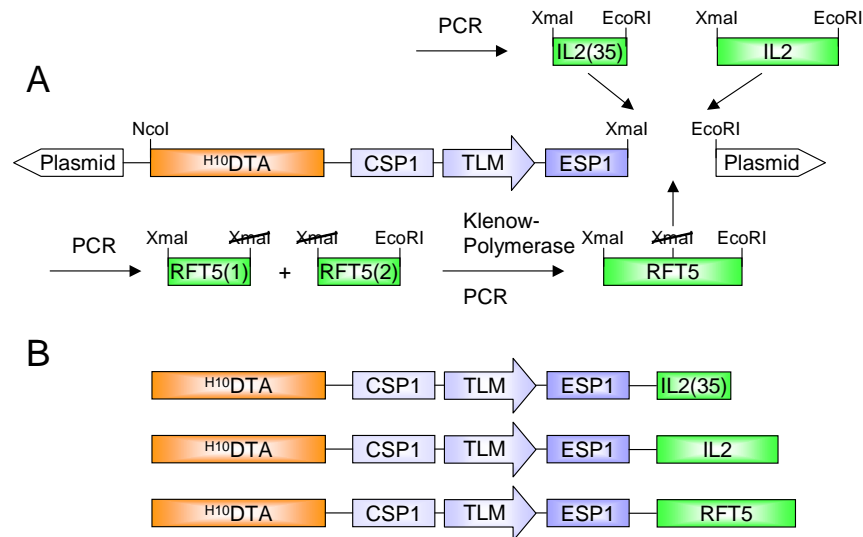


Abb. 3.6: Schematische Übersicht zur Klonierung der chimären Toxine mit Liganden für den IL2R. (A) Die durch PCR erstellten Liganden IL2(35) und IL2 wurden über XmaI und EcoRI Restriktionsverdau in ein Konstrukt ohne Ligand ligiert. Das *single chain Fv*-Fragment RFT5 wurde durch PCR in zwei Teilen (RFT5(1) und RFT5(2)) erstellt. Beide Sequenzen enthielten eine Mutation in der XmaI-Schnittstelle innerhalb von RFT5 (~~XmaI~~), die Ligationen ermöglichte, erneute Restriktion aber unterband. Durch Zusammenlagerung der beiden Teilsequenzen, Auffüllen der Einzelstränge durch Klenow-Polymerase und nachfolgender PCR wurde der vollständige RFT5 mit der inaktivierten XmaI-Schnittstelle (~~XmaI~~) erzeugt. Diese Sequenz wurde dann ebenfalls über XmaI und EcoRI in ein Konstrukt ohne Ligand ligiert. (B) Die drei klonierten chimären Toxine $H^{10}DTA$ -Ad_{TLM}-IL2(35), $H^{10}DTA$ -Ad_{TLM}-IL2 und $H^{10}DTA$ -Ad_{TLM}-RFT5 sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt.

Für die Klonierung des IL2-Peptides (IL2(35)) und des vollständigen IL2 wurde jeweils eine PCR, wie bei 2.2.1 beschrieben, mit einer Mini-Präparation des rzdpc-Klones DKFZp564B1070Q3 als Template durchgeführt. Für das IL2-Peptid mit 35 Aminosäuren wurde die Primerkombination IL2 21–55 for XmaI / IL2 21–55 rev EcoRI verwendet, für das vollständige IL2 die Primerkombination IL2 21–55 for XmaI / IL2 fl rev EcoRI. Die erhaltenen PCR-Produkte mit der erwarteten Größe wurden anschließend mit XmaI und EcoRI verdaut (2.2.7) und nach Agarosegelelektrophorese (2.2.9) mit einem gleichsam geschnittenen pLITMUS28-Vektor ligiert (2.2.10.1) (Abb. 3.6). Dieser Vektor enthielt bereits die Sequenz für $10 \times$ His-tag markiertes DTA ($H^{10}DTA$) mit Adapter, so dass folgende Konstrukte entstanden: $H^{10}DTA$ -CSP1-TLM-ESP1-IL2(35) ($H^{10}DTA$ -Ad_{TLM}-IL2(35)) und $H^{10}DTA$ -CSP1-TLM-ESP1-IL2 ($H^{10}DTA$ -Ad_{TLM}-IL2). Die Konstrukte wurden in *E. coli* DH5 α transformiert (2.2.11), die Plasmid-DNA isoliert (2.2.2), mit NcoI und EcoRI zur Analyse verdaut (2.2.7) und anschließend durch Sequenzierung (2.2.12) bestätigt.

Zur Klonierung des *single chain Fv*-Fragmentes des Antikörpers gegen IL2R (RFT5) musste zuvor eine XmaI-Schnittstelle innerhalb der Sequenz von RFT5 mutiert werden. Das wurde durch die Kombination von zwei PCRs erreicht (Abb. 3.6). Der Vektor RFT5pcDNA3 diente für beide PCRs als Template, bei denen folgende Primerkombinationen verwendet wurden: RFT5 XmaI for / RFT5 XmaI mut. rev und RFT5 XmaI mut.

for / RFT5 EcoRI rev (2.2.1). Mit der ersten PCR wurde das erste Teilstück von RFT5 bis zur zu mutierenden XmaI-Schnittstelle amplifiziert, mit der zweiten PCR wurde der Rest von RFT5 amplifiziert. Dabei wurde die Mutation der XmaI-Schnittstellen durch die Primer RFT5 XmaI mut. rev und RFT5 XmaI mut. for durch den Austausch eines Guanosins zu einem Thymin bereits bei dieser PCR erreicht. Um nun die beiden Teilstücke zu verbinden, wurden die PCR-Produkte vereinigt, auf 96 °C erhitzt und durch Eiswasser schnell abgekühlt. Dabei konnten sich DNA-Stränge, die den ersten Teil von RFT5 enthielten mit solchen verbinden, die den zweiten Teil enthielten, da sie mit den XmaI-Überhängen eine komplementäre Sequenz besaßen. Diese Stränge wurden durch Klenow-Polymerase aufgefüllt (2.2.4). Um sicherzustellen, dass die vollständige Sequenz von RFT5 erstellt wurde, wurde eine Ligation durchgeführt (2.2.10.1) und anschließend eine PCR mit den Primern RFT5 XmaI for / RFT5 EcoRI rev durchgeführt (2.2.1). Da das Amplifikat noch keine eindeutige Bande ergab, wurde die schwache Bande des Amplifikates nach Agarosegelelektrophorese eluiert (2.2.9) und als Template für die gleiche PCR verwendet. Die danach erhaltene Bande der richtigen Größe wurde durch das »TOPO TA Cloning Kit« ligiert (2.2.10.2), in *E. coli* DH5 α transformiert (2.2.11), die Plasmid-DNA isoliert (2.2.2) und durch XmaI und EcoRI verdaut (2.2.7). Da durch XmaI keine Spaltung der RFT5-Sequenz erfolgte, war die Mutation der Schnittstelle erfolgreich verlaufen. Nach Agarosegelextraktion (2.2.9) wurde die Sequenz von RFT5 mit einem gleichsam geschnittenen pLITMUS28-Vektor ligiert (2.2.10.1). Dieser Vektor enthielt bereits die Sequenz für ^{H10}DTA mit Adapter, so dass folgendes Konstrukt entstand: ^{H10}DTA-CSP1-TLM-ESP1-IL2 (^{H10}DTA-Ad_{TLM}-RFT5). Das Konstrukt wurde in *E. coli* DH5 α transformiert (2.2.11), die Plasmid-DNA isoliert (2.2.2), mit NcoI und EcoRI zur Analyse verdaut (2.2.7) und anschließend durch Sequenzierung (2.2.12) bestätigt.

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden alle Konstrukte aus pLITMUS28 über NcoI und EcoRI ausgeschnitten und in pET11d ligiert. Die Ligationsansätze wurden dann in *E. coli* DH5 α transformiert, die Plasmide isoliert sowie durch NcoI und EcoRI die erfolgreiche Ligation überprüft. Zum Schluss wurden die Konstrukte für die Expression in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS transformiert.

3.2.2 Expression und Aufreinigung der chimären Toxine

Die Proteine ^{H10}DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), ^{H10}DTA-Ad_{TLM}-IL2 und ^{H10}DTA-Ad_{TLM}-RFT5 wurden wie unter 2.3.1 beschrieben exprimiert und denaturierend über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (2.3.3.2). Nach erfolgter Renaturierung der Proteine durch Dialyse wurden die Proteine aufkonzentriert (2.3.8) und die Proteinkonzentrationen ermittelt (2.3.9). Zur Bestätigung der bestimmten Konzentrationen und um die Qualität der Proteine beurteilen zu können, wurde 1 μ g BSA als Vergleich zu jeweils

1 μg der aufgereinigten Proteine durch SDS-PAGE (2.3.5) mit anschließender Coomassiefärbung (2.3.6) analysiert (Abb. 3.7).

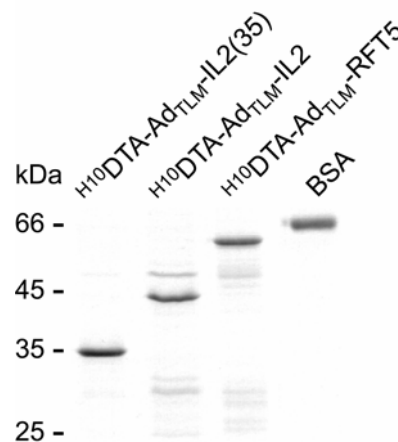


Abb. 3.7: Analyse von H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 und H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 nach erfolgter Aufreinigung und Dialyse. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurde jeweils 1 μg des Proteins und als Vergleich 1 μg BSA mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung analysiert. Die Analyse erfolgte auf einem 12 %igem SDS-Gel.

Die drei chimären Toxine wurden erfolgreich aufgereinigt (Abb. 3.7). Insbesondere H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35) mit einer molekularen Masse von 31,2 kDa lag in einer ausgezeichneten Qualität vor, da fast keine Verunreinigungen detektiert wurden. H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 (molekularen Masse 42,6 kDa) und H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 (molekularen Masse 52,7 kDa) wiesen geringfügige Verunreinigungen auf. Nach der erfolgten Überprüfung der Qualität der Proteine konnte die funktionelle Analyse der ADP-Ribosylierung durch das in jedem Fusionsprotein enthaltene DTA *in vitro* durchgeführt werden.

3.2.3 Nachweis der ADP-Ribosylierung durch die chimären Toxine

Um die Aktivität der chimären Toxine *in vitro* nachzuweisen, wurde der unter 2.4.1 beschriebene Versuch durchgeführt. Dazu wurde biotinmarkiertes NAD⁺ in Gegenwart von EF2 mit den chimären Toxinen H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 und H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 inkubiert und anschließend die erfolgte ADP-Ribosylierung an EF2 mit Antikörpern gegen Biotin in einem Westernblot nachgewiesen (Abb. 3.8). Für die Aktivitätsnachweise wurden die chimären Toxine wie in Abb. 3.7 gezeigt eingesetzt.

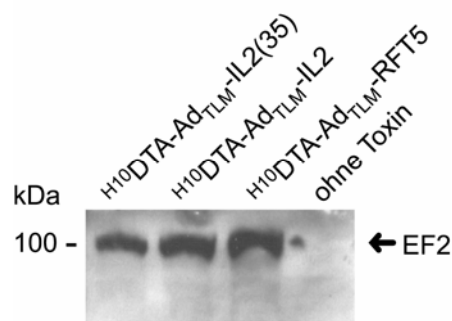


Abb. 3.8: *In-vitro*-Aktivitätsnachweis für die chimären Toxine H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 und H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5. Je 1 ng der Proteine wurde zusammen mit EF2 aus Weizenkeimlingen und biotinyliertem NAD⁺ 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und biotinylierter EF2 (Pfeil) durch Westernblot und Immunodetektion mit GABiotin und RAG nachgewiesen. Die Analyse erfolgte auf einem 12 %igem SDS-Gel.

In der Abb. 3.8 sind die Ergebnisse des ADP-Ribosylierungsassays für H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 und H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 gezeigt. Der EF2 wurde für alle drei chimären Toxine deutlich erkennbar bei seiner molekularen Masse von 100 kDa in seiner ADP-ribosylierten Form nachgewiesen (Pfeil). Die Intensitäten der gebildeten Banden, die als Maß für die ADP-Ribosylierungsaktivität angesehen werden können, sind bei allen Konstrukten vergleichbar. Die Kontrolle ohne chimäres Toxin ergab kein Signal von ADP-ribosyliertem EF2. Nachdem die enzymatische Aktivität der chimären Toxine erfolgreich *in vitro* nachgewiesen wurde, konnte im nächsten Schritt die Wirkung auf IL2R exprimierende Zellen im Zellkulturmodell untersucht werden.

3.2.4 Analyse der Cytotoxizität der chimären Toxine in der Zellkultur

Die chimären Toxine H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 und H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 wurden in unterschiedlichen Konzentrationen wie unter 2.4.4.2 beschrieben auf L540Cy-Zellen inkubiert. Anhand der dadurch ermittelten Werte für das Überleben der Zellen wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt (Abb. 3.9).

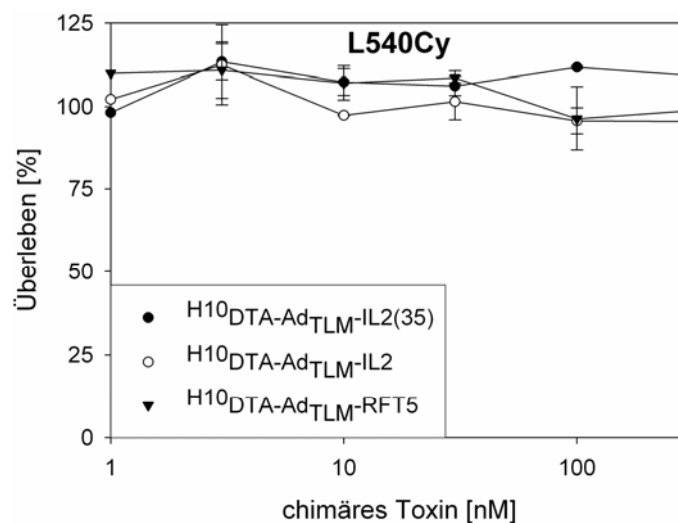


Abb. 3.9: Cytotoxizität der chimären Toxine H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 und H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 auf L540Cy-Zellen. Die eingesetzten Endkonzentrationen der chimären Toxine wurden zwischen 1 nM und 300 nM gewählt. Das Überleben der Zellen wurde anhand der Umsetzung von MTT durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen ermittelt. Die dargestellten Daten stammen aus zwei unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung, die Fehler sind Standardabweichungen vom Mittelwert.

Die Analyse der cytotoxischen Wirkung der drei chimären Toxine mit IL2(35), vollständigem IL2 und dem *single chain Fv*-Fragment RFT5 ergab bis zu einer Konzentration von 300 nM überhaupt keine Cytotoxizität (Abb. 3.9). Da in dem *In-vitro*-ADP-Ribosylierungsassay die enzymatische Aktivität von DTA nachgewiesen wurde, lag die Vermutung nahe, dass die fehlende Cytotoxizität durch zu geringe Bindung oder Aufnahme der chimären Toxine in die Zellen verursacht wurde. Daher wurde mit den chimären Toxinen die Bindung an die Zielzellen untersucht.

3.2.5 Charakterisierung der Bindung der chimären Toxine an Zielzellen

Für die Analyse der Bindung der chimären Toxine H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 und H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 und einer Kontrolle ohne Ligand (H6 DTA-Ad_{TLM}) wurden L540Cy-Zellen zusammen mit den Konstrukten inkubiert und anschließend über FITC-markierte Antikörper die Bindung in einem FACS-Messgerät ausgewertet (2.4.5). Die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 dargestellt und in Tab. 3.1 zusammengefasst.

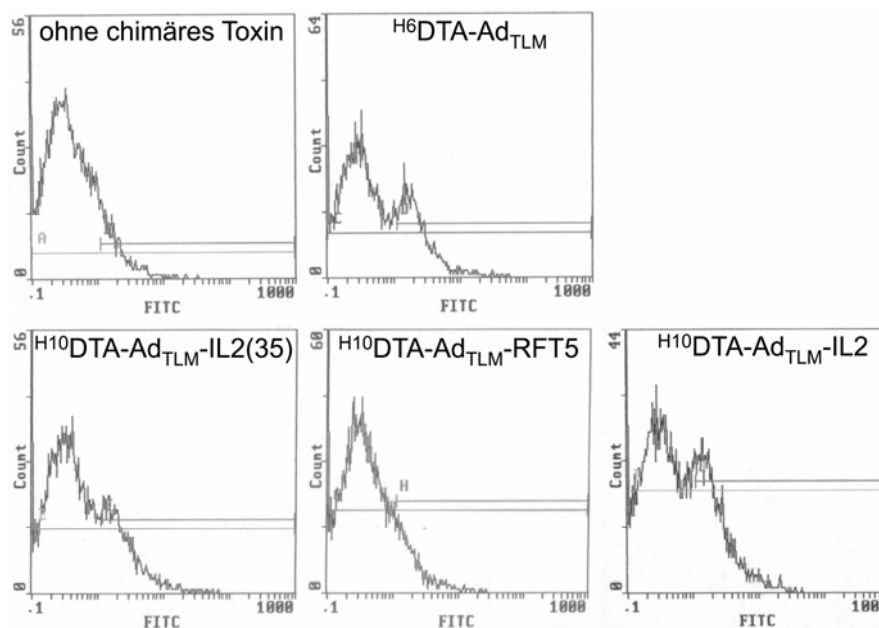


Abb. 3.10: Bindungsstudie an L540Cy-Zellen für die chimären Toxine H6 DTA-Ad_{TLM}, H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 und H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 am FACS-Messgerät. Die Detektion gebundener Fusionsproteine erfolgte durch α DT und RAG-FITC.

Am FACS-Messgerät wurden nach einem üblicherweise für FITC-Markierungen verwendeten Protokoll fluoreszierende Zellen detektiert. Es wurden für jede Messung 10 000 Zellen gezählt und ihre Fluoreszenzintensität gemessen. Dadurch ergaben sich die in Abb. 3.10 gezeigten Darstellungen (Ordinate: Anzahl der Zellen, Abzisse: Fluoreszenzintensität). Die durch den rechten kürzeren Strich in jeder Abbildung eingeschlossenen Zellen fluoreszierten so stark, dass sie als mit FITC markiert angesehen werden und als detektierte Zellen bezeichnet werden. Auch in der Kontrolle ohne chimäres Toxin fallen einige Zellen in diesen Bereich. Dabei handelt es sich um apoptotische Zellen, die auch in dem Grenzbereich detektiert werden. Die Auswertung der Messungen ist tabellarisch zusammengefasst (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Auswertung der Bindung der chimären Toxine H6 DTA-Ad_{TLM}, H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2(35), H10 DTA-Ad_{TLM}-RFT5 und H10 DTA-Ad_{TLM}-IL2 auf L540Cy-Zellen.

chimäres Toxin	detektierte Zellen	
	absolut	[%]
ohne chimäres Toxin	1 295	13,0
H6 DTA-Ad _{TLM}	2 680	26,8
H6 DTA-Ad _{TLM} -IL2(35)	2 572	25,7
H6 DTA-Ad _{TLM} -IL2	3 004	30,0
H6 DTA-Ad _{TLM} -RFT5	1 461	14,6

Wie schon zuvor beschrieben, wird ein gewisser Teil der Zellen detektiert, obwohl keine chimären Toxine, die durch die Antikörper detektiert werden können, vorhanden waren. Dieser Wert von 13 % der Zellen ist daher als Hintergrund zu betrachten. Die Bindung des

Fusionsproteins $^{\text{H}6}$ DTA-Ad_{TLM} ohne Liganden für den IL2R wurde ebenfalls untersucht. Dabei ergab sich eine deutliche Bindung dieses Proteins an die Zellen. Da diese Bindung nicht durch den IL2R zustande kommen kann, spielen wahrscheinlich unspezifische Wechselwirkungen des Proteins mit den Zellen eine Rolle für die Bindung. Die chimären Toxine mit IL2(35) und vollständigem IL2 weisen nur eine Bindung im Bereich der unspezifischen Bindung des Fusionsproteins ohne Liganden auf. Daher ist ihre Bindung vermutlich ebenfalls hauptsächlich aufgrund unspezifischer IL2R unabhängiger Interaktionen zustande gekommen. Nach Inkubation mit dem chimären Toxin $^{\text{H}10}$ DTA-Ad_{TLM}-RFT5 können sogar nur etwa 15 % der Zellen detektiert werden. Das ist deutlich unterhalb der unspezifischen Bindung des Proteins ohne Ligand und nur wenig höher als der Hintergrund der unbehandelten Zellen. Möglicherweise verhindert RFT5 im chimären Toxin durch seine Größe die Exposition von Sequenzen, die für die unspezifische Bindung verantwortlich sind, weist jedoch selbst nur eine geringe Bindung an IL2R auf.

3.3 Analyse unterschiedlicher Membrantransferpeptide als Bestandteil des Adapters

Da die chimären Toxine mit Liganden gegen den IL2R nicht die erwartete toxische Wirkung auf IL2R exprimierende Zellen zeigten, wurden für Untersuchungen zur Rolle der MTPs innerhalb des Adapters (1.5.1) chimäre Toxine gegen den EGFR (1.4.1.2) verwendet. Mit unterschiedlichen MTPs sollte die Aufnahme der Toxine in die Zellen moduliert werden, aber auch die Spezifität der Bindung untersucht werden. Die Durchführung dieser Versuche wurde freundlicherweise von Dr. Mark Sutherland unterstützt.

3.3.1 Klonierung der chimären Toxine mit unterschiedlichen Membrantransferpeptiden

Ziel dieser Klonierung war die Erstellung neuer chimärer Toxine mit unterschiedlichen MTPs (Anhang Tab. 8.2), um den Einfluss dieser Sequenzen im Adapter auf die Cytotoxizität, die Bindung und die Aufnahme der chimären Toxine beschreiben zu können. Zur Erläuterung sind die Klonierungen schematisch dargestellt (Abb. 3.11).

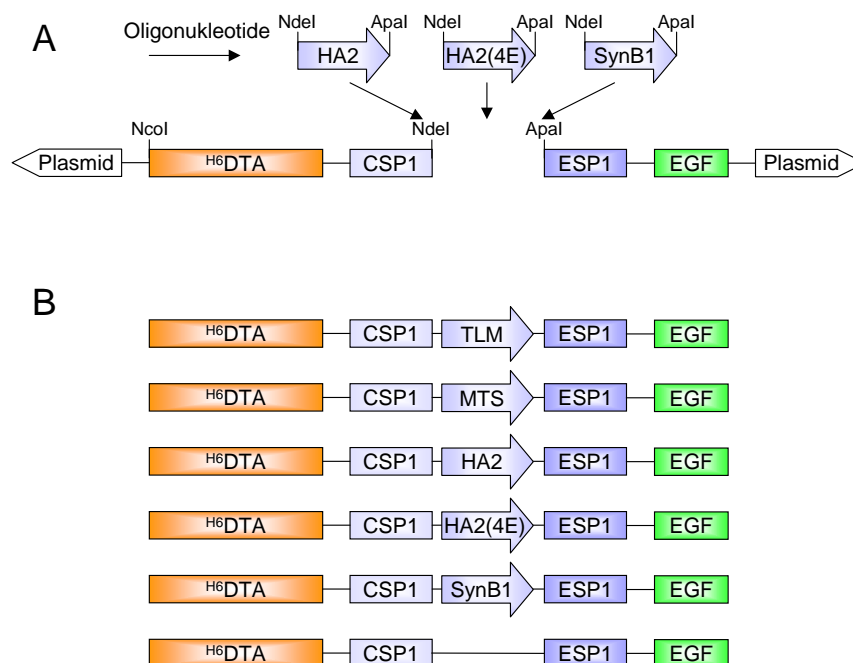


Abb. 3.11: Schematische Übersicht zur Klonierung der chimären Toxine mit unterschiedlichen MTPs. **(A)** Die dimerisierten und phosphorylierten Oligonukleotide für die Sequenzen von HA2, HA2(4E) und SynB1 wurden über NdeI und ApaI Restriktionsverdau in ein mit den gleichen Enzymen verdautes Konstrukt mit EGF als Ligand ligiert. **(B)** Im unteren Bereich der Abbildung sind die schematischen Darstellungen der Konstrukte mit unterschiedlichen Membrantransferpeptiden dargestellt. Die chimären Toxine ^{H6}DTA-Ad_{TLM}-EGF und ^{H6}DTA-Ad_{MTS}-EGF lagen bereits vor und mussten nicht kloniert werden. Darunter sind die drei neu klonierten chimären Toxine ^{H6}DTA-Ad_{HA2}-EGF, ^{H6}DTA-Ad_{HA2(4E)}-EGF und ^{H6}DTA-Ad_{SynB1}-EGF gezeigt. Das Konstrukt ohne Membrantransfersequenz (^{H6}DTA-Ad_{ohne MTP}-EGF) ist ebenfalls dargestellt. Es wurde durch sequentiellen Verdau mit NdeI und ApaI mit jeweils anschließender Entfernung einzelsträngiger DNA durch Klenow-Polymerase und abschließender Religation der DNA erzeugt.

Die chimären Toxine ^{H6}DTA-CSP1-TLM-ESP1-EGF (^{H6}DTA-Ad_{TLM}-EGF) und ^{H6}DTA-CSP1-MTS-ESP1-EGF (^{H6}DTA-Ad_{MTS}-EGF) lagen bereits in pLITMUS28 vor und mussten nicht mehr kloniert werden. Um für weitere Konstrukte innerhalb des Adapters die MTPs auszutauschen, wurde das bereits vorhandene chimäre Toxin ^{H6}DTA-Ad_{MTS}-EGF in pLITMUS28 mit NdeI / ApaI (2.2.7) verdaut. Anschließend wurde jeweils eines der dimerisierten Oligonukleotide (2.2.3) mit den DNA-Sequenzen der unterschiedlichen MTPs in den geschnittenen Vektor ligiert (2.2.10.1) (Abb. 3.11) und in *E. coli* DH5α transformiert (2.2.11). Die erfolgreiche Ligation wurde nach Präparation der Plasmide durch Sequenzierung bestätigt (2.2.12). Damit wurden die Konstrukte ^{H6}DTA-CSP1-HA2-ESP1-EGF (^{H6}DTA-Ad_{HA2}-EGF), ^{H6}DTA-CSP1-HA2(4E)-ESP1-EGF (^{H6}DTA-Ad_{HA2(4E)}-EGF) und ^{H6}DTA-CSP1-SynB1-ESP1-EGF (^{H6}DTA-Ad_{SynB1}-EGF) in pLITMUS28 erhalten.

Das chimäre Toxin ohne MTP wurde aus ^{H6}DTA-Ad_{TLM}-EGF in pLITMUS28 erstellt. Durch zwei aufeinander folgende Einfachverdau mit NdeI und ApaI (2.2.7) mit jeweils anschließender Entfernung einzelsträngiger DNA durch die Klenow-Polymerase (2.2.4)

wurde *blunt end* DNA hergestellt, die dann nach Agarosegelextraktion (2.2.9) unter Erhalt des Leserahmens durch Ligation (2.2.10.1) zur Klonierung von $^{\text{H6}}$ DTA-CSP1-EGF ($^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{ohne MTP}-EGF) führte. Die resultierende Entfernung der NdeI- und ApaI-Schnittstellen wurde durch einen NdeI- und ApaI-Verdau (2.2.7) überprüft und anschließend durch Sequenzierung bestätigt (2.2.12).

Um Kontrollkonstrukte ohne EGF zu generieren wurden die Konstrukte mit NcoI und XmaI verdaut und in einen pLITMUS28-Vektor mit entsprechenden Restriktionschnittstellen aber ohne EGF ligiert. Durch einen Restriktionsverdau mit NcoI und EcoRI wurde die erfolgreiche Entfernung der EGF-Sequenz überprüft. Nach Präparation der Plasmide (2.2.2) wurden die Konstrukte durch Sequenzierung bestätigt (2.2.12). Damit wurden die Konstrukte $^{\text{H6}}$ DTA-CSP1-TLM-ESP1 ($^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{TLM}), $^{\text{H6}}$ DTA-CSP1-MTS-ESP1 ($^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{MTS}), $^{\text{H6}}$ DTA-CSP1-HA2-ESP1 ($^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{HA2}), $^{\text{H6}}$ DTA-CSP1-HA2(4E)-ESP1 ($^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{HA2(4E)}}), $^{\text{H6}}$ DTA-CSP1-SynB1-ESP1 ($^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{SynB1}) und $^{\text{H6}}$ DTA-CSP1-ESP1 ($^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{ohne MTP}) in pLITMUS28 erhalten.

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden alle Konstrukte aus pLITMUS28 über NcoI und EcoRI ausgeschnitten und in pET11d ligiert. Die Ligationsansätze wurden dann in *E. coli* DH5 α transformiert, die Plasmide isoliert und durch Restriktionsverdau mit NcoI und EcoRI die erfolgreiche Ligation überprüft. Zum Schluss wurden die Konstrukte für die Expression in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS transformiert.

Zusätzlich wurde noch ein Kontrollkonstrukt kloniert, das nicht nur DTA enthielt, sondern außerdem die toxineigene Transfersequenz von DT. Dieses chimäre Toxin beinhaltete keinen Adapter, trug aber EGF anstelle der Zellbindedomäne von DT. Die Klonierung dieser Sequenz ist schematisch in Abb. 3.12 dargestellt.

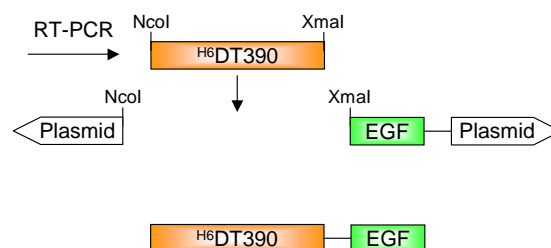


Abb. 3.12: Schematische Übersicht zur Klonierung des DT390 Kontrollkonstruktes. Die durch RT-PCR klonierte Sequenz der ersten 390 Aminosäuren von DT wurde durch NcoI und XmaI aus dem Plasmid pCR2.1 ausgeschnitten und in mit den gleichen Enzymen verdauten pET11d ligiert. Da dieses Plasmid noch die Sequenz von EGF enthielt, wurde damit $^{\text{H6}}$ DT390-EGF kloniert.

Zur Gewinnung der cDNA wurde aus einer RNA-Präparation (2.2.5) von *C. diphtheriae* mittels RT-PCR (2.2.6) mit den Primern Nco-His-DTA vor / DT390rev die Sequenz der ersten 390 Aminosäuren von DT amplifiziert, in pCR2.1-TOPO ligiert (2.2.10.2) und in *E. coli* DH5 α transformiert (2.2.11). Nach Präparation der Plasmid-DNA, erfolgreichem

Testverdau mit NcoI und XmaI und erfolgter Sequenzierung wurde DT390 nach Restriktionsverdau mit NcoI und XmaI in pET11d ligiert (Abb. 3.12). Die verwendete Variante des Vektors enthielt bereits die DNA für den Liganden EGF, so dass die anschließende Transformation in *E. coli* DH5 α mit $^{\text{H6}}$ DT390-EGF erfolgte. Die gelungene Ligation und der Erhalt von $^{\text{H6}}$ DT390-EGF wurde durch einen Verdau präparierter Plasmide mit NcoI und EcoRI bestätigt. Für die Expression wurden die Plasmide in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS transformiert.

3.3.2 Expression und Aufreinigung der chimären Toxine

Die chimären Toxine wurden alle in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS exprimiert (2.3.1) und durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie denaturierend aufgereinigt (2.3.3.2). Nach erfolgreicher Aufreinigung wurden die Proteine durch Dialyse renaturiert und anschließend aufkonzentriert (2.3.8). Dann wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.3.9) und zur Überprüfung dieser Konzentration 1 μg jedes Proteins sowie 1 μg BSA nach SDS-PAGE (2.3.5) und anschließender Coomassiefärbung (2.3.6) analysiert (Abb. 3.13).

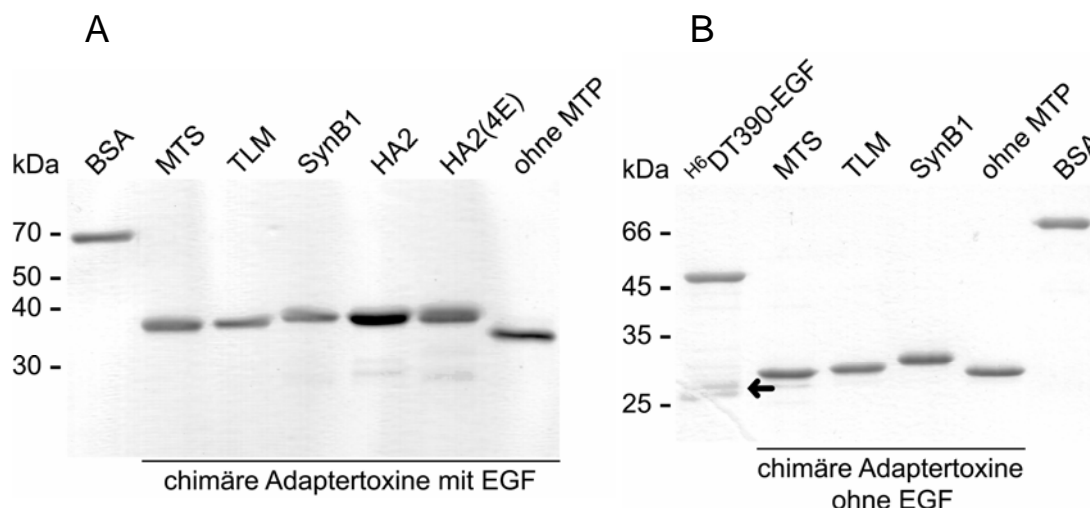


Abb. 3.13: Analyse der chimären Toxine mit unterschiedlichen MTPs nach ihrer Aufreinigung. Von jedem Fusionsprotein wurde nach Renaturierung und Proteinkonzentrationsbestimmung 1 μg nach SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung in 12 %igen SDS-Gelen analysiert und mit 1 μg ebenfalls aufgetragenem BSA abgeglichen, um die ermittelte Konzentration noch zu überprüfen. **(A)** Analyse der chimären Adaptertoxine mit EGF: $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{MTS}-EGF, $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{TLM}-EGF, $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{SynB1}-EGF, $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{HA2}-EGF, $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{HA2(4E)}}-EGF und $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{ohne MTP}-EGF. **(B)** Analyse von $^{\text{H6}}$ DT390-EGF und den chimären Adaptertoxinen ohne EGF: $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{MTS}, $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{TLM}, $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{SynB1} und $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{ohne MTP}.

Die meisten Fusionsproteine wurden mit Erfolg aufgereinigt und konnten in ausreichender Menge renaturiert werden. Die Abb. 3.13 zeigt alle chimären Adaptertoxine mit und ohne EGF sowie adapterfreies $^{\text{H6}}$ DT390-EGF nach der Bestimmung der Proteinkonzentration. Nur die beiden Konstrukte $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{HA2} sowie $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{HA2(4E)}} konnten nicht exprimiert werden. Die Proteine liegen weitgehend ohne Verunreinigungen und Spaltprodukte sowie in ihrer erwarteten Größe vor. $^{\text{H6}}$ DT390-EGF hat eine molekulare Masse von 49 kDa und

die anderen chimären Toxine mit EGF haben abhängig von dem MTP eine molekulare Masse von 31–34 kDa, die Konstrukte ohne EGF 26–29 kDa. Lediglich $^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$ weist deutlich sichtbare Banden bei etwa 26 kDa auf (Abb. 3.13 B, Pfeil). Aufgrund der Größe könnte es sich bei diesen Proteinen um Spaltprodukte, insbesondere DTA, handeln. Für chimäre Toxine, deren Bandenintensität von der des BSA abweicht, wurde die Proteinkonzentration entsprechend korrigiert. Mit diesen Konzentrationen wurden die folgenden Funktionsassays für die chimären Toxine durchgeführt.

3.3.3 Analyse der *In-vitro*-ADP-Ribosylierung durch die chimären Toxine

Für die Analyse der enzymatischen Aktivität von DTA in den chimären Toxinen wurde der ADP-Ribosylierungsassay eingesetzt (2.4.1). Die Proben wurden dann in einem Western-blot mit anschließender Immunodetektion ausgewertet (Abb. 3.14).

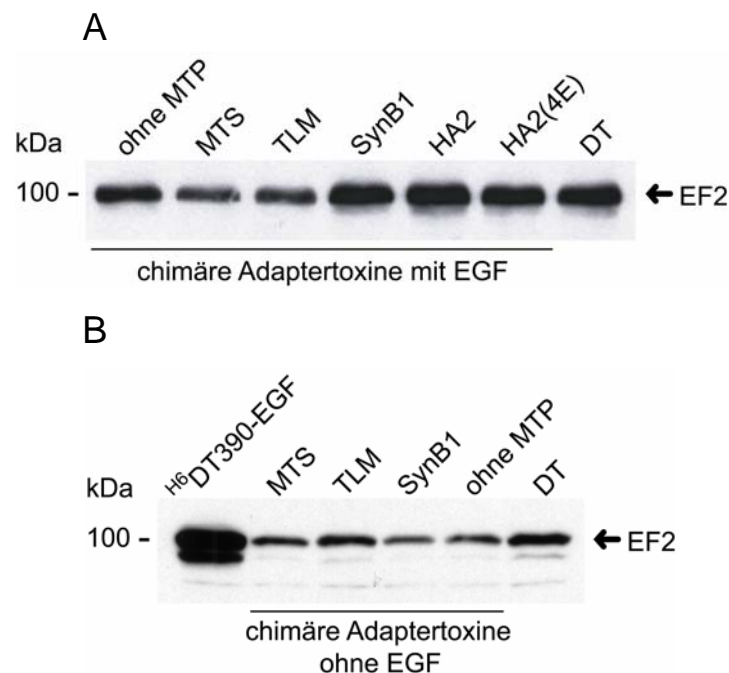


Abb. 3.14: *In-vitro*-ADP-Ribosylierungsassay von chimären Toxinen mit unterschiedlichen MTPs. Der Nachweis erfolgte im Westernblot mit Immunodetektion gegen biotinylierten EF2 (Peil) durch die Antikörper GABiotin und RAG. Von allen Proteinen wurde 1 ng für die Analyse eingesetzt und mit EF2 aus Weizenkeimlingen und biotinyliertem NAD^+ 30 min bei 37 °C inkubiert. **(A)** ADP-Ribosylierung der chimären Toxine mit EGF und als Kontrolle mit DT. Die verwendeten Konstrukte waren $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2(4E)-EGF}}$ und vollständiges DT. **(B)** ADP-Ribosylierung der chimären Toxine ohne EGF und als Kontrolle mit DT und $^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$. Die verwendeten Konstrukte waren $^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}$ und vollständiges DT.

Wie die Abb. 3.14 zeigt, sind alle chimären Toxine mit und ohne EGF in der Lage, EF2 durch die Übertragung von ADP-Ribose zu modifizieren. Durch die Biotinylierung des NAD^+ wird damit EF2 für die Detektion durch den Antikörper gegen Biotin markiert und

kann immunologisch nachgewiesen werden. Geringe Unterschiede in den Signalen des markierten EF2 können durch kleine Ungenauigkeiten beim Ansetzen der Proben in dem sehr geringen Volumen von insgesamt nur 10 μ l entstanden sein. Die deutlich stärkeren Signale für $^{\text{H6}}$ DT390-EGF kommen vermutlich durch das in der Probe von $^{\text{H6}}$ DT390-EGF vorhandene Spaltprodukt zustande (Abb. 3.13 B, Pfeil), bei dem es sich wahrscheinlich um DTA handelt, dass natürlich ebenfalls ADP-Ribosylierungsaktivität besitzt.

3.3.4 Cytotoxische Wirkung auf HER14- und NIH-3T3-Zellen

Nachdem für alle Konstrukte die enzymatische Aktivität von DTA erfolgreich detektiert wurde, konnte die Cytotoxizität der chimären Toxine auf Zellen mit und ohne EGFR untersucht werden. Dazu wurden die Konstrukte auf HER14- und NIH-3T3-Zellen inkubiert und anschließend das Überleben der Zellen in einer Dosis-Wirkungskurve analysiert (2.4.4.1).

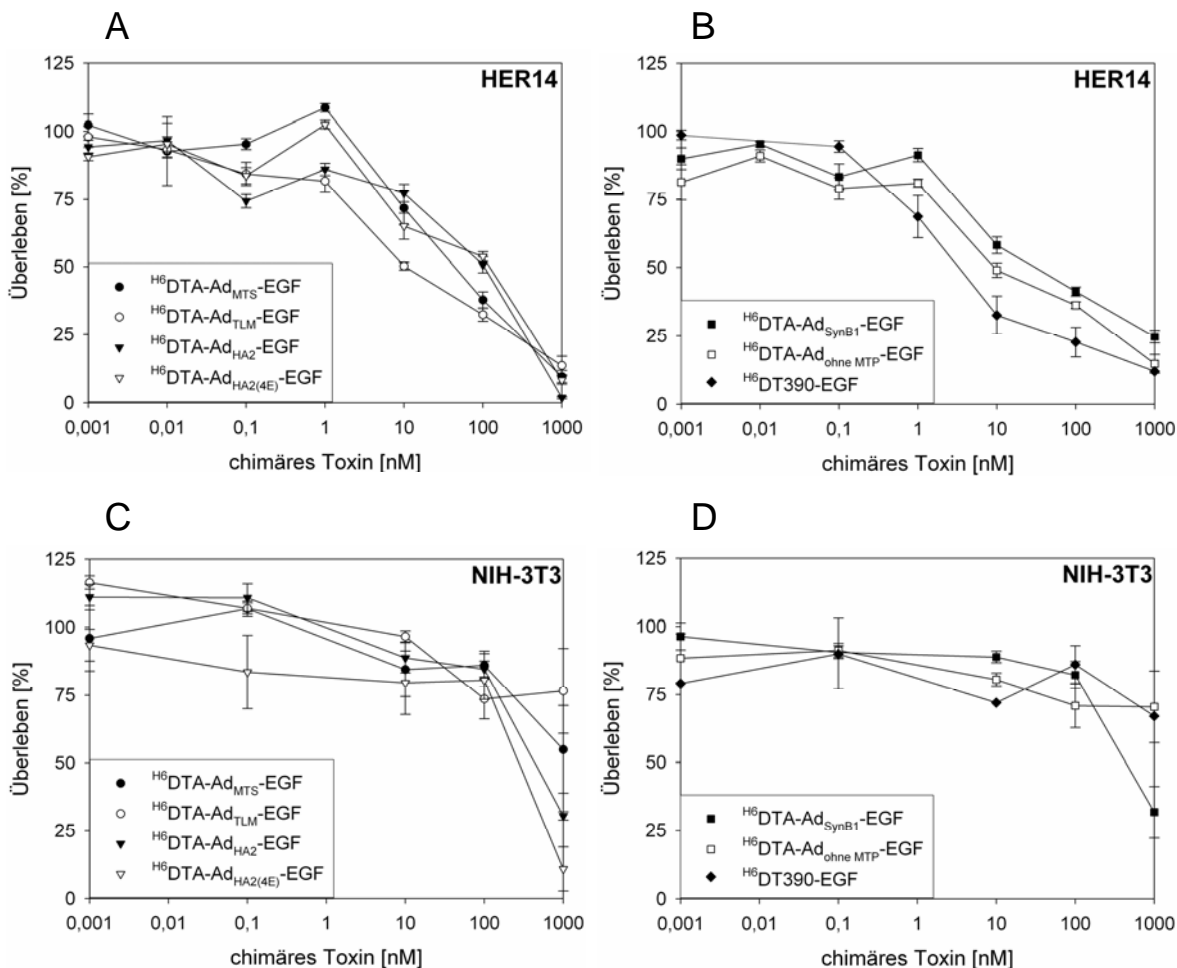


Abb. 3.15: Cytotoxizität der chimären Toxine mit EGF als Ligand auf HER14-Zellen und auf NIH-3T3-Zellen. Die eingesetzten Endkonzentrationen der chimären Toxine wurden zwischen 0,001 nM und 1 000 nM gewählt und die Toxine 48 h auf 5 000 Zellen inkubiert. Das Überleben der Zellen wurde durch Spaltung von Fluoresceindiacetat durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen ermittelt. Die dargestellten Daten stammen aus 3–5 unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung, die Fehler sind die Standardabweichung vom Mittelwert. (A) Cytotoxizität der chimären Toxine $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{MTS}-EGF, $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{TLM}-EGF, $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{HA2}-EGF und $^{\text{H6}}$ DTA-Ad_{HA2(4E)}-EGF auf EGFR exprimierenden HER14-Zellen. (B) Cytotoxizität der

chimären Toxine ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1}}\text{-EGF}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}\text{-EGF}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$ auf EGFR exprimierenden HER14-Zellen. (C) Cytotoxizität der chimären Toxine ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS}}\text{-EGF}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM}}\text{-EGF}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2}}\text{-EGF}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2(4E)}}\text{-EGF}$ auf NIH-3T3-Zellen. (D) Cytotoxizität der chimären Toxine ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1}}\text{-EGF}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}\text{-EGF}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$ auf NIH-3T3-Zellen.

Die Abb. 3.15 zeigt die cytotoxische Wirkung der EGF tragenden chimären Toxine mit unterschiedlichen MTPs auf humane EGFR exprimierende HER14-Zellen und auf entsprechende Kontrollzellen ohne humanen EGFR (NIH-3T3). Den Unterschied in der cytotoxischen Wirkung in Bezug auf die Expression des Zielrezeptors kann man sehr gut erkennen. Während auf den HER14-Zellen bei Konzentrationen zwischen 10 und 100 nM bei allen Toxinen eine deutliche cytotoxische Wirkung detektiert wird, sind viele Konstrukte auf den Kontrollzellen erst bei einer Konzentration von 1 000 nM cytotoxisch. Vier Konstrukte, die chimären Toxine mit MTS, TLM und ohne MTP sowie ${}^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$ bewirken selbst bei der höchsten Dosis nur etwa 25 % Cytotoxizität. Ein genauerer Vergleich der Wirkungen der chimären Toxine auf die beiden Zelltypen kann anhand der aus den Dosis–Wirkungskurven ermittelten IC_{50} -Werte durchgeführt werden (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: IC_{50} -Werte für die Wirkung der chimären Toxine mit EGF als Ligand auf HER14- und NIH-3T3-Zellen.

chimäres Toxin	IC_{50} [nM]	
	HER14	NIH-3T3
${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS}}\text{-EGF}$	70	>1 000
${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM}}\text{-EGF}$	18	>1 000
${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2}}\text{-EGF}$	102	500
${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2(4E)}}\text{-EGF}$	106	300
${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1}}\text{-EGF}$	35	500
${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}\text{-EGF}$	9	>1 000
${}^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$	3	>1 000

Anhand der bestimmten IC_{50} -Werte ist eindeutig zu erkennen, dass die Expression des EGFR für die spezifische Aufnahme aller chimären Toxine von erheblicher Relevanz ist. Während auf den NIH-3T3-Zellen für die eingesetzten Konzentrationen nur die chimären Toxine mit HA2, HA2(4E) und SynB1 die Überlebensrate der Zellen auf 50 % zu reduzieren in der Lage sind (300 und 500 nM), liegen alle Werte auf den Rezeptor exprimierenden HER14-Zellen deutlich niedriger. Am Besten sind die Konstrukte ${}^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}\text{-EGF}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM}}\text{-EGF}$ mit IC_{50} -Werten von 3 nM bis 18 nM. Etwas weniger wirksam sind die beiden Konstrukte mit SynB1 (35 nM) und MTS (70 nM) als MTP. Die beiden Fusionsproteine mit den HA2-Derivaten zeigen die schwächste cytotoxische Wirkung auf HER14-Zellen mit IC_{50} -Werten über 100 nM.

Um den Effekt des Liganden EGF für unspezifische Bindung und Aufnahme bewerten zu können, wurde ferner die Cytotoxizität der EGF freien Toxine, aber mit der gleichen Adapterzusammensetzung, auf HER14- und NIH-3T3-Zellen untersucht (Abb. 3.16).

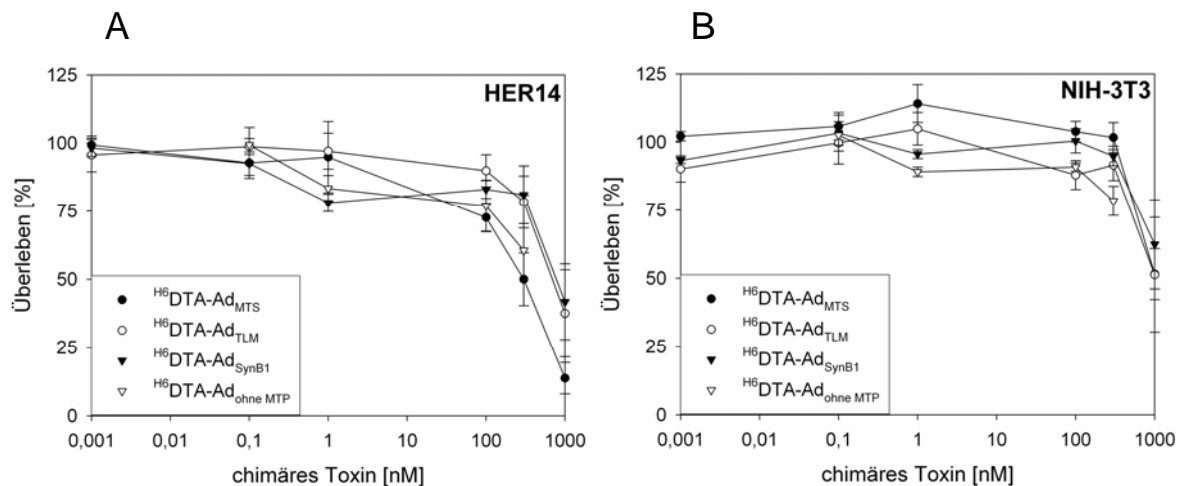


Abb. 3.16: Cytotoxizität der chimären Toxine ohne EGF als Ligand auf HER14-Zellen und auf NIH-3T3-Zellen. Die eingesetzten Endkonzentrationen der chimären Toxine wurden zwischen 0,001 nM und 1 000 nM gewählt und die Toxine 48 h auf 5 000 Zellen inkubiert. Das Überleben der Zellen wurde durch Spaltung von Fluoresceindiacetat durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen ermittelt. Das Fusionsprotein H^6 DTA-Ad_{ohne MTP} wurde in beiden Versuchen nur bis zu einer Konzentration von 300 nM eingesetzt. Die gezeigten Daten sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung und die Fehler sind die Standardabweichung vom Mittelwert. **(A)** Cytotoxizität der chimären Toxine H^6 DTA-Ad_{MTS}, H^6 DTA-Ad_{TLM}, H^6 DTA-Ad_{SynB1} und H^6 DTA-Ad_{ohne MTP} auf EGFR exprimierenden HER14-Zellen. **(B)** Cytotoxizität der chimären Toxine H^6 DTA-Ad_{MTS}, H^6 DTA-Ad_{TLM}, H^6 DTA-Ad_{SynB1} und H^6 DTA-Ad_{ohne MTP} auf NIH-3T3-Zellen.

Aufgrund des Fehlens des EGFR bindenden EGF weisen die chimären Toxine auf HER14-Zellen mit EGFR ungefähr die gleichen Cytotoxizitäten auf wie auf den NIH-3T3-Kontrollzellen. Für einen genaueren Vergleich sind die aus den Kurven errechneten IC_{50} -Werte zusammengefasst (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: IC_{50} -Werte für die Wirkung der chimären Toxine ohne EGF als Ligand auf HER14- und NIH-3T3-Zellen.

chimäres Toxin	IC_{50} [nM]	
	HER14	NIH-3T3
H^6 DTA-Ad _{MTS}	300	>1 000
H^6 DTA-Ad _{TLM}	700	>1 000
H^6 DTA-Ad _{SynB1}	800	>1 000
H^6 DTA-Ad _{ohne MTP}	>300	>300

Im Vergleich zur Cytotoxizität der chimären Toxine mit EGF erweisen sich die Kontrollkonstrukte ohne EGF alle als wesentlich weniger wirksam. Die niedrigste IC_{50} kann für das Fusionsprotein mit MTS als MTP detektiert werden, sie ist jedoch mit dem Wert von 300 nM immer noch wesentlich höher als für das entsprechende Konstrukt mit EGF (70 nM). Für die HA2- und HA2(4E)-Sequenzen können die Vergleiche nicht gezogen werden, da die Kontrollkonstrukte ohne EGF nicht exprimierbar waren. Da bei gleichen Konzentrationen die Wirkung auf HER14-Zellen jeweils etwas stärker ist als auf NIH-3T3-Zellen, sind die chimären Toxine ohne EGF offensichtlich etwas toxischer für die HER14-Zellen. Möglicherweise ist durch die Expression von EGFR die Protein-

expression der HER14-Zellen leicht verändert, obwohl beide Zelllinien im Prinzip den gleichen genetischen Hintergrund besitzen.

Nachdem die cytotoxischen Wirkungen der chimären Toxine mit unterschiedlichen MTPs beschrieben wurden, wurde im nächsten Schritt die spezifische Bindung und der Einfluss der MTPs auf die Bindung analysiert.

3.3.5 Untersuchung der Zellbindung von chimären Toxinen mit unterschiedlichen Membrantransferpeptiden

Um die Bindung der chimären Toxine mit unterschiedlichen MTPs zu analysieren, wurden die Proteine auf Zellen bei 4 °C und 37 °C inkubiert und nach Fixierung der Zellen und der Proteine die gebundenen chimären Toxine durch Antikörper detektiert (2.4.3.1). Die Inkubation bei 4 °C wurde durchgeführt, um die maximal bindende Menge des Proteins zu ermitteln, da bei dieser Temperatur aktive Transportmechanismen der Zelle, wie die Rezeptor vermittelte Endocytose, nicht ablaufen. Als Vergleich wurden die gleichen Messungen bei 37 °C getätigt. Bei dieser Temperatur erfolgt die Bindung an die Zellen und die Aufnahme der Proteine. Proteine, die nicht aufgenommen werden, können bei dieser Temperatur dennoch unspezifisch an die Zellen binden. Daher dient diese Messung dem Bestimmen der Menge der aufgenommenen chimären Toxine und der Abschätzung unspezifischer Bindungen. Für die Untersuchung der Spezifität der Bindung in Abhängigkeit des EGFR wurden alle Versuche auf NIH-3T3-Zellen ohne EGFR und auf EGFR exprimierenden HER14-Zellen analysiert (Abb. 3.17).

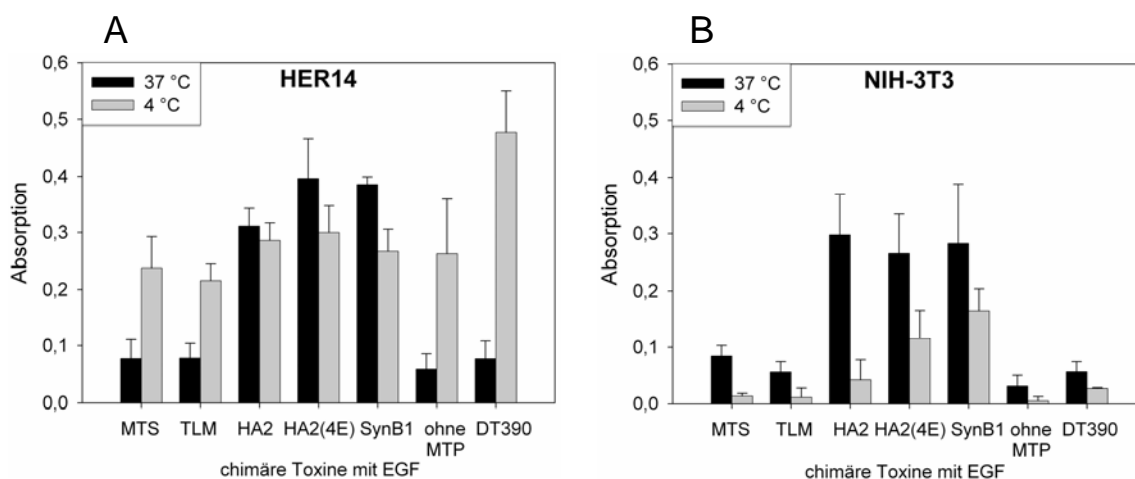


Abb. 3.17: Bindung der EGF tragenden chimären Toxine mit unterschiedlichen MTPs an HER14- und NIH-3T3-Zellen bei 4 °C und 37 °C. Als Kontrolle wurde ^6H DT390-EGF mitgeführt. Die hier gezeigten Daten sind aus mindestens drei unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung zusammengestellt, als Fehler ist die Standardabweichung gezeigt. **(A)** Zellbindung der chimären Toxine ^6H DTA-Ad_{MTS}-EGF, ^6H DTA-Ad_{TLM}-EGF, ^6H DTA-Ad_{HA2}-EGF und ^6H DTA-Ad_{HA2(4E)}-EGF, ^6H DTA-Ad_{SynB1}-EGF, ^6H DTA-Ad_{ohne MTP}-EGF und ^6H DT390-EGF an EGFR exprimierende HER14-Zellen bei 4 °C und 37 °C. **(B)** Zellbindung der chimären Toxine ^6H DTA-Ad_{MTS}-EGF, ^6H DTA-Ad_{TLM}-EGF, ^6H DTA-Ad_{HA2}-EGF und ^6H DTA-Ad_{HA2(4E)}-EGF, ^6H DTA-Ad_{SynB1}-EGF, ^6H DTA-Ad_{ohne MTP}-EGF und ^6H DT390-EGF an NIH-3T3-Zellen bei 4 °C und 37 °C.

Die Konstrukte $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP-EGF}}$ und $^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$ zeigten alle eine sehr gute Bindung bei 4 °C an HER14-Zellen, die bei 37 °C wesentlich geringer war, wahrscheinlich durch erfolgte Aufnahme der Konstrukte in die Zellen (Abb. 3.17 A). Dabei ist auffällig, dass die Bindung von $^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$ bei 4 °C etwa doppelt so stark ausfiel wie die der anderen Konstrukte. Demnach konnte dieses Konstrukt am Besten an die Zellen binden. Die anderen drei Fusionsproteine $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2(4E)-EGF}}$ und $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1-EGF}}$ zeigten bei 4 °C und 37 °C auf HER14-Zellen etwa gleiche oder sogar höhere Bindungssignale bei 37 °C. Während die Signale für 4 °C mit denen der anderen Adapterkonstrukte vergleichbar sind, sind die Signale bei 37 °C wesentlich höher als bei den anderen Konstrukten. Demnach erfolgte für diese Proteine keine Aufnahme in die Zellen.

Zur Analyse der Spezifität der Bindung in Bezug auf die EGFR-Expression wurden die chimären Toxine unter gleichen Bedingungen auf NIH-3T3-Zellen inkubiert (Abb. 3.17 B). Dabei wurde festgestellt, dass für die Proteine, die in die HER14-Zellen aufgenommen wurden ($^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM-EGF}}$, $^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP-EGF}}$ und $^{\text{H}6}\text{DT390-EGF}$) fast keine Bindung bei 4 °C auf NIH-3T3-Zellen erfolgt. Bei 37 °C zeigen diese chimären Toxine Signale, die denen auf HER14-Zellen bei dieser Inkubationstemperatur ungefähr entsprechen. Die Signale bei 37 °C kommen vermutlich durch unspezifische Bindungen der Konstrukte zustande. Die anderen Fusionsproteine mit den MTPs HA2, HA2(4E) und SynB1 zeigten in dieser Reihenfolge auch auf NIH-3T3-Zellen bei 4 °C eine Bindung und bei 37 °C sogar noch erheblich stärkere Signale, die mit denen auf HER14-Zellen vergleichbar sind. Diese chimären Toxine zeigen demnach teilweise erhebliche Bindungsaktivität ohne die Präsenz von EGFR. Die hohen Signale bei 37 °C auf NIH-3T3- und HER14-Zellen spiegeln eine erhebliche unspezifische Bindung dieser Proteine wider.

Um die Spezifität der detektierten Bindungseigenschaften in Abhängigkeit des Liganden EGF zu untersuchen, wurden die Bindungsstudien auch mit chimären Toxinen ohne EGF durchgeführt (Abb. 3.18). Die Versuche wurden sowohl auf HER14- als auch auf NIH-3T3-Zellen durchgeführt.

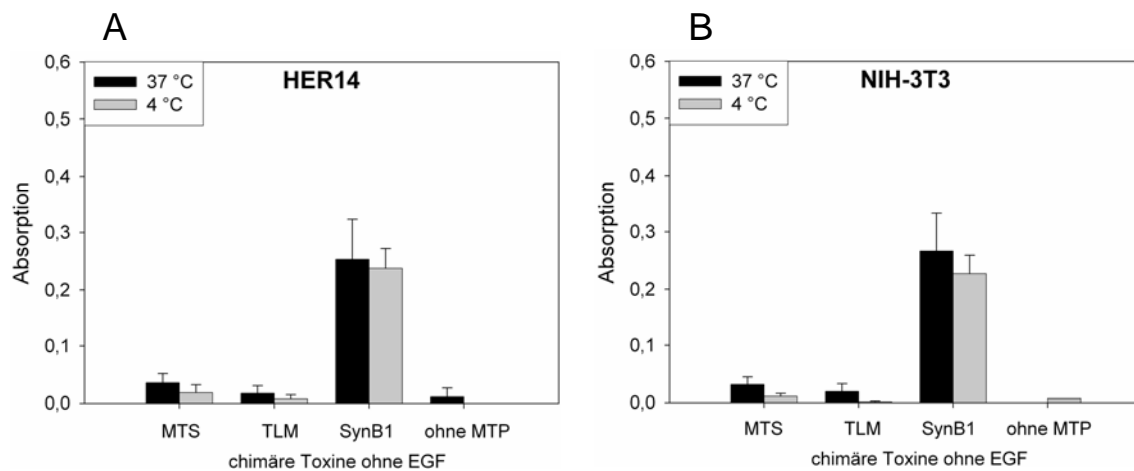


Abb. 3.18: Bindung der EGF freien chimären Toxine mit unterschiedlichen MTPs an HER14- und NIH-3T3-Zellen bei 4 °C und 37 °C. Die hier gezeigten Daten sind aus mindestens zwei unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung zusammengestellt, als Fehler ist die Standardabweichung gezeigt. **(A)** Zellbindung der chimären Toxine ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS}}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM}}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1}}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}$ an EGFR exprimierende HER14-Zellen bei 4 °C und 37 °C. **(B)** Zellbindung der chimären Toxine ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS}}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM}}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1}}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}$ an NIH-3T3-Zellen bei 4 °C und 37 °C.

Da die chimären Toxine ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2}}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{HA2(4E)}}$ nicht aufgereinigt werden konnten, wurden die Versuche für die Fusionsproteine nur für die Konstrukte ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS}}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM}}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1}}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}$ durchgeführt. Da alle Konstrukte kein EGF trugen, wurden für ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{MTS}}$, ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{TLM}}$ und ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{ohne MTP}}$ sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C auf HER14-Zellen fast keine Signale detektiert (Abb. 3.18 A). ${}^{\text{H}6}\text{DTA-Ad}_{\text{SynB1}}$ zeigte jedoch bei beiden Temperaturen deutliche Bindungssignale, offensichtlich aufgrund unspezifischer Bindung. Die gleichen Beobachtungen konnten auf NIH-3T3-Zellen gemacht werden, sowohl für die Konstrukte mit MTS, TLM und ohne MTP als auch für SynB1 (Abb. 3.18 B).

Für die Bestätigung der in Abb. 3.17 analysierten spezifischen Bindung der EGF tragenden chimären Toxine an den EGFR auf HER14-Zellen wurden die Bindungsstudien dieser Konstrukte bei 4 °C auf HER14-Zellen nach einer 10-minütigen Vorinkubation mit der 10fachen Menge an EGF durchgeführt (2.4.3.1). Die Ergebnisse dieser Messung sind in Tab. 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: Inhibition der Bindung chimärer Toxine an HER14-Zellen durch EGF bei 4 °C.

chimäres Toxin	Inhibition [%]	
	möglicher Maximalwert ^a	experimenteller Wert
^{H6} DTA-Ad _{MTS} -EGF	94	87
^{H6} DTA-Ad _{TLM} -EGF	95	87
^{H6} DTA-Ad _{HA2} -EGF	85	75
^{H6} DTA-Ad _{HA2(4E)} -EGF	61	36
^{H6} DTA-Ad _{SynB1} -EGF	38	17
^{H6} DTA-Ad _{ohne MTP} -EGF	98	84
^{H6} DT390-EGF	94	92

^a Der mögliche Wert für die Inhibition der Bindung der chimären Toxine durch EGF wurde aus der Differenz der spezifischen Bindung bei 4 °C auf HER14-Zellen und der unspezifischen Bindung bei 4 °C auf NIH-3T3-Zellen bestimmt.

Durch Bildung der Differenz zwischen den Bindungssignalen der chimären Toxine mit EGF bei 4 °C an HER14-Zellen (gesamte Bindung ohne Aufnahme in die Zellen) und den Bindungssignalen der chimären Toxine mit EGF bei 4 °C an NIH-3T3-Zellen (unspezifische Bindung der Proteine an die Zellen) kann der Anteil der spezifischen Bindung im Gesamtsignal auf HER14-Zellen berechnet werden. Durch freies EGF sollte ausschließlich die spezifische Bindung der chimären Toxine an EGFR vollständig inhibierbar sein. In Tab. 3.4 sind daher die Werte für die maximal mögliche Inhibition und die experimentell ermittelte Inhibition gegenübergestellt. Anhand der möglichen Werte der Inhibition ist eine Abschätzung des Anteils spezifischer Bindungsereignisse möglich. Die chimären Toxine mit MTS, TLM, HA2 ohne MTP und ^{H6}DT390-EGF zeigen sehr hohe Anteile für eine mögliche Inhibition und weisen damit sehr geringe unspezifische Bindungen auf. Bei den Konstrukten mit HA2(4E) und insbesondere SynB1 als MTP ist der Anteil unspezifischer Bindungen jedoch sehr groß, so dass auch nur wenig Inhibition möglich ist. Die experimentellen Werte für die Inhibition durch EGF bestätigen für alle chimären Toxine die erwartete Inhibition. Lediglich für die beiden Fusionsproteine mit dem hohen Anteil unspezifischer Bindungen (^{H6}DTA-Ad_{HA2(4E)}-EGF und ^{H6}DTA-Ad_{SynB1}-EGF) ist die im Experiment ermittelte Inhibition sogar noch deutlich geringer als die berechnete mögliche Inhibition.

3.4 Charakterisierung unterschiedlicher Saponine in Kombination mit chimären Toxinen

Die chimären Toxine mit EGF als Ligand wurden für die Analyse der MTPs erfolgreich eingesetzt. Daher wurde an diesen Toxinen auch die Wirkung unterschiedlicher Saponine (1.6) auf die Cytotoxizität der chimären Toxine untersucht. Aufgrund ihrer Varianz sollten die Saponine verschiedene Wirkungen aufweisen und damit auch Schlussfolgerungen auf die Relevanz bestimmter struktureller Komponenten erlauben.

3.4.1 Expression und Aufreinigung der chimären Toxine und von Kontrollkonstrukten

Für die Untersuchung der kombinierten Wirkung von Saponinen und chimären Toxinen mussten unterschiedliche chimäre Toxine exprimiert und aufgereinigt werden. Die Konstrukte H10 SAP-CSP1-TLM-ESP2-EGF (H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF) und das Kontrollkonstrukt H6 SAP ohne Ligand und Adapter wurden wie unter 2.3.1 beschrieben exprimiert und danach unter nativen Bedingungen ohne Harnstoff aufgereinigt (2.3.3.2). Diese Proteine können so aufgereinigt werden, da sie bei der Expression bereits richtig gefaltet werden und nicht in Form von *Inclusion bodies* vorliegen. Nach der Dialyse wurden die Proteine aufkonzentriert (2.3.8) und die Proteinkonzentration ermittelt (2.3.9). Zur Bestätigung der bestimmten Konzentrationen und um die Qualität der Proteine beurteilen zu können, wurde 1 μ g BSA als Vergleich zu jeweils 1 μ g der aufgereinigten Proteine nach SDS-PAGE (2.3.5) mit anschließender Coomassiefärbung (2.3.6) analysiert (Abb. 3.19).

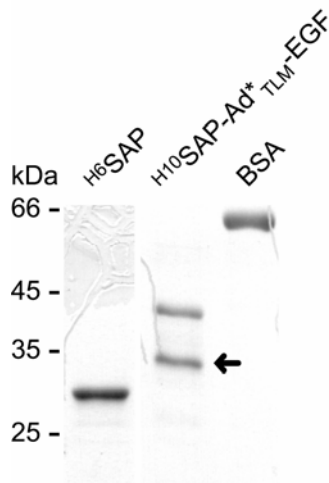


Abb. 3.19: Analyse von H6 SAP und H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF nach der Aufreinigung und Dialyse. Von jedem Protein wurde nach der Proteinkonzentrationsbestimmung 1 μ g nach SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert und mit 1 μ g ebenfalls aufgetragenem BSA abgeglichen, um die ermittelte Konzentration zu überprüfen. Mit dem Pfeil ist das Spaltprodukt von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF markiert.

Sowohl H6 SAP (molekulare Masse 29,6 kDa) als auch H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF (molekulare Masse 41,4 kDa) konnten erfolgreich aufgereinigt werden. Ein Problem bei der Aufreinigung von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF war die erhebliche Spaltung innerhalb des Adapters schon während der Expression und Affinitätschromatographie. Dadurch liegt das Protein auch zu ungefähr 50 % gespalten vor (Pfeil). Die eingesetzte Proteinkonzentration bezog sich in diesen Fällen immer auf das ungespaltene Fusionsprotein. Die Korrektur der ermittelten Proteinkonzentration erfolgte anhand der oben dargestellten Bandenintensitäten durch Vergleich zu BSA.

3.4.2 Beschreibung der verwendeten Saponine

Alle Saponine wurden von Prof. Dr. M. F. Melzig zur Verfügung gestellt. Die Strukturen der unterschiedlichen Saponine sind in Abb. 3.20 dargestellt.

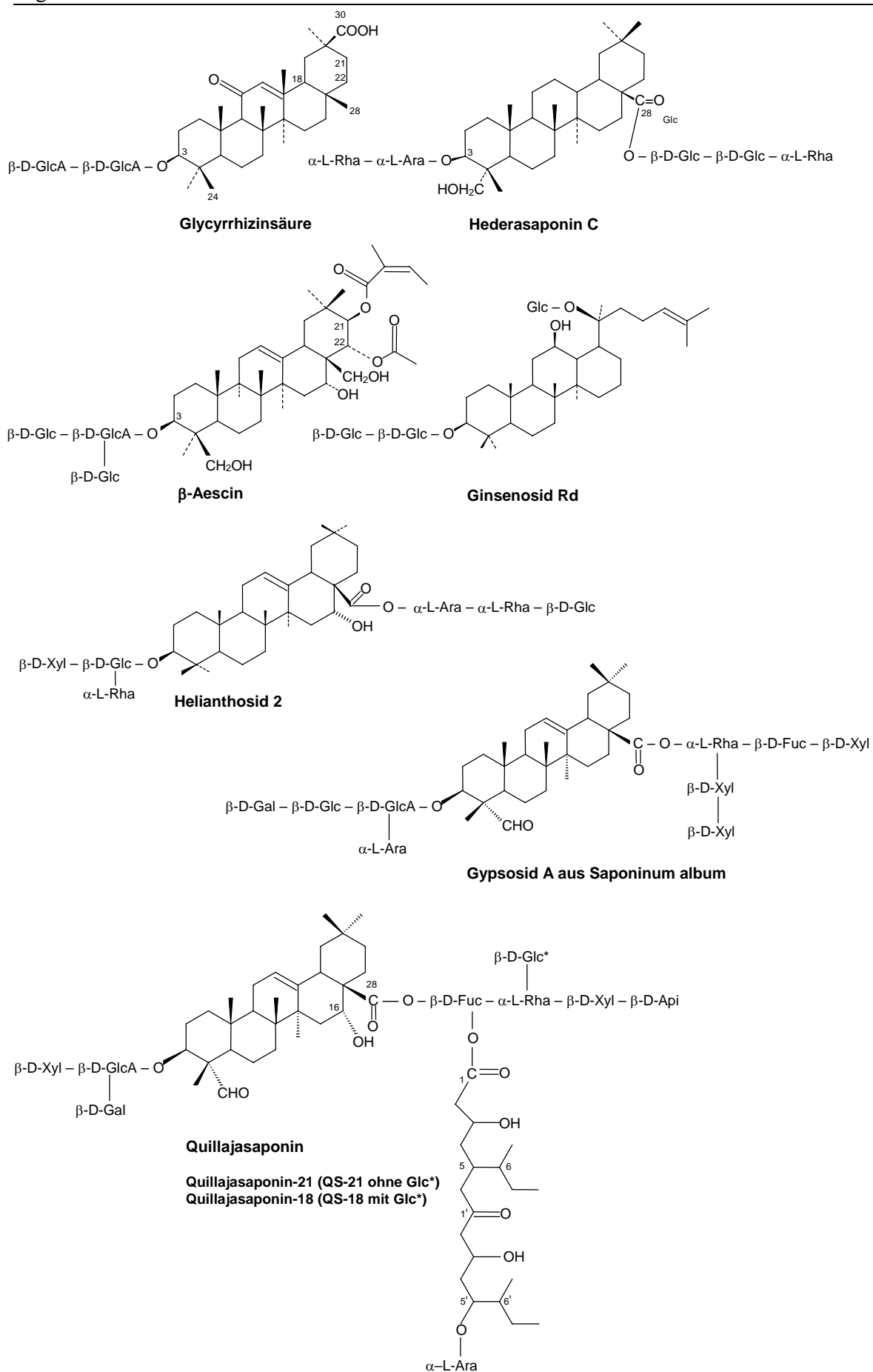


Abb. 3.20: Strukturen der sieben verwendeten Saponine Glycyrrhizinsäure, Hederasaponin C, β -Aescin, Helianthosid 2, Ginsenosid Rd, Saponinum album und Quillajasaponin.

Von den Saponinen besitzt nur Ginsenosid Rd ein steroidales Aglycon, während alle anderen ein triterpenoides Aglycon aufweisen. In den spezifischen funktionalen Gruppen weisen diese weitere Unterschiede auf. Die Hauptkomponenten aus Quilljasaponin (QS-21 und QS-18) und Saponinum album (Gypsosid A) besitzen eine Aldehydgruppe in der Position C4. In dieser Position tragen Glycyrrhizinsäure, Helianthosid 2 und Ginsenosid Rd Methylgruppen und Hederasaponin C und β -Aescin eine Alkoholfunktion. Helianthosid 2 weist abgesehen von der funktionalen Gruppe an C4 das gleiche Aglycon wie Quilljasaponin auf. Der Unterschied zwischen diesen beiden Substanzen besteht in den Zuckerketten. Die Zuckerketten aller hier aufgeführten Saponine unterscheiden sich deutlich voneinander. Glycyrrhizinsäure und Ginsenosid Rd haben nur unverzweigte Disaccharide an der Position C3 des Aglycons. Hederasaponin C besitzt auch das unverzweigte Disaccharid an C3, zusätzlich aber auch ein unverzweigtes Trisaccharid an C28. β -Aescin und Helianthosid 2 haben ein einfach verzweigtes Trisaccharid an C3 und Helianthosid 2 zusätzlich ein unverzweigtes Trisaccharid an C17. Nur die Saponine in Saponinum album und Quilljasaponin haben sowohl an Position C3 als auch an C17 verzweigte Oligosaccharide. In Saponinum album ist die Hauptkomponente das abgebildete Gypsogenin A und in Quilljasaponin sind es die Saponine QS-21 und QS-18. Der Unterschied zwischen Saponinum album und Quilljasaponin besteht neben der Varianzen in den Zuckerketten in einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in Position C16 von Quilljasaponin.

3.4.3 Cytotoxizität der Saponine

Um eine geeignete Konzentration der Saponine (2.1.3) für die spätere Kombination mit den chimären Toxinen zu ermitteln, wurden die Saponine zunächst allein mit HER14-Zellen inkubiert (2.4.4.1). Dazu wurden die Saponine in einer Konzentration von 3 mg/ml in PBS gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Aus diesen Lösungen wurden die weiteren Verdünnungen angesetzt, mit denen die Zellen dann inkubiert wurden. Die Endkonzentrationen wurden zwischen 0,5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ gewählt, da für Saponinum album bereits gezeigt wurde, dass eine Konzentration von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ für die Kombinationsversuche ideal ist [86]. Die nach Durchführung des Assays resultierenden Werte für das Überleben der Zellen sind in der Abb. 3.21 dargestellt.

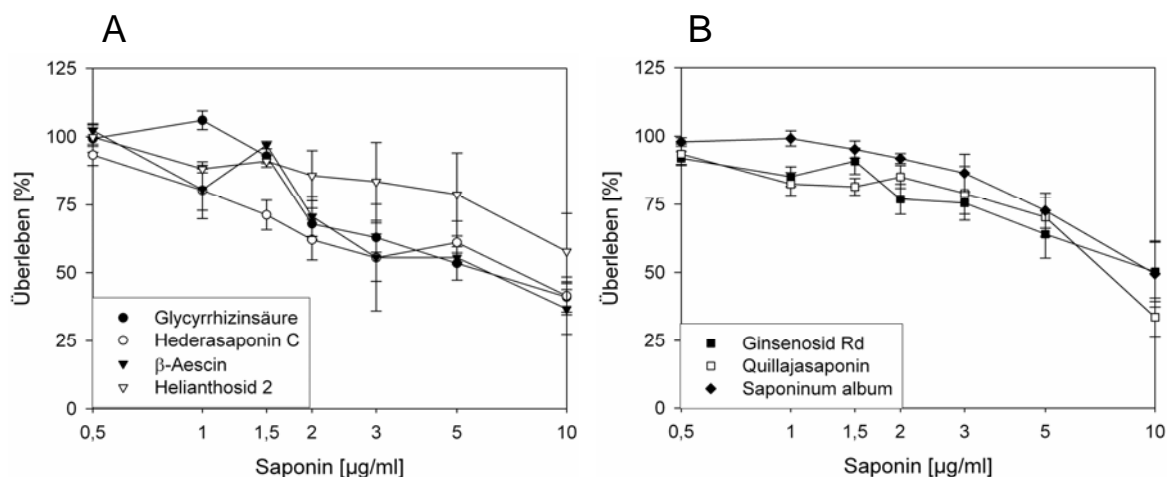


Abb. 3.21: Cytotoxizität der Saponine auf HER14-Zellen. Die Saponine wurden in Konzentrationen von 0,5–10 µg/ml 48 h mit 2000 HER14-Zellen inkubiert und anschließend anhand der Spaltung von Fluoresceindiacetat das Überleben der Zellen in Abhängigkeit der Saponinkonzentration durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen (100 % Überleben) ermittelt. **(A)** Cytotoxizität der Saponine Glycyrrhizinsäure, Hederasaponin C, β-Aescin und Helianthosid 2. **(B)** Cytotoxizität der Saponine Ginsenosid Rd, Quillajasaponin und Saponinum album.

Die in Abb. 3.21 präsentierten Dosis–Wirkungskurven für die sieben untersuchten Saponine auf HER14-Zellen zeigen für alle Saponine einen ähnlichen Verlauf. Nach Inkubation mit der geringsten Konzentration der Saponine (0,5 µg/ml) lag das Überleben der Zellen für alle Saponine bei etwa 100 %. Bei einer Konzentration von 1,5 µg/ml überlebten mit den meisten Saponinen noch über 90 % der Zellen. Nur Hederasaponin C und Quillajasaponin wiesen mit 71 % und 82 % Überleben eine stärkere cytotoxische Wirkung auf. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 10 µg/ml Saponin lag das Überleben der Zellen zwischen 34 % (Quillajasaponin) und 57 % (Helianthosid 2). Von 1 µg/ml zu 1,5 µg/ml zeigt β-Aescin einen deutlichen Anstieg der überlebenden Zellen. Da aber schon bei 2 µg/ml wieder eine erheblich höhere Toxizität vorliegt, handelt es sich bei dem beschriebenen Anstieg vermutlich um ein Artefakt der Messung.

Die gleichen Analysen wurden auch mit NIH-3T3-Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hier war die Wirkung der Saponine schwächer als auf HER14-Zellen. Bei der höchsten Saponinkonzentration von 10 µg/ml überlebten für alle Saponine mehr als 70 % der Zellen. Wie schon für die HER14-Zellen beschrieben, war die Wirkung der Saponine in einer Konzentration von 1,5 µg/ml vernachlässigbar, da mehr als 90 % der Zellen diese Konzentration überlebten. Quillajasaponin und Hederasaponin C hatten jedoch auch auf NIH-3T3-Zellen eine etwas cytotoxischere Wirkung als die anderen Saponine, so dass diese beiden Saponine bei der Konzentration von 1,5 µg/ml zu einem Überleben von nur 87 % führten.

Da die oben beschriebenen Ergebnisse gezeigt haben, dass auf HER14-Zellen mit einer Konzentration von 1,5 µg/ml das Überleben der Zellen nur wenig eingeschränkt ist, wurde

diese Konzentration für die folgenden Versuche zur Kombination mit chimären Toxinen ausgewählt. Quillajasaponin und Hederasaponin C sind zwar in dieser Konzentration zumindest auf HER-14-Zellen bereits etwas toxisch, wurden für die Kombinationsversuche aus Gründen der Vergleichbarkeit jedoch auch in der Konzentration von 1,5 µg/ml eingesetzt.

3.4.4 Cytotoxizität von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF in Kombination mit Saponinen

Nach Ermittlung der geeigneten Saponinkonzentration für die Kombination mit den chimären Toxinen wurde zunächst die resultierende Cytotoxizität für H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF auf HER14- und NIH-3T3-Zellen untersucht. Die Cytotoxizitätsassays wurden wie unter 2.4.4.1 beschrieben durchgeführt und die Ergebnisse für zwei der Saponine in folgender Abbildung exemplarisch dargestellt (Abb. 3.22).

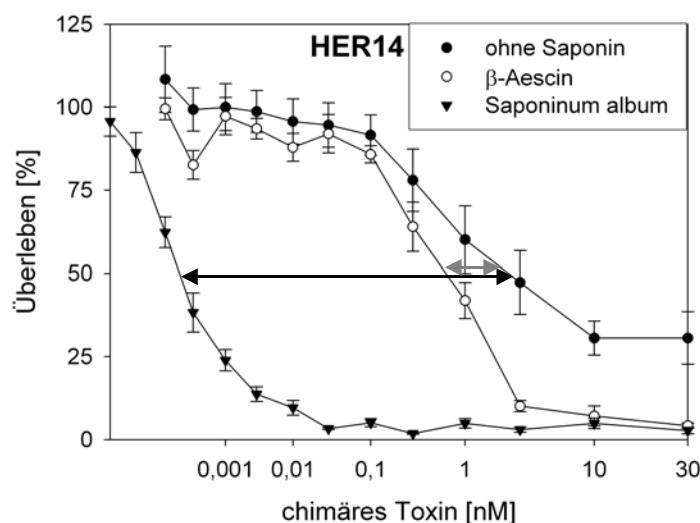


Abb. 3.22: Cytotoxizität von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF in Kombination mit Saponinum album und β-Aescin auf HER14-Zellen. Die Saponine wurden in einer Konzentration von 1,5 µg/ml 5 min auf 2000 HER14-Zellen vorinkubiert, dann wurde H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF in unterschiedlichen Konzentrationen hinzugefügt und für 48 h auf den Zellen inkubiert. Zur Bestimmung der Cytotoxizität wurde das Überleben der Zellen in Abhängigkeit der Konzentration des chimären Toxins anhand der Spaltung von Fluoresceindiacetat durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen ermittelt.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in Abb. 3.22 nur zwei der sieben analysierten Saponine nach Kombination mit H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF auf HER14-Zellen gezeigt. Bei den beiden präsentierten Saponinen handelt es sich um die Saponine, die die Cytotoxizität des chimären Toxins auf HER14-Zellen am wenigsten (β-Aescin) und am meisten verstärkt haben (Saponinum album). In der Dosis-Wirkungskurve ist zum Vergleich die Wirkung des chimären Toxins ohne Vorinkubation mit Saponin dargestellt. Durch die beiden Doppelpfeile in der Abbildung ist angedeutet, wie stark die zytotoxische Wirkung des Toxins durch das jeweilige Saponin verstärkt wurde. Der lange schwarze Pfeil für die

Verstärkung durch Saponinum album zeigt anschaulich, dass das Saponin die Wirkung des chimären Toxins um mehr als das 10 000fache angehoben hat, während β -Aescin die Wirksamkeit nicht einmal um das 10fache steigert. Dieser Verstärkungsfaktor ist der Quotient aus dem IC_{50} -Wert der Kombination von Saponin und chimärem Toxin und dem IC_{50} -Wert einer Analyse des chimären Toxins ohne Saponin. Für Saponinum album liegt in Kombination mit $^{H10}SAP-Ad^*_{TLM}-EGF$ eindeutig ein synergistischer Effekt vor, da die resultierende Steigerung des Effektes bereits bei Konzentrationen eintritt, bei denen sowohl Saponinum album als auch das chimäre Toxin allein noch gar keine Wirkung auf das Überleben der Zellen zeigen. Zur besseren Übersicht und auch um die Daten der anderen Saponine zu präsentieren, wurden alle IC_{50} -Werte und die aus dem Vergleich mit Versuchen ohne Saponin resultierenden Verstärkungsfaktoren für die Kombination mit $^{H10}SAP-Ad^*_{TLM}-EGF$ auf HER14- und NIH-3T3-Zellen zusammengefasst (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: IC_{50} -Werte und Verstärkungsfaktoren nach einer Inkubation von HER14- und NIH-3T3-Zellen mit einer Kombination aus Saponinen und $^{H10}SAP-Ad^*_{TLM}-EGF$.

Saponin	HER14		NIH-3T3	
	IC_{50} [nM]	Verstärkungs- faktor	IC_{50} [nM]	Verstärkungs- faktor
ohne Saponin	2,4	–	27,2	–
Glycyrrhizinsäure	0,4	6,0	4,6	6,0
Hederasaponin C	0,5	4,9	5,8	4,7
β -Aescin	0,6	3,7	11,6	2,4
Helianthosid 2	0,2	10,9	6,6	4,1
Ginsenosid Rd	0,2	11,3	7,3	3,7
Quillajasaponin	0,0017	1 434	0,013	2 113
Saponinum album	0,00018	13 647	0,014	1 977

Die in Tab. 3.5 aufgelisteten IC_{50} -Werte der Kombination von $^{H10}SAP-Ad^*_{TLM}-EGF$ mit den sieben Saponinen und die aus dem Vergleich zu dem Ansatz ohne Saponin errechneten Verstärkungsfaktoren für die Cytotoxizität zeigen erhebliche Unterschiede. Damit wird die unterschiedliche Wirkung der Saponine in Rahmen der Kombination deutlich. Während auf HER14-Zellen ohne Saponine der IC_{50} -Wert bei 2,4 nM liegt, wird dieser durch alle Saponine verringert. Während jedoch Glycyrrhizinsäure, Hederasaponin C, β -Aescin, Helianthosid 2 und Ginsenosid Rd den IC_{50} -Wert auf maximal 0,2 nM senken, wird durch Quillajasaponin 1,7 pM und durch Saponinum album sogar 0,18 pM erreicht. Die Größe des Unterschiedes wird durch den Vergleich der Verstärkungsfaktoren besonders deutlich. Die ersten Saponine (Glycyrrhizinsäure, Hederasaponin C, β -Aescin, Helianthosid 2 und Ginsenosid Rd) verstärken die Cytotoxizität von $^{H10}SAP-Ad^*_{TLM}-EGF$ gegenüber den EGFR exprimierenden HER14-Zellen nur bis zu 11,3fach. β -Aescin erreicht sogar nur einen Wert von 3,7 und hat damit den schwächsten Effekt. Quillajasaponin dagegen kann die Cytotoxizität etwa 1 400fach steigern und Saponinum album erreicht den höchsten Verstärkungsfaktor mit 13 600.

Bei den gleichen Versuchen auf NIH-3T3-Zellen ohne EGFR ist die Wirkung des chimären Toxins wesentlich schwächer. Die auftretende Cytotoxizität wird von unspezifisch aufgenommenen chimären Toxinen verursacht. Der IC_{50} -Wert von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF liegt daher mit 27,2 nM höher als der entsprechende Wert auf HER14-Zellen. Die Saponine können in der Kombination mit dem chimären Toxin aber auch die Aufnahme in NIH-3T3-Zellen erhöhen. Daher wird der IC_{50} -Wert des chimären Toxins durch alle Saponine verringert. Wie schon auf den HER14-Zellen beobachtet, wurde die cytotoxische Wirkung des Fusionsproteins von Glycyrrhizinsäure, Hederasaponin C, β -Aescin, Helianthosid 2 und Ginsenosid Rd nur wenig erhöht. Die resultierenden IC_{50} -Werte liegen zwischen 4,6 und 7,3 nM, außer für β -Aescin, dass durch die Kombination nur einen Wert von 11,6 nM erreicht. Auch für NIH-3T3-Zellen sind Quillajasaponin und Saponinum album mit IC_{50} -Werten von 0,013 und 0,014 nM wesentlich potentere Verstärker der Cytotoxizität. Damit ergeben sich Verstärkungsfaktoren zwischen 2,4 (β -Aescin) und 6 (Glycyrrhizinsäure) für die weniger verstärkenden Saponine und von etwa 2 000 für Quillajasaponin und Saponinum album.

Um für die einzelnen Saponine die Relevanz der Expression von EGFR auf den Zielzellen bewerten zu können, wurden für jedes Saponin die in Tab. 3.5 aufgelisteten Verstärkungsfaktoren auf HER14-Zellen durch die auf den NIH-3T3-Zellen dividiert. Die berechneten Quotienten spiegeln die Spezifität des Verstärkungseffektes in Bezug auf das Vorhandensein des EGFR wider. Ein hoher Quotient für ein bestimmtes Saponin besagt, dass die Wirkung des chimären Toxins H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF auf EGFR exprimierenden HER14-Zellen durch die Kombination mit dem Saponin stärker erhöht wird als auf den NIH-3T3-Zellen ohne EGFR. Die berechneten Quotienten für jedes Saponin sind in der folgenden Abbildung präsentiert.

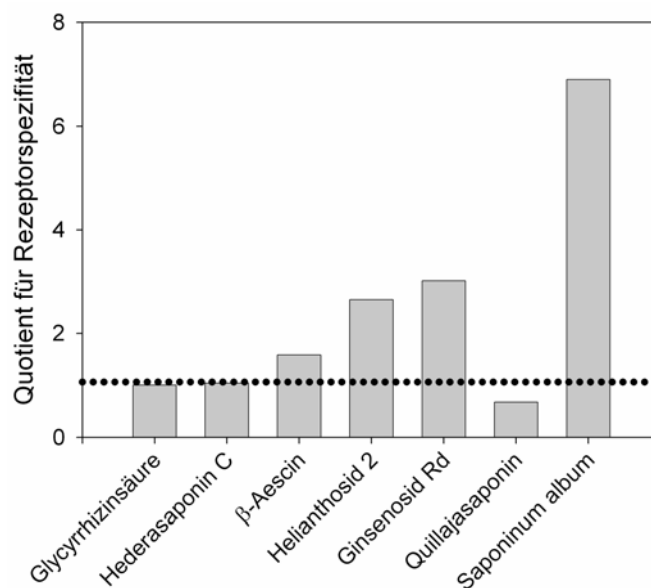


Abb. 3.23: Quotienten für die Rezeptorspezifität der Saponinwirkung. Zur Ermittlung der Quotienten für die Rezeptorspezifität durch die Saponinwirkung wurden die IC_{50} -Werte der Kombination von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF mit den unterschiedlichen Saponinen auf EGFR exprimierenden HER14-Zellen durch die entsprechenden Werte auf NIH-3T3-Zellen dividiert. Die gepunktete Linie zeigt den Quotienten von 1 an, bei dem ein Saponin die Wirkung von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF auf beiden Zelltypen gleichermaßen verstärkt.

Die gezeigten Quotienten der Abb. 3.23 verdeutlichen sehr übersichtlich die unterschiedlichen Effekte der Saponine bei der Erhöhung der Cytotoxizität. Die gestrichelte Linie bei dem Quotienten von 1 in der Graphik gibt den Grenzwert an, ab dem man von einer rezeptorspezifischen Erhöhung der Cytotoxizität durch das Saponin sprechen kann. Ist die verstärkende Wirkung des Saponins auf HER14-Zellen deutlich höher als auf NIH-3T3-Zellen, so ergibt sich ein Quotient, der deutlich über 1 liegt. Während β-Aescin, Helianthosid 2 und Ginsenosid Rd erhöhte Quotienten mit Werten bis zu 3 aufweisen, liegt der Wert für Saponinum album sogar bei über 7. Die übrigen Saponine haben Quotienten um 1, die auf eine vergleichbare Erhöhung der Cytotoxizität bei HER14- und NIH-3T3-Zellen hindeuten.

Um nach der Untersuchung der Relevanz der EGFR-Expression auch den Effekt eines spezifischen Liganden am chimären Toxin zu untersuchen, wurden die Kombinationsanalysen auch mit H6 SAP durchgeführt.

3.4.5 Cytotoxizität von H6 SAP in Kombination mit Saponinen

Die Cytotoxizität von H6 SAP in Kombination mit den sieben Saponinen wurde sowohl an HER14-Zellen als auch auf NIH-3T3-Zellen untersucht. Die Cytotoxizitätsassays wurden wie unter 2.4.4.1 beschrieben durchgeführt und die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: IC₅₀-Werte und Verstärkungsfaktoren nach einer Inkubation von HER14- und NIH-3T3-Zellen mit einer Kombination aus Saponinen und ^{H6}SAP.

Saponin	HER14		NIH-3T3	
	IC ₅₀ [nM]	Verstärkungs- faktor	IC ₅₀ [nM]	Verstärkungs- faktor
ohne Saponin	175	–	83	–
Glycyrrhizinsäure	50,9	3,4	71,7	1,2
Hederasaponin C	24,4	7,2	153,9	0,5
β-Aescin	80,5	2,2	110,4	0,8
Helianthosid 2	55,8	3,1	25,7	3,2
Ginsenosid Rd	70,5	2,5	73,8	1,1
Quillajasaponin	0,17	1 009	1,3	62,4
Saponinum album	0,093	1 881	0,5	174,9

Da die Aufnahme von ^{H6}SAP durch den nicht vorhandenen Liganden nur unspezifisch erfolgen kann, sollten die IC₅₀-Werte des Proteins für HER14- und NIH-3T3-Zellen gleich sein. Tatsächlich ergibt sich jedoch ein Unterschied von 175 nM für HER14-Zellen und 83 nM für NIH-3T3-Zellen. Unterschiede in der Wirkung der Saponine in höheren Konzentrationen konnten auch schon bei der Cytotoxizität der Saponine allein festgestellt werden. Möglicherweise haben sich die HER14-Zellen durch die Transformation mit dem EGFR etwas verändert, so dass die leichten Unterschiede in der Wirkung der Saponine und des chimären Toxins mit einer Varianz in der Gesamtsituation der Zellen zu erklären ist. Die Unterschiede sind jedoch nicht von Bedeutung, da es hier um die Erhöhung der Cytotoxizität von ^{H6}SAP durch die Saponine und nicht um absolute Werte geht.

Wie schon zuvor mit ^{H10}SAP-Ad*_{TLM}-EGF können alle Saponine die cytotoxische Wirkung verstärken. Auf HER14-Zellen erhöhen die Saponine Glycyrrhizinsäure, β-Aescin, Helianthosid 2 und Ginsenosid Rd die Cytotoxizität 2–3fach. Hederasaponin C liegt mit einem Verstärkungsfaktor von 7,2 etwas höher. Quillajasaponin und Saponinum album zeigen mit etwa 100facher und 1900facher Verstärkung wieder die deutlichsten Resultate. Für die NIH-3T3-Zellen sind die Verstärkungsfaktoren durch alle Saponine niedriger als für den HER14-Zellen. Lediglich Helianthosid 2 weist einen gleichen Verstärkungsfaktor auf. Quillajasaponin und Saponinum album senken den IC₅₀-Wert von ^{H6}SAP nur noch 62,4 beziehungsweise 174,9fach. Insgesamt zeigt sich jedoch, dass die Verstärkung der Cytotoxizität von ^{H6}SAP insbesondere durch Quillajasaponin und Saponinum album wesentlich geringer ist als die von ^{H10}SAP-Ad*_{TLM}-EGF. Die Verstärkung durch die anderen fünf Saponine ist in allen Fällen recht gering.

Um die Bedeutung des receptorspezifischen Liganden EGF in ^{H10}SAP-Ad*_{TLM}-EGF für die Kombinationsversuche zu klären, wurden wie schon zuvor Quotienten gebildet. Da nur die spezifische Ligand–Rezeptor–Interaktion betrachtet werden sollte und die Rolle der EGFR–Expression bereits zuvor untersucht wurde, wurden für diesen Vergleich nur die Daten der Kombination mit ^{H10}SAP-Ad*_{TLM}-EGF und ^{H6}SAP auf HER14-Zellen

herangezogen. Durch Division der Verstärkungsfaktoren nach Kombination mit H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF und H6 SAP für jedes Saponin wurden Quotienten erhalten, bei denen ein hoher Wert eine Saponin abhängige Verstärkung der Cytotoxizität aufgrund des Vorhandenseins des EGF ausdrückt. Die Quotienten wurden für jedes Saponin berechnet und sind in der folgenden Graphik dargestellt.

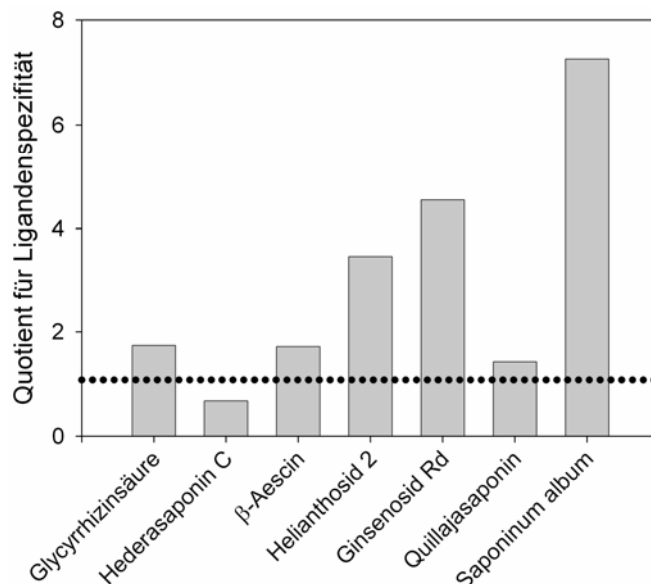


Abb. 3.24: Quotienten für die Ligandenspezifität der Saponinwirkung. Zur Ermittlung der Quotienten der Ligandenspezifität wurden die IC_{50} -Werte von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF in Kombination mit den Saponinen durch die entsprechenden Werte von H6 SAP dividiert. Für die Ligandenspezifität wurden nur die Messungen auf HER14-Zellen für die Quotientenbildung berücksichtigt. Die gepunktete Linie zeigt den Quotienten von 1 an, bei dem keine erhöhte Wirkung eines Saponins durch das Vorhandensein von EGF erzielt wird.

Die Quotienten für die Ligandenspezifität (Abb. 3.24) ergeben für die Saponine Glycyrrhizinsäure, β-Aescin und Quillajasaponin nur geringfügig höhere Werte als 1. Damit bewirken diese Saponine nur wenig höhere Verstärkungsfaktoren für H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF als für H6 SAP. Den geringsten Quotienten, der sogar unter 1 liegt, besitzt Hederasaponin C. Dieses Saponin verstärkt die Aufnahme von H6 SAP ohne Ligand bei HER14-Zellen sogar stärker als die des ligandentragenden chimären Toxins. Deutlich spezifischer sind die Saponine Helianthosid 2 und Ginsenosid Rd, die Quotienten um 4 haben. Damit ist die Verstärkung der Cytotoxizität für H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF viermal höher als für H6 SAP. Den höchsten Quotienten (über 7) weist, wie schon bei der Rezeptorspezifität (Abb. 3.23), Saponinum album auf.