

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

**Diplom-Biologe Jan Anderl**

aus Jugenheim

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# **Synthese und Cytotoxizität membranpermeabler Phallotoxine**

Gutachter: Prof. Dr. Felix Wieland  
Biochemie-Zentrum (BZH)  
Universität Heidelberg

Prof. Dr. Heinz Faulstich  
Max-Planck-Institut für medizinische  
Forschung, Heidelberg

# **Meinen Eltern**

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Zellbiologie in Ladenburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Faulstich in der Zeit von April 2000 bis August 2003 durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Faulstich für die Bereitstellung des Themas sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. F. Wieland danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. P. Traub danke ich für die Unterstützung durch die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Geräten.

Ebenso möchte ich Frau Traub für die Überlassung der einzelnen Zelllinien und Zellkultur-Materialien danken.

Bei Dr. R. Hartwig bedanke ich mich für die Hilfe bei der konfokalen Lasermikroskopie.

Weiter danke ich ganz herzlich allen Mitarbeitern der Heidelberg Pharma Holding, die durch gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

## Zusammenfassung

Die Phallotoxine, eine Familie F-Aktin stabilisierender, giftiger Peptide aus dem Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*), lassen sich aufgrund ihrer schlechten Membranpermeabilität nur bedingt zur Untersuchung lebender Zellen verwenden. Wie diese Arbeit zeigt, können jedoch durch Kopplung an verschiedene Liganden Phallotoxin-Derivate mit hoher Membranpermeabilität erhalten werden. Insbesondere drei Strategien verbesserten die Translokation der Toxinderivate in das Zellinnere ohne Verlust der biologischen Aktivität: (1) Die Erhöhung der Hydrophobizität der Toxine durch Veresterung mit Fettsäuren; (2) die Bindung von kationischen Polymeren wie Polylysin; und (3) die Kopplung an *trojanische Peptide*, wie HIV-Tat-Peptid oder Arginin<sub>8</sub>, über Disulfid-haltige Linker. Alle drei Strategien lieferten Phallotoxin-Derivate mit Cytotoxizitäten, die bis zu 1000-mal höher waren als die des natürlichen Phalloidins. Die Cytotoxizität wurde anhand der Proliferationshemmung in Mausfibroblasten-Kulturen bestimmt, wobei für Oleoyl-Phalloidin, Tat-SS-Phalloidin und Poly-L-Lysin-Phalloidin IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von 2.5 µM, 3.8 µM bzw. 3.1 µM erhalten wurden (Phalloidin >1000 µM). Da die Affinität von Oleoyl-Phalloidin und Tat-SS-Phalloidin für F-Aktin gering ist (bis zu 40-mal geringer als Phalloidin), kann man von einer hydrolytischen Abspaltung des Toxins durch zelluläre Esterasen im Oleoyl-Phalloidin, bzw. einer Reduktion der Disulfidbrücke im Tat-SS-Phalloidin ausgehen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß die Aufnahme bei allen Derivaten über eine nicht-spezifische, adsorptive Endocytose erfolgt. Dabei wurden die modifizierten Phallotoxine an die Zellmembran gebunden, entweder über hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen, anschließend in Vesikeln internalisiert und gespalten, und schließlich über einen unbekanntem Transportweg ins Cytosol transportiert. Es stellte sich heraus, daß die viel diskutierte, permeationsvermittelnde Wirkung der sogenannten *trojanischen Peptide* weitgehend auf deren kationischer Natur, d.h. auf elektrostatischer Wechselwirkung mit der Membran, beruht. Morphologisch führte die Vergiftung durch membrangängige Phallotoxine zu charakteristischen Veränderungen der Cytoskelett-Struktur der Fibroblasten, wie einer Kumulation des Aktins in "Patches", einer starken Verkleinerung der Zellen und zu häufiger Doppelkernigkeit. Der Nachweis charakteristischer Apoptose-Marker in Jurkat-Zellen deutet darauf hin, daß die toxinbedingte Stabilisierung des Aktin-Cytoskeletts zur Apoptose führt. Eine therapeutische Verwendung F-Aktin-stabilisierender Toxine zur Proliferationshemmung schien aufgrund der Erfolge Tubulin-stabilisierender Toxine in der Tumorbehandlung interessant. Eine gezielte Vergiftung von Tumor-Zelllinien durch Kopplung spezifischer Liganden wie Folsäure, Polyethylenglykole und Albumin an Phallotoxine konnte jedoch an Zellkulturen nicht gezeigt werden. Gleichwohl erscheinen für Folsäurederivate und Albumin-konjugierte Phallotoxine weitere Studien im Tiermodell vielversprechend.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
1.1	DER GRÜNE KNOLLENBLÄTTERPILZ .....	4
1.2	PHALLOTOXINE – AUFNAHME IN DIE LEBER.....	6
1.3	PHALLOTOXINE - CHEMISCHE STRUKTUR.....	10
1.4	AKTIN - DAS ZIELPROTEIN DER PHALLOTOXINE.....	12
1.5	PHALLOTOXINE IN DER MOLEKULARBIOLOGISCHEN FORSCHUNG.....	19
1.6	AUFGABENSTELLUNG.....	20
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN .....</b>	<b>21</b>
2.1	BIOLOGISCHES MATERIAL.....	21
2.2	CHEMIKALIEN UND SÄULENMATERIALIEN .....	21
2.3	ENZYME UND PROTEINE.....	24
2.4	STANDARDS UND KITS.....	24
2.5	PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN .....	25
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>30</b>
3.1	NATURSTOFF-REINIGUNG.....	30
3.2	SYNTHESEN VON PHALLOTOXINDERIVATEN .....	32
3.2.1	<i>Darstellung der Vorstufen.....</i>	<i>32</i>
3.2.2	<i>Synthesen von Phallotoxinen mit hydrophoben Liganden.....</i>	<i>36</i>
3.2.3	<i>Synthesen von Derivaten trojanischer Peptide.....</i>	<i>38</i>
3.2.4	<i>Synthesen Polymer-gebundener Phallotoxine.....</i>	<i>39</i>
3.2.5	<i>Synthesen Liganden- und Protein-gebundener Phallotoxine .....</i>	<i>42</i>
3.2.6	<i>Photosensitive und radioaktive Phallotoxine.....</i>	<i>43</i>
3.3	PHYSIKOCHEMISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE MESSUNGEN .....	44
3.3.1	<i>Konzentrationsbestimmungen.....</i>	<i>44</i>
3.3.2	<i>Bestimmung des Oktanol/H<sub>2</sub>O-Partitionskoeffizienten .....</i>	<i>45</i>
3.3.3	<i>Massenbestimmung nach MALDI-TOF .....</i>	<i>46</i>
3.3.4	<i>Gelpermeationsschromatographie .....</i>	<i>47</i>
3.3.5	<i>Ionenaustauscherchromatographie .....</i>	<i>48</i>
3.3.6	<i>Reversed-Phase HPLC.....</i>	<i>48</i>

3.4	BIOCHEMISCHE UND BIOPHYSIKALISCHE MESSUNGEN .....	50
3.4.1	<i>Aktinbindungsassay</i> .....	50
3.4.2	<i>Nachweis freier Thiolgruppen durch Ellman-Assay</i> .....	51
3.4.3	<i>Aktivierung des photosensitiven Phalloidins</i> .....	52
3.5	ZELLKULTUREN .....	53
3.5.1	<i>Anzucht und Handhabung der Zellkulturen</i> .....	53
3.5.2	<i>MTT-Proliferationsassay</i> .....	54
3.5.3	<i>Proliferationsassay mit <sup>3</sup>H-Thymidin</i> .....	55
3.5.4	<i>Färbungen lebender Zellen</i> .....	55
3.5.5	<i>Färbungen fixierter Zellen</i> .....	56
3.6	METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER APOPTOSE .....	56
3.6.1	<i>Durchflußzytometrie</i> .....	56
3.6.2	<i>Annexin-V-FLUOS</i> .....	57
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>59</b>
4.1	REINIGUNGEN.....	59
4.2	SYNTHESEN DER VORSTUFEN .....	61
4.2.1	<i>Einführung von Aminogruppen</i> .....	61
4.2.2	<i>Einführung von Linkerreagenzien</i> .....	63
4.3	SYNTHESEN DER MEMBRANGÄNGIGEN KONJUGATE.....	65
4.3.1	<i>Synthesen von Phallotoxinen mit hydrophoben Liganden</i> .....	65
4.3.2	<i>Synthesen von Derivaten trojanischer Peptide</i> .....	68
4.3.3	<i>Synthesen Polymer-gebundener Phallotoxine</i> .....	71
4.4	SYNTHESEN LIGANDEN- UND PROTEIN-GEBUNDENER PHALLOTOXINE.....	72
4.4.1	<i>Herstellung des Albumin-SS-Phalloidin</i> .....	72
4.4.2	<i>Folat-MPEG<sub>3350</sub>-SS-Phalloidin</i> .....	74
4.5	BESTIMMUNG DER OKTANOL-WASSER-KOEFFIZIENTEN .....	75
4.6	AKTINBINDUNG DER PHALLOIDINDERIVATE.....	76
4.7	ZELLKULTUR-VERSUCHE .....	82
4.7.1	<i>Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Cytotoxizitätskonzentrationen</i> .....	82
4.7.2	<i>Aufnahmekinetik der Toxine</i> .....	90
4.8	MIKROSKOPISCHE STUDIEN .....	92
4.9	APOPTOSE-VERSUCHE.....	100
4.9.1	<i>Versuche mit Annexin-V-FLUOS</i> .....	100
4.9.2	<i>Apoptose-Versuche mit Caspase-Inhibitoren</i> .....	103

4.10	HERSTELLUNG UND AKTIVIERUNG EINES PHOTOSENSITIVEN PHALLOTOXINS .....	106
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>110</b>
5.1	AKTINBINDUNG ALS VORAUSSETZUNG FÜR CYTOTOXIZITÄT.....	110
5.2	ERHÖHUNG DER MEMBRANGÄNGIGKEIT DURCH LIPOPHILE LIGANDEN.....	113
5.3	ERHÖHUNG DER MEMBRANGÄNGIGKEIT DURCH TROJANISCHE PEPTIDE UND KATIONISCHE POLYMERE .....	116
5.4	AUFNAHME DURCH ENDOCYTOSE .....	120
5.5	ÄNDERUNG DER ZELLMORPHOLOGIE UND MIKROFILAMENTSTRUKTUR .....	124
5.6	APOPTOSE DURCH STABILISIERUNG DES AKTINFILAMENTS.....	129
5.7	ZELLSPEZIFITÄT DER PHALLOTOXIN-DERIVATE ALS ANSATZ THERAPEUTISCHER BEHANDLUNGEN .....	132
5.8	AUSBLICK.....	135
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>137</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Der grüne Knollenblätterpilz

Der Grüne Knollenblätterpilz, *Amanita phalloides*, gehört zur Klasse der Basidiomyceten (Wieland, 1986). Man findet ihn von Juli bis Ende Oktober einzeln oder in Gruppen im Laubwald und Parkanlagen, meist unter Eichen und Rotbuchen, mit deren Wurzeln der Pilz eine Mykorrhiza bildet. Sein Verbreitungsgebiet erstreckt sich über ganz Mittel-, Süd- und Teile Nord-Europas sowie ausgedehnte Bereiche Eurasiens. Seit Beginn des letzten Jahrhunderts findet man den Grünen Knollenblätterpilz in geringem Vorkommen auch auf dem nordamerikanischen Kontinent (Tanghe & Simons 1973; Smith 1978), insbesondere in Kalifornien und Oregon in der Nähe von Korkbäumen, mit deren Setzlingen er wohl in das bestehende ökologische System eingeführt wurde.

---

**Abbildung 1.1: Der Grüne Knollenblätterpilz**

---



Der Grüne Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) ähnelt insbesondere im jungen Zustand dem Speisepilz *Agaricus bisporus* (Wiesenchampignon).

---

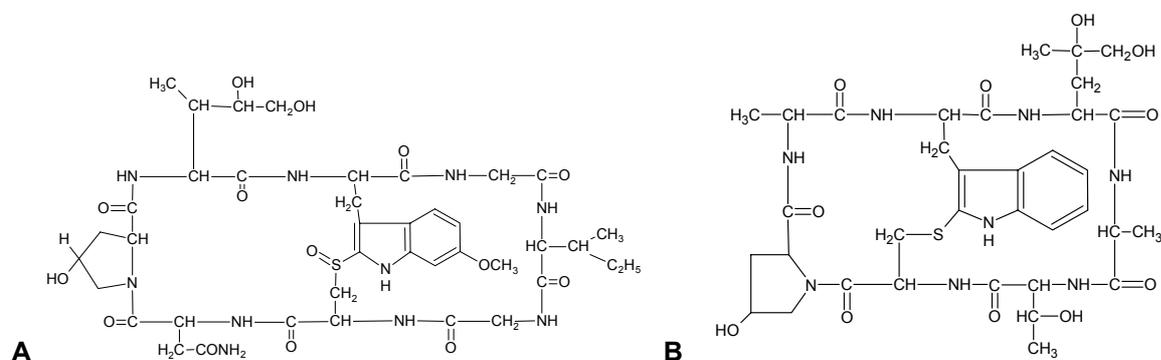
*Amanita phalloides* ist einer der gefährlichsten toxischen Pilze überhaupt. Etwa 95 % aller tödlich verlaufenden Pilzvergiftungen in Europa sind auf diese Art zurückzuführen, die Letalität liegt bei 10-30 % (Floersheim *et al.*, 1982). Für einen Menschen mit einem Gewicht von 70kg genügen rund 50g Frischpilze für eine lebensbedrohende Vergiftung – das ist ein einziger, großer Pilz.

Alle Knollenblätterpilz-Vergiftungen zeigen nach Verzehr denselben dreiphasigen Krankheitsverlauf (Faulstich, 1980): nach einer Latenzzeit von sechs bis zwölf Stunden

beginnt eine gastrointestinale Phase mit starken Abdominalschmerzen, die von einer Cholera-ähnlichen Diarrhoe und Dehydratation begleitet werden. Nach dem ersten bis dritten Tag kann es zu einer trügerischen Besserung kommen, bevor sich eine starke Schädigung der Leber und Niere einstellt, die durch Anstieg von Transaminase-Enzymen und Lactat-Dehydrogenase im Blutserum nachweisbar ist. Daneben ist die Blutkoagulation gestört, was innere Blutungen auslöst. Meist führt schließlich ein Leberversagen zum hepatischen Koma, der Tod tritt zwischen dem sechsten und achten Tag ein.

Von den niedermolekularen toxischen Inhaltsstoffen der Knollenblätterpilze sind zwei Klassen bekannt: die Amatoxine und die Phallotoxine (siehe Abbildung 1.1) (Lynen & Wieland, 1938; Wieland & Hallermayer, 1941; Wieland & Gebert, 1966; Wieland & Faulstich, 1979; Faulstich *et al.*, 1980). Beide Verbindungsklassen bestehen aus zyklischen Peptiden und bilden farblose, in Wasser und polaren Lösungsmitteln gut lösliche Kristalle. Ein weiterer toxischer Inhaltsstoff ist Phallolysin (Seeger *et al.*, 1973), ein ca. 30 kDa Protein, das im Gegensatz zu den genannten Peptiden hitze- und säurelabil ist.

**Abbildung 1.1: Grüner Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) – Amanitin und Phalloidin**



**A:**  $\alpha$ -Amanitin ist ein in der Zellbiologie weit verbreitetes Amatoxin. **B:** Das Cyclopeptid Phalloidin ist das bekannteste Toxin aus der Gruppe der Phallotoxine.

Anhand von gereinigten Pilzextrakten und deren klinischen Symptomen in Versuchstieren konnte gezeigt werden (Faulstich, 1980), dass ausschließlich die "langsam-wirkenden" bicyklischen Oktapeptide der Amanitin-Klasse für den tödlichen Verlauf der Vergiftung im

---

Menschen verantwortlich sind. Die letale Dosis für Amatoxine wird für den Menschen auf ca. 0,1 mg/kg Körpergewicht geschätzt. Die Pilztoxine werden nach Verzehr weder im Magen noch im Darm enzymatisch abgebaut; bisher ist keine Peptidase bekannt, welche die Gifte der Knollenblätterpilze angreift. Obwohl 90% des aufgenommenen Giftes innerhalb der ersten fünf Stunden über die Niere wieder ausgeschieden werden, kommt es zu einer akuten Leberdystrophie durch Schädigung der parenchymalen Hepatocyten und zur Zerstörung proximaler Nierentubuli. Aus der unter Amanitin-Einwirkung eintretenden Verminderung der RNA-Synthese in den Hepatocyten von Mäusen schloss man, daß die toxische Wirkung des Amanitins auf einer Hemmung von RNA-Polymerasen beruht (Fiume & Stirpe, 1966). Von den drei RNA-Polymerasen in eukaryontischen Zellen werden jedoch nur zwei spezifisch gehemmt. Die im Zellkern lokalisierte RNA-Polymerase II, die für die Synthese des Vorläufermoleküls der mRNA (hnRNA) verantwortlich ist, wird schon bei Amanitin-Konzentrationen von  $K_I = 3 \times 10^{-9}$  M gehemmt (Cochet-Meilhac & Chambon, 1974). Durch die Hemmung kommt die Biosynthese von Proteinen zum Erliegen und die Zelle stirbt nach neueren Erkenntnissen vermutlich durch Apoptose über das TNF- $\alpha$ -System (Leist *et al.*, 1997). Die RNA-Polymerase III, die ebenfalls im Zellkern lokalisiert ist und die Vorstufe der tRNA und 5s-sRNA synthetisiert, wird hingegen erst bei hohen Amanitinkonzentrationen gehemmt ( $K_I = 10^{-5}$  M) (Seifart & Benecke, 1975; Kedinger *et al.*, 1970).

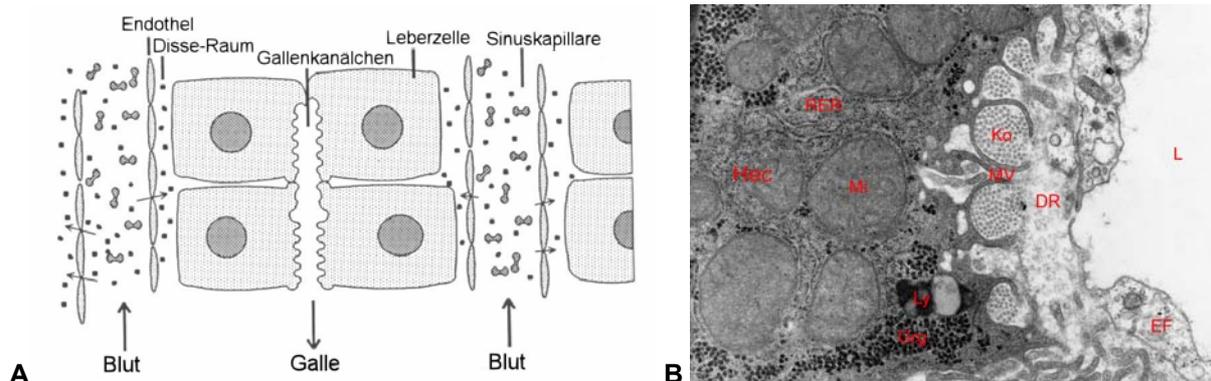
## 1.2 Phallotoxine – Aufnahme in die Leber

Die Phallotoxine von *Amanita phalloides* unterscheiden sich grundlegend in ihren toxikologischen Eigenschaften von den Amatoxinen. Diese "schnell-wirkenden" Peptide verursachen den Tod von Versuchstieren schon nach ca. zwei bis fünf Stunden, allerdings bei deutlich höheren Konzentrationen (LD<sub>50</sub> weiße Maus: 2,5mg/kg Körpergewicht; LD<sub>50</sub> Ratte: 1,5mg/kg Körpergewicht) (Wieland, 1986). Nach heutigem Verständnis ist der Wirkort der Phallotoxine, wie der der Amatoxine, die Leber. Im Gegensatz zu den Amatoxinen greifen die Phallotoxine jedoch nicht in die Proteinbiosynthese ein, sondern schädigen Zellen nach Aufnahme in das Cytoplasma durch ihre Bindung an Aktinfilamente.

---

**Abbildung 1.3: Leberaufbau**


---



**A:** Schematische Darstellung des mikroskopischen Aufbaus der Leber: Das Blut gelangt über Sinuskapillaren zu den Leberzellbalken. Proteine und andere lösliche Substanzen wie die Phallotoxine passieren die endotheliale Barriere, während Erythrocyten und andere Blutzellen im Sinus verbleiben. Hepatocyten nehmen Stoffe aus dem Dissé-Raum auf bzw. sondern Stoffe in diesen ab. Abfallprodukte werden auf der apikalen Seite der Leberzelle über die Gallenkanälchen ausgeschieden. Die gebildete Galle verläßt das Leberläppchen in entgegengesetzter Richtung zum Blutfluß (verändert nach Heijn, 1994). **B:** Dissé-Raum zwischen Hepatocyten und Sinusendothelzellen der Leber vom Affen. (DR: Dissé-Raum; EF: Endothelcytus fenestratus; Grg: Glykogengranula; Hec: Hepatocyt (Leberparenchymzelle); Ko: Kollagenfaserbündel (Typ 3) L: Lebersinusoid; Mi: Mitochondrium; MV: Mikrovilli der Hepatocyten; Ly: tertiäres Lysosom; RER: rauhes endoplasmatisches Retikulum)

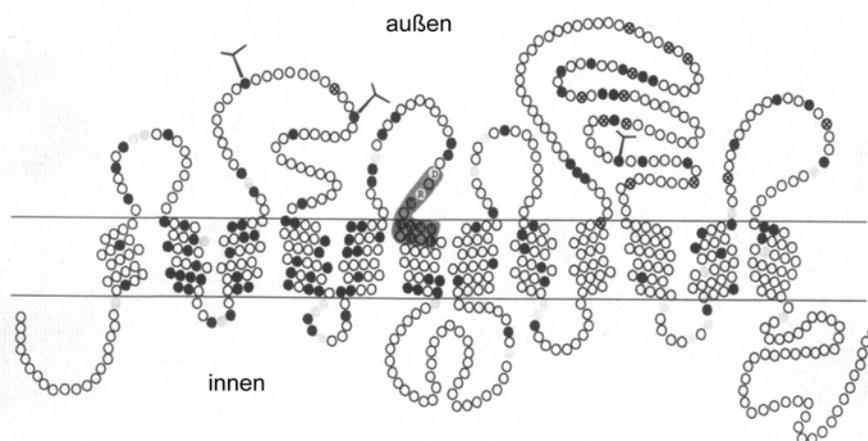
---

Durch Verzehr aufgenommene oder in den Kreislauf injizierte Phallotoxine gelangen über das Blut in die Lebersinusoiden und erreichen von dort über die endothelialen Fenestrae den Dissé-Raum, wo ein komplexes Transportsystem in der sinusoidalen Plasmamembran der Hepatocyten liegt. Die dortigen Gradienten-abhängigen Transportproteine haben ihre physiologische Funktion in der Rückführung von Gallensäuren aus dem hepatischen Zyklus sowie in der Aufnahme von Thyroidhormonen, Steroiden und Xenobiotika (Meier *et al.*, 1997; Kullak-Ublick *et al.*, 2000).

Zahlreiche *in-vitro*-Modelle wurden zur Erforschung der funktionellen Eigenschaften dieser Transportsysteme benutzt. Hierzu zählen isolierte Rattenhepatocyten, Primärkulturen und Zellkultursysteme (Münter *et al.*, 1986; Schwarz *et al.*, 1975; Schwarz & Barth, 1979; Anwer *et al.*, 1976, Petzinger & Frimmer 1984 / 1988; Föllmann *et al.*, 1990), isolierte perfundierte Lebern (Wieland *et al.*, 1978; Reichen & Paumgartner, 1976) sowie basolaterale und kanalikuäre Plasmamembranvesikel von Leberzellen (Inoue *et al.*, 1982; Meier *et al.*, 1984). Erst in den letzten zehn Jahren konnten die für den Transport der Phallotoxine verantwortlichen Carrierproteine mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zur Klonierung und molekularen Charakterisierung identifiziert werden:

Neben dem an den  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Transport über das *Na<sup>+</sup>-Taurocholat-Cotransport-Protein* (Ntcp in Maus und Ratte bzw. NTCP im Mensch) (Hagenbuch *et al.*, 1991; Hagenbuch & Meier, 1994) findet sich in der Hepatocyten-Membran eine Gruppe von Membranproteinen, die über einen  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Anionen-Antiport amphiphatische Substrate in das Zellinnere transportieren. Sie gehören zu den sogenannten *Organic Anion Transporting Peptides* (OATP), die wiederum der Subfamilie SLC21A der "solute carrier superfamily" zugeordnet werden. Zur Familie der OATP (Mensch) bzw. Oatp (Nager) rechnet man inzwischen eine Vielzahl (18) von Membranproteinen, die nicht nur in der Leber, sondern auch in Geweben der Blut-Hirn-Schranke, Lungen, Herz, Nieren, Placenta und Testis exprimiert werden. Allen gemein ist die die Struktur mit 12 Transmembrandomänen, wobei zwischen Domäne 9 und 10 eine großer extrazellulärer Abschnitt mit konservierten Cysteinresten liegt, der den Zinkfinger-Strukturen von DNA-Bindeproteinen ähnelt (Abbildung 1.4). Die Zahl der Aminosäurereste liegt zwischen 643 und 722, 57 davon sind über alle 18 Mitglieder reserviert. Anhand von phylogenetischen Studien lassen sich vier Subfamilien unterscheiden (OATP-1 / OAPT-2 / OATP-3 / OATP-4), wobei OATP-1 durch ein breiteres Substratspektrum für amphiphatische Verbindungen auffällt. Die Mitglieder dieser Familie sind Teil des körpereigenen Detoxifizierungssystems und nehmen potentiell toxische Endo- und Xenobiotika aus dem zirkulierend System.

**Abbildung 1.4: Modell des Oatp1 aus der Ratte**



Nach Hydrophathie-Analyse vorhergesagtes 12-Transmembrandomänen-Modell des Oatp1 aus der Ratte. Schwarz: konservierte Aminosäurereste; Grau: konservierte und geladene Aminosäurereste (D, E, K, R); Kreuze: konservierte Cystein-Reste; Y: Drei mögliche N-Glykosylierungsstellen der extrazellulären Proteinloops; Graue Fläche: OATP-Superfamilien Signatur-Sequenz

Aus Photoaffinitäts-Labeling Experimenten ließ sich ein Polypeptid ( $M_r$  98.000) charakterisieren, das mit photolabilem Phalloidin und Antamanid interagiert. Aktuelle

---

Arbeiten (Fehrenbach *et al.*, in press; Hagenbuch & Meier; 2003) deuten daraufhin, daß bestimmte Varianten der OATPs (Mensch) bzw. Oatps (Ratte), bei ähnlicher molarer Masse, [<sup>3</sup>H]-Desmethylphalloin in das Zellinnere transportieren. Bei Versuchen mit Xenopus-Oocyten konnte gezeigt werden (Hagenbuch & Meier, 2003), daß bestimmte Mitglieder der OATP-1-Familie, genauer OATP2 (*SLC21A6*; Mensch), OATP8 (*SLC21A8*; Mensch) und Oatp4 (*Slc21a10*), am Transport beteiligt sind. Experimente mit transfizierten HEK293-Zellen bestätigten dies zumindest für OATP2 ( $K_m=39\mu\text{M}$ ), nicht jedoch für OATP8 (Fehrenbach *et al.*, in press).

Es ist seit langem bekannt, daß Phalloidin nach dem Eintritt in Hepatocyten am F-Aktin bindet. Dagegen gibt es nur wenige Informationen darüber, ob das Toxin über die kanalikuläre Membran wieder in die Galle zurückgelangt und so in die hepatische Zirkulation eintritt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß ein transzellulärer Toxintransport OATP2/ABCC2-transfizierter MDCK-Zellen stattfindet (Fehrenbach *et al.*, in press). Beim ABCC2 (MRP2) handelt es sich um ein Protein, daß zu der Gruppe der "Multidrug resistance-associated proteins" zählt (Elferink & Jansen, 1994). Dies sind integrale Membranglykoproteine, die als primär aktive ATP-abhängige Exportpumpen arbeiten. Sie gehören zur Familie der ATP-Bindekassetten-Transporter (ABC-Transporter).

Der spezifische Transport der Phallotoxine in die parenchymalen Zellen der Leber und die Bindung am filamentösen Aktin nach Aufnahme führt zu einer erheblichen Organvergrößerung (mehr als zweifach) durch Blutakkumulation. Die Einblutung in die Leber und die daraus folgende Reduktion des zirkulierenden Blutvolumens um ca. 60 %, führt schließlich zum Tod durch hämodynamischen Schock. Durch frühe lichtmikroskopische (Matschinsky & Wieland, 1960) und elektronenmikroskopische (Miller & Wieland, 1967) Untersuchungen zeigte sich in isolierten und perfundierten Rattenlebern nach Phallotoxinzugabe eine starke Vakuolisierung ausgehend von der sinusoidalen Region. Diese Vakuolisierung ist *in vivo* für die Vergrößerung der Leber verantwortlich (Tuchweber *et al.*, 1973). In einzelnen Hepatocytenvakuolen wurden nach Vergiftung bis zu 13 Erythrocyten gezählt. Vermutlich resultiert die Vesikelbildung aus einer Veränderung der mechanischen Eigenschaften der Phospholipid-Bilayer durch Disintegration von filamentösen Aktinstrukturen. So dringt extrazelluläre Flüssigkeit, dem Druckgradienten folgend, zwischen Sinus und Zellinnerem in das Cytoplasma ein. Die Beobachtung von blasenartigen Ausstülpungen ("blebs") auf der Plasmamembran von frisch isolierten Hepatocyten 10 bis

---

20min nach Phallotoxin-Applikation bestätigt diese Vermutung (Weiss *et al.*, 1973; Frimmer *et al.* 1974). Wahrscheinlich ist die Vergrößerung der Zelloberfläche der an sich globulären Zellen ebenfalls eine Folge des - jetzt umgekehrten - Druckgradienten.

### 1.3 Phallotoxine - Chemische Struktur

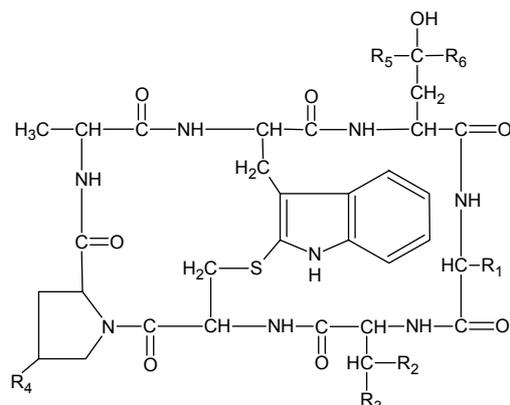
Alle sieben natürlichen Varianten der Phallotoxine (siehe Abbildung 1.5) sind bicyclische Heptapeptide (Wieland & Witkop, 1940). Charakteristisch ist das Vorkommen hydroxylierter Aminosäuren (Asp, Pro, Leu) sowie von Aminosäuren in der D-Konfiguration. Die Nummerierung des cyclischen Peptides beginnt bei dem alphabetisch ersten Aminosäurerest (Alanin) und wird im Uhrzeigersinn fortgeführt.

Allen Phallotoxinen gemeinsam ist ein Tryptophanrest in Position 6, der mit dem Cystein in Position 3 zu einer bicyclischen Struktur verbunden ist. Das Tryptophan ist in Stellung 2 des Indolrings mit dem Schwefelatom des Cysteins substituiert. Ein solches Strukturelement, formal ein Oxidationsprodukt aus Tryptophan und Cystein, wird als Tryptathionin bezeichnet. Der 2-Indolyl-Thioether ist als chromophores System für das charakteristische UV-Spektrum ( $\lambda_{\max} = 291\text{nm}$ ) des Peptides verantwortlich (siehe Abbildung 4.1).

Innerhalb der Phallotoxine kann man eine neutrale Gruppe, bestehend aus Phalloidin, Phalloin, Phallisin und Prophalloin, von einer Gruppe saurer Toxine unterscheiden, die durch den Term "aci" gekennzeichnet sind: Phallacidin, Phallacin und Phallisacin. In ihnen ersetzt ein  $\beta$ -Hydroxy-D-Aspartat ein D-Threonin der neutralen Gifte an Position 2. Ein zweiter Unterschied ist das Vorkommen eines L-Valin in den sauren Derivaten anstatt eines L-Alanin an Position 1 der neutralen Toxine.

Alle Phallotoxine besitzen neben dem Tryptathionin und L-Alanin ein 4-*cis*-Hydroxy-L-prolin (mit Ausnahme des Prophalloin), das in der Natur selten ist. Die verschiedenen neutralen und sauren Phallotoxine unterscheiden sich wiederum in der Zahl der Hydroxylgruppen in der Seitenkette des L-Leucin (Position 7).

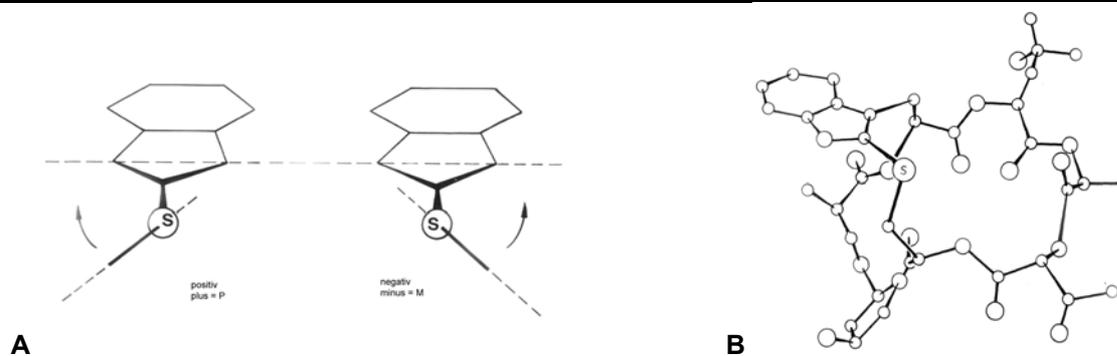
Abbildung 1.5: Die natürlich vorkommenden Phallotoxine



Name	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	LD <sub>50</sub> Maus [mg/kg]
Phalloin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1,5
Phalloidin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	2
Phallisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	2
Prophalloin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	>20
Phallacin	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	COOH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	1,5
Phallacidin	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	COOH	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	1,5
Phallisacin	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH	COOH	OH	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	4,5

Die Phallotoxine bilden bei der Kristallisation sehr feine, Asbest-ähnliche Fasern, die für eine Röntgenstrukturanalyse ungeeignet sind. Die räumliche Struktur der Toxine wurde daher anhand von [<sup>1</sup>H]-NMR-Spektroskopie, Energie-Minimierungs-Berechnungen (Patel *et al.*, 1973) sowie mit Hilfe synthetischer Peptidstrukturen (Zanotti *et al.*, 1978) bestimmt.

Abbildung 1.6: Räumliche Struktur der Phallotoxine



**A:** Orientierung der 2-Indolyl-Thioetherbrücke. **B:** Raumstruktur des Phalloidins.

---

Die Orientierung der 2-Indolyl-Thioetherbrücke im Molekül kann zwei Konfigurationen annehmen: positiv (P) helical oder negativ (M) helical (Abbildung 1.6 A). Die Ergebnisse aus CD-Analysen der synthetischen Peptidstrukturen zeigen die P-Helicität als einzig mögliche Struktur (Wieland *et al.*, 1981) (siehe Abbildung 1.6 B).

## 1.4 Aktin - das Zielprotein der Phallotoxine

Mitte der 70er Jahre konnte durch Differenzspektroskopie mit Muskelaktin gezeigt werden, daß Phalloidin am F-Aktin bindet, und daß durch diese Komplexierung F-Aktin gegen Depolymerisation durch z.B. Iodid oder Ultraschall stabilisiert ist (Wieland & Govindan, 1974; Faulstich *et al.*, 1975).

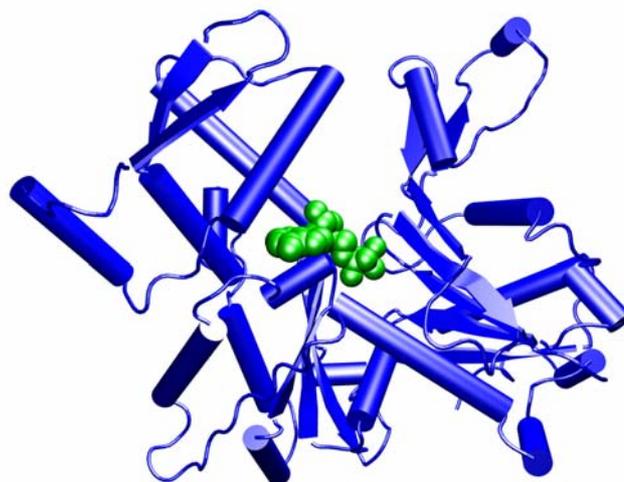
Aufgrund seiner zentralen Bedeutung in einer Vielzahl von zellulären Prozessen und seines ubiquitären Vorkommens in verschiedensten Organismen wurde Aktin zu einem der meistuntersuchten Proteine überhaupt. Die aktinhaltigen Mikrofilamente bilden zusammen mit den Mikrotubuli und den Intermediärfilamenten das Cytoskelett, das den Zellen ihre definierte Gestalt gibt. Aktin ist dabei wahrscheinlich das am stärksten regulierte Protein der Cytoskelettproteine. Es ist nicht nur an der zellulären Mobilität (Wang, 1985) beteiligt, sondern verleiht auch mechanische Stabilität, steuert die Endocytose bzw. Exocytose von Proteinen, und spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und Zellteilung (kontraktiler Ring; Schroeder, 1973). In Nicht-Muskelzellen liegt je nach Zelltyp ungefähr die Hälfte des Aktins als monomeres (G-)Aktin im Komplex mit Polymerisations-hemmenden Proteinen vor.

Aktin aus verschiedenen Organismen und Gewebetypen ist hochkonserviert (Korn, 1982). Die Aminosäuresequenzen cytoplasmatischer Aktine ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktine) unterscheiden sich nur geringfügig von denen der Muskelaktine ( $\alpha$ -Aktine), im Gegensatz zu Pflanzenaktinen, die teilweise bis zu 10 % Abweichung zeigen (Pollard & Cooper, 1986). Insbesondere Sequenzabschnitte, die an der Ausbildung der Kontaktstellen zwischen den einzelnen Aktinmonomeren im Filament beteiligt sind, zeigen nahezu vollständige Identität, was sich auch im äquivalenten Polymerisationsverhalten aller Aktine widerspiegelt (Clarke & Spudich, 1977; Korn, 1978; van Troys *et al.*, 1999). Das  $\alpha$ -Aktin aus dem Skelettmuskel des Kaninchen dient wegen seiner relativ einfachen Aufarbeitung oft als Modellaktin für wissenschaftliche Fragestellungen. Es besteht aus 375 Aminosäuren (Elzinga *et al.*, 1973) und besitzt eine molare Masse von 42 kDa.

Mit einer Ausnahme nutzten die bisherigen röntgenkristallographischen Strukturbestimmungen des G-Aktins zur Verhinderung einer Polymerisation immer proteingebundene Monomere. Neben DNaseI (Kabsch *et al.*, 1990) fanden hierbei GS-1 (McLaughlin *et al.*, 1993), Profilin (Schutt *et al.*, 1993; Chik *et al.*, 1996) und das Vitamin-D-Bindeprotein Verwendung (Head *et al.*, 2002; Otterbein *et al.*, 2001). Erst kürzlich konnte eine Struktur des unkomplexierten, monomeren Aktins, markiert durch den Farbstoff Tetramethylrhodamin, ermittelt werden (Otterbein *et al.*, 2001). Dabei zeigte sich, daß die aktinbindenden Proteine keinen signifikanten Einfluß auf die Struktur des Monomers haben.

Das Aktinmolekül läßt sich anhand der Tertiärstruktur in zwei Domänen unterteilen: Die sogenannte kleine Domäne besteht aus den Subdomänen 1 und 2 und beinhaltet neben dem N- und C-Terminus die Aminosäurereste 1-144 und 338-375, während sich die große Domäne aus den Subdomänen 3 und 4 zusammensetzt und die Aminosäurereste 145-337 umfaßt (Abbildung 1.7). Die große und die kleine Domäne sind untereinander nur durch zwei Polypeptidstränge im unteren Teil des Moleküls, der sog. *Hinge*-Region, verbunden, was eine große Flexibilität innerhalb des Aktinmoleküls nahelegt. Die vier Subdomänen bilden eine Spalte ("*cleft*"), die eine Bindetasche für das Nukleotid (im Falle des  $\alpha$ -Aktins ATP bzw. ADP) und ein mit ihm assoziiertes zweiwertiges Kation (physiologisch meist  $Mg^{2+}$ , in Strukturbestimmungen dagegen  $Ca^{2+}$ ) bildet.

**Abbildung 1.7:** Struktur des  $\alpha$ -Aktins



Tertiärstruktur des monomeren  $\alpha$ -Aktins anhand der röntgenkristallographischen Koordinaten aus Otterbein *et al.*, 2001. Polypeptidkette in blauer *cartoon*-Darstellung, gebundenes ADP in grüner *ball*-Darstellung. Erstellt mit der Software VMD 1.8 und dem Raytracer PovRay 3.1.

---

Aktin und die meisten Mitglieder seiner strukturell verwandten Familie, wozu die hsp70-Chaperone, die Hexokinase und verschiedene andere Zuckerkinasen gehören, unterliegen einer an die ATP-Hydrolyse gekoppelten Konformationsänderung. Im Aktin nimmt diese Änderung eine wichtige Aufgabe bei der Dynamik der Filamente ein (siehe unten; Sheterline *et al.*, 1998). ADP-Aktinfilamente zeigen eine höhere Bindefähigkeit gegenüber depolymerisierenden Proteinen (Pollard *et al.*, 2000). Zurückzuführen ist dies auf eine Änderung der Tertiärstruktur im Aktinmolekül. Wie Vergleiche zwischen ATP-G-Aktin- und ADP-G-Aktin-Monomeren zeigen (Otterbein *et al.*, 2001) führt dabei eine relativ kleine Änderung an der Nukleotidbindestelle des Moleküls zu einer signifikanten Konformationsänderung in den Subdomänen 2 und 4, die sich nach Hydrolyse des ATP um 10° bzw. 5° drehen.

Ein Modell zur Beschreibung des F-Aktins wurde auf Basis der Kristallstruktur des Monomers (Kabsch *et al.*, 1990) und Daten aus der Kryo-Elektronenmikroskopie sowie der Kleinwinkel-Röntgenbeugung von orientierten Aktinfilamenten entwickelt (Holmes *et al.*, 1990; Lorenz *et al.*, 1993). Nach diesen Ergebnissen bildet das filamentöse Aktin eine einsträngige, linksgängige Helix (*genetic Helix*), die bei einer Ganghöhe von 360Å 13 Untereinheiten umfaßt, was einer Steigung von 27,5Å pro Monomer entspricht. Jedes dieser Monomere ist innerhalb der Helix um 167° gedreht, wodurch die Helix morphologisch als rechtsgängige Doppelhelix (*long-pitch Helix*) mit einer Ganghöhe von 720Å und einem Durchmesser von 95Å erscheint. Die Stabilisierung dieser long-pitch Helix wird neben lateralen vor allem durch longitudinale Wechselwirkungen zwischen der Subdomäne 1 eines Moleküls und den Subdomänen 3 und 4 des benachbarten Moleküls erzielt. Innerhalb der Helix sind die Monomere so angeordnet, daß die große Domäne (Subdomänen 3 und 4) in der Nähe der Filamentachse liegt, während die kleine Domäne (Subdomäne 1 und 2) am Filamentradius lokalisiert ist. Durch diese Orientierung ist die Subdomäne 1, die eine primäre Kontaktstelle für eine Vielzahl von aktinbindenden Proteinen und für die Phallotoxine bildet, nach außen orientiert und gut zugänglich (siehe Abbildung 1.8).

Die Fähigkeit zur reversiblen Polymerisation prädestiniert das Aktin für statische und dynamische Prozesse innerhalb der Zelle. Divalente Kationen (vor allem  $Mg^{2+}$ , aber auch  $Ca^{2+}$ ) begünstigen die Polymerisation durch Bindung an die G-Aktin-Untereinheit (Selden *et al.*, 1983; Mornet & Ue, 1984). Die G-Aktine erfahren durch die Bindung von zweiwertigen Kationen eine Konformationsänderung, was als Aktivierungs-Phase (erster Schritt des

Polymerisationsvorgangs) angesehen werden kann. Neben zweiwertigen Kationen können auch monovalente Kationen eine Aktivierung bewirken (Maruyama & Tsukagoshi, 1984).

Die Zusammenlagerung mehrerer G-Aktine zu einem Polymerisationskern (Nukleus) ist der folgende und zeitbestimmende Schritt der Polymerisation. Aktin-Dimere sind auch unter polymerisationsfördernden, ionischen Bedingungen instabil und dissoziieren bevor sich größerer Aggregate bilden (Wegner & Engel, 1975). Bei erfolgreicher Bildung eines Nukleus steigt die Wahrscheinlichkeit einer weiteren Monomeranlagerung gegenüber der Dissoziation eines bestehenden Aktin-Oligomers (Wegner & Engel, 1975; Tobacman & Korn, 1983). Dieser als Nukleation bezeichneten Phase folgt die Elongations-Phase, die durch das Wachstum des Polymers gekennzeichnet ist, bis schließlich ein Gleichgewichtszustand (steady-state) erreicht ist. Dieser beschriebene Verlauf der Polymerisation kann durch eine sigmoidale Kurve dargestellt werden, die aufgrund des langsamen Beginns der Polymerisation bis zur Bildung eines Nukleus und dem anschließenden schnellen Wachstum bis zum Erreichen des Gleichgewichts zustande kommt. Verbunden mit der Polymerisation ist die Dephosphorylierung von ATP. Hingegen erfolgt bei der Depolymerisation keine Phosphorylierung von ADP (Straub & Feuer, 1950).

Dass Aktin-Filamente polar sind, konnte von Huxley 1969 erstmals aufgrund der Komplexierung ("Dekoration") von Aktin mit Myosinköpfen gezeigt werden. Es entsteht dabei ein im Elektronenmikroskop sichtbares „Fischgräten“- oder „Arrowhead“-Muster, das am einen Ende eine Pfeilspitzen-ähnliche Struktur („pointed end“) besitzt, während das andere Ende einem Widerhaken gleicht („barbed end“). Das beschriebene Muster entsteht durch die Bindung der Myosinköpfe an das Aktin in einem Winkel von  $45^\circ$ . Das „barbed end“ wird auch als „schnell wachsendes Ende“ oder „(+)-Ende“ und das „pointed end“ auch als „langsam wachsendes Ende“ oder „(-)-Ende“ bezeichnet (Woodrum *et al.*, 1975), was das unterschiedliche Assoziationsverhalten der G-Aktin-Monomere an die beiden Filamentenden veranschaulicht. An beiden Enden erfolgt ein Monomer-Turnover, wenn kein Netto-Wachstum mehr stattfindet (Elongationsphase und Gleichgewichtszustand). Während am (+)-Ende die Assoziation von G-Aktinmonomeren überwiegt, ist es am (-)-Ende die Dissoziation, was zur Folge hat, dass sich Aktin-Monomere vom (+)- zum (-)-Ende durch das Filament hindurchbewegen. Dieser Vorgang wird in der Literatur als „head-to-tail polymerization“ oder „treadmilling“ bezeichnet (Wegner, 1976; Kirschner, 1980; Neuhaus *et al.*, 1983). Die Konzentration freier G-Aktin-Moleküle beeinflusst wesentlich die Filamentlänge. Die im Gleichgewichtszustand zwischen Polymer und freien Monomeren herrschende G-Aktin-Konzentration, wird „kritische Konzentration“ genannt (Wegner, 1976). Das Unterschreiten

---

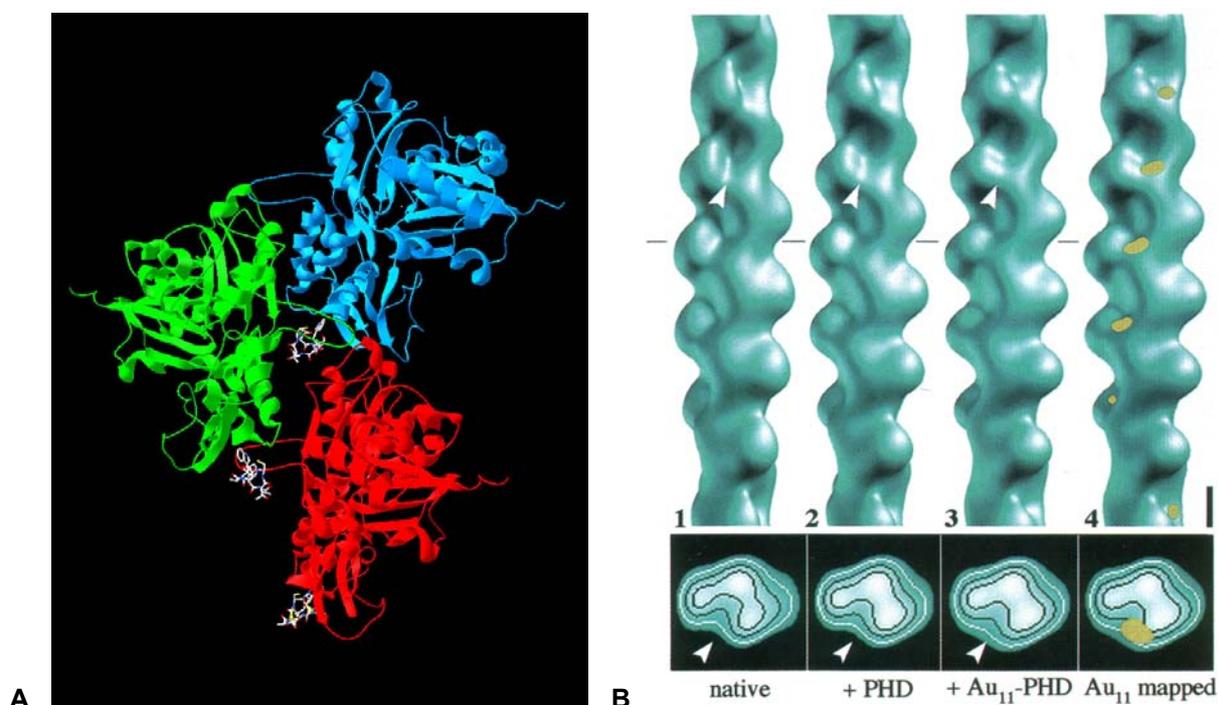
dieser Konzentration führt zu einer Netto-Depolymerisation. Die kritische Konzentration ist für das (-)-Ende um den Faktor 6 höher als die für das (+)-Ende (Wegner, 1976; Kischner, 1980; Pollard & Mooseker, 1981; Gaertner *et al.*, 1989).

Phallotoxine greifen in dieses dynamische System ein: sie beschleunigen die Polymerisation des G-Aktins unter suboptimalen Bedingungen und stabilisieren die F-Aktinfilamente durch Bindung mit hoher Affinität ( $K_D = 3 \times 10^{-8}$  M; Faulstich *et al.*, 1977), wobei die Filamente durch Abnahme der Dissoziationsgeschwindigkeit, mit welcher sich die Aktinmonomere von den Filamentenden lösen, gegen Depolymerisation stabilisiert werden und die kritische Konzentration des Aktins um den Faktor 10 bis 30 erniedrigt wird (Estes *et al.*, 1981). Diese Stabilisierung wird bereits bei einem stöchiometrischen Verhältnis Phalloidin/Aktin von 1:3 erreicht (Miyamoto *et al.*, 1986; Dancker *et al.*, 1975), jedoch ist eine Bindung des Peptids bis zu einer Stöchiometrie von 1:1 möglich (Wieland *et al.*, 1975). Die PHD-Bindung bewirkt einen Schutz der Filamente vor Denaturierung durch erhöhte Temperatur (De Vries *et al.*, 1976) und niedrige pH-Werte (Löw *et al.*, 1976), sowie vor Depolymerisation durch DNase I (Dancker *et al.*, 1975) und Spaltung durch Proteasen (De Vries & Wieland, 1978).

Mitte der 70er konnte die Bindung der Phallotoxine am F-Aktin durch UV-Differenzspektroskopie gezeigt werden (Wieland & Govindan, 1974; Faulstich *et al.*, 1975). Die Kristallisation eines Phallotoxin-gebundenen Aktins bzw. Aktinfilaments gelang jedoch nicht. Zur Bestimmung der Bindestelle des Toxins wurde F-Aktin mit zwei chemisch unterschiedlich aktivierten Phallotoxinen ("*affinity labels*"; Vandekerckhove *et al.*, 1985) kovalent markiert. Das eine Phallotoxin besaß eine [<sup>3</sup>H]-Iodacetyl-Gruppe, die ein nucleophiles Atom in der Seitenkette eines Aminosäurerests in der Binderegion des F-Aktins alkylieren konnte. Die zweite Verbindung, ebenfalls [<sup>3</sup>H]-markiert, enthielt ein photolabiles Diazirin. Nach Belichtung kann es das entstehende Carben sogar in C-H-Bindungen inserieren. Nach enzymatischer Proteinspaltung und Detektion der Radioaktivität konnte gezeigt werden, daß die Iodacetyl-Gruppe an dem Met<sup>119</sup> der Subdomäne 1 und am Met<sup>355</sup> der Subdomäne 2 gebunden hatte. Der photoaktive Rest befand sich am Glu<sup>117</sup> der Subdomäne 1. Aus diesem Versuch konnte damals aufgrund fehlender Strukturdaten im Aktinmolekül jedoch nicht bestimmt werden, ob diese Reste einem oder zwei benachbarten Monomeren zugeschrieben werden müssen. Zudem waren die *affinity labels* für eine direkte Lokalisierung der Bindungsstelle aufgrund ihrer Länge nur bedingt geeignet.

Mit Hilfe der Kleinwinkel-Röntgenbeugung von orientierten Aktin/Phalloidin-Gelen und computergestützten Energieminimierungs-Algorithmen ("*directed mutation algorithm*"; Lorenz *et al.*, 1993) konnte gezeigt werden, daß Phalloidin wahrscheinlich durch Bindung in der "*cleft*" der Aktinhelix mit drei Untereinheiten gleichzeitig wechselwirken kann (siehe Abbildung 1.8 A). Dabei ist der Tryptophanring in räumlicher Nähe zu drei aromatischen Seitenketten im Aktinmolekül (Tyr<sup>198</sup> im Monomer 1, Trp<sup>79</sup> in Monomer 2, Tyr<sup>279</sup> in Monomer 3), was die früheren differenzspektroskopischen Beobachtungen bekräftigte. Aufgrund fehlender Auflösung war diese Orientierung des Phalloidin-Moleküls im Polymer allerdings ungenau.

**Abbildung 1.8: Phalloidin-Bindung am F-Aktin**



**A:** Ausschnitt eines Phalloidin-gebundenen F-Aktinfilaments nach Lorenz *et al.*. Drei Aktin-Untereinheiten sind in *ribbon*-Darstellung in grün, rot und blau markiert. Drei Phalloidin-Moleküle sind als *stick*-Modell in CPK-Farben eingetragen. **B:** 3D-Helix-Rekonstruktion eines negativ-stained nativen (1), Phalloidin-stabilisierten (2) und Au<sub>11</sub>-Phalloidin-stabilisierten F-Aktinfilaments. Es sind jeweils 26 Aktinuntereinheiten *surface-rendered* dargestellt. Die weißen Pfeilspitzen deuten auf den Bereich, in dem beide long-pitch Helixstränge nebeneinander zum liegen kommen. Die Differenzen zwischen 2 und 3 sind in Rekonstruktion 4 gelb markiert. Die Abbildungen unten zeigen Querschnitte und Massenverteilungen durch das Filament (nach Steinmetz *et al.*, 1998; abgeändert)

Steinmetz *et al.* nutzen 1998 eine Undeca-Gold-Markierung zur Visualisierung eines Au<sub>11</sub>-Phalloidin am F-Aktin durch Scanning-Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (STEM), wodurch das Toxin durch die hohe Elektronendichte direkt sichtbar gemacht werden konnte.

Die Gold-Partikel befanden sich in Abständen von 5,5nm, was der axialen Ausdehnung einer Aktin-Untereinheit entspricht, entlang der beiden halbversetzten long-pitch Helixstränge eines einzelnen F-Aktinfilaments. Eine 3D-Rekonstruktion der Helix zeigte (Abbildung 1.8 B), daß sowohl die Filamentmorphologie als auch die Konformation der einzelnen Monomere durch die Phalloidinbindung kaum Veränderungen zeigten. Einzig die Massendichte im Filamentquerschnitt war leicht erhöht. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Orientierung des Toxins am Filament bei Lorenz *et al.* vermutlich falsch ist. Ein Bindung des Undeca-Gold-markierten Phalloidins ist nur nach einer Drehung um 180° parallel zur Filamentachse gegenüber der Lorenz-Positionierung ohne sterische Kollisionen am Aktin möglich.

Die gedrehte Orientierung nach Steinmetz *at al.* deckt sich mit den Ergebnissen aus Synthesen verschiedener modifizierter Phallotoxinderivate. Es zeigte sich hierbei, daß bestimmte strukturelle Charakteristika im Peptidmolekül für eine Bindung am F-Aktin und einer damit einhergehenden Toxizität grundlegend sind:

Nur die bicyclische Verbindung besitzt eine toxische Wirkung. Nach reduktiver Desulfurierung mit Raney-Nickel unter Öffnung der Thioetherbrücke zwischen dem 2-Indolyl-Ring des Tryptophans und dem Cysteinrest an Position 3 entstanden ebenso nicht-toxische und nicht-bindende Derivate wie bei der Spaltung der Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 1 und 7 mittels verdünnter Säuren.

Die Phallotoxine besitzen primäre und sekundäre Hydroxylgruppen, die sich in ihrer Reaktivität unterscheiden, sowie eine kaum reaktive, tertiäre Hydroxylgruppe. In Phalloidin und Phallacidin, den mengenmäßig mit Abstand am meisten vorkommenden Toxinen in *Amanita phalloides* (ca. 1mg/g bzw. 2mg/g Trockengewicht), ist das primäre  $\delta$ -OH der Seitenkette 7 die reaktivste Hydroxylgruppe im Molekül. In verschiedenen Reaktionen wurden an diese Gruppe Substituenten unterschiedlichster Größe gekoppelt, die von einem einfachen Acetylrest bis zur genannten Undeca-Gold-Markierung reichten. Alle Derivate zeigten gute Bindungseigenschaften am F-Aktin. Die Abwesenheit der zweiten, sekundären Hydroxylgruppe an der Seitenkette der Aminosäure 7, wie im Phalloin, reduzierte die Bindung nur geringfügig.

Die Carboxylgruppe an der Seitenkette der Aminosäure 2 der sauren Phallotoxine konnte in verschiedenen Reaktionen ohne Verringerung der Toxizität verestert oder durch eine

Methylgruppe ersetzt werden. Säureamide zeigten einen geringen Verlust der Bindefähigkeit am Filament, große Reste in dieser Position verringern die Affinität zum Aktin erheblich.

Eine Substitution der Hydroxylgruppe am 4-*cis*-Hydroxy-Prolin (Aminosäure 4) führte zu nicht-toxischen Produkten, da diese Struktur wohl zu Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Aktin benötigt wird.

Ebenfalls schlechte Bindungsfähigkeiten zeigten Toxinprodukte, die aus einer Alkylierung des Indol-Stickstoffs am Trp-Rest entstanden sind. Gruppen, die über die Größe zweier Kohlenstoff-Atome hinausgehen, reduzieren die Affinität vollständig.

## 1.5 Phallotoxine in der molekularbiologischen Forschung

Die Aufklärung von Phänomenen und Zusammenhängen der Zellbewegung, Transportprozesse, Signaltransduktion und Zellteilung wurden durch die charakteristischen Eigenschaften dieser Peptidfamilie erleichtert bzw. überhaupt erst ermöglicht. Als wichtiger Bestandteil des Cytoskeletts von Zellen lassen sich Aktinfilamente durch die Bindung von fluoreszierenden Phallotoxin-Derivaten in fixierten Zellen lokalisieren (Wulf *et al.*, 1979) und quantifizieren (Howard & Oresajo, 1985). Es sind verschiedene Fluoreszenzmarkierungen bekannt, wobei die Synthese der wichtigsten Vertreter über eine Derivatisierung der  $\gamma,\delta$ -Dihydroxyleucin-Seitenkette im Phalloidin verlaufen. An dieser Stelle konnte eine chemische Modifikation erreicht werden, ohne daß die Bindungsaffinität für Aktin erheblich beeinträchtigt wurde. In der Zellbiologie haben fluoreszierende Phallotoxine eine große Bedeutung erlangt. Gegenüber aktinspezifischen Antikörpern, die schon Jahre zuvor in der Immunofluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt wurden, um aktinhaltige Strukturen des Cytoskeletts zu erkennen (Lazarides & Weber, 1974), haben sie den Vorteil der einfacheren Applikation, was zu einem breiten Anwendungsfeld geführt hat (Faulstich *et al.*, 1988).

Die fehlende Aufnahmefähigkeit für Phalloidin durch Zellen, denen ein entsprechendes Transportsystem fehlt, hat den Einsatz der Gifte zur Untersuchung des Cytoskeletts in lebenden Systemen jedoch erheblich erschwert. Bei vielen Zelltypen blieb bisher als einzige Lösung die zeitraubende und wenig verträgliche Methode der Mikroinjektion.

---

## 1.6 Aufgabenstellung

Ziel dieses Projektes ist es, die Membranpermeabilität der Phallotoxine durch Bindung an Liganden zu erhöhen. Drei Prinzipien zu Erhöhung der Membranpermeabilität sollten dabei verfolgt werden: (1.) Die Erhöhung der Hydrophobizität der Toxine durch Kopplung an lipophile Liganden, wie zB. Fettsäuren. (2.) Die Kopplung an kationische Polymere, wie zB. Polylysine. (3.) Die Kopplung an sogenannte trojanische Peptide, wie zB. Tat-Peptid, Antenna-Peptid und Kaposi-Peptid.

Die Bindung dieser Toxinderivate an F-Aktin sollte in einem *in vitro* Aktinbindungsassay mit der Bindung des natürlichen Phalloidins verglichen werden. Weiterhin sollte die Cytotoxizität ( $IC_{50}$ -Konzentration) der Toxinderivate in einer Fibroblasten-Zellkultur bestimmt werden. Aus der ermittelten Affinität zum Aktin und der  $IC_{50}$ -Konzentration kann die Zunahme der Membranpermeabilität der Toxinderivate gegenüber Phalloidin abgeschätzt werden. Die Aufnahme der Gifte und die toxischen Effekte in der Zelle sollten an den Änderungen des Aktinskeletts durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgt werden. Weiterhin sollte geprüft werden, ob der Zelltod durch Apoptose eintritt.

Nach Erhöhung der Membrangängigkeit sollte in einem zweiten Teil der Arbeit die Zellspezifität der hergestellten Toxinderivate ermittelt werden. Diese ist bei Liganden zu erwarten, die einem erleichterten Transport (*facilitated transport*) unterliegen, sofern dieser in den verschiedenen Zellarten verschieden stark ausgeprägt ist. Dazu müssen die Toxinderivate an verschiedenen Tumor-Zelllinien auf ihre jeweilige Cytotoxizität untersucht werden. Hier könnten möglicherweise Tumor-spezifische Liganden, wie zB. Folsäure, Polyethylenglykole und Albumin einen spezifischen Transport der Phallotoxine in bestimmte Zelllinien ermöglichen und so die Voraussetzung für eine therapeutische Verwendung der membranpermeablen Toxine schaffen.

---

## 2 Materialien

### 2.1 Biologisches Material

MF/LDB-Zelllinie	aus fötalen Mausfibroblasten; Max-Planck-Inst. für Zellbiologie Abt. Prof. Dr. P. Traub, Ladenburg
NIH/3T3-Zelllinie	embryonale Mausfibroblasten; American Type Culture Collection, Maryland; ATCC Nr. CRL 1658 (Jainchill <i>et al.</i> , 1969)
HELA-Zelllinie	humanes Cervix-Karzinom, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; DSMZ Nr. ACC 57 (Scherer <i>et al.</i> , 1953)
Jurkat-Zelllinie	humane T-Zellen (akute lymphoblastische Leukämie); Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; DSMZ Nr. ACC 282 (Schneider <i>et al.</i> , 1977)

### 2.2 Chemikalien und Säulenmaterialien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Aldrich, Steinheim
Ammoniak	Merck, Darmstadt
ATP	Sigma, München
Benzoylchlorid	Sigma, München

---

Bisacrylamid	USB, USA
Bromphenolblau	Fluka, Neu-Ulm
n-Butanol	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cholesterin	Sigma, München
Coomassie Blue R-250	Merck, Darmstadt
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizsäure	Sigma, München
DAPI	Sigma, München
DCC	Sigma, München
Diaminohexan	Sigma, München
Diethylether	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Dipalmitoylphosphatidylethanolamin	Sigma, München
DMF	Merck, Darmstadt
DMEM-Fertigmedium	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DNB	Aldrich, Steinheim
DSP	Pierce, Rockford (USA)
DSS	Pierce, Rockford (USA)
DTNB (Ellman-Reagenz)	Sigma, München
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure, 99-100%	Riedel-de Haen, Seelze
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Merck, Darmstadt
FITC	Sigma, München
FKS (fötales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Folsäure	Sigma, München
Glutathion (reduzierte Form)	Sigma, München
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, München
HEPES	Gerbu, Gaiberg
HSA (humanes Serumalbumin)	Dessau-Pharma, Dessau
Hydroxylamin-HCl	Merck, Darmstadt

---

<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	Fluka, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MTT	Acros Organics, Geel (Belgien)
Mycostatin	Serva, Heidelberg
Myristinsäurechlorid	Sigma, München
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Ninhydrin	Merck, Darmstadt
1-Oktanol	Sigma, München
Oktanoylchlorid	Sigma, München
Oleoylchlorid	Sigma, München
PD10-Säulen, Gelfiltration	Pharmacia, Schweden
Penicillin G	Serva, Heidelberg
PMSF	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol-mono-methylether 0,81	Polymer Source Inc., Kanada
Polyethylenglykol-mono-methylether 5,2	Polymer Source Inc., Kanada
Polyethylenglykol-mono-methylether 22,6	Polymer Source Inc., Kanada
Poly-L/D-Lysin; HydroBromid (Ø27.500)	Sigma, München
Poly-mount	Polysciences, Washington
Pyridin	Merck, Darmstadt
Salicylsäurechlorid	Sigma, München
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt
SATP	Pierce, Rockford (USA)
Q Sepharose FF, Ionenaustauscher	Pharmacia, Schweden
Sephadex LH20, Gelfiltration	Pharmacia, Schweden
Sephadex G25, Gelfiltration	Pharmacia, Schweden
SP Sepharose HP, Ionenaustauscher	Pharmacia, Schweden
SDS	Roth, Karlsruhe

---

Seesand	Roth, Karlsruhe
Silica Si, Normal Phase, 60A 35-70MY	Amicon, Beverly (USA)
SPDP	Pierce, Rockford (USA)
Streptomycin	Serva, Heidelberg
Szintillationscocktail	Packard, USA
TEMED	Merck, Darmstadt
Toluol-4-sulfonylchlorid	Merck, Darmstadt
Triethylamin	Sigma, München
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, München
6-TRITC; R-Isomer	Molecular Probes, Eugene
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Schuchardt, Hohenbrunn
Zimtaldehyd	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Roth, Karlsruhe

### 2.3 Enzyme und Proteine

Aktin-Acetonrockenpulver	MPI Heidelberg
Anti-Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP)	Roche Diagnostics, Mannheim
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, München
Trypsin	Sigma, München

### 2.4 Standards und Kits

#### Protein Größenstandards:

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, High Range	Bio-Rad, München
SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range	Bio-Rad, München
Protein Molecular Weight Marker, Premixed, Prestained	New England Biolabs, Schwalbach

---

Apoptose-Kits:

Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Diagnostics, Mannheim

## 2.5 Puffer, Lösungen und Medien

Die Medien sowie alle Lösungen (Sambrook *et al.*, 1989) für die Arbeit mit biologischem Material wurden direkt nach der Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert. Grundsätzlich wurde doppelt destilliertes Wasser oder durch eine Millipore®-Anlage aufgearbeitetes Wasser verwendet. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

10 x PBS-Puffer:

40 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
160 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
1,15 M	NaCl	(pH 7,4 stellt sich ein)

PBS/T 0,1:

PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20

**Puffer für die SDS-PAGE:**Aufbewahrungslösung für Proteingele:

7 % (v/v)	Essigsäure
2 % (v/v)	Glycerin

5 x Auftragspuffer:

25 % (v/v)	Glycerin
12,5 % (v/v)	2-Mercaptoethanol (nur für reduzierenden Auftragspuffer)
7,5 % (v/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)

---

0,25 M Tris/HCl pH 8,0  
0,25 mg/ml Bromphenolblau  
(Aufbewahrung bei 4°C)

Entfärbelösung für Proteingele:

40 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure

Färbelösung für Proteingele:

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250  
40 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure

5 x Laufpuffer (Fling&Gregerson, 1986):

950 mM Glycin  
5 g/l Natriumdodecylsulfat (SDS)  
250 mM Tris  
(pH 8,8 stellt sich ein)

4 x Lower-Tris:

4 g/l Natriumdodecylsulfat (SDS)  
3 M Tris/HCl pH 8,85

4 x Upper-Tris:

4 g/l Natriumdodecylsulfat (SDS)  
0,5 M Tris/HCl pH 6,8

---

**Puffer und Lösungen für die Zellfärbung:****Fixierungspuffer:**

4 % Paraformaldehyd/PBS; Aufbewahrung bei -20°C

**Permeabilisierungspuffer:**

0,1 % Triton X-100/PBS

**Phalloidin-Färbelösungen:**

0,1 mg fluoreszierendes Phalloidin in 1 ml Methanol; Aufbewahrung bei -20°C;  
methanolische Phalloidinlösung 1:60 in 1 % BSA /PBS vor Färbung frisch angesetzt

**McIlvaine's Puffer für DAPI-Färbung:**

Lösung A: 0.1 M Zitronensäure

Lösung B: 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

18 ml Lösung werden mit 82 ml Lösung B gemischt; pH 7,0 stellt sich ein

**DAPI-Färbelösung:**

DAPI-Stammlösung: 100 µg/ml in H<sub>2</sub>O; Aufbewahrung bei -20°C;

2 µg DAPI / ml in McIlvaine's Puffer vor Färbung frisch angesetzt

**Lösungen für die Zellkultur und Zytotoxizitätsassays:****Trypsin-EDTA-Lösung:**

0,15 % Trypsin

0,02 % EDTA

in PBS

MTT-Lösung:

5 mg/ml in PBS

Lösung für Zellyse:

99,4 ml      DMSO  
 0,6 ml      Eisessig  
 10 g        Natriumdodecylsulfat (SDS)

Medien für die Zellkultur:**Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien**

	Zelltypen			
	MF/LDB	NIH/3T3	HELA	Jurkat
<b>Grundmedium</b>	DMEM	DMEM	DMEM	RPMI 1640
<b>Zusätze</b>				
FKS	10 %	10 %	10 %	10 %
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Penicillin G	65 mg/l	65 mg/l	65 mg/l	65 mg/l
Streptomycin	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l	100 mg/l
Mycostatin	5,7 mg/l	5,7 mg/l	5,7 mg/l	5,7 mg/l
β-Mercaptoethanol	-	-	-	0,05 mM

---

## Dünnschichtchromatographie

### Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie:

Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O (65:25:4)

Chloroform/Methanol/2N Essigsäure (65:25:4)

Chloroform/Methanol/NH<sub>4</sub> konz. (65:25:4)

Isobutanol/Eisessig/H<sub>2</sub>O (4:1:1)

### Ninhydrin-Sprühreagenz:

600 mg	Ninhydrin
15 ml	2N Essigsäure
175 ml	n-Butanol
300 ml	Methanol

### Zimt/HCl-Färbung

Als Sprühreagenz:

2 % Zimtaldehyd in Methanol

Zur Entwicklung:

Rauchende Salzsäure

### DTT-Sprühreagenz zum Nachweis von Disulfiden

1% DTT in Methanol

---

## 3 Methoden

### 3.1 Naturstoff-Reinigung

In der vorliegenden Arbeit wurden mehr als 20 Phallotoxinderivate verwendet. Die natürlichen Phallotoxine Phalloidin und Phallacidin, die als Ausgangsstrukturen für die semisynthetischen Varianten dienten, wurden aus dem Fruchtkörper des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) isoliert. Während die Reinigung des Naturstoffes Phalloidin in der Literatur beschrieben ist (Wieland, 1986), musste die Isolation des Phallacidins etabliert werden.

#### Phallacidin-Reinigung

Vorreinigung über Anionenaustauscher

Ausgang für die Reinigung bilden die Phallacidinfraktionen aus der Gelfiltrationschromatographie mit Sephadex-LH<sub>20</sub> der Rohextrakte aus den Carpophoren (Wieland, 1986) der Pilze. Für die weitere Isolation des Naturstoffes wurden Glassäulen (50cm Länge; Ø 4cm) mit DEAE-Sepharose (Anionenaustauscher) in H<sub>2</sub>O/HAc befüllt und für 5h mit H<sub>2</sub>O dest. gewaschen. Anschließend wurde soviel Rohextrakt-Lösung aufgetragen, dass ca. 10 cm der Sepharosefüllung frei von brauner Färbung blieb. Es wurde mit H<sub>2</sub>O dest. solange gespült (ca. 5 l), bis die Absorption bei 280nm am LKB-Durchflussphotometer konstant blieb. Anschließend wurden mit H<sub>2</sub>O/2 % HAc ca. 4-5g Phallacidin eluiert, eingedampft und weiterverarbeitet.

Reinigung über Gelpermeationschromatographie

Für die weitere Reinigung wurde eine Glassäule (2,30m Länge; Ø 5cm) mit Sephadex-LH<sub>20</sub> Gelpermeations-Säulenmaterial gefüllt und mit H<sub>2</sub>O/0,5 % HAc für 24h equilibriert. Ca. 5g Phallacidin aus der Anionenaustauscher-Reinigung wurde in 300ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst, mit HAc auf pH 4,0-5,0 eingestellt und ohne Schädigung des Säulenbettes auf die Sephadex-LH<sub>20</sub>-Säule aufgetragen. Im LKB-Fraktionssammler konnten anhand des Elutionsprofils und des

charakteristischen Phalloidinspektrums im Spektrophotometer die Phallacidin-Fractionen (ca. 2g Ausbeute) detektiert werden.

### Reinigung über Flash-Chromatographie

Die Flash-Chromatographie ist eine schnelle säulenchromatographische Trennmethode, deren Hauptanwendungsgebiet die Aufreinigung organischer Verbindungen im präparativen Maßstab darstellt (Still *et al.*, 1978). Bei der Flash-Chromatographie wird das Elutionsmittel unter Gasdruck (in der Regel Stickstoff) schnell durch eine SiO<sub>2</sub>-Säule mit großem Innendurchmesser gepreßt. Für die Reinigung des Phallacidins wurde eine Säule (80 cm Länge; Ø 5 cm) mit einem Adsorbens definierter Korngröße gefüllt. Dazu schlämmt man 80ml Kieselgel (Matrex, Normal Phase Silica Si, 60A 35-70MY) in 300 ml CHCl<sub>3</sub> auf und lässt es 10 min bei Raumtemperatur stehen. Das Säulenende wurde mit Glaswolle versehen und vorsichtig bis zu einer Schichthöhe von 3cm mit Seesand aufgefüllt. Aufgeschlammtes Kieselgel in CHCl<sub>3</sub> wurde dann mittels Trichter in die Säule überführt und für 30 min absitzen lassen. Durch gleichmäßiges Klopfen für 10min mit einem Gummischlauch wurde die Säulenfüllung verdichtet.

Zur Vorbereitung der Startsubstanz wurden 500mg Phallacidin aus der Gelpermeationschromatographie im 250ml-Rundkolben in 50ml MeOH gelöst und zwei gehäufte Löffel Kieselgel zugegeben. Im Rotationsverdampfer, mit Gummistopfen und Filterpapier staubdicht verschlossen, wurde das Methanol bei 40-60°C im Vakuum verdampft, sodass nach ca. 20min ein trockenes Kieselgel-Phallacidin-Gemisch im Kolben verblieb. Dieses Gemisch wurde mittels Trichter auf das Säulenbett aufgetragen (Staubentwicklung !) und mit CHCl<sub>3</sub> nachgespült. Nach weiterer Verdichtung durch Klopfen wurden wiederum 4 cm Seesand aufgetragen und nochmals mit CHCl<sub>3</sub> nachgespült und verdichtet.

Die Säule wurde, an einen LKB-Fraktionssammler und -Durchflussphotometer angeschlossen und über eine Teflondichtung mit einem 2 l-Vorratsgefäß verbunden. Das Vorratsgefäß wurde ohne Störung des Säulenbettes mit 2 l Laufmittel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/2N HAc ; 65:25:4) befüllt, der Druckkopf angeschlossen und das ganze System dann unter ca. 2 bar Arbeitsdruck (Stickstoff) betrieben. Die Phallacidin-haltigen Fraktionen wurden mittels Elutionsprofil, photometrischem Spektrum und Dünnschicht-Chromatographie (Isobutanol/HAc/H<sub>2</sub>O; 4:1:1) detektiert.

Abschließend wurde die Reinheit des isolierten Phallacidins mittels analytischer HPLC zu ca. 93 % bestimmt (Vydac Reversed Phase 218TP54 C18; siehe 3.3.6).

## 3.2 Synthesen von Phallotoxinderivaten

### 3.2.1 Darstellung der Vorstufen

#### Mono-Tosyl-Phalloidin

100mg Phalloidin (0,127mmol), gelöst in 1ml wasserfreiem Pyridin (50ml Kolben) wurde bei 4°C (Eisbad) mit 400mg Toluol-4-sulfonylchlorid (2,01mmol) in 400µl CHCl<sub>3</sub> tropfenweise unter magnetischem Rühren innerhalb von 30min umgesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20ml Diethylether (über Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gereinigt) gestoppt, nach 15min dekantiert und der Rückstand nochmals mit Diethylether ü.N. bei 4°C inkubiert. Analyse des Präzipitats durch DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) und Identifizierung mit Zimtaldehyd/HCl zeigte eine nahezu vollständige Umsetzung des Phalloidins (RF-Wert: 0,25) zum Mono-Tosyl-Phalloidin (RF-Wert: 0,42).

Die Reinigung erfolgte über eine Glassäule (Länge: 230cm; Ø5cm) mit Sephadex-LH<sub>20</sub>-Gelpermeationssäulenmaterial und einem LKB-Fraktionssammler. Dazu wurde das Tosyl-Phalloidin aus 5 Reaktionsansätzen (500mg Phalloidin) in 10ml Laufmittel (MeOH/H<sub>2</sub>O; 1:1) gelöst und aufgetragen. Anhand eines LKB-Durchflussphotometers wurde ein Elutionsprofil durch Absorptionsmessung bei 280nm erstellt und nach 5d Laufzeit die Trennung mittels analytischer DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) und Zimtaledhyd-Sprühreagenz kontrolliert. Die Ausbeute an Mono-Tosyl-Phalloidin betrug nach photometrischer Bestimmung 354mg (68,8 %), die Reinheit lag nach Reversed-Phase C<sub>18</sub>-Chromatographie bei 94,9% (siehe 3.3.6). Zur Synthesekontrolle erfolgte eine Massenanalyse mittels MALDI-TOF (siehe 3.3.3). Das Produkt wurde gefriergetrocknet und bis zur weiteren Umsetzung bei 4°C gelagert.

#### Amino-Phalloidin-II

Zur Synthese des Amino-Phalloidin-II wurden 400mg gefriergetrocknetes Mono-Tosyl-Phalloidin (0,42mmol) in einen 100ml-Rundkolben mit Magnetrührer gegeben, mit 40ml methanolischer 2,5N-Ammoniak-Lösung übergossen und anschließend mit einem Glasstopfen verschlossen. Die Reaktion erfolgte für 2h bei RT. Durch analytische DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HAc; 65:25:4) und Ninhydrin-Sprühreagenz zeigte sich eine ca. 80 %ige Umsetzung des Mono-Tosyl-Phalloidins (RF-Wert: 0,39) zum Amino-Phalloidin-II (RF-Wert: 0,13). Der Reaktions-

ansatz wurde eingedampft, in 5ml MeOH gelöst, auf einer mit Sephadex-LH<sub>20</sub>-gefüllten Gelpermeationssäule aufgetragen (Länge 100cm; Ø4cm; Laufmittel MeOH) und im LKB-Fraktionssammler aufgefangen. Die Amino-Phalloidin-II-haltigen Fraktionen enthielten 320mg Amino-Phalloidin-II (Ausbeute: 80%); mittels Reversed-Phase C<sub>18</sub>-HPLC (siehe 3.3.6) wurde die Reinheit auf 89,2 % bestimmt (Elutionsdauer: 17,36min). Die Masse wurde durch MALDI-TOF (siehe 3.3.3) verifiziert.

### **ATP-Amino-Phalloidin-II**

50mg Amino-Phalloidin-II (63µmol) wurden im 25ml-Rundkolben in 3,4ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Mit Teststreifen wurde ein Wert von pH 7,0 bestimmt. 16mg (1 eq.) SATP (*N*-Succinimidyl S-acetylthiopropionat) wurde in 900µl DMF gelöst und der wäßrigen Amino-Phalloidin-II-Lösung zugesetzt. Sofort nach Zugabe wurde mit 120µl 1N NaOH ein pH 7,5 eingestellt. Die Reaktion erfolgte für 1h bei RT. Danach wurde durch analytische DC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) und Zimtaldehyd-Sprühreagenz die Umsetzung kontrolliert. Neben kleinen Verunreinigungen zeigte sich eine nahezu vollständige Umsetzung des Amino-Phalloidin-II (RF-Wert: 0,15) zum Konjugat (RF-Wert: 0,48). Der Reaktionsansatz wurde im Rotationsverdampfer eingedampft und darauf in 5ml MeOH gelöst. Die methanolische Toxinlösung wurde über eine mit Sephadex-LH<sub>20</sub> gefüllte Glassäule getrennt (Länge 100cm; Ø4cm; Laufmittel MeOH) und die Elution im LKB-Durchflussphotometer durch Absorptionmessung bei 280nm bestimmt. Die gesammelten Fraktionen wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und nach dem Lauf in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:25:4) durch Zimtaldehyd-Sprühreagenz identifiziert. Die ATP-Amino-Phalloidin-II-haltigen Fraktionen wurden eingedampft und gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte trocken bei -20°C. In der Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC (siehe 3.3.6) zeigte sich eine Reinheit von 91,6 %, die Masse des Peptid-Konjugates wurde durch MALDI-TOF (siehe 3.3.3) bestimmt.

### **PDP-Amino-Phalloidin-II**

Für die Umsetzung mit SPDP (3-(2-Pyridyldithio)propionsäure *N*-Hydroxysuccinimidester) wurden 50mg Amino-Phalloidin-II (63µmol) im 25ml-Rundkolben in 3,4ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst und pH 7,0 anhand von Teststreifen ermittelt. 20mg SPDP (1,7 eq.) wurden in 900µl

DMF gelöst, dem Toxin zugesetzt, und der pH des Reaktionsansatz mit 120µl 1N NaOH auf 7,5 erhöht. Nach einer Reaktionsdauer von 1h bei RT erfolgte die Auswertung der Umsetzung über analytische DC (Laufmittel: CH<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) und Zimtaldehyd-Sprühreagenz. Es zeigte sich eine nahezu vollständige Umsetzung des Amino-Phalloidin-II (RF-Wert: 0,15) zum PDP-Amino-Phalloidin-II (RF-Wert: 0,51). Zur Reinigung des Produktes und insbesondere zur Abtrennung des unumgesetzten Amino-Phalloidin-II bzw. des durch die Reaktion freigesetzten Hydroxysuccinimids, wurde eine Gelpermationssäule mit Sephadex-LH<sub>20</sub> (Länge 100cm; Ø4cm; Laufmittel MeOH) benutzt; die produkthaltigen Fraktionen konnten mittels analytischer DC (Laufmittel: CH<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) identifiziert werden. Die Reinheit lag nach Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC (siehe 3.3.6) bei 93,2 %, die Massenbestimmung durch MALDI-TOF (siehe 3.3.3) bestätigte das Syntheseprodukt. Die Lagerung erfolgte nach Eindampfen am Rotationsverdampfer bei -20°C.

### **DSP-Amino-Phalloidin-II und DSS-Amino-Phalloidin-II**

100mg DSP (248µmol; 4 eq.; Dithiobissuccinimidyl propionat) bzw. 91mg DSS (248µmol; 4eq.; Disuccinimidyl suberat) wurden jeweils in 1ml DMF gelöst und zu 50mg gefriergetrocknetem Amino-Phalloidin-II (63µmol) zupipettiert. Die Reaktion wurde mit 2µl Triethylamin gestartet und unter magnetischem Rühren ü.N. fortgesetzt. In einem Zentrifugenglas wurde die Reaktionslösung mit 10ml Diethylether versetzt, zentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge 2; 2000g; 10min; RT) und der Niederschlag in 5ml MeOH aufgenommen und zusammen mit dem Überstand auf eine analytische DC-Platte (Laufmittel: CH<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) aufgetragen. Während sich im Überstand überschüssiges Reagenz und freies Hydroxysuccinimid befanden, konnten im Niederschlag durch Zimtaldehyd-Sprühreagenz das Reaktionsprodukt (RF-Wert: 0,43 für DSS bzw. 0,39 für DSP) und unumgesetztes Amino-Phalloidin-II (RF-Wert: 0,15) sowie noch geringe Mengen des DSS bzw. DSP nachgewiesen werden (ca. 90% Umsatz). Es folgte eine Gelfiltrationsreinigung mit Sephadex-LH<sub>20</sub> (Glassäule; Länge 100cm; Ø4cm), wobei MeOH als Laufmittel diente. Die Elution wurde im LKB-Sammler fraktioniert und die Absorption bei 280nm mit Hilfe eines Durchflussphotometers aufgezeichnet. Die Auswertung der analytischen DC (Laufmittel: CH<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) ergab, dass die Produkte DSS-Amino-Phalloidin-II bzw. DSP-Amino-Phalloidin-II nach dem unumgesetzten Ausgangsprodukt Amino-Phalloidin-II eluierten. Die Ausbeute betrug nach photometrischer Bestimmung bei 300nm ca. 80%, die Reinheit lag bei beiden Produkten nach Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC bei ca. 93%. Die Lagerung

der Produkte erfolgte trocken über  $P_2O_5$  bei  $-20^\circ C$ . Nach ca. 14 Tagen war ein Teil der aktivierten Toxine jedoch hydrolytisch gespalten. Die weitere Umsetzung erfolgte daher spätestens nach 3d.

### Hexamethyldiamin-Phallacidin

263mg Phallacidin ( $310\mu\text{mol}$ ) wurden im 5ml-Rundkolben in 2ml DMF gelöst. 250mg *N*-Hydroxysuccinimid ( $2,16\text{mmol}$ ; 7 eq.) wurden in 1ml DMF, 115mg *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid ( $557\mu\text{mol}$ ; 1,8 eq.) ebenfalls in 1ml DMF gelöst und in dieser Reihenfolge der Toxinlösung zugesetzt. Nach Reaktion ü.N. ohne Rühren bei RT fiel der Dicyclohexylharnstoff als unlöslicher Niederschlag aus. Der Überstand mit dem Hydroxysuccinimid-Phallacidin wurde mit einer Glaspipette vorsichtig entnommen und in einen 25ml-Rundkolben überführt. 330mg Diaminohexan ( $3,1\text{mmol}$ ; 10 eq.), gelöst in 5ml DMF, wurden dem aktivierten Toxin zugeführt. Während der Reaktion (5h) fällt ein Niederschlag aus, der anschließend abzentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge 2; 2000g; 10min; RT) und verworfen wurde. Die Peptide im Überstand wurden in einem Zentrifugenglas mit 15ml Diethylether gefällt und nochmals zentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge 2; 2000g; 10min; RT). Überschüssiges Diaminohexan bleibt dabei zum Großteil in Lösung. Das Sediment wurde in ca. 20ml MeOH/ $H_2O$  (1:1) aufgenommen und auf eine Glassäule (Länge 20cm;  $\varnothing 1,2$  cm) mit SP-Sepharose-Anionenaustauscher (16h in MeOH/ $H_2O$  äquilibriert) aufgetragen. Unumgesetztes Phallacidin, Dicyclohexylcarbodiimid und Hydroxysuccinimid binden nicht am Austauscher und befinden sich im Durchlauf. Das Produkt Hexamethyldiamin-Phallacidin wurde mit 20 % Eisessig in MeOH/ $H_2O$  (1:1) innerhalb von 12h eluiert, eingedampft und im Vakuum getrocknet. Nach Lösen in 5ml MeOH erfolgte eine weitere Trennung über eine Sephadex-LH<sub>20</sub>-Gelfiltrationssäule (Länge 100cm;  $\varnothing 4$ cm). Die Elutionsfraktionen wurden im LKB-Sammler aufgefangen und mittels analytischer DC (Laufmittel:  $CHCl_3/MeOH/NH_4^+$ ; 65:25:4) ausgewertet. Die Reinheit wurde mittels Reversed Phase  $C_{18}$ -HPLC (siehe 3.3.6) bestimmt (Elutionsdauer: 19,51min) und die Masse durch MALDI-TOF (siehe 3.3.3) nachgewiesen.

### 3.2.2 Synthesen von Phallotoxinen mit hydrophoben Liganden

#### Ellman-Amino-Phalloidin-II

20 mg ATP-Amino-Phalloidin-II (21,8 $\mu$ mol) wurden im 5ml Rundkolben in 1,4ml MeOH/H<sub>2</sub>O dest. (4:3) gelöst. Eine 20 $\mu$ l Probe wurde für eine spektrophotometrische Analyse entnommen.

164mg Hydroxylamin-HCl (240 $\mu$ mol; 11 eq.) wurden im 5ml-Rundkolben in 800 $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst, mit 2N Ammoniak auf pH 8,0 eingestellt und mit H<sub>2</sub>O anschließend auf 4ml Volumen aufgefüllt.

9,5mg Ellman-Reagenz (DTNB; 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure); 24 $\mu$ mol; 1,1 eq.) wurde in 400 $\mu$ l H<sub>2</sub>O dest. suspendiert und mit 2N Ammoniak nach Einstellung auf pH 8,0 in Lösung gebracht. Weitere 400 $\mu$ l H<sub>2</sub>O dest. wurden zugesetzt. Daraufhin wurde zunächst die 800 $\mu$ l DTNB-Lösung und danach 400 $\mu$ l der Hydroxylamin-Lösung dem Toxin zugesetzt.

Nach 1min, 4min, 7min, 10min, 25min und 75min wurden 20 $\mu$ l Proben spektrophotometrisch (200-450nm) untersucht. Anhand der Absorption des Thionitro-benzoat(NTB)-Anions bei 412nm (NTB  $\epsilon_{412}=14100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) konnte die Reaktionsumsetzung photometrisch verfolgt werden.

Nach 120min wurde der Reaktionsansatz über eine Sephadex-LH<sub>20</sub>-Gelfiltrationssäule (Länge 120cm;  $\varnothing$ 3cm) getrennt. Die Aufzeichnung des Säulenlaufes erfolgte über LKB-Durchflussphotometer, die Sammlung der Proben im LKB-Fraktionssammler. Mittels analytischer DC (Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HAc; 65:25:4) konnte das Syntheseprodukt identifiziert werden. Dabei wurden auf der DC-Platte Phalloidin-Derivate durch Zimtaldehyd-Sprühreagenz blau gefärbt, Disulfidbrücken zeigten durch DTT-Sprühreagenz und die damit einhergehende Reduktion eine gelbliche Farbe. Das Ellman-Toxin-Konjugat zeigte sich in beiden Farbreaktionen positiv; unumgesetztes Toxin, Hydroxamsäure, überschüssiges Ellman und NTB waren abgetrennt.

Die entsprechenden Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingedampft und die Reinheit durch Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC (siehe 3.3.6) auf 88,9 % bestimmt. Die Ausbeute an Ellman-Amino-Phalloidin-II lag bei 15,2mg (76%). Nach Bestätigung der Masse durch MALDI-TOF (siehe 3.3.3) wurde das Produkt bei 4°C trocken gelagert.

## Produkte der Umsetzungen mit Säurechloriden

Zur Kopplung mit Säurechloriden wurde jeweils 7,9mg Phalloidin (10 $\mu$ mol) mit 3 eq. Benzoyl- (4,2mg), Salicyl- (5,2mg), Octoyl- (5,4mg), Myristoyl- (7,4mg) und Oleoylsäurechlorid (9,1mg) umgesetzt. Dazu wurde das Phalloidin im 5ml-Rundkolben in 100 $\mu$ l trockenem Pyridin gelöst und das entsprechende Säurechlorid zugesetzt. Nach 2h wurde dem Reaktionsansatz 3ml MeOH zugefügt und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 60°C abgedampft. Es wurde nochmals in 3ml MeOH gelöst und abgedampft um noch vorhandenes Pyridin zu entfernen. Der Reaktionsansatz wurde zunächst in einer analytischen DC ausgewertet (Laufmittel: CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HAc; 65:25:4). Durch Färbung mit Zimtaldehyd Sprühreagenz zeigten sich im Reaktionsgemisch jeweils drei Toxinderivate. Das unumgesetzte Phalloidin (ca. 20%; RF-Wert:0,33), die mono-substituierten Produkte (ca. 60%) und die di-substituierten Toxinderivat (ca. 20%).

**Tabelle 3.1: RF-Werte der Toxine aus Säurechloridumsetzungen in der DC**

Toxinderivat	RF-Wert	
	mono-substituiert	di-substituiert
Benzoyl-Phalloidin	0,51	0,78
Salicyl-Phalloidin	0,46	0,72
Oktanoyl-Phalloidin	0,53	0,79
Myristoyl-Phalloidin	0,62	0,86
Oleoyl-Phalloidin	0,68	0,87

In einer präparativen DC wurden die Reaktionsansätze in einem Volumen von ca. 200 $\mu$ l MeOH auf zwei 20x20cm Kieselgelglasplatten aufgetragen und in CHCl<sub>3</sub>/MeOH/HAc (65:25:4) getrennt. Im UV-Licht wurden die entsprechenden Substanzen markiert und mit einem Spatel das Kieselgel von der Glasoberfläche der Platten abgetragen. Dieses Kieselgel wurde schließlich mit Hilfe eines Trichters auf das Bett einer zuvor vorbereiteten Sephadex-LH<sub>20</sub>-Säule gegeben (Länge 15cm;  $\varnothing$ 1cm) und die Substanzen durch ca. 80ml Laufmittel MeOH aus dem Adsorbens eluiert. Das MeOH wurde am Rotationsverdampfer abgedampft, die Substanzen in einer definierten Menge von 5ml MeOH gelöst und jeweils auf eine

Sephadex-LH<sub>20</sub> Gelfiltrationssäule (Länge 100cm; Ø4cm) aufgetragen. Die Reinigung wurde mittels LKB-Durchflussphotometer kontrolliert, die einzelnen Fraktionen im LKB-Sammler aufgenommen. Anhand einer analytischen Reversed Phase HPLC (siehe 3.3.6) konnte die Reinheit aller Konjugate auf über 88% angegeben werden; die Ausbeuten für die monosubstituierten Derivate lagen bei 35-50%. Die Massen aller Substanzen wurden mit MALDI-TOF (siehe 3.3.3) überprüft und verifiziert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C, die Substanzen sind mehrere Monate stabil.

### **DL- $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylethanolamin-SS-Amino-Phalloidin-II**

Für die Umsetzung wurden 10mg DSP-Amino-Phalloidin-II (9,3 $\mu$ mol) im 5ml Rundkolben in 1ml MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1:3) aufgenommen. 10mg DL- $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylethanolamin (1,5 eq.; 14,4 $\mu$ mol) wurden in 1ml MeOH/CHCl<sub>3</sub> unter Erwärmung auf 60°C mit einem Heißluftföhn gelöst und dem Toxin zugegeben. Durch Zugabe von 2 $\mu$ l Triethylamin wurde ein nucleophiler Angriff durch die Aminogruppe des Ethanolamins auf den aktivierten Ester ermöglicht; die Reaktionszeit betrug 16h bei RT.

Der Reaktionsansatz wurde am Rotationsverdampfer eingedampft und in 5ml MeOH gelöst. Es folgte eine Trennung über Sephadex-LH<sub>20</sub> Gelfiltrationsäulenmaterial in einer Glassäule (Länge 100cm; Ø4cm) an einer LKB-Detektions-/Sammeleinheit. Das Produkt eluierte nach analytischer DC vor dem unumgesetzten DSP-Amino-Phalloidin und dem freigesetzten Hydroxysuccinimid. Die Ausbeute lag bei 67%, bezogen auf die eingesetzte Vorstufe. Die Lagerung erfolgte bei -20°C für mehrere Monate.

### **3.2.3 Synthesen von Derivaten trojanischer Peptide**

An die Toxinvorstufe PDP-Amino-Phalloidin-II wurden verschiedene trojanische Peptide mit aminoterminalen Ac-Cys-Gly durch Disulfidaustausch gekoppelt. Die Peptide wurden in der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen (Dr. H. Echner) über Festphasensynthese hergestellt. Im eigenen Labor wurde die Masse durch MALDI-TOF bestimmt und die freie Thiolgruppe durch Ellman-Assay (3.4.4) bestätigt. Die Peptide hatten folgende Sequenzen:

**Tabelle 3.2: Peptidsequenzen**

Peptid	Sequenz / Molmasse
Tat-Peptid	Ac-Cys-Gly-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-OH / $M_r = 1926$
Antenna-Peptid	Ac-Cys-Gly-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH / $M_r = 2621$
Arg <sub>8</sub> -Peptid	Ac-Cys-Gly-(Arg) <sub>8</sub> -OH / $M_r = 1470$
Kaposi-Peptid	Ac-Cys-Gly- Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-OH / $M_r = 1902$

Für die Umsetzung mit 63mg Tat-Peptid (33 $\mu$ mol; 0,8 eq.) in 1,0ml PBS-Puffer wurden 28mg PDP-Amino-Phalloidin-II in 0,5ml MeOH gelöst und zupipettiert. 20mg Arg<sub>8</sub>-Peptid (13,6 $\mu$ mol; 0,7 eq.) wurden in 1,5ml PBS-Puffer gelöst und 20mg PDP-Amino-Phalloidin-II in 250 $\mu$ l MeOH addiert. 5mg Antenna-Peptid (1,9  $\mu$ mol; 0,9 eq.) wurden in 300 $\mu$ l PBS-Puffer gelöst und 2mg PDP-Amino-Phalloidin-II zugesetzt. Die Reaktion erfolgte in allen Fällen für 16h bei RT. Jeder Ansatz wurde auf eine Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC-Säule (siehe 3.3.6) aufgetragen und die Umsetzung kontrolliert. Die Reinigung erfolgte über eine präparative Gelpermeationssäule (siehe 3.3.4), wobei das Säulenmaterial Sephadex LH<sub>20</sub> und das Laufmittel H<sub>2</sub>O/MeOH (4:1) Verwendung fand. Anhand von analytischen Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC-Säulenläufen (siehe 3.3.6) und Reduktion durch DTT der Disulfidbrücke konnten die gereinigten Konjugate identifiziert werden. Die Ausbeute von Tat-Phalloidin betrug 52 %, die an Arg<sub>8</sub>-Phalloidin 43 %. Eine Umsetzung mit Antennapeptid war nicht möglich. Die Proben wurden gefriergetrocknet und bei 4°C mehrere Monate gelagert.

### 3.2.4 Synthesen polymer-gebundener Phallotoxine

Die Polymere Poly-L-Lysin, Poly-D-Lysin und Methoxypolyethylenglykol wurden über verschiedene Linker an das Phallotoxingerüst gebunden.

#### Poly-L-Lys-Phallacidin und Poly-D-Lys-Phallacidin

Die Carboxylgruppe des Phallacidins wurde mit einem Carbodiimid aktiviert, mit N-(OH)-Succinimid verestert und schließlich durch Reaktion mit der Aminogruppe der Poly-Lysine über eine Peptidbindung verknüpft. Die Umsetzung verlief wie folgt:

Getrocknetes Phallacidin (10 $\mu$ mol; 1 eq.) wurde in 250 $\mu$ l DMF gelöst, und je 7 eq. *N*-Hydroxy-Succinimid und 1,8 eq. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid in je 250 $\mu$ l DMF addiert. Der Überstand wurde von den entstandenen, unlöslichen Harnstoff-Kristallen mit einer Glaspipette entfernt und das aktivierte Toxin in 10ml Diethylether gefällt. Nach Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge 2; 2000g; 10min; RT) wurde das Hydroxysuccinimid-Phallacidin in 500 $\mu$ l getrocknetem DMF aufgenommen und einer Poly-D-Lysin- bzw. Poly-L-Lysin-Lösung (Hydrobromid;  $\text{ØMW}$ =27.500) in PBS-Puffer (5 eq.) zupipettiert. Die weitere Reaktion verlief ü. N. bei RT unter ständigem Rühren. Die Reinigung des Phallacidin-haltigen Poly-Lysins erfolgte jeweils säulenchromatographisch an einer Sephadex G-25-Säule (Länge 80cm;  $\text{Ø}$ 1,5cm; Durchflussgeschwindigkeit 2ml/min, ü. N. äquilibriert mit 0,1% NaCl). Die austretenden Fraktionen wurden mit einem UV-Detektor bei 280nm verfolgt. Die mit dem Ausschlussvolumen austretenden Fraktionen enthielten das Produkt. Sie wurden spektrophotometrisch identifiziert. Das gereinigte Poly-L-Lysin-Phallacidin und Poly-D-Lysin-Phallacidin wurde lyophilisiert und bei 4°C über Phosphoroxid aufbewahrt. Es wurden ca. 50% des eingesetzten Phallacidins gebunden, d.h. ca. 10% der Aminogruppen der Polylysine waren mit Phallacidin beladen.

### **Poly-L(-D)-Lysin-SS-Amino-Phalloidin-II und Poly-L(-D)-Lysin-CONH-Amino-Phalloidin-II**

Zur Darstellung von Phalloidin-derivaten der Polylysine, die über eine Linkergruppe verfügten, wurde DSS-Amino-Phalloidin-II und DSP-Amino-Phalloidin-II mit Poly-L-Lysin und Poly-D-Lysin umgesetzt. Hierzu wurden 7mg DSP- bzw. DSS-Amino-Phalloidin-II in 500 $\mu$ l DMF gelöst und 5 eq. Poly-L-Lysin Hydrobromid oder Poly-D-Lysin Hydrobromid ( $\text{ØMW}$  = 27.500) in 500 $\mu$ l PBS-Puffer zugegeben. Die Umsetzung erfolgte ü. N. bei RT unter Rühren. In einer Reinigung über Sephadex G-25 (Laufmittel 0,1% NaCl; Säulenlänge 80cm;  $\text{Ø}$ 1,5cm; Durchflussgeschwindigkeit 2ml/min) lief das polymere Toxin-Konjugat mit der Front und konnte spektrophotometrisch identifiziert werden. Anhand des Trockengewichtes nach Lyophilisation und der Absorption bei 300nm und des bekannten Extinktionskoeffizienten konnte bestimmt werden, dass jedes zehnte Lysin der polymeren Kette mit einem Toxin besetzt war. Die Lagerung erfolgte über Phosphoroxid für mehrere Monate bei 4°C.

## MPEG-SS-Amino-Phalloidin-II

Für die Umsetzung mit Polyethylenglykolen wurden Monomethoxy-Polyethylenglykole der durchschnittlichen molekularen Massen 810, 5200 und 22600 tosyliert und mit Ammoniak umgesetzt, um eine Aminogruppe für die Umsetzung mit DSP-Amino-Phalloidin-II einzuführen. Dazu wurden je 100mg der Polyethylenglykole in 1ml wasserfreiem Pyridin im 50ml Rundkolben gelöst und in ein Eisbad gestellt. 5eq. Toluol-4-sulfonylchlorid wurden in 400 $\mu$ l CHCl<sub>3</sub> gelöst und tropfenweise der gekühlten Pyridinlösung zugeführt. Unter vorsichtigem Rühren erfolgte die Reaktion für 30min auf dem Eisbad und wurde durch Zugabe von 20ml Diethylether gestoppt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und der Rückstand in 20ml methanolischer Ammoniak-Lösung (2,5N) aufgenommen. Nach 1h wurde das Ammoniak abgedampft und die Substanz einer analytischen DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH konz.; 65:25:4) unterzogen. Durch Färbung mit Ninhydrin-Reagenz bzw. durch unspezifische Anfärbung aller Bestandteile in der Iodkammer, konnte eine vollständige Umsetzung gezeigt werden. Es folgte eine Trennung über Sephadex LH<sub>20</sub>, wobei das umgesetzte Polyethylenglykol anhand seiner Aminogruppe mit Ninhydrinsprühreagenz durch DC im Eluat identifiziert wurde. Die Amino-mono-methoxy-polyethylenglykole (1 eq.) wurden gefriergetrocknet, und mit jeweils 10mg DSP-Amino-Phalloidin-II, gelöst in 500 $\mu$ l DMF, in 500 $\mu$ l PBS-Puffer umgesetzt. Die Umsetzung erfolgt bei RT ü.N.. Die Polyethylenkonjugate mit der höheren molaren Masse (5200, 22600) wurden über Sephadex-G-25-Säulen 25 (Laufmittel 0,1% NaCl; Säulenlänge 80cm; Ø1,5cm; Durchflussgeschwindigkeit 2ml/min) isoliert, das Derivat geringerer Molmasse (810) über eine Sephadex LH<sub>20</sub>-Säule (Länge 100cm; Ø4cm; Laufmittel MeOH). Die Aufzeichnung erfolgte über Absorptionmessung bei 280nm. Die Reinigung wurde mittel Reverse Phase C<sub>18</sub>-HPLC kontrolliert (siehe 3.3.6) und die Masse durch MALDI-TOF überprüft (siehe 3.3.3). Die Ausbeuten betragen 34 % bis 45 %. Eine Lagerung erfolgte bei 4°C für mehrere Monate.

### 3.2.5 Synthesen Liganden- und Protein-gebundener Phallotoxine

#### HSA-Phalloidin

50mg Human-Serumalbumin (HSA; Dessau Albumin 200; 1,36 $\mu$ mol) wurden mit 2ml PBS-Puffer verdünnt und 10 eq. DSP-Amino-Phalloidin-II in 200 $\mu$ l DMSO zugesetzt. Nach Reaktion ü.N. erfolgte eine Trennung über Sephadex-G25 (Laufmittel PBS; Säulenlänge 80cm;  $\varnothing$ 1,5cm; Durchflussgeschwindigkeit 2ml/min). Das Produkt eluierte mit dem Ausschlußvolumen und konnte photometrisch anhand des Phalloidin-Anteils im Proteinspektrum ( $\epsilon_{280}=35000$ ) identifiziert werden. Die Proteinlösung wurde im Centricon-Konzentrator unter Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge 2; 2000g; 4°C) auf eine Konzentration von 50mg HSA/ml eingestellt und bei 4°C für wenige Tage aufbewahrt.

#### Folat-MPEG<sub>3350</sub>-Phalloidin

1g Folsäure (MW=441,41) wurde in 50ml DMSO gelöst und 290mg *N*-OH-Succinimid (1,1 Äquivalente; MW=115,9) und 515mg Dicyclohexylcarbodiimid (DCC; 1,1 Äquivalente; MW=206,33) zugesetzt. Der Ansatz wurde im 100ml-Rundkolben (in Aluminiumfolie eingepackt) bei RT ü.N. gerührt. Daraufhin wurde er mit Filterpapier und durch Zentrifugation (Heraeus Christ Minifuge 2; 4000g; RT) von ausgefallenen Substanzen befreit und bei -20°C gelagert.

Von entstandenen NHS-Folat-Lösung mit einer Konzentration von 20mg/ml DMSO wurden 3ml (135 $\mu$ mol) entnommen und mit einer äquimolaren Menge Polyoxyethylen-bis(amin) (452mg; MW=3350) umgesetzt (trocken zugegeben). Die Reinigung erfolgte über eine Sephadex-G25-Säule in deionisiertem Wasser. Das Produkt Folat-MPEG<sub>3350</sub> läuft dabei als hellgelbe Bande mit der Front. Es wurde lyophilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

43mg des Folat-MPEG<sub>3350</sub> wurden mit 9mg DSP-Amino-Phalloidin-II (11,42 $\mu$ mol) in 800 $\mu$ l DMF und 6 $\mu$ l Triethylamin ü.N. bei RT umgesetzt. Das Produkt läuft dabei als erste Bande, die sich bei Färbung der analytischen DC mit Zimtaldehyd-Sprühreagenz als gelb-blauer Fleck zeigte. Folat-MPEG<sub>3350</sub>-Amino-Phalloidin-II wurde am Rotationsverdampfer getrocknet und bei -20° aufbewahrt.

### 3.2.6 Photosensitive und radioaktive Phallotoxine

#### DNB-Phalloidin

In einem 50ml Rundkolben mit Magnetrührer wurden in 30ml NH<sub>3</sub> 5mg metall. Natrium gelöst (blau) und bis zur Entfärbung 20-30 min gerührt. Danach wurde 50mg trockenes Phalloidin in 5ml kaltem NH<sub>3</sub> fl. und 50mg DNB (4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide) fest zugesetzt. Nach Verdunsten des NH<sub>3</sub> wurde der Ansatz im Exsikkator für 15min getrocknet, in 20ml MeOH gelöst und am Rotationsverdampfer abgedampft. Der Rohansatz wurde über zwei LH<sub>20</sub>-Säulenläufe (Laufmittel MeOH; Säulenlänge: 100cm; Ø3cm) getrennt, das Produkt im Gemisch über analytische DC identifiziert und in der Reversed Phase HPLC (siehe 3.3.6) eine Reinheit von 91,6 % ermittelt.

#### Radioaktives Phallotoxin

In einem 25ml Zweihalskolben mit Claisen-Aufsatz (gefüllt mit feuchter Palladium-Kohle) wird zu 3µMol Ketophalloidin (Rehbinder *et al.*, 1963) 25mCi <sup>3</sup>H-NaBH<sub>4</sub> (spezifische Aktivität 34Ci/mmol) in 1ml 0,1 M NaOH mit einer Injektionsspritze im Abzug zugetropft und nach 5min die Reaktion mit je 0,4ml einer kalten NaBH<sub>4</sub>-Lösung (10mg in 10ml 0,1 M NaOH) zu Ende geführt. Nach weiteren 5min wird mit ca. 2-3ml 0,1 M HCl-Lösung ein pH 2,0 eingestellt, wobei N<sub>2</sub> zur Entfernung des freiwerdenden [<sup>3</sup>H] durch die Lösung geleitet wird. Nach 30min wird mit 1 n NaOH neutralisiert und 10min Stickstoff eingeleitet, um restliches [<sup>3</sup>H] zu entfernen. Die Lösung wird im Vakuum bei 35°C eingedampft, der Rückstand zum Austausch labil gebundenen Tritiums in 5ml MeOH aufgenommen, 15min bei 20°C stengelassen und im Vakuum abgedampft. Danach wird der Rückstand in 5ml EtOH gelöst und bei -70°C aufbewahrt. Spezifische Aktivität: 282mCi/mMol (4,1\*10<sup>8</sup> cpm/mg).

### 3.3 Physikochemische und spektroskopische Messungen

#### 3.3.1 Konzentrationsbestimmungen

##### Spektroskopische Methoden

Die Konzentrationen der Peptidtoxine, der gereinigten und dialysierten Proteinlösungen und verschiedener weiterer Substanzen wurden durch Absorptionsmessungen nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz anhand ihrer bekannten molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) bestimmt (Tabelle 3.2). Die Werte gelten für 25°C. Alle Messungen wurden puffer-korrigiert.

$$A_{\lambda} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Wobei:

- $A_{\lambda}$  : gemessene Absorption bei  $\lambda$  nm
- $\epsilon$  : molarer Extinktionskoeffizient bei  $\lambda$  [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
- $c$  : Proteinkonzentration [M]
- $d$  : Schichtdicke der Küvette [cm]

**Tabelle 3.3: Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) der verwendeten Substanzen**

Substanz	Wellenlänge $\lambda$ [nm]	$\epsilon$ [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]	MW [g/mol]
Phalloidin <sup>a</sup>	300	10100	788
NTB <sup>b</sup>	412	14150	197
G-Aktin <sup>c</sup>	290	26460	42000
F-Aktin <sup>c</sup>	290	277210	-
HSA	280	35000	68000

<sup>a</sup> Wieland (1986); <sup>b</sup> Riddles *et al.*(1982); <sup>c</sup> Houk & Ue (1974)

### **Methode nach Bradford**

Die Methode nach Bradford (1976) beruht auf der Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 ( $\epsilon_{\max}=465\text{nm}$ ) bei dessen Anlagerung an Proteine ( $\epsilon_{\max}=595\text{nm}$ ). Grund dafür ist vermutlich die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonatform durch Komplexbildung von Farbstoff und Protein. Die quantitative Anlagerung des Farbstoffes ist proportional zur Masse der Proteine.

100mg Coomassie Brilliant Blue R250 werden mit 50ml 95 % Ethanol versetzt und filtriert. Zu dem Filtrat gibt man 100ml 85 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und füllt mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 1l auf. Es wurden Eichkurven für BSA und G-Aktin erstellt. Pro Versuchsansatz wurden dabei 900 $\mu\text{l}$  der Bradford-Lösung und 100 $\mu\text{l}$  der jeweiligen Proteinlösung verwendet. Die Konzentrationen der für die Eichkurven eingesetzten Proteinlösungen wurden direkt über die bekannten Absorptionskoeffizienten bestimmt (Tabelle 3.2). Damit war es möglich, die Konzentration von Aktin-Lösungen und den Proteingehalt von Zellaufschlüssen zu bestimmen.

### **3.3.2 Bestimmung des Oktanol/ $\text{H}_2\text{O}$ -Partitionskoeffizienten**

Zur Abschätzung der Hydrophobizität verschiedener Toxinkonjugate wurde der  $\log P$  dieser Substanzen bestimmt, der nach folgender Formel die Verteilung von Verbindungen in einem Oktanol/Wasser-Gemisch angibt:

$$\log P = \log (C_{1\text{-Oktanol}} / C_{\text{H}_2\text{O}})$$

wobei C die Gleichgewichtskonzentrationen der gelösten Substanzen in 1-Oktanol bzw.  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. darstellen.

Für die Bestimmung wurde die sogenannte Schüttelflaschenmethode (L.G. Danielsson & Y.-H. Zhang, 1996) genutzt. In 15ml-Glasröhrchen wurden je 1mg der Toxinderivate in einem Gemisch aus 5ml 1-Oktanol und 5ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. gelöst. Die Röhrchen wurden mit einem Stopfen verschlossen und ü.N. auf einem Tischschüttler bei RT gemischt, so dass sich ein Löslichkeitsgleichgewicht der Substanz einstellen konnte. Die beiden Lösungsmittelphasen wurden getrennt und separat am Rotationsverdampfer abgedampft. Die Substanzen wurden in 1ml MeOH gelöst und nach 1:10-Verdünnung in  $\text{H}_2\text{O}$  in einer Quarzküvette die Menge im Photometer anhand des bekannten Extinktionskoeffizienten von Phalloidin (siehe Tabelle 3.2) bestimmt. Anhand der Mengenverteilung der Substanzen in beiden Lösungsmittelphasen konnte der jeweilige  $\log P$  errechnet werden.

### 3.3.3 Massenbestimmung nach MALDI-TOF

Unter Massenspektrometrie versteht man eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Bei der Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS; Karas & Hillenkamp, 1986) mischt man auf einem metallischen Probenhalter eine Analytprobe mit einem 1000 bis 10000 fachen molaren Überschuss einer geeigneten, bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbierenden Matrix, wobei es nach der Verdunstung des Lösungsmittels auf dem Probenhalter zu einer Kokristallisation von Matrix und Analyt kommt. Im Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers wird die kristalline Oberfläche der präparierten Probe einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ( $10^6$ - $10^7$  W/cm<sup>2</sup>) von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Die Einkoppelung der für die Ionen notwendigen Energie erfolgt bei UV-Bestrahlung über resonante elektronische Anregung der Matrixmoleküle, etwa in das  $\pi$ -Elektronensystem aromatischer Verbindungen. Photoionisierte, radikalische Matrixmoleküle bewirken durch Protonentransfer eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Probenmolekülen. Der Probe gegenüber befindet sich in einem Abstand von wenigen Millimetern eine Elektrode, durch die ein elektrostatisches Feld von einigen 100 bis einigen 1000 V/mm erzeugt wird. Je nach Polarität der Elektrode werden positive oder negative Ionen von der Probenoberfläche in Richtung des Analysators beschleunigt.

Bei den für MALDI eingesetzten Massenanalysatoren handelt es sich um Flugzeitmassenspektrometer (TOF-Analysator; engl. *time of flight*), bei denen die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit erfolgt, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Dabei werden Ionen unterschiedlicher Masse-Ladungs- $(m/z)$ -Werten – bei gleicher kinetischer Energie – in der Beschleunigungsstrecke der Quelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht.

Die MALDI-TOF-Messung zur Bestimmung der Massen synthetischer Phalloidin-Derivate erfolgte mit einem Kratos Kompact MALDI 4 V5.2.4 (Shimadzu). Die Analysen wurden im linearen, high-mass, positiven Ionen-Modus des Instruments durchgeführt. Es wurde eine gepulste Extraktion (*time-delayed*) der Ionen zur besseren Auflösung genutzt. Die Proben wurden mittels Sandwichtechnik in Methanol bei einer Konzentration von ca. 5mg/ml auf den Metallproben-Plättchen vermessen. Dazu wurden 0,7 $\mu$ l Matrixlösung (10mg/ml  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure in Acetonitril/0.1% TFA 1:1) auf das Probenfeld aufgetragen, getrocknet, mit 0,7 $\mu$ l Probenlösung überschichtet und nach Trocknen nochmals mit 0,7 $\mu$ l Matrix

---

eingebettet. Jedes Metallprobenplättchen enthält 20 Probenfelder. Feld 1 und 20 wurden wegen der Krümmung der Platten nicht genutzt. Als Standard diente ein Peptidgemisch, das ebenfalls wegen der Krümmung der Platten am Rande (Feld 2 und 19) und in der Mitte (Feld 10) aufgetragen wurde, um eine genaue Kalibrierung des Gerätes zu ermöglichen. Für bessere Messergebnisse wurde die Probenplatte mit folgenden Parametereinstellungen gereinigt und getrocknet: Profiles = 20 (Impulse pro Probe); Aim = 0-1000; Power = 60 . Während der Messungen wurde die Einstellung Profiles auf 50-100 erhöht. Auch der Power-Wert wurde für gute Messergebnisse entsprechend variiert.

### 3.3.4 Gelpermeationsschromatographie

Die Gelpermeationsschromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Zudem beruht diese Reinigung auf Matrixeffekten, sodaß auch eine Trennung strukturell sehr ähnlicher Verbindungen möglich ist. Da für eine effektive Trennung die Molekülgröße in einem kritischen Verhältnis zur Porengröße stehen sollte, eignete sich für die Reinigung der Toxinderivate (788-2500 Da) das Trägermaterial Sephadex LH<sub>20</sub> (Pharmacia; Wieland, 1986). Hierbei handelt es sich um ein hydroxypropyliertes Dextran-Derivat, das, nachdem es vor Verwendung in verschiedenen Glassäulen (Länge 10cm-230cm; Ø1cm-10cm) für 2h in MeOH vorgequollen war, eine Partikelgröße von 27-163µm besitzt. Die Ausschlussgröße liegt bei ca. 4 kDa (Peptide). Die Elution wurde am LKB-Durchflussphotometer bei 280nm detektiert, die Sammlung der Fraktionen erfolgte ebenfalls in einer entsprechenden LKB-Einheit. Als Laufmittel dienten neben reinem MeOH diverse MeOH/H<sub>2</sub>O-Gemische.

Zur Abtrennung hochmolekularer Verbindungen von kleineren organischen Substanzen im wäßrigen Milieu wurde das Säulenmaterial Sephadex G-25 Fine (Pharmacia) verwendet. Sein Fraktionierungsbereich liegt im Bereich von 1-5 kDa. Das Säulenmaterial wurde in H<sub>2</sub>O dest. für 2h gequollen und dann mittels Trichter in entsprechende Glassäulen überführt. Als Laufmittel dienten neben H<sub>2</sub>O, Puffer (PBS) und NaCl-Lösungen (0.1% NaCl).

### 3.3.5 Ionenaustauscherchromatographie

Die Grundlage für den Ionenaustausch ist die kompetitive Wechselwirkung geladener Ionen. Als schwacher Anionenaustauscher wurde für die Naturstoffreinigung des Phallacidins (siehe 3.1) DEAE-Sepharose (Diethylaminoethyl-Sepharose; Matrix ist ein Dextran-Agarose-Polymer) verwendet. Dazu wurde DEAE-Sepharose in H<sub>2</sub>O/HAc (2%) vorgequollen und dann 5h mit H<sub>2</sub>O dest. neutral gewaschen. Nach Auftrag des Phallacidin-angereicherten Extraktes bindet das Toxin, während neutrale Verunreinigungen im Durchlauf zu finden sind.

Als starker Kationenaustauscher wurde für die Reinigung des Hexamethyldiamin-phallacidins SP-Sepharose verwendet (siehe 3.2.1). Hier befindet sich als funktionelle Gruppe ein Sulfopropyl-Rest an den Matrix-Polymeren. SP-Sepharose wurde vor der Benutzung in 5 % HCl/H<sub>2</sub>O vorgequollen und für 16h mit H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1) neutral gewaschen. Im ersten Schritt bindet Hexamethyldiamin-Phallacidin an die fixierten Ladungen der stationären Phase, im zweiten Schritt erfolgte dann die Verdrängung und Elution des Toxins durch 20 % HAc in H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1).

### 3.3.6 Reversed-Phase HPLC

Die Kontrolle der Reinheit der synthetischen Toxinderivate erfolgte mittels Reversed-Phase HPLC. Hierbei findet eine hydrophobe Wechselwirkung der Analyten mit einer unpolaren, stationären Kieselgel-C<sub>18</sub>-Phase im polaren, wäßrigen Lösungsmittel statt. Zur Trennung wurde ein Gradientensystem durch Zumischen des organischen Lösungsmittels Acetonitril zur wäßrigen Phase verwendet, womit die Polarität verringert und somit die Elutionskraft erhöht wurde. Als Ionenpaarreagenz diente Trifluoressigsäure (TFA). Folgende Geräte und Parameter wurden verwendet:

HPLC-System: Waters 600 Pumpen, Waters Photodiodenarray 996,  
Waters 600 Controller, Waters in-line Degasser,  
Waters Millennium Software

RP-Säulen: Knauer RP Nucleosil-100 C<sub>18</sub> mit integrierter Vorsäule (250x4mm)

Puffer A: H<sub>2</sub>O, 0,05 % TFA

---

Puffer B: Acetonitril/H<sub>2</sub>O (9:1), 0,05 % TFA

Flußrate: 1,2ml/min

Auftragsvolumen: 20µl

Konzentration: 1mg/ml Phallotoxin-Derivat

Alle Säulenläufe wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

---

**Tabelle 3.4: RP-HPLC Gradientensystem**

---

<b>Zeit [min]</b>	<b>Flußrate [ml/min]</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>	<b>Kurve</b>
-	1,2	95	5	-
5	1,2	95	5	6
25	1,2	50	50	6
30	1,2	0	100	6
35	1,2	0	100	6
40	1,2	95	5	6

---

---

## 3.4 Biochemische und biophysikalische Messungen

### 3.4.1 Aktinbindungsassay

#### Aktin-Präparation

Die Präparation des Aktins erfolgte aus Aceton-Trockenpulver von Kaninchen-Muskelfleisch, das durch die Arbeitsgruppe von Prof. Faulstich zur Verfügung gestellt wurde (nach Spudich & Watt, 1971).

3g Acetontrockenpulver wurden in 80ml eiskaltem H<sub>2</sub>O bidest. suspendiert und für 30min unter vorsichtigem Rühren im Kühlraum (4°C) extrahiert. Danach wurde der Ansatz über einen gekühlten Büchnertrichter in eine vorgekühlte Waschflasche abgesaugt (Filterpapier: Schleicher & Schuell, Ø90mm; Nr. 597) und der Rückstand für weitere 30min mit H<sub>2</sub>O bidest. extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden 20min bei 30.000 rpm in einem Beckman Ti60 Rotor zentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert (0,2 µm; Schleicher & Schuell) und auf 1mM MgCl<sub>2</sub> und 5mM HEPES pH 7,8 (oder 5mM Tris-HCl pH 7,8) eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz für 90min bei RT polymerisiert. Danach wurde die Proteinlösung für 1h im gleichen Rotor bei 54.000 rpm und 15°C zentrifugiert. Die erhaltenen F-Aktin-Pellets wurden anschließend behutsam zweimal mit G-Puffer (5mM HEPES pH 7,8; 0,1mM CaCl<sub>2</sub>; 0,2mM ATP; 0,02mM NaN<sub>3</sub>) gewaschen. Jedes Pellet wurde mit 5ml kaltem G-Puffer überschichtet und für 5min auf Eis stehengelassen. Danach wurden die Pellets mit einem Plastikspatel vorsichtig aufgerührt, in einen Glas/Teflon-Potter überführt und vorsichtig homogenisiert. Es folgte eine Dialyse ü.N. gegen 2 l G-Puffer bei 4°C (MWCO: 16.000). Das Dialysat wurde für 60min im Ti60 Rotor bei 54.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut sterilfiltriert (s. oben). Das so gewonnene G-Aktin war in SDS-PAGE-Gelen frei von Verunreinigungen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch (siehe 3.3.1).

#### Bindungsassay

Die frisch präparierte G-Aktin-Lösung wird in einem Tris/ATP-Puffer (2mM Tris; 0,2mM ATP; 0,1mM CaCl<sub>2</sub>; 0,02 % NaN<sub>3</sub>; pH 7,8) auf eine Extinktion von 0,28 bei 290 nm eingestellt, wobei der Nullabgleich bei 310nm erfolgt.

Für 1,5ml dieser G-Aktin-Lösung, einer typischen Menge für die in dieser Arbeit durchgeführten Assays, werden 18µl der methanolischen Lösung von [<sup>3</sup>H]-DMPHD (spezifische Aktivität 9 Ci/mmol; siehe 3.2.7) benötigt. Das organische Lösungsmittel wird hierbei zunächst in einem Szintillationsröhrchen mittels eines Heißluftföhns entfernt, dann die G-Aktin-Lösung zupipettiert. Es wurden 12,5µl 0.2M wäßrige MgCl<sub>2</sub>-Lösung addiert, um die Polymerisation zu starten. Nach 30min Polymerisationsdauer bei RT wird die Lösung auf das 10-fache ihres Volumens aufgefüllt.

Das zu testende Toxinderivat wurde in einem KCl/Tris-Puffer (100mM KCl, 1mM Tris, pH 7,4) gelöst, und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt (siehe 3.3.1). Im Falle der Toxinderivate mit hydrophoben Liganden (siehe 3.2.2) wurden die Substanzen zunächst in MeOH gelöst, danach die Konzentration bestimmt und schließlich auf das dreifache Volumen mit KCl/Tris-Puffer aufgefüllt, sodaß sich ein Verhältnis Puffer/MeOH von 2:1 ergab. Anschließend wurde von jeder Substanz eine Verdünnungsreihe bis zu Konzentrationen im Bereich von 10<sup>-7</sup> M erstellt. Zu jeweils 450µl wurden 50µl der verschiedenen Verdünnungen der Testsubstanzen hinzupipettiert, durchmischt, und für 1h bei RT zur Ausbildung eines Gleichgewichts inkubiert. Zur Kontrolle wurden dem [<sup>3</sup>H]-DMPHD/Aktin anstelle der Toxinlösung 50µl Tris/ATP-Puffer zugesetzt. Aus jeder Lösung wurden nach Einstellung des Gleichgewichtes je 180µl Lösung entnommen, in entsprechende Zentrifugenröhrchen für einen Ti 42.2 Rotor (Beckman) pipettiert und bei 40.000 rpm für 50min bei 10°C zentrifugiert.

Aus allen Ultrazentrifugenröhrchen wurden je 3 x 20µl entnommen und zu jeweils 5ml Emulsifizier-Safe LCD Cocktail ins Zählgefäß gegeben. Die Auszählung des radioaktiven Zerfalls erfolgt im Szintillationszähler bei einer Meßdauer von 5min je Probe.

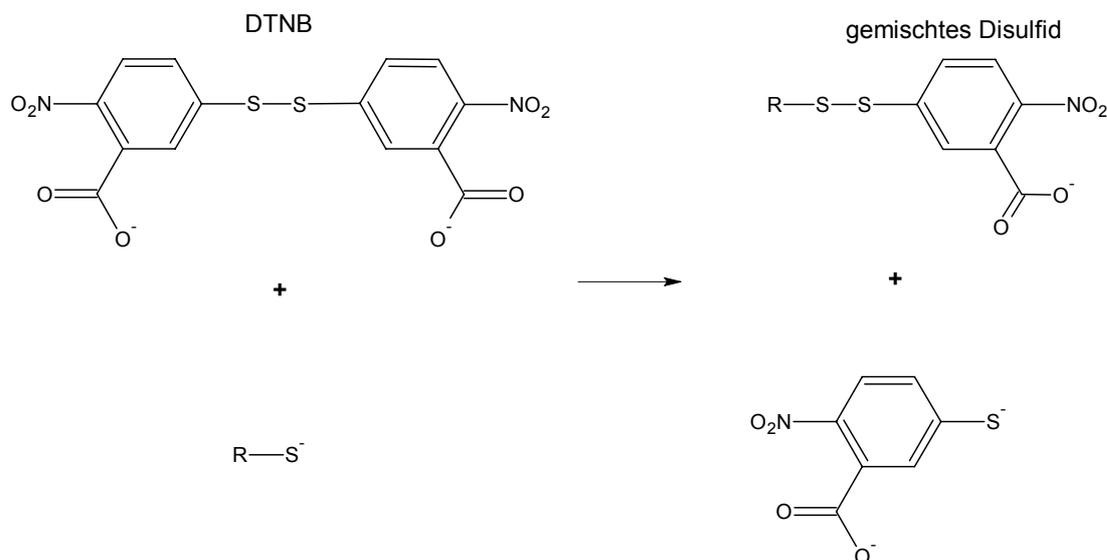
### **3.4.2 Nachweis freier Thiolgruppen durch Ellman-Assay**

Detektion und Quantifizierung von freien Thiolgruppen in Cysteinresten trojanischer Peptide erfolgte durch Umsetzung mit 5,5'-Dithio-bis(2-dinitrobenzoat; DTNB; Ellman Reagenz). Dabei reagiert das Reagenz mit reduzierten Thiolresten unter Ausbildung eines gemischten Disulfides, gleichzeitig wird im stöchiometrischen Verhältnis das Thionitrobenzoat-Anion (NTB, A<sub>max</sub> = 412nm) freigesetzt (siehe Abbildung 3.1). Die Konzentration reduziert vorliegender SH-Gruppen wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Extinktionskoeffizient NTB siehe Tabelle 3.2) bestimmt.

---

**Abbildung 3.1: Nachweis freier Thiolgruppen durch Ellman-Reagenz**


---




---

Zum Nachweis der Thiolgruppen in den Cysteinresten der trojanischen Peptidderivate wurden diese auf eine Konzentration von 15  $\mu$ M in PBS eingestellt und anschließend 300  $\mu$ l der Peptidlösung mit 15  $\mu$ l (1/20 Volumen) 3mM DTNB in PBS bei einer Temperatur von 22°C für 30min inkubiert und die Bildung von NTB durch Änderung der Absorption bei 412nm bis zum Erreichen des Maximalwertes verfolgt.

### 3.4.3 Aktivierung des photosensitiven Phalloidins

#### Photolyse in Puffer

1mg/ml DNB-Phalloidin (trocken eingewogen) in PBS-Puffer wurde zu je 100  $\mu$ l in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Die abgedeckte Zellkulturplatte wurde im Abstand von 10cm unter eine UV-Lampe (Vilber Lourmat VL-215 L 2x15 Watt) gestellt und bei einem Maximum von 366nm belichtet. Nach jeweils 0min, 20min, 40min, 60min und 100min wurden je 20  $\mu$ l Toxinlösung entnommen und durch HPLC (siehe 3.3.6) bzw. DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) analysiert.

---

## Photolyse in der Zellkultur

MF/LDB-Zellen in Kulturflasche wurden trypsiniert, abzentrifugiert und in neuem Medium (DMEM/10 % FKS) gelöst. Dabei wurde eine Konzentration von  $1.6 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Je 50µl dieser Zellsuspension wurde zum Zeitpunkt  $t=0$  in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert (damit ergeben sich  $8.0 \cdot 10^4$  Zellen pro Well). Nach 4h waren die Zellen adhärent. DNB-PHD wurde in Medium gelöst und davon jeweils 50µl PHD jedem Well zugesetzt (Endvolumen 100µl/Well). Die DNB-Konzentration wurde so eingestellt, dass die Endkonzentration  $10^{-3}$  mol/l betrug (DNB-PHD-Menge wurde durch Einwaage bestimmt).

Nach jeweils 1h, 3h, 24h und 48 h wurden das toxische Medium abgezogen und durch 100µl frisches Medium ohne Toxin ersetzt. Die Hälfte der Kultur wurde nach dem Wechsel des Mediums belichtet, die andere Hälfte nicht. Die Belichtung der 96-Well-Platten erfolgte für 50min bei Raumtemperatur und ausserhalb des Brutschranks (siehe oben).

Alle Zellen wurden nach der Belichtung sofort in den Inkubator zurückgestellt und nach 72h dem MTT-Assay unterworfen (siehe 3.5.2).

## 3.5 Zellkulturen

### 3.5.1 Anzucht und Handhabung der Zellkulturen

Alle Zellkulturarbeiten wurden in Sterilbänken mit HEPA-Filtern durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt (alle 72h) und spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Im Überstand wachsende Zellen oder semiadhärente Zellen wurden mit Medium abgespült und dann verdünnt umgesetzt. Die Zellablösung adhärenter Zellen erfolgte durch Inkubation der mit PBS gewaschenen Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen neu ausgesät.

---

## **Einfrieren von Zellen**

Zum Erhalt einer niedrigen Zahl von Passagen wurden Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben (siehe oben) gewaschen, trypsinisiert und anschließend in 5ml reines FKS aufgenommen. Ca. 1,5ml dieser Zellsuspension (ca.  $2 \times 10^6$  Zellen) wurde in ein steriles 2ml Kryogefäß pipettiert, in dem zuvor 150µl DMSO angefroren worden war. Durch vorsichtiges Schütteln wurde das DMSO gleichmäßig in der Zellsuspension verteilt und die Zellen zur weiteren Aufbewahrung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## **Auftauen von Zellen**

Das Kryogefäß mit ca.  $2 \times 10^6$  Zellen wurde bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad kurz angetaut und dann sofort in ein steriles Zentrifugenröhrchen mit 5ml frischem, vorgelegtem Medium überführt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1000 rpm wurde der Mediumüberstand abgenommen und das Zellsediment in 2ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann in ein Kulturgefäß mit bereits vorgelegtem, frischem Medium ausgesät. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel.

### **3.5.2 MTT-Proliferationsassay**

Der MTT-Proliferationsassay ist ein quantitativer kolorimetrischer Test, der den Anteil lebender Zellen anhand mitochondrialer Stoffwechselaktivität nachweist. Das den Zellen angebotene MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird von Mitochondrien vitaler Zellen in einer NADH-abhängigen Reaktion zu Formazanen reduziert. Farbintensität und Vitalität sind einander direkt proportional.

In 96-Well-Mikrotiterplatten wurden  $2 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in 50µl des jeweiligen Vollmediums ausgesetzt und für 24h bei  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  inkubiert. Das jeweilige Toxin-konjugat wurde danach in 50µl Zellkulturmedium gelöst und den Zellen zupipettiert. Einige hydrophobe Toxinderivate wurden durch 2 % DMSO im Wachstumsmedium mit einem Ultraschallstab gelöst (Substanzen wurden in DMSO vorgelöst und unter Beschallung in das Medium injiziert). Nach Inkubationszeiten von 10min bis 72h wurden je 20µl MTT-Lösung (5mg/ml in PBS) pro Well zugegeben und die Zellkulturplatten für weiter 4h bei  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Durch anschließende Zugabe von je 100µl Zellyse-Puffer (10g SDS in 99,4 ml DMSO und 0,6ml Eisessig) pro Well wurden die Zellen lysiert und die

während der Inkubationszeit mit dem MTT gebildeten blauen Formazankristalle gelöst. Es folgte eine kolorimetrische Messung bei 500nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630nm im Mikroplattenphotometer. Als Nullwert wurde die Extinktion in einem Ansatz bestimmt, der die jeweiligen Lösungen und Medium erhält, jedoch keine Zellen.

Zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden die gemessenen Daten in der SPSS Sigma Plot 8.0 Software bearbeitet und an folgende hyperbolische Inhibitionskurve angepasst:

$$y = v_{\max} / (1 + (x / IC_{50}))$$

### 3.5.3 Proliferationsassay mit <sup>3</sup>H-Thymidin

Die Bestimmung der Proliferationsrate mit Hilfe der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation beruht auf dem Einbau des radioaktiv markierten Metaboliten in neu synthetisierte DNS während der Zellteilung. Dazu wurde die jeweilige Zelllinie in einer Konzentration von 1 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml zu je 100µl in die Vertiefung einer 24-Well-Zellkulturplatte pipettiert und 100µl der jeweiligen Toxinverdünnung in Vollmedium addiert. Hydrophobe Derivate benötigten für eine vollständige Löslichkeit 0,5 % DMSO, wobei das Peptidderivat zunächst in DMSO vorgelöst und dann in Medium, in dem ein Ultraschallstab fixiert war, injiziert wurde. Nach 36h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden 50µl <sup>3</sup>H-Thymidin-Lösung (40µCi/ml in Vollmedium) zugesetzt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen mit eiskalter 10% Trifluoressigsäure für 1h bei 4°C inkubiert, mit PBS gewaschen und 12h in einer Mischung aus 500µl/Well 0,1 % Triton X-100 und 0,5M NaOH inkubiert. Nach 10 minütigem Schütteln der zu messenden Platte konnten die Überstände in Szintillationsgefäße mit 3ml Szintillationslösung überführt und die radioaktiven Zerfälle pro Minute im Beta-Counter gemessen werden.

### 3.5.4 Färbungen lebender Zellen

Je 400µl Zelllösung der MF/LDB- und NIH/3T3-Zelllinie wurden in einer Konzentration von 2 x 10<sup>4</sup>-Zellen für 24h im entsprechenden Medium auf Coverslips (Ø12mm; gereinigt in 60%EtOH/ 40 % HCl konz. für 10min) in 24-Well-Zellkulturplatten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden fluoreszierende Toxinderivate in verschiedenen Konzentration (10<sup>-3</sup>M; 10<sup>-4</sup>M; 10<sup>-5</sup>M; 10<sup>-6</sup>M in 100µl Medium) zupipettiert und im Brutschrank weiter inkubiert.

---

Nach 1h, 6h, 24h und 48h wurden Coverslips zweimal mit PBS gewaschen, entnommen, auf Objektträgern fixiert und direkt im Fluoreszenzmikroskop beobachtet bzw. fotografiert.

### 3.5.5 Färbungen fixierter Zellen

Je 400µl Zelllösung der MF/LDB- und NIH/3T3-Zelllinie wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^4$ -Zellen für 24h im entsprechenden Medium auf Coverslips (Ø12mm; gereinigt in 60%EtOH/ 40 % HCl konz. für 10min) in 24-Well-Zellkulturplatten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die verschiedenen Toxinderivate wurden in 100µl Medium (bzw. in 1% DMSO/Medium) in verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-3}$  M bis  $10^{-7}$  M) gelöst und zugesetzt. Nach 1h, 6h, 24h und 48h wurden Zellkulturplatten aus dem Brutschrank entnommen und zweimal jedes Coverslip in PBS-Puffer (37°C) gewaschen. Die Zellen wurden in 500µl/Well Fixierungspuffer für 10min bei RT fixiert und abermals mit 500µl/Well PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte in 500µl/Well Permeabilisierungspuffer für 5min bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit PBS folgte die Färbung in 300µl/well Phalloidin-Färbelösung (FITC-, TRITC-, CPITC-Phalloidin) für 30min bei RT. Nach zweimaligem Waschen in 500µl/Well PBS wurde je 300µl/well DAPI-Färbelösung für 5min bei RT zur Kernmarkierung zupipettiert. Jedes Coverslip wurde abschließend noch zweimal mit PBS gewaschen, auf Filterpapier kurz getrocknet mit einem Tropfen Poly-Mount-Lösung versehen und mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Austrocknen des Harzes ü.N. konnten die fixierten Proben am Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

## 3.6 Methoden zur Bestimmung der Apoptose

### 3.6.1 Durchflußzytometrie

Das Prinzip der Durchflußzytometrie basiert auf der Messung unterschiedlicher Eigenschaften einzelner Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Jede Zelle interagiert dabei mit dem Laserlicht, was zu einer Streuung des Lichtes führt. Die Streuung wird durch verschiedene zellbiologische Parameter wie Zellgröße, Zellmembran, Zellkern und Granularität beeinflusst. Darüber hinaus können Zelloberflächen-Antigene durch Markierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern oder anderen Verbindungen nachgewiesen werden, die durch Laserlicht angeregt werden.

Es ist möglich folgende optische Parameter gleichzeitig zu messen:

*Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter)*: Ein Teil des Lichtes wird relativ zur Achse der Einstrahlung in einem Winkel von 2 bis 6 Grad gestreut. Diese Streuung gilt als Maß für die Zellgröße, denn große Zellen streuen mehr Licht als kleine Zellen.

*Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward scatter)*: Diese Bezeichnung steht für das im rechten Winkel zum einfallenden Strahl gestreute Licht. Die Intensität dieses Lichtes ist von der Granularität, den kernhaltigen Bestandteilen der Zelle abhängig. Höhere Granularität bedingt stärkeres Seitwärtsstreulicht.

*Fluoreszenz*: Spezielle Filtersysteme zerlegen das seitwärts abgestrahlte Licht in drei verschiedene Spektralbereiche. Damit ist es möglich, sowohl Einzel-, als auch Doppel- und Dreifachfluoreszenzen zu messen. Dies erlaubt eine gleichzeitige Analyse von bis zu drei verschiedenen Zelloberflächenmerkmalen.

Bei der Anfärbung mit Fluorochrom-konjugierten Verbindungen ist zu beachten, dass die gewählten Fluorochrome durch Laserlicht der Wellenlänge 488 nm anregbar sein müssen. Die Emissionsspektren der drei Fluorochrome müssen jedoch verschieden sein, wobei nicht vermeidbare Überlappungen durch Kompensation ausgeglichen werden können.

### **3.6.2 Annexin-V-FLUOS**

Annexin-V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein. Es besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin, das sich normalerweise bei intakten Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet. In frühen Apoptose-Stadien, wenn die Zellmembran noch intakt ist, verlagert sich das Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran, wo es mit Annexin interagieren kann. Annexin kann somit zum Nachweis für Apoptose-typische Veränderungen eingesetzt werden. Da nekrotische Zellen aufgrund des Verlustes der Membranintegrität ebenfalls Annexin binden können, ist eine weitere Differenzierung der apoptotischen von nekrotischen Zellen erforderlich. Hierfür eignen sich DNA-Farbstoffe, wie beispielsweise Propidiumiodid (PI), die nur permeabilisierte Membranen nekrotischer Zellen passieren können. Die simultane Anwendung von Annexin

---

und Propidiumiodid ermöglicht so eine einfache Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen.

Für die Apoptose-Versuche wurde der Annexin-V-FLUOS Staining Kit genutzt (Roche Diagnostics; Cat-No. : 1 858 777).  $1 \times 10^6$  Jurkat-Zellen wurden geerntet, in 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert (Heraeus Christ Minifuge 2; 200g; 10min; RT) und das Zellsediment in 100  $\mu$ l Annexin-V-FLUOS Labeling Solution (hergestellt aus 20 $\mu$ l Annexin-V-FLUOS Labeling Reagent in 1ml Inkubationspuffer, dem 20 $\mu$ l Propidiumiodid Reagent zugesetzt werden) resuspendiert. Nach Inkubation für 15min bei RT wurde die Suspension in ein FACS-Röhrchen überführt und 0.5ml Inkubationspuffer addiert. Die Proben wurden bis zur durchflusszytometrischen Analyse im Kühlschrank aufbewahrt. Die Messung erfolgte für das Fluorescein mit Hilfe eines 488nm Excitationsfilters und eines 515nm Bandpassfilters, für das Propidiumiodid wurde ein Filter >600nm genutzt. Am Gerät wurde die elektronische Kompensation genutzt, um eine Überlappung der beiden Emissionsspektren auszuschließen.

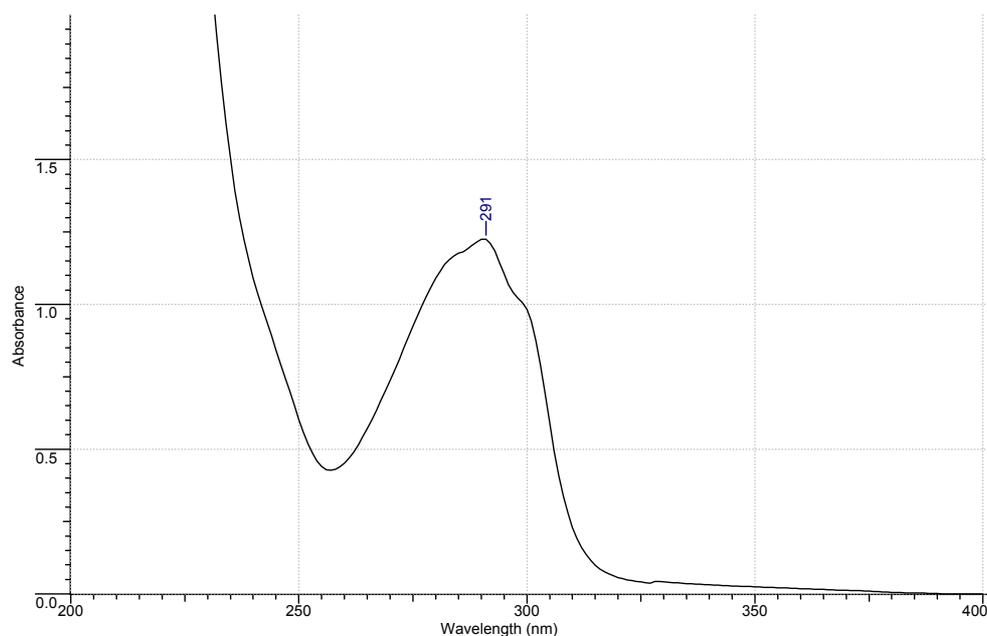
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Reinigungen

Die Toxine Phalloidin und Phallacidin wurden aus dem Pilz *Amanita phalloides* für chemische Modifizierungen gewonnen. Dabei konnte das neutrale Phalloidin aus Rohextrakten der Pilze durch zweimalige Gelfiltrationschromatographie (Sephadex-LH<sub>20</sub>) und anschließende Flash-Chromatographie gereinigt werden (Normal Phase Silica Si). Für die Isolation des sauren Phallacidins mußte eine erweiterte Reinigung etabliert werden. Durch aufeinanderfolgende Säulenläufe der Anionenaustauscher- (DEAE-Sepharose), Gelfiltrations- (Sephadex-LH<sub>20</sub>) und Flash-Chromatographie (Normal Phase Silica Si) gelang es Phallacidin in für weitere Derivatisierungen geeigneter Reinheit herzustellen (siehe 3.1).

Anhand ihres charakteristischen UV-Spektrums (siehe Abbildung 4.1) lassen sich die Toxine photometrisch identifizieren (siehe 3.3.1). Die Reinheit der Toxine (durchschnittlich ca. 95 %;

**Abbildung 4.1: Charakteristisches UV-Spektrum der Phallotoxine**

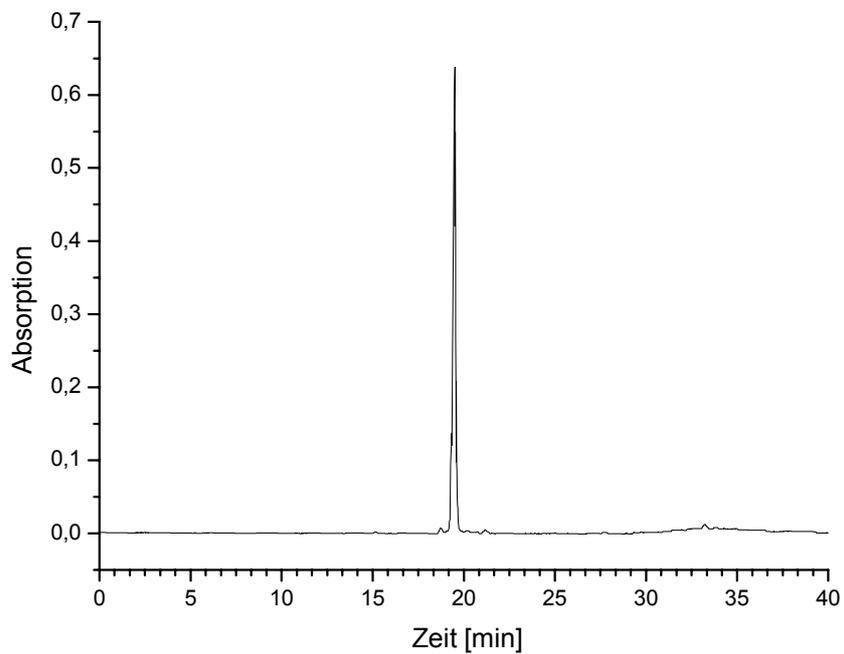
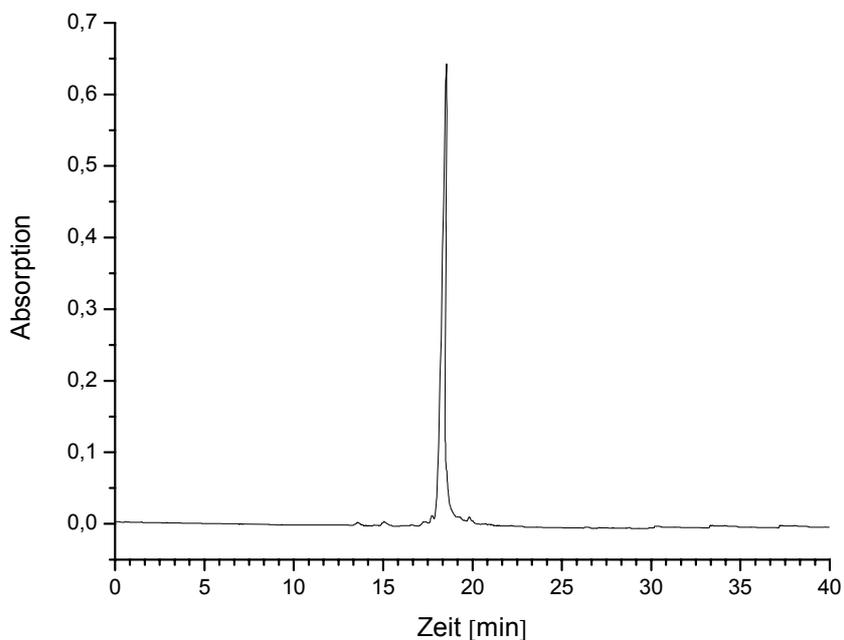


Das UV-Spektrum der Phallotoxine läßt den Tryptophan-Typ erkennen, der durch die  $\alpha$ -Thiosubstitution in einen Bereich höherer Wellenlänge verschoben ist. Charakteristisch ist das Absorptionsmaximum bei 291nm und die Schulter bei 300nm.

---

**Abbildung 4.2: HPLC-Säulenläufe der gereinigten Toxine**

---

**A****B**

Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC-Säulenläufe zur Bestimmung der Reinheit der Toxine. Puffer 1: H<sub>2</sub>O, 0,05 % TFA. Puffer 2: Acetonitril/H<sub>2</sub>O (9:1), 0,05 % TFA. Flußrate 1,2 ml/min. Auftragsvolumen 20µl Toxinlösung. Konzentration: 1mg/ml. **A:** Phalloidin; R<sub>T</sub> = 19,51 min; Reinheit: 98,2 % **B:** Phalloidin; R<sub>T</sub> = 18,55 min; Reinheit: 94,6 %

---

siehe Abbildung 4.2) wurde über Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC (siehe 3.3.6) bestimmt und die Masse der Toxine über MALDI-TOF (siehe 3.3.3) verifiziert. Die sauberen Toxine zeigten sich nach der Lyophilisation als pulverige Produkte von nahezu weißer bis schwach gelber Farbe.

## 4.2 Synthesen der Vorstufen

Die Giftwirkung der Phallotoxine ist an die Existenz einiger wichtiger Strukturmerkmale gebunden. Zur Herstellung membrangängiger Peptidtoxine konnten daher nur Seitengruppen der Aminosäuren in Position 2 und 7 ohne großen Verlust der Aktinaffinität derivatisiert werden. Funktionelle Gruppen sind dabei der  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin-Rest mit seiner primären Hydroxylgruppe, der sowohl im Phalloidin wie auch im Phallacidin vorkommt, und der  $\beta$ -Hydroxyasparaginsäure-Rest mit seiner Carboxylgruppe im Phallacidin (siehe Abbildung 1.5).

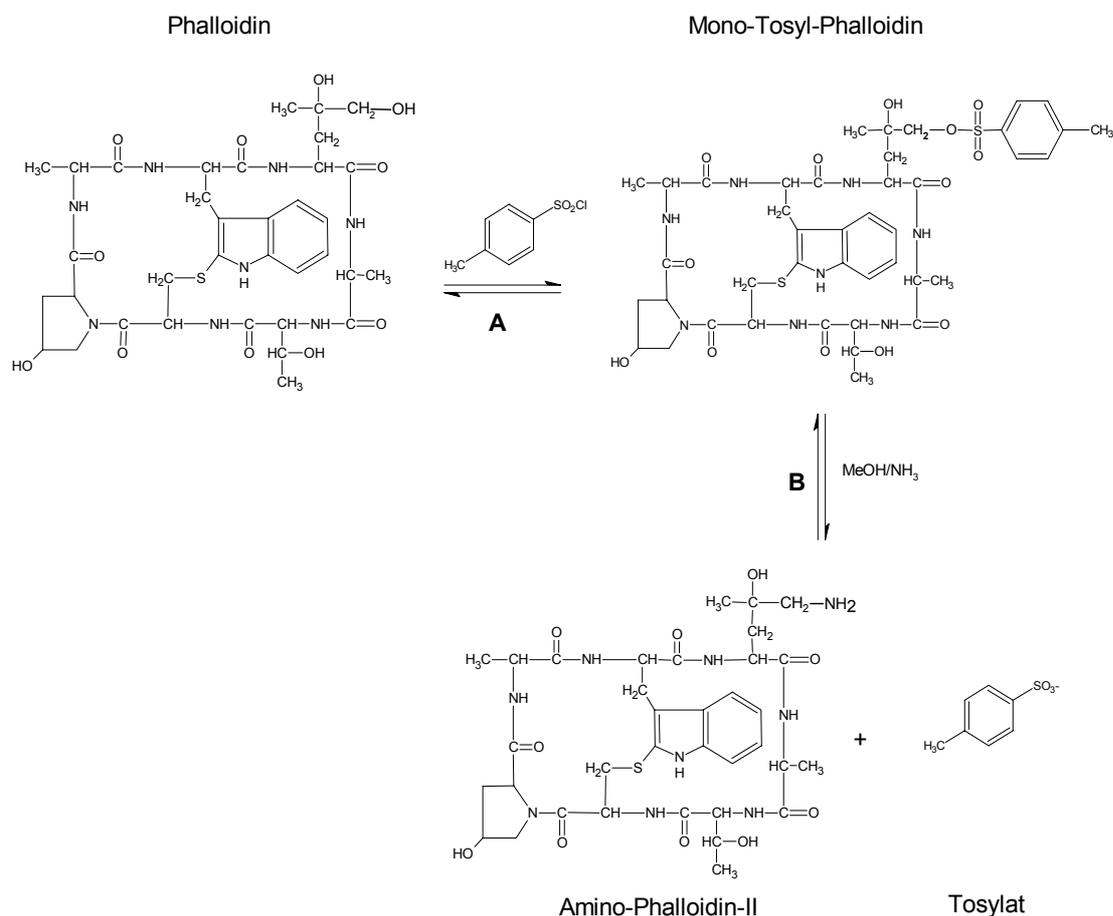
### 4.2.1 Einführung von Aminogruppen

In dieser Arbeit wurden Liganden entweder direkt oder indirekt an das Toxin gekoppelt. Für die direkte Kopplung wurden die Liganden an den genannten funktionellen Gruppen eingeführt. Für indirekte Kopplungen hingegen erfolgte zunächst die Einführung einer Aminogruppe an der primären Hydroxylgruppe des  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucins und der Carboxylgruppe der  $\beta$ -Hydroxyasparaginsäure.

Zur Einführung einer primären Aminogruppe am  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin wurde Phalloidin in einer zweistufigen Synthese zunächst durch Toluol-4-sulfonylchlorid aktiviert (siehe 3.2.1). Das Halogenid des Sulfonylchlorids wird dabei in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion durch die primäre Hydroxylgruppe im  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> substituiert (Abbildung 4.3) zum Alkylsulfonat, das durch nukleophile Substitution mit NH<sub>3</sub> das gewünschte Aminophalloidin ergibt. Zur Unterscheidung vom Aminomethyldithiolano-Phalloidin (Amino-Phalloidin-I), das für viele Phalloidinderivate als Ausgangsbasis dient (Faulstich, 1976), wurde das hier gebildete Amino-Phalloidin als Amino-Phalloidin-II bezeichnet.

Die funktionelle Aminogruppe wurde durch Färbung mit Ninhydrin nachgewiesen (Reinheit: 89,2 %; Ausbeute 80 %).

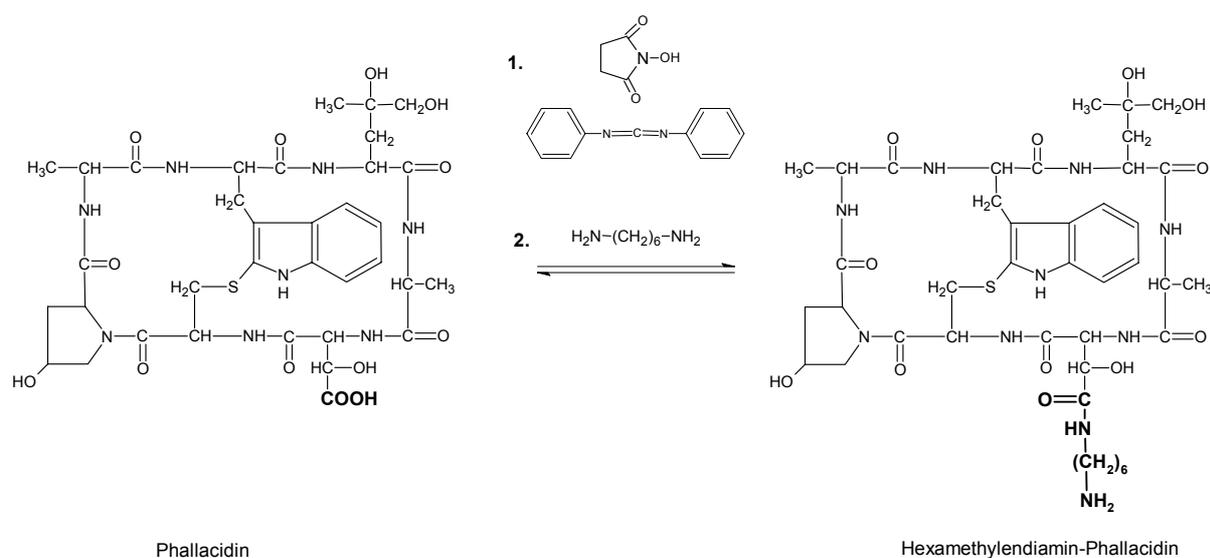
**Abbildung 4.3: Synthese des Amino-Phalloidin-II**



Umsetzung von Phalloidin zum Amino-Phalloidin-II über die Mono-Tosyl-Zwischenstufe. **A:** Synthese von Mono-Tosyl-Phalloidin aus Phalloidin und Toluol-4-sulfonylchlorid. **B:** Umsetzung mit methanolischer Ammoniaklösung zu Amino-Phalloidin-II.

Ein weiteres Aminoderivat der Phallotoxine wurde aus dem sauren Phallacidin erhalten. Dessen Carboxylgruppe wurde mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Bildung von *N,N'*-Dicyclohexyl-Harnstoffs (siehe 3.2.1) zum *N*-Hydroxysuccinimidester aktiviert, aus dem dann durch Aminolyse mit Hexamethyldiamin Hexamethyldiamin-Phallacidin entstand (Abbildung 4.4). Das Produkt erschien in der analytischen Reversed Phase  $\text{C}_{18}$ -HPLC bei einer Retentionszeit von  $R_T = 19,51$  min und war im Ninhydrin-Nachweis positiv.

Abbildung 4.4: Synthese des Hexamethyldiamin-Phallacidin



Die Carbonsäure-Gruppe des Phallacidin wird mit *N*-Hydroxysuccinimid und *N,N'*-Dicyclohexyl-Carbodiimid aktiviert (1.), danach erfolgt die Umsetzung mit Hexamethyldiamin (2.).

#### 4.2.2 Einführung von Linkerreagenzien

Um die sterische Hinderung der Toxinwirkung bei raumbeanspruchenden Liganden zu vermeiden, wurden entweder zwischen Toxin und Ligand langkettige Linkermoleküle eingeführt, oder spaltbare Linkermoleküle (z.B. mit Disulfidbrücke -S-S-), die eine Abspaltung des Toxins in der Zelle gewährleisten. Hierfür wurde z.B. Amino-Phalloidin-II mit SPDP (3-(2-Pyridyldithio)propionsäure *N*-Hydroxysuccinimidester), SATP (*N*-Succinimidyl S-acetylthiopropionat), DSS (Disuccinimidylsuberat) und DSP (Dithiobis[succinimidyl propionat]; Lomant's Reagenz) umgesetzt (Abbildung 4.5). Alle Reagenzien reagieren über einen aminolytisch spaltbaren *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester), der mit Aminophalloidin-Derivaten Amidbrücken bildet (siehe 3.2.1).

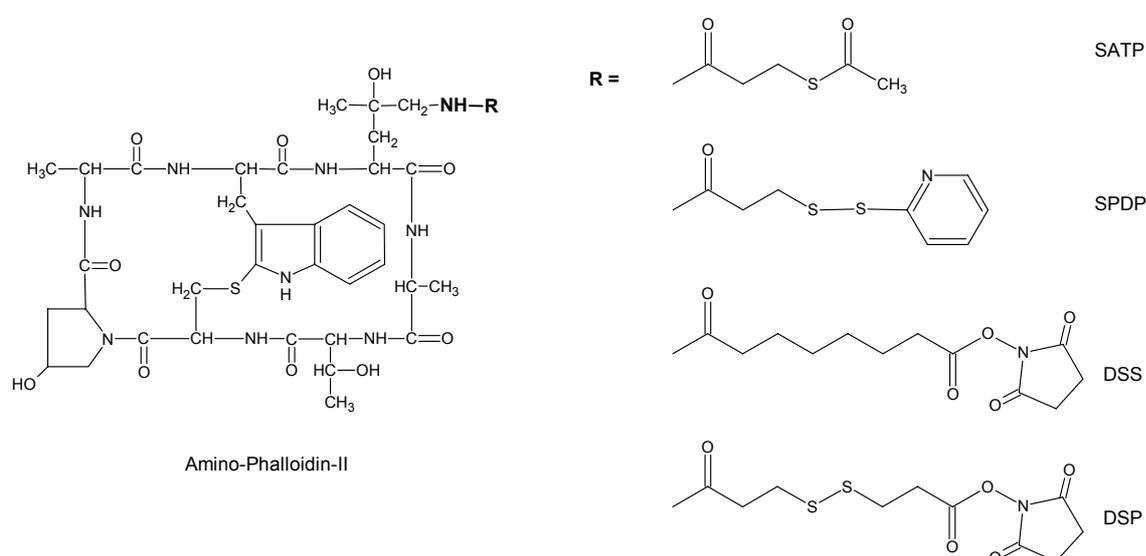
DSS und DSP sind homobifunktionelle Cross-Linker, die auf beiden Seiten über eine NHS-Ester-Funktion verfügen und so nach der Konjugation an das Toxin eine weitere Umsetzung mit dem Amin des Liganden erlauben. Die beiden symmetrischen Verbindungen unterscheiden sich lediglich durch eine im DSP vorhandene Disulfidbrücke, die durch reduzierende Agenzien (z.B. Glutathion in der Zelle) spaltbar ist. Die Kohlenwasserstoffkette

des DSS ist dagegen nicht spaltbar, die Crosslinks daher irreversibel. Die Länge des achtatomigen Spacers beträgt 12 Å (DSP) bzw. 11,4 Å (DSS). Beide Verbindungen sind hydrophob und wurden daher in DMF mit dem Amino-Toxin umgesetzt.

Durch Umsetzung mit SATP konnte eine geschützte Sulphydryl-Gruppe in das Toxin eingeführt werden. Die Schutzgruppe kann durch Hydroxylamin entfernt werden und man erhält das freie Thiol.

Auch das heterobifunktionelle SPDP bildete als NHS-Ester eine Amidbindung zum Toxin aus, während die am anderen Terminus des Reagenzes befindliche 2-Pyridylthiol-Gruppe mit Sulphydryl-Resten eines weiteren Moleküles unter Ausbildung einer Disulfidbindung reagiert.

**Abbildung 4.5: Umsetzung des Amino-Phalloidin-II mit Linkerreagenzien**



Reaktion des Amino-Phalloidin-II erfolgte mit vier verschiedenen *N*-Hydroxysuccinimid-Reagenzien, sodaß in der  $\delta$ -Position des Dihydroxyleucins verschiedene Linker (**R**) mit und ohne Disulfidbindung als Amide eingeführt wurden. Es konnten so die Toxin-Konjugate ATP-Amino-Phalloidin-II, PDP-Amino-Phalloidin-II, DSS-Amino-Phalloidin-II und DSP-Amino-Phalloidin-II synthetisiert werden.

Die Reinigung aller Toxin-Linker Konjugate erfolgte über Gelfiltrationschromatographie (Sephadex-LH<sub>20</sub>); die Reinheit lag nach analytischer Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC jeweils bei über 90%. Die deutlich erhöhten RF-Werte in der DC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O; 65:25:4) gegenüber Phalloidin bzw. Amino-Phalloidin-II (siehe Kapitel 3.2.1) sind eine Folge der eingeführten, hydrophoben Linkermoleküle.

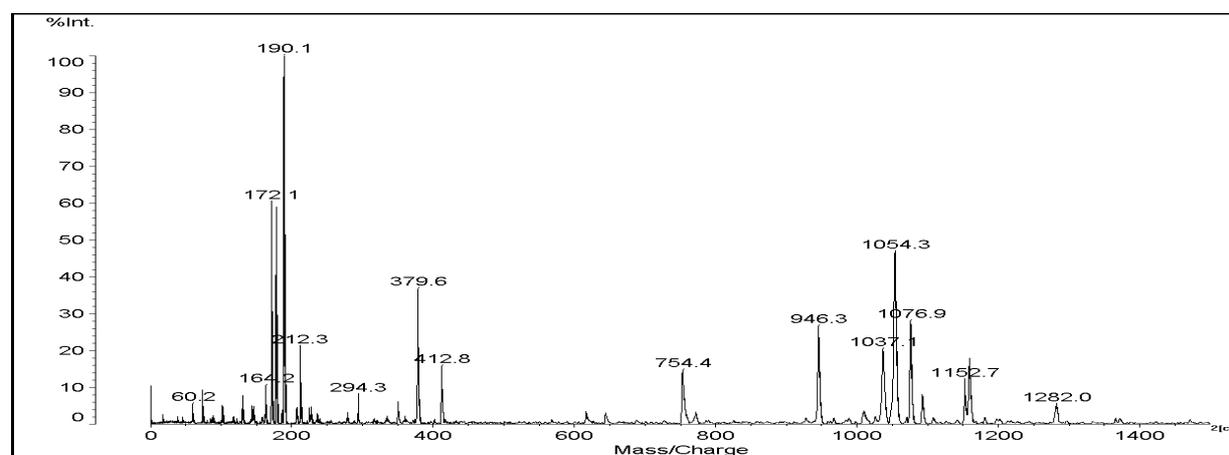
### 4.3 Synthesen der membrängängigen Konjugate

Um die Membranpermeabilität der Phallotoxine zu erhöhen, wurden die beschriebenen Zwischenprodukte mit hydrophoben Liganden, permeationserleichternden Peptiden, sowie kationischen bzw. neutralen Polymeren verbunden.

#### 4.3.1 Synthesen von Phallotoxinen mit hydrophoben Liganden

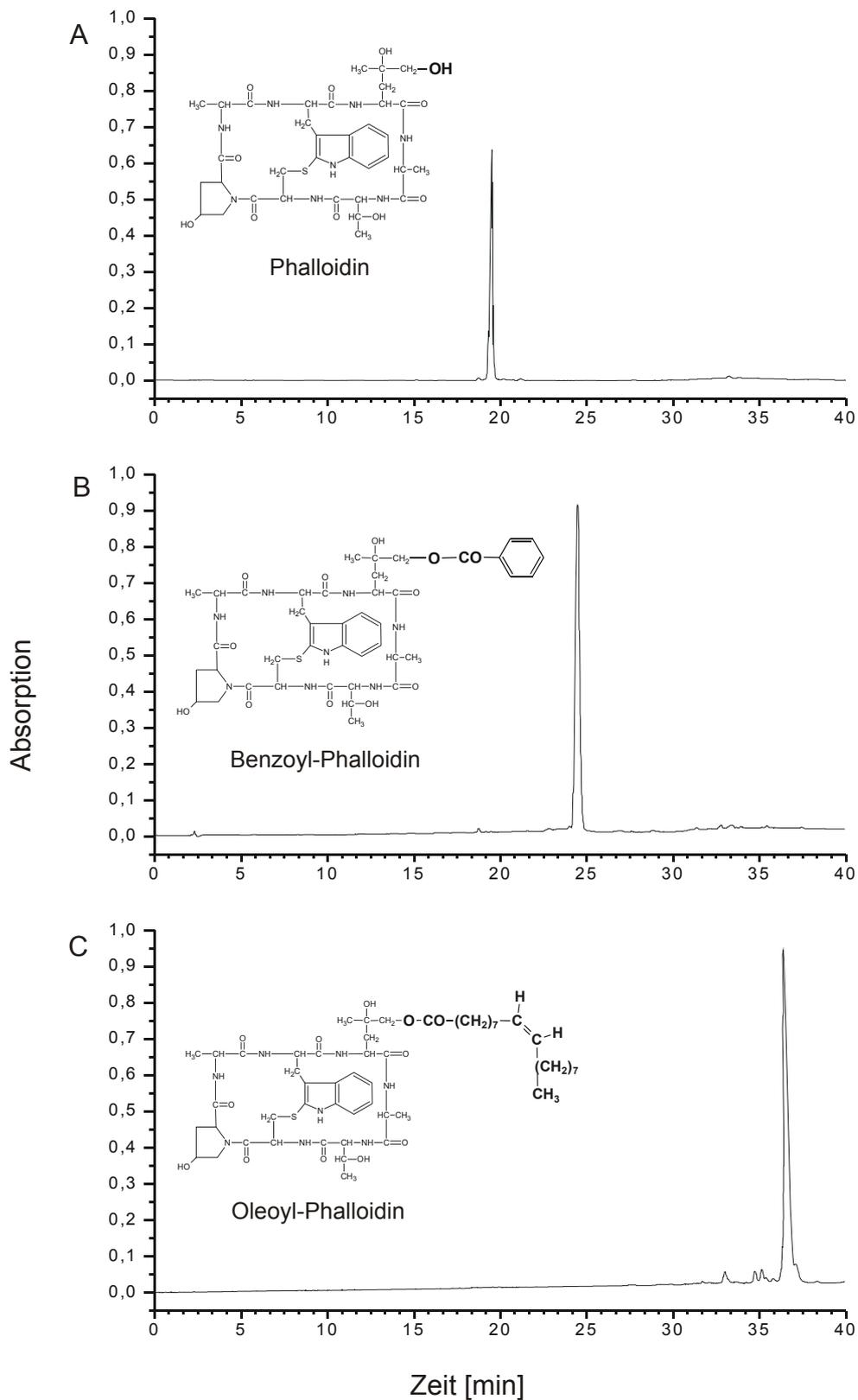
Die primäre OH-Gruppe des Phalloidins wurde mit Säurechloriden in Pyridin verestert. Auf diese Weise konnten Oleoyl-Phalloidin, Myristoyl-Phalloidin und Octanoyl-Phalloidin dargestellt werden (siehe 3.2.2). Auf ähnliche Weise reagierte Phalloidin mit den aromatischen Säuren Benzoylchlorid und Salicylchlorid. Die Acylierung der primären OH-Gruppe ist kinetisch bevorzugt, sodaß man bei kurzer Reaktionszeit (2h) mit 3-fachem Überschuß des Reagenzes überwiegend Monoacyl-Derivate (mono:disubstituiert Verhältnis 3:1) erhielt. Die Trennung der Produkte erfolgte über präparative DC und Sephadex-LH<sub>20</sub> Gelfiltration. Die Reinheit der Konjugate lag bei durchschnittlich 90 %. Die Masse wurde über MALDI-TOF verifiziert (Abbildung 4.6). Anhand der R<sub>F</sub>-Werte der analytischen DC (siehe Tabelle 3.1) auf Kieselgelplatten und der Retentionszeiten R<sub>T</sub> in der Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC (Abbildung 4.7) konnte ein deutlicher Anstieg der Hydrophobizität der Konjugate gegenüber der Ausgangsverbindung Phalloidin registriert werden was zu einer Erhöhung der Membranaffinität bzw. Membranpermeabilität führen sollte.

**Abbildung 4.6: Massenbestimmung nach MALDI-TOF am Beispiel des Oleoyl-Phalloidin**



Massenspektrum nach MALDI-TOF des Oleoyl-Phalloidin. Der Hauptmassenpeak mit 1054,3 entspricht der molekularen Masse der protonierten Toxinform. Meßparameter: Kratos Kompact MALDI 4; linearer, high-mass, positiver Ionenmodus; *time-delayed*; Power=60; Profiles 50-100; Aim=0-1000; Probe mit einer Konzentration von 5mg/ml in MeOH nach der Sandwich-Methode in 2 \* 0,7µl Matrixlösung (10mg/ml α-Cyano-4-hydroxizimtsäure in Acetonitril/0.1% TFA 1:1) auf Metallmeßstreifen aufgetragen.

Abbildung 4.7: HPLC-Elutionsdiagramme hydrophober Toxin-Derivate

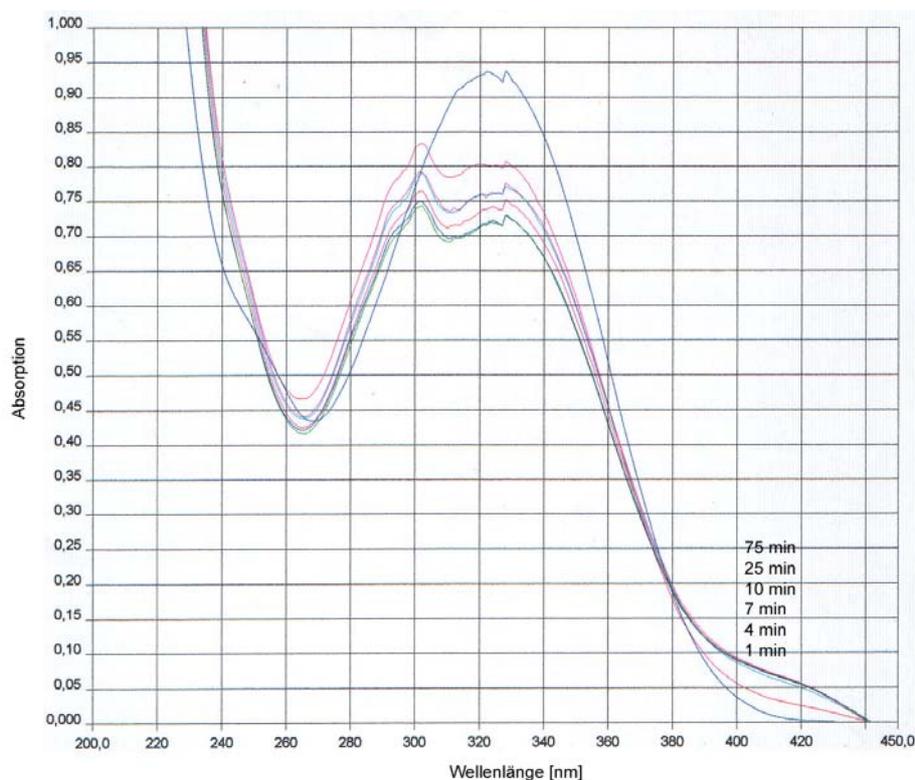


Elutionsdiagramme der Reversed Phase  $C_{18}$ -HPLC von Phalloidin, Benzoyl-Phalloidin und Oleoyl-Phalloidin. Die Retentionszeit der Toxine nimmt mit der Hydrophobizität aufgrund höherer Affinität zur Säulenmatrix zu.  $R_T$  Phalloidin: 19,51 min;  $R_T$  Benzoyl-Phalloidin: 24,48 min;  $R_T$  Oleoyl-Phalloidin: 36,70 min. Aufzeichnung der Absorption bei 280nm.

Als weiteres hydrophobes Toxin wurde Ellman-Amino-Phalloidin-II synthetisiert (siehe 3.2.2). Neben seinen physiko-chemischen Eigenschaften zeichnet sich das Ellman-Reagenz (DTNB; 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) durch seine Fähigkeit aus, durch Thiol-Disulfidaustausch mit exponierten SH-Gruppen von integrierten Membranproteinen auf Oberflächen von Zellen zu reagieren. Es wurde spekuliert, daß integrierte Membranproteine, die Thiolgruppen enthalten, mit Ellman-Amino-Phalloidin-II reagieren, und daß diese Membranproteine, die über Disulfidbrücken gebundene Toxinmoleküle tragen, nachfolgend als biologisch unbrauchbar in die Zelle zurückgeholt und abgebaut werden.

Zur Darstellung des Ellman-Amino-Phalloidin-II wurde die geschützte SH-Gruppe des ATP-Amino-Phalloidin-II (siehe 4.2.2) mit Hydroxylamin freigesetzt und mit DTNB in MeOH/H<sub>2</sub>O umgesetzt. Nach 1min, 4min, 7min, 10min, 25min und 75min wurden Proben des Reaktionsansatzes entnommen und spektrophotometrisch vermessen. Die Produktbildung konnte anhand des stöchiometrisch freigesetzten 2-Nitrobenzoat-Thio-Anions spektrophotometrisch verfolgt werden (siehe Abbildung 4.8).

**Abbildung 4.8: Freisetzung des NTB-Anions bei Ellman-Amino-Phalloidin-II Synthese**



ATP-Amino-Phalloidin-II wurde mit 11 Äquivalenten Hydroxylamin und 1,1 Äquivalenten Ellman-Reagenz in MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>3</sub> pH 8,0 umgesetzt. Nach 1min, 4min, 7min, 10min, 25min und 75min wurden aus dem Reaktionsansatz Proben entnommen und im UV/VIS-Photometer die Absorptionszunahme der NTB-Anion-Bildung bei 412nm aufgezeichnet. Nach 25min ist der Absorptionsanstieg bei 412nm nahezu abgeschlossen, die Umsetzung zum Ellman-Amino-Phalloidin-II daher vollständig.

Das Produkt wurde über eine Sephadex-LH<sub>20</sub> Gelfiltrationssäule getrennt. Zur Identifizierung der Substanzen wurden die Banden von analytischen DC-Platten parallel mit DTT-Lösung und Zimtaldehyd-Reagenz eingesprüht. Nur das Produkt Ellman-Amino-Phalloidin-II zeigte sowohl die blaue Zimtaldehyd-Färbung als auch die gelbe Färbung des NTB-Anions als Folge der Reduktion mit DTT. Die Ausbeute der Reaktion betrug 76%; Massen-Bestimmung erfolgte nach MALDI-TOF.

Als drittes Prinzip in der Reihe der hydrophoben Toxin-Liganden wurde die Kopplung an Phospholipide verfolgt. Da Phospholipide der Hauptbestandteil eukaryontischer Membranen sind, schien eine Insertion der Toxinkonjugate in die Zellmembran möglich. Mit Hilfe der aminospezifischen NHS-Ester-Funktion im DSP-Amino-Phalloidin-II (siehe 4.2.2) konnte DL- $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylethanolamin an das Peptid gekoppelt werden. Die Umsetzung erfolgte in MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1:3), das Produkt (67% Ausbeute) wurde über Sephadex-LH<sub>20</sub> getrennt. *In vivo* sollte die Disulfideinheit im DSP-Linker eine effektive Abspaltung des sterisch ungünstigen Lipidrestes vom Toxin gewährleisten.

#### 4.3.2 Synthesen von Derivaten trojanischer Peptide

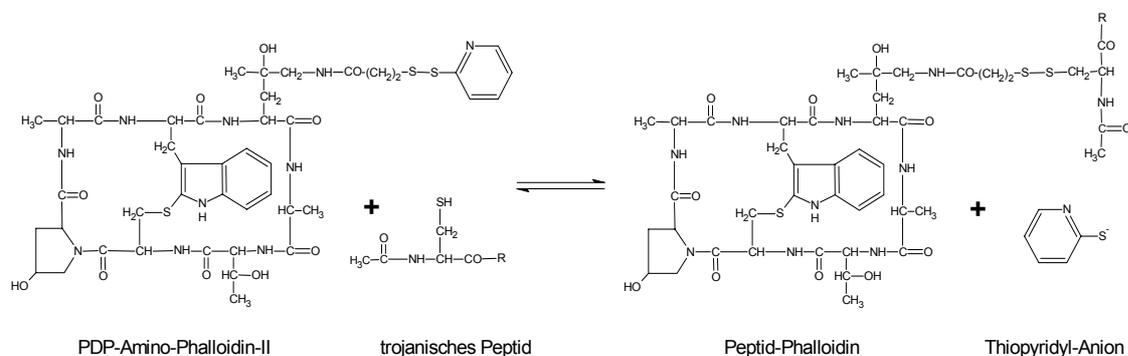
Bestimmte Proteine besitzen die Fähigkeit nach einem bisher noch wenig verstandenen Mechanismus in das Innere von Zellen zu gelangen. Diese Eigenschaft ist auf bestimmte Sequenzabschnitte ihrer Aminosäureketten zurückzuführen.

Mit Hilfe der Abteilung für Physikalische Biochemie des Physiologisch-chemischen Instituts der Universität Tübingen (Dr. H. Eschner) wurden solche Peptide mit membranpermeationsvermittelnder Wirkung durch Festphasensynthese hergestellt. Dazu gehörten das Tat-Peptid aus dem Tat-Protein von HIV-1, das Antenna-Peptid aus dem Antennapedia-Homeodomänenprotein von *Drosophila*, das Kaposi-Peptid des Kaposi "fibroblast growth factor" (K-FGF) aus dem Kaposi-Virus sowie ein Arg<sub>8</sub>-Peptid zum Vergleich (siehe Abbildung 4.9). Als Kopplungsgruppe diente in allen "trojanischen Peptiden" ein aminoterminal eingeführtes, acetyliertes Cysteinylglycin, das nach Ellman-Assay (siehe 3.4.4) in allen Peptiden zu 89-94 % in der SH-Form vorlag.

---

**Abbildung 4.9: Kopplung der trojanischen Peptide über Thiol-Disulfid-Austausch**


---



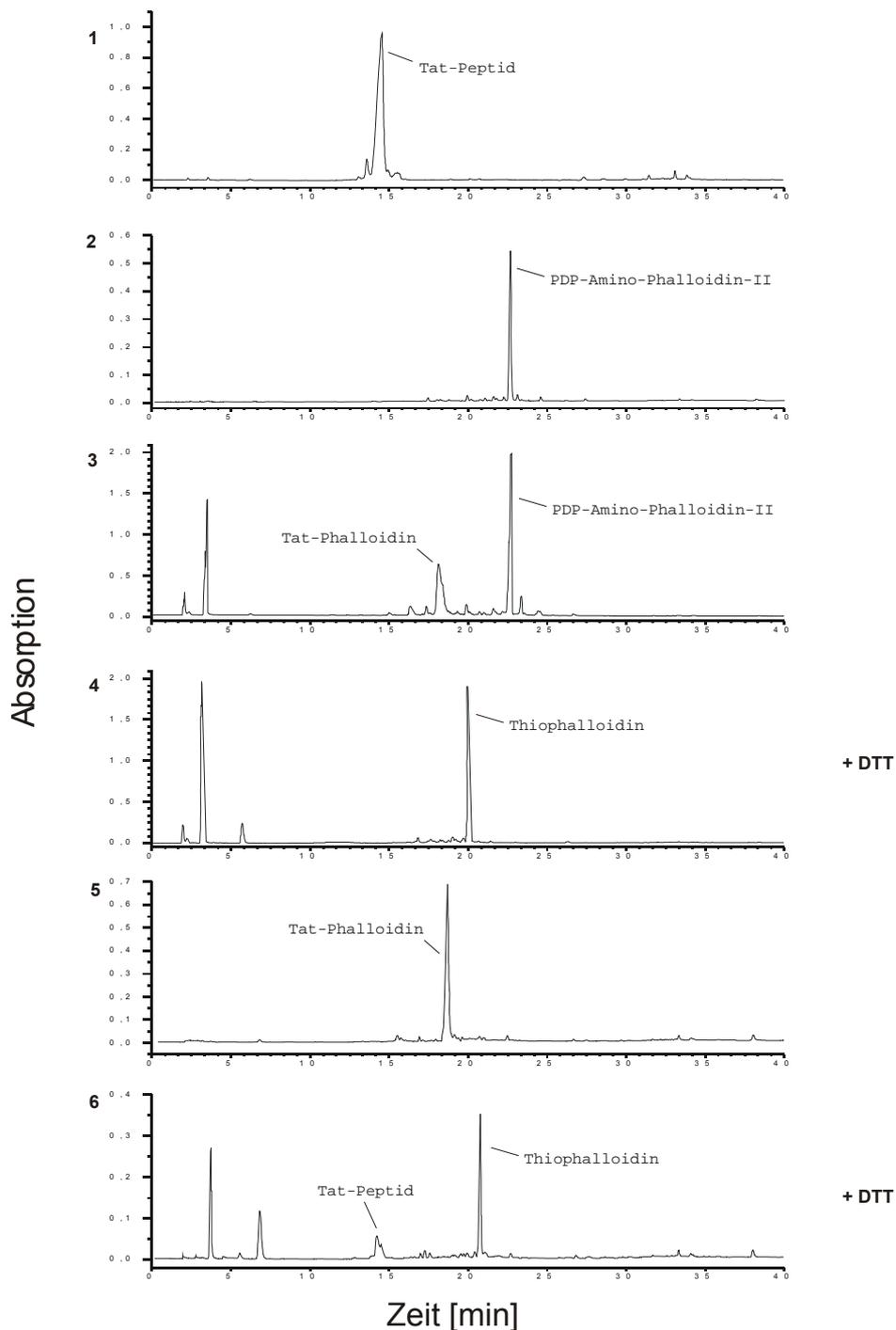
- Tat-Peptid:** Ac-Cys-Gly-Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-OH
- Antenna-Peptid:** Ac-Cys-Gly-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH
- Arg<sub>8</sub>-Peptid:** Ac-Cys-Gly-(Arg)<sub>8</sub>-OH
- Kaposi-Peptid:** Ac-Cys-Gly-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-OH

Die Kopplung der trojanischen Peptide an die Toxine erfolgte durch eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion zwischen der freien Thiolgruppe der terminalen, *N*-acetylierten Cysteingruppe in der Aminosäurekette und dem aktivierten Disulfid im Linker des PDP-Amino-Phalloidin-II in PBS/MeOH (pH 7,4). Bei der Reaktion ü.N. wird das Thiopyridyl-Anion freigesetzt.

---

Reaktionspartner war PDP-Amino-Phalloidin-II (siehe Abbildung 4.9), das mit 0,7-0,9 Äquivalenten der Peptide über Thiol-Disulfidaustausch umgesetzt wurde. Anhand der Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC konnte gezeigt werden, daß Tat-SS-Phalloidin (siehe Abbildung 4.10), Arg<sub>8</sub>-SS-Phalloidin und Kaposi-SS-Phalloidin ü. N. gebildet wurden. Die Kopplung des Antenna-Peptids an Phalloidin war nicht möglich. Die Massenbestimmung über MALDI-TOF bestätigte die Bildung von Tat-SS-Phalloidin, Arg<sub>8</sub>-SS-Phalloidin und Kaposi-SS-Phalloidin. Die Ausbeute der Produkte lag bei durchschnittlich 40-55 % bezogen auf die Phallotoxin-Vorstufe.

Abbildung 4.10: Synthese und Reinigung des Tat-SS-Phalloidin



Reversed Phase  $C_{18}$ -HPLC Säulenläufe zur Kontrolle der Umsetzung des Tat-Peptides mit PDP-Amino-Phalloidin-II. Detektion bei 280nm; Auftragsvolumen 20 $\mu$ l; 1,2ml/min. **1:** Tat-Peptid (10mg/ml) vor der Umsetzung;  $R_T=14,30$  min. **2:** PDP-Amino-Phalloidin-II vor der Umsetzung  $R_T=22,64$  min. **3:** Reaktionsansatz in PBS/MeOH nach Thiol-Disulfid-Austausch ü.N. in PBS/MeOH;  $R_T$  Tat-SS-Phalloidin=18,23 min;  $R_T$  Thiopyridyl-Anion=3,60 min. **4:** Reaktionsansatz wie 3, 10-facher Überschuß DTT für 60min bei 50°C; die Absorption des einzigen Tyrosin-Rests im Tat-Peptid ist bei dieser Wellenlänge gering und daher das Peptid im reduzierten Reaktionsansatz im Vergleich zum Toxin kaum detekierbar;  $R_T$  Thiophalloidin=20,45 min;  $R_T$  DTT=6,00 min. **5:** Tat-SS-Phalloidin nach Reinigung über Sephadex-LH<sub>20</sub> Gelfiltration;  $R_T$  Tat-SS-Phalloidin=18,26. **6:** Wie 5, 10-facher Überschuß DTT für 60min bei 50°C.

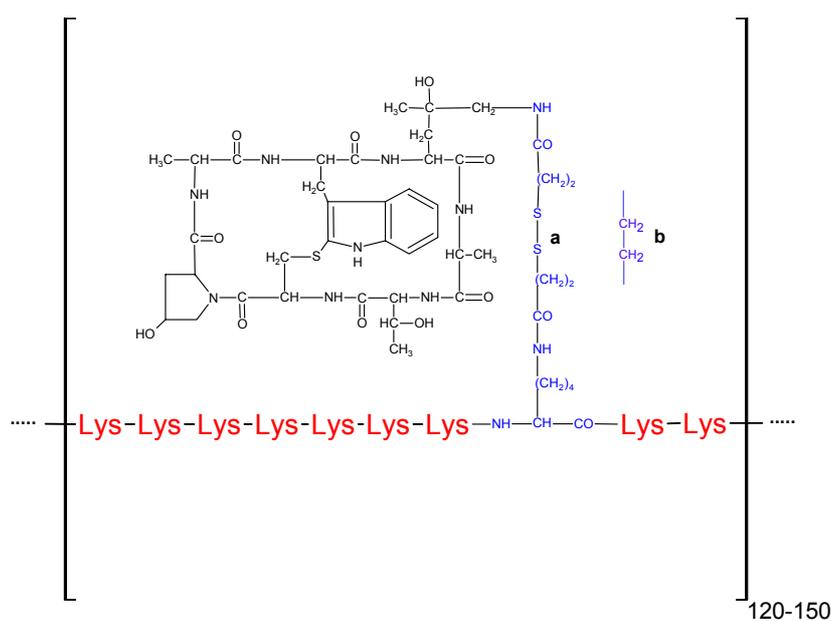
### 4.3.3 Synthesen polymer-gebundener Phallotoxine

Verschiedene Polymere erhöhen die Zellpenetration von Wirkstoffen und Makromolekülen. Zu ihnen zählen Poly-L-Lysin bzw. Poly-D-Lysin sowie Polyethylenglykole unterschiedlicher Länge. Wir haben daher diese Polymere mit verschiedenen Phallotoxinderivaten verknüpft.

Die Carboxylgruppe des  $\beta$ -Hydroxyl-Aspartat in Position 2 im Phallacidin wurde über Carbodiimid und *N*-OH-Succinimid aktiviert (siehe 3.2.4) und mit den  $\epsilon$ -Aminogruppen von Poly-L-Lysin·HBr und Poly-D-Lysin·HBr ( $\bar{M}_w = \text{ca. } 27500$ ) umgesetzt. Die Produkte Poly-L-Lys-Phallacidin und Poly-D-Lys-Phallacidin eluierten in der Gelfiltration mit dem Ausschlußvolumen (Ausbeute ca. 50 %). Die spektrophotometrische Analyse ergab, daß jede zehnte  $\epsilon$ -Aminogruppe in den Polymeren ein Toxinmolekül gebunden hatte.

Entsprechende Derivate des Phalloidins, verbunden über  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin in Position 7, wurden erhalten, indem DSP-Amino-Phalloidin-II bzw. DSS-Amino-Phalloidin-II mit den Lysin-Polymeren amidartig verknüpft wurden. Zur Trennung diente ebenfalls die Gelfiltrationchromatographie über Sephadex-G25. Auch hier war ca. jede zehnte Seitengruppe in der Polymerkette an ein Phallotoxin konjugiert. Die Ausbeute an Poly-Lys-SS-Amino-Phalloidin-II und Poly-Lys-CONH-Amino-Phalloidin-II (Abbildung 4.11), beide in L- bzw. D-Form, betrug ca. 70 %.

**Abbildung 4.11: Poly-Lys-SS-Amino-Phalloidin-II und Poly-Lys-CONH-Amino-Phalloidin-II**



Chemische Struktur des Poly-Lys-SS-Amino-Phalloidin-II (a) und Poly-Lys-CONH-Amino-Phalloidin-II (b). Ca. jeder zehnte Lysinrest ist über eine Amidfunktion an ein Toxinmolekül gebunden. Nur (a) verfügt über eine Disulfidgruppe.

---

Monomethoxy-Polyethylenglykole (MPEG) der molekularen Massen 810, 5200 und 22600 wurden in Pyridin mit Toluol-4-sulfonylchlorid aktiviert und in methanolischer Amoniaklösung in die Aminform überführt (siehe 3.2.4). Die freie Aminogruppe wurde darauf in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit dem aktivierten *N*-Hydroxysuccinimidester im DSP-Amino-Phalloidin-II in äquimolaren Mengen in DMF/PBS umgesetzt. MPEG<sub>5200</sub>-SS-Phalloidin und MPEG<sub>22600</sub>-SS-Phalloidin wurden durch Gelfiltration über Sephadex-G25 von kleinen Molekülen getrennt, für MPEG<sub>810</sub>-SS-Phalloidin wurde Sephadex-LH<sub>20</sub> benutzt, als Laufmittel diente MeOH. Die erfolgreiche Produktbildung konnte durch Massenbestimmung geprüft werden.

## 4.4 Synthesen Liganden- und Protein-gebundener Phallotoxine

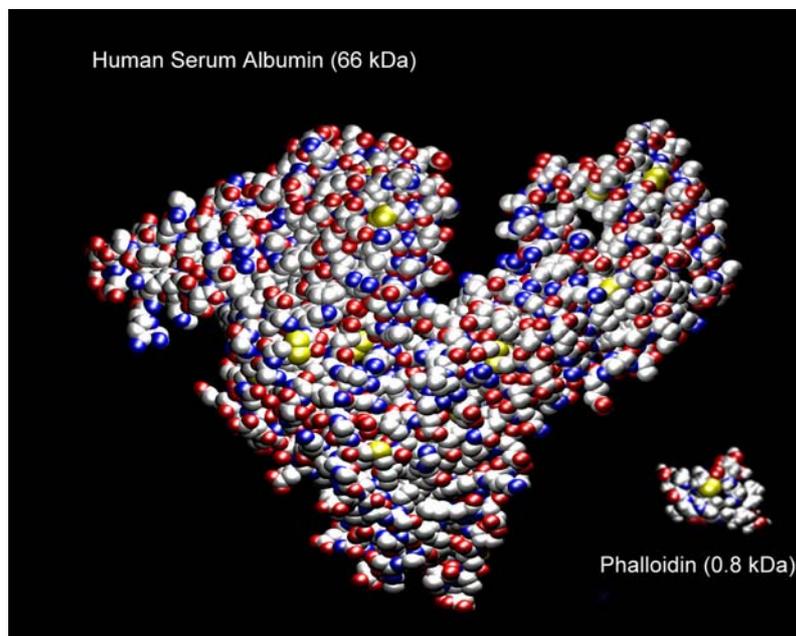
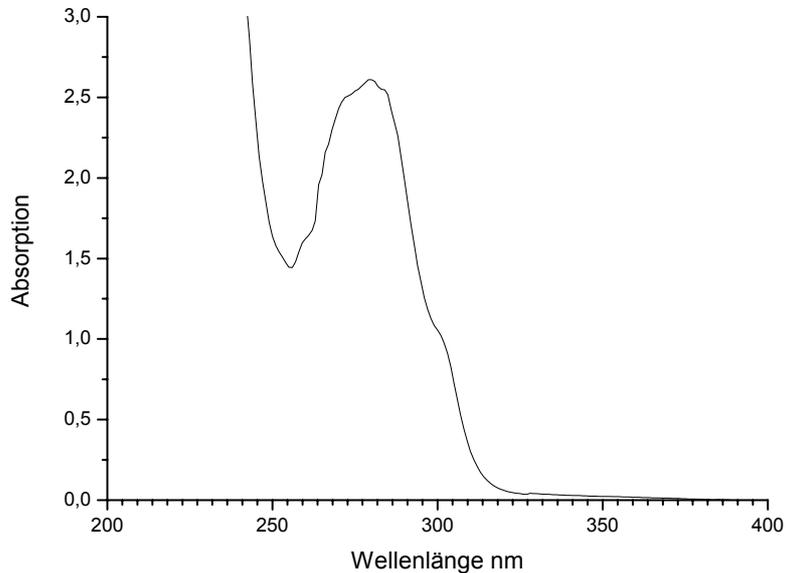
### 4.4.1 Herstellung des Albumin-SS-Phalloidin

Humanes Serumalbumin (HSA; MW=66000) wurde an  $\epsilon$ -Aminogruppen exponierter Lysinseitenketten mit dem *N*-Hydroxysuccinimid-Ester des aktivierten Toxins umgesetzt. Anhand des Spektrums des gereinigten Produkts konnte die Kopplung des Phallotoxins an das Albumin bestätigt werden (siehe Abbildung 4.13 B). Da die Extinktionskoeffizienten des HSA ( $\epsilon_{280}=35000$ ) und des Phallotoxins ( $\epsilon_{300}=10100$ ) bekannt sind, konnte an den Absorptionen bei 300nm und 280nm ein molekulares Verhältnis von 1:1 abgeschätzt werden. Auch mit großem Überschuß an Toxin konnte immer nur ein Phallotoxinmolekül pro Albumin nachgewiesen werden. Nach Reinigung wurde die Lösung des Protein-Toxin-Konjugats mit Centricon-Konzentratoren (Ausschlußgröße MW=10000) auf eine Konzentration von 50mg/ml eingestellt und innerhalb von 48h für Aktinbindungsstudien und Cytotoxizitäts-Tests verwendet.

---

**Abbildung 4.13: Das Albumin-SS-Phalloidin-Konjugat – Charakteristisches Produktspektrum**

---

**A****B**

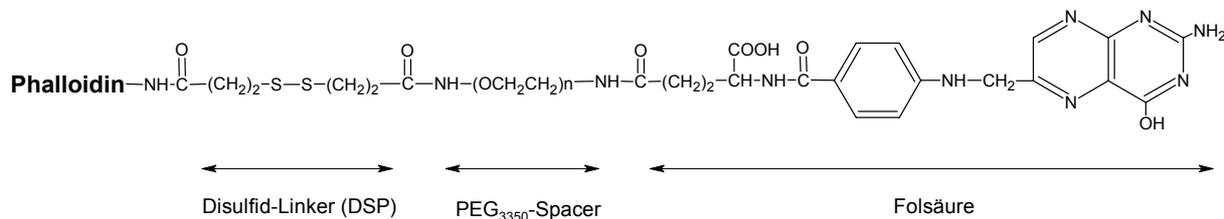
**A:** Das Phalloidin wurde über den DSP-Disulfidlinker an einen Lysinrest des HSA gebunden. Hier: Größenvergleich der beiden Moleküle. **B:** Das Proteinkonjugat zeigt im Bereich einer Wellenlänge von 300nm die charakteristische Phallotoxinschulter. Anhand eines Differenzspektrums zwischen HSA und Albumin-SS-Phalloidin konnte abgeschätzt werden, daß pro Polypeptid ein Toxin bindet. Das entspricht einem Massenverhältnis von 83:1.

---

#### 4.4.2 Folat-MPEG<sub>3350</sub>-SS-Phalloidin

Für eine Rezeptor-vermittelte Endocytose wurde der Ligand Folsäure über einen Polyethylenglykol-Spacer an Phalloidin gebunden. Hierfür wurde die Folsäure an ihrer Carboxylgruppe aktiviert und dieser aktivierte NHS-Folat-Ester mit der Aminogruppe des Polyoxyethylen-bis(amin) (MW=3350) umgesetzt (siehe Abbildung 4.14). Die Reinigung erfolgte über eine Sephadex-G25-Gelfiltrationssäule (Laufmittel: H<sub>2</sub>O dest.), wobei das Produkt Folat-MPEG<sub>3350</sub> als lichtgelbe Bande mit dem Ausschlußvolumen eluiert. Für die Kopplung an das Toxin wurden äquimolare Mengen des DSP-Amino-Phalloidin-II mit dem Folsäure-Derivat in DMF umgesetzt. Die analytische HPLC zeigte Folat-MPEG<sub>3350</sub>-SS-Phalloidin mit einer Reinheit von 80 %, daneben aber Verunreinigung durch freie Folsäure und weitere Verbindungen, die nicht näher identifiziert werden konnten. Da eine weitergehende Reinigung nicht möglich war, wurde das Produktgemisch für Cytotoxizitätsversuche weiterverwendet.

**Abbildung 4.14: Folat-MPEG<sub>3350</sub>-SS-Phalloidin**



Aktiviert Folsäure wurde an einem Diamin-Derivat des Polyethylenglykols gebunden und dieses Konjugat über den aktivierten Disulfid-Linker des DSP-Amino-Phalloidin-II in das Peptidrückgrat eingeführt.

## 4.5 Bestimmung der Oktanol-Wasser-Koeffizienten

Zur Abschätzung der Hydrophobizität verschiedener Toxinkonjugate, und damit der Affinität zu Zellmembranen, wurde die Verteilung von Verbindungen in einem Oktanol/Wasser-Gemisch bestimmt als  $\log P$  dieser Substanzen. Es gilt:

$$\log P = \log (C_{1\text{-Oktanol}} / C_{\text{H}_2\text{O}})$$

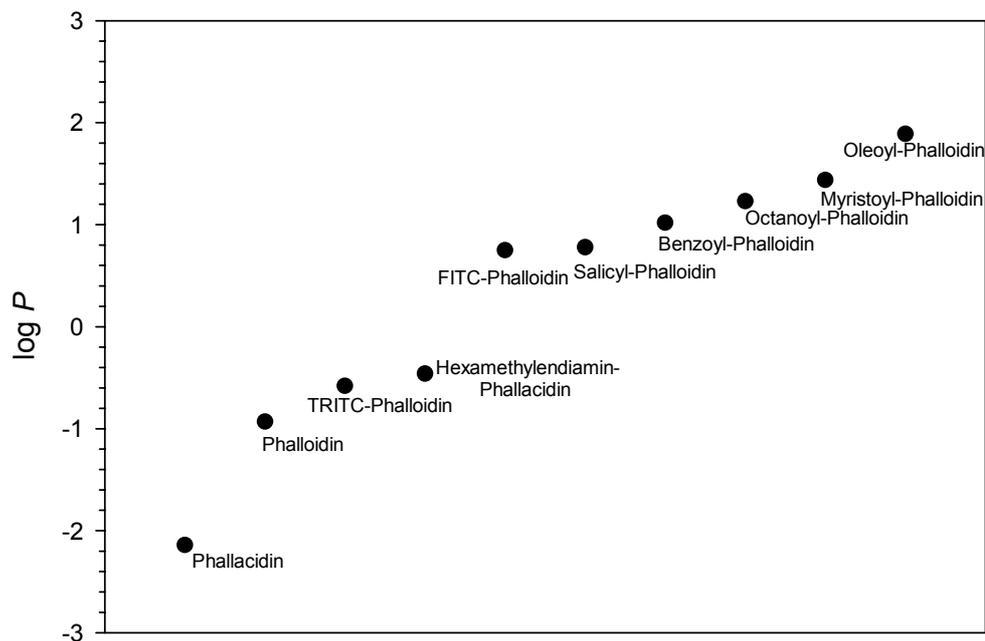
wobei  $C$  die Gleichgewichtskonzentrationen der gelösten Substanzen in 1-Oktanol bzw.  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. darstellen.

Für eine Messung der Oktanol-Wasser-Verteilung wurde eine bestimmte Menge der Toxinderivate (siehe 3.3.2) in Wasser bidest. gelöst oder suspendiert und mit einer gleichen Menge des organischen Lösungsmittels Oktanol ü. N. geschüttelt. Das Oktanol wurde zuvor mit Wasser bidest. gesättigt. Organische und wäßrige Phasen wurden durch Zentrifugation getrennt (Heraeus Christ Minifuge 2; 4000g; 10min; RT) und die Konzentration des Toxins in der wäßrigen Phase durch Absorptionsmessung bei 300nm im UV/VIS-Photometer bestimmt. Die Toxinkonzentration im Oktanol ergab sich aus der Differenz der Menge des eingesetzten Toxins und der gemessenen Menge im Wasser. Die Werte von  $\log P$  wurden berechnet:

**Tabelle 4.1: Oktanol/H<sub>2</sub>O-Partitionskoeffizienten**

Phallotoxin-Derivat	$\log P$
Phalloidin	-0,93
Phallacidin	-2,14
Oleoyl-Phalloidin	1,89
Myristoyl-Phalloidin	1,44
Octanoyl-Phalloidin	1,23
Benzoyl-Phalloidin	1,02
Salicyl-Phalloidin	0,78
Hexamethyldiamin-Phallacidin	-0,46
FITC-Phalloidin	0,75
TRITC-Phalloidin	-0,58

Durch Einführung aliphatischer Reste in das Molekül erhöht sich dessen Löslichkeit im organischen Lösungsmittel, das Molekül hat eine grössere Hydrophobizität. Polare Gruppen, zB. die Carboxylgruppe des Phallacidins, erhöhen hingegen die Löslichkeit in der wäßrigen Phase.

Abbildung 4.15: Oktanol/H<sub>2</sub>O-Partitionskoeffizienten

Dot-Plot-Darstellung der Verteilungskoeffizienten von Phallotoxinderivaten in Oktanol-Wasser. Substanzen die in H<sub>2</sub>O besser löslich sind besitzen einen Koeffizienten kleiner 0, solche die im Oktanol besser löslich sind einen Koeffizienten grösser 0.

Während die natürlichen Toxine vorwiegend im Wasser gefunden wurden, zeigten die lipophilen Phallotoxin-Derivate eine Korrelation der Länge der aliphatischen Seitenkette mit der Zunahme des log *P*-Wertes. Auch die Veresterung mit aromatischen Säuren, wie im Benzoyl-Phalloidin oder Salicyl-Phalloidin, verbesserten die Löslichkeit in der organischen Phase. Geladene Gruppen, zB. die Carboxylgruppe im Phallacidin oder die Aminogruppe im Hexamethyldiamin-Phallacidin, oder Gruppen, die die Ausbildung von Wasserstoffbrücken ermöglichen, reduzierten hingegen den log *P*-Wert und verbesserten die Löslichkeit im Wasser.

#### 4.6 Aktinbindung der Phalloidinderivate

Die Fähigkeit zur Bindung an filamentöses Aktin wurde für die verschiedenen Phalloidinderivate durch eine Austauschreaktion mit einem radioaktiv markierten Phallotoxin gemessen (siehe 3.4.1). Hierbei wird G-Aktin aus Kaninchenmuskel (nach Löw & Dancker, 1976; siehe 3.4.1) in Gegenwart von [<sup>3</sup>H]-Desmethylphalloin in hoher Konzentration (ca. 1 μM) polymerisiert, was zur Anlagerung des radioaktiven Peptids an die Filamente führte. Durch Verdünnen wird der F-Aktin-[<sup>3</sup>H]-Desmethylphalloin-Komplex auf eine Konzentration

nahe der Dissoziationskonstanten (ca. 10 nM) gebracht. Nach Zugabe des zu testenden Phalloidinderivates in steigender Konzentration ermöglichte dies die schnelle Einstellung eines Bindungsgleichgewichts mit dem radioaktiven Toxin. Mittels Ultrazentrifugation konnte kompetitiv verdrängtes [<sup>3</sup>H]-Desmethylphalloin von F-Aktin-gebundenem Toxin getrennt und quantifiziert werden. Je stärker ein zu testendes Phalloidin-Derivat am F-Aktin bindet, umso weniger benötigt man davon für eine 50 %ige Verdrängung des [<sup>3</sup>H]-Desmethylphalloins. Durch direkten Vergleich mit Phalloidin konnte für die verschiedenen Substanzen ein relativer Affinitätswert (Phalloidin=1) für die Bindung am Aktin ermittelt werden.

Phalloidin selbst bindet mit hoher Affinität an Aktinfilamente ( $K_D \approx 3 \times 10^{-8}$  M, Faulstich *et al.*, 1977). Die Einführung von kleineren Substituenten am  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> wie Salicylsäure und Benzoylsäure verringert die Bindung am F-Aktin im Vergleich zum Phalloidin kaum (siehe Tabelle 4.2; Abbildung 4.16 A). Mit zunehmender Grösse der aliphatischen Kette lipophiler Derivate nimmt hingegen die Bindung deutlich ab: die Affinität des Octanoyl-Phalloidin ist verglichen mit Phalloidin ca. 8-mal, die des Myristoyl-Phalloidin ca. 14-mal und die des Oleoyl-Phalloidin sogar 24-mal niedriger. Vergleicht man dies mit der Bindung des Oleoyl-Amino-Phalloidin-II (22-mal niedriger) und Benzoyl-Amino-Phalloidin-II (1,4-mal niedriger), so hat die Art der Bindung, Ester- oder Säureamidfunktion, praktisch keinen Einfluß.

Noch stärker wirkt sich die Modifikation des gleichen Aminosäurerestes im Toxinpeptid durch trojanische Peptide aus (Abbildung 4.16 B). So bindet Kaposi-SS-Phalloidin um den Faktor 80 schlechter als Phalloidin, Tat-SS-Phalloidin und Arg<sub>8</sub>-SS-Phalloidin um den Faktor 40 bzw. 60. Dabei bleibt unklar, ob die geringere Affinität des Kaposi-Toxins gegenüber den beiden kationischen Peptiden auf die fehlende Ladung oder die längere Aminosäurekette zurückzuführen ist (siehe Abbildung 4.9). Durch Reduktion der Linker-Disulfidbrücke mit DTT erhält man aus den drei trojanischen Peptidderivaten ein identisches Phalloidin-Derivat mit freier Thiolgruppe. Dieses Toxin-Derivat zeigt eine fast vollständige Wiederherstellung der Aktinaffinität (ca. Faktor 2,5 schlechter als Phalloidin; Abbildung 4.16 B). Nach Aufnahme in das Zellinnere im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas sollte dies eine effektive Bindung des Toxins gewährleisten.

Die Modifikation mit verschiedenen Polymeren erfolgte über die Aminosäurereste in Position 7 des Phalloidin ( $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin) und Position 2 ( $\beta$ -Hydroxyl-Aspartat) des Phallacidin. Eine Derivatisierung an Position 7 des Phalloidins mit Poly-Lysinen zeigte überraschend eine nur geringe Reduzierung der Affinität zum Aktin (Faktor 2-3 schlechter

verglichen mit Phalloidin; Abbildung 4.17 A). Da es sich hier um einen sterisch ungünstigen Substituenten handelt und aus den Ergebnissen oben eigentlich eine geringe Bindung zu erwarten war, scheinen Wechselwirkungen der kationischen Seitenketten im Polymer mit dem filamentösen Aktin möglich. Dabei ist die Affinitätsdifferenz zwischen Poly-L-Lysin- und Poly-D-Lysin-Derivaten gering, auch die Art der chemischen Kopplung an das Peptidrückgrat, über Disulfid-Linker oder ohne Disulfid, hatten kaum Einfluß auf die Wechselwirkungen mit dem Filament. Hingegen zeigte im Phalloidin eine Derivatisierung über die Carboxylgruppe der Aminosäure 2 bei gleichen Substituenten eine erhebliche Erniedrigung der Bindung. Poly-L-Lys-Phalloidin bindet etwa 20-mal geringer als Phalloidin am Aktin und damit auch um den Faktor 8 geringer als das Poly-L-Lys-SS-Phalloidin, das die polymere Kette an Position 2 trägt. Eine Reduktion der polymeren Derivate Poly-L(-D)-Lys-SS-Phalloidin mit DTT führte auch hier in beiden Fällen zum Phalloidin-SH mit freier Thiolgruppe. Verglichen mit der unreduzierten polymeren Verbindung zeigt es nahezu gleiche Aktinaffinität.

Die Kopplung an verschiedene Polyethylenglykole erfolgte nur über  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup>. Dabei ist die F-Aktin-Bindung erheblich geringer als bei den kationischen Poly-Lysinen mit ähnlich hoher molarer Masse. Die Abnahme der Filamentaffinität innerhalb der Polyethylengruppe korreliert dabei mit der Kettenlänge im Polyether: MPEG<sub>810</sub>-SS-Phalloidin bindet ca. um den Faktor 13 schlechter als Phalloidin, MPEG<sub>5200</sub>-SS-Phalloidin um den Faktor 29 und MPEG<sub>22600</sub>-SS-Phalloidin um den Faktor 111. Folat-PEG<sub>3350</sub>-SS-Phalloidin gliedert sich in diese Reihe ein (Faktor 17,5 schlechter). Allerdings gewährleistet auch hier eine Reduktion des Disulfidlinkers die nahezu vollständige Wiederherstellung der Aktinbindung. Ähnliches gilt für das Albumin-SS-Phalloidin, das in proteingebundener Form nur geringe Affinität zum Filament besitzt (142-mal geringer als Phalloidin).

Modifikationen an der Indolylgruppe des Tryptophans im Phalloidin wurden zur Synthese des photoaktiven DNB-Phalloidin genutzt. Wie erwartet zeigte dieses Produkt keine Bindung am F-Aktin. Nach Freisetzung des aromatischen Rings durch Belichtung entsteht das Phalloidin, was eine effektive Bindung des Toxins nach Aktivierung ermöglicht.

Bei den Derivaten TRITC-Oleoyl-Phalloidin und FITC-Oleoyl-Phalloidin handelt es sich um disubstituierte Produkte, die am  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> durch Ölsäure und am  $\beta$ -Hydroxyl-Aspartat<sup>2</sup> über den Hexamethyldiamin-Linker durch einen fluoreszierenden Farbstoff chemisch modifiziert sind. Dies reduziert die Aktinaffinität gegenüber dem schlecht bindenden Oleoyl-Phalloidin nochmals: das TRITC-Derivat bindet 47-mal schlechter als Phalloidin, das FITC-Toxin sogar 59-mal schlechter.

---

**Tabelle 4.2: Aktinbindung der chemisch modifizierten Toxinvarianten**


---

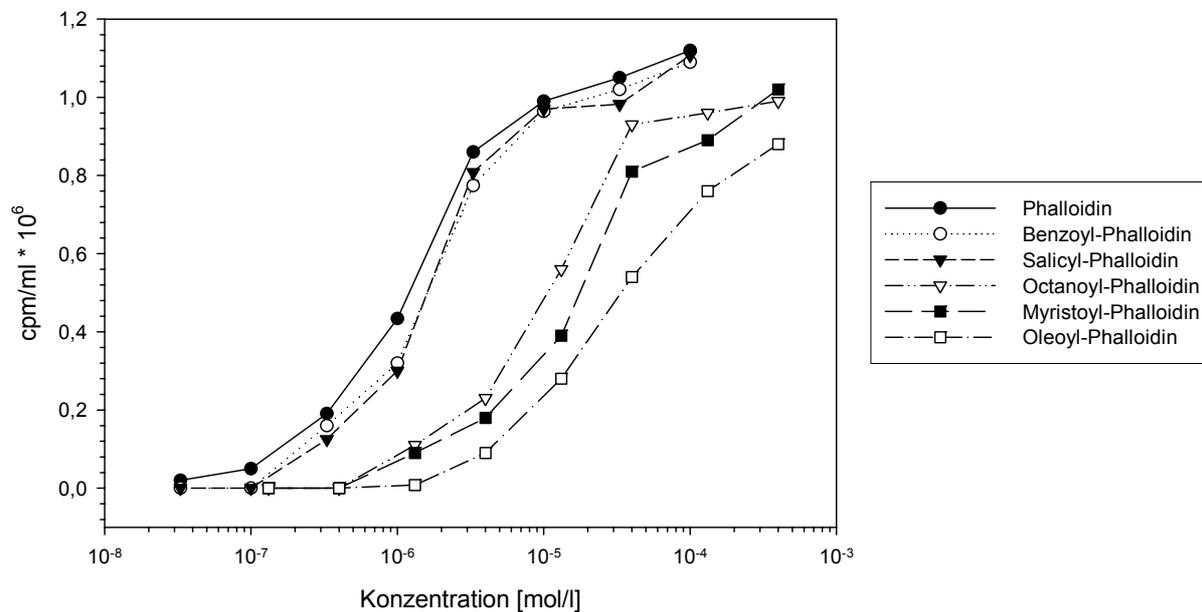
<b>Phallotoxin-Derivat</b>	<b>relativer Affinitätswert zur Aktinbindung des Phalloidin</b>
Phalloidin	1,000
Ellman-Amino-Phalloidin-II	0,196
Benzoyl-Phalloidin	0,755
Salicyl-Phalloidin	0,809
Octanoyl-Phalloidin	0,123
Myristoyl-Phalloidin	0,073
Oleoyl-Phalloidin	0,042
Benzoyl-Amino-Phalloidin-II	0,735
Oleoyl-Amino-Phalloidin-II	0,046
Tat-Phalloidin	0,025
Arg <sub>8</sub> -Phalloidin	0,017
Kaposi-Phalloidin	0,012
Poly-L-Lys-SS-Phalloidin	0,391
Poly-D-Lys-SS-Phalloidin	0,326
Poly-L-Lys-CONH-Phalloidin	0,402
Poly-D-Lys-CONH-Phalloidin	0,376
Poly-L-Lys-Phallacidin	0,049
Poly-D-Lys-Phallacidin	0,039
MPEG <sub>810</sub> -Phalloidin	0,079
MPEG <sub>5200</sub> -Phalloidin	0,035
MPEG <sub>22600</sub> -Phalloidin	0,009
Albumin-Phalloidin	0,007
Folat-MPEG <sub>3350</sub> -Phalloidin	0,057
Phalloidin-SH (DTT-Reduktion)	0,370
DNB-Phalloidin	< 0,001
FITC-Oleoyl-Phalloidin	0,017
TRITC-Phalloidin	0,021

Relative Aktinbindung der verschiedenen Toxinderivate im Vergleich zu Phalloidin ( $K_D \approx 3 \times 10^{-8}$  M; Faulstich *et al.*, 1977). Insbesondere durch Einführung sterisch ungünstiger Reste geht die Bindung am Aktin deutlich zurück. Alle Gruppen die über die verschiedenen Disulfidlinker an das Peptidrückgrat gebunden sind, bilden nach Reduktion Phalloidin-SH.

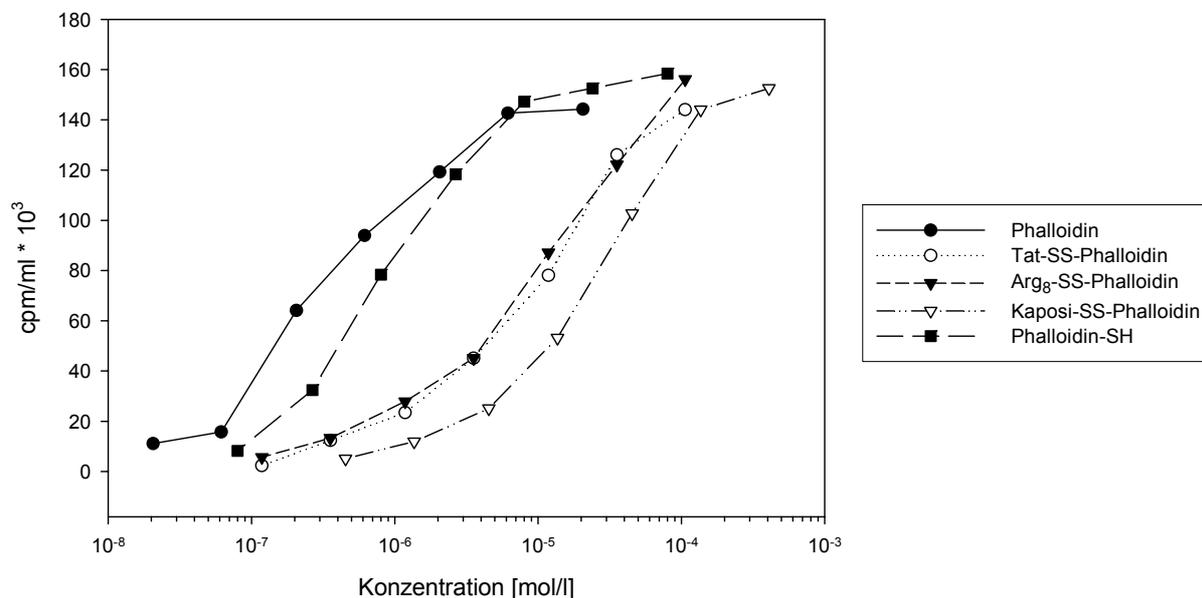
---

Abbildung 4.16: Aktin-Bindungsassay von Phallotoxin-Derivate

A



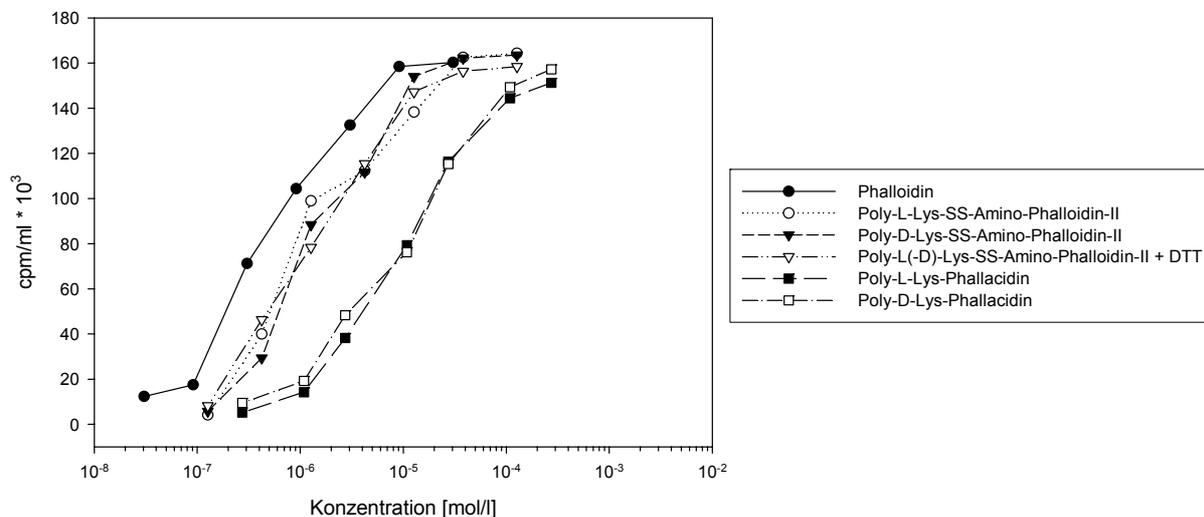
B



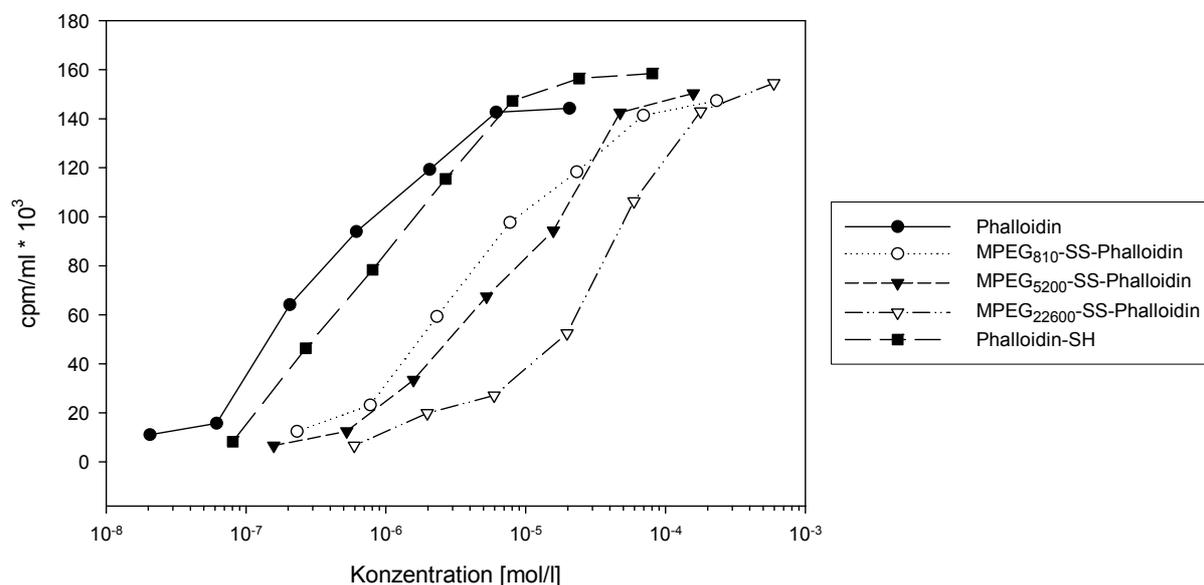
Aktinbindungsassay chemisch modifizierter Toxinderivate im Vergleich mit Phalloidin. Anhand der abgebildeten Meßwerte wurden mit Hilfe der sigmoidalen Funktion  $y = (B_{max} * x^n) / (EC_{50}^n + x^n)$  die  $EC_{50}$ -Werte, also die Toxinderivat-Konzentrationen bei denen die Bindung des [<sup>3</sup>H]-Desmethylphalloidin um 50 % verringert ist, ermittelt. Die relativen Bindungsaffinitäten errechneten sich aus dem  $EC_{50}$ -Verhältnis der einzelnen Synthesederivate zum Phalloidin. **A:** Aktinbindungsassay der lipophilen Phallotoxin-derivate. **B:** Aktinbindungsassay der Phallotoxin-derivate trojanischer Peptide. Nach Reduktion mit DTT entsteht aus Tat-SS-Phalloidin, Arg<sub>8</sub>-SS-Phalloidin und Kaposi-SS-Phalloidin aufgrund des gleichen Disulfidlinkers ein chemisch identisches Phalloidin-SH mit freier Thiolgruppe.

Abbildung 4.17: Aktin-Bindungsassay von Phallotoxin-Derivate

A



B



Aktinbindungsassays polymergebundener Phallotoxin-derivate. **A:** Bindungsassay der Poly-Lysin-Derivate. Die Lysinketten in den Poly-L(-D)-SS-Lys-Phalloidinen sind über einen Disulfidlinker an das  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> gebunden. Die Disulfidbindung konnte mit DTT reduziert werden unter Bildung des Phalloidin-SH mit freier Thiolgruppe. In den Poly-L(-D)-Phalloidinen ist die polymere Aminosäurekette über eine Säureamid-Funktion am D-Threonin<sup>2</sup> gebunden. **B:** Bindungsassay der Polyethylenglykol-Derivate. Auch hier wurde der Disulfidlinker im Molekül reduziert und das entstandene Phalloidin-SH auf seine Aktinbindung untersucht.

## 4.7 Zellkultur-Versuche

### 4.7.1 Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Cytotoxizitätskonzentrationen

Der Einfluß der synthetischen Toxinkonjugate auf das Wachstum von Mausfibroblasten-(MF/LDB), Jurkat- und Hela-Zellkulturen wurde mittels MTT-Proliferationsassay gemessen. Hierbei kommt es zur Bildung des farbigen Formazans durch Reduktion eines Tetrazoliumsalzes in den noch lebenden Zellen.

Da die lipophilen Konjugate nur schlecht wasserlöslich sind, mußte in einer Verdünnungsreihe die maximale DMSO-Konzentration ermittelt werden, bei der die Zellen überlebten. Diese lag in allen drei Kulturen bei ca. 2 %; für Vitalitätsversuche wurden DMSO-Konzentrationen bis ca. 1 % eingesetzt.  $2 \times 10^4$  Zellen/Well wurden in DMEM-(MF/LDB- und Hela-Zellen) oder RPMI-Medium (Jurkat-Zellen) mit 10 % fötalem Kälberserum in Mikrotiterplatten ausgesät und inkubiert. Nach 24h wurden die verschiedenen Toxinderivate in Medium bzw. Medium/DMSO in Konzentrationsreihen zugesetzt. Nach weiteren 72h Inkubation konnte die Proliferationshemmung der Toxine im Vergleich zu unbehandelten Zellkulturen bestimmt werden. Aus diesen Versuchen ergab sich die spezifische Cytotoxizität als eine Konzentration, bei der das Wachstum zu 50 % gehemmt ist (IC<sub>50</sub>).

Für die natürlich vorkommenden Phallotoxinderivate Phalloidin und Phalloidin konnten selbst bei Konzentrationen von  $10^{-3}$  M keine Proliferationshemmung nachgewiesen werden. Auch die semisynthetische Vorstufe Amino-Phalloidin-II zeigte sich in allen drei Zellkulturen als nicht-toxisch. Damit unterscheiden sich die natürlichen Phallotoxine deutlich von dem ebenfalls aktinbindenden Cyclodepsipeptid Chondramid A aus dem Myxobakterium *Chondromyces crocatus*, das die Proliferation von Zellkulturen in mikromolaren Konzentrationen hemmt.

Durch Einführung lipophiler Substituenten am  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> der Phallotoxine erhöhte sich die Cytotoxizität deutlich (siehe Abbildung 4.18 A). Die Derivate aromatischer Säuren, Salicyl- und Benzoyl-Phalloidin, besitzen IC<sub>50</sub>-Konzentration von ca.  $9 \times 10^{-5}$  M bis  $3 \times 10^{-4}$  M, wobei das Benzoyl-Derivat geringfügig toxischer ist. Innerhalb der drei Zelllinien sprechen die Jurkat-Kulturen etwas stärker auf die Toxine an, ein Effekt der sich bei allen cytotoxischen Verbindungen, auch außerhalb der lipophilen Gruppe, zeigte. Die IC<sub>50</sub>-

Konzentrationen der MF/LDB-Kulturen und Hela-Kulturen sind dagegen für alle Toxine sehr ähnlich.

Eine weitere Erhöhung der Hydrophobizität im Peptidmolekül durch Ester organischer Fettsäuren verschlechterte zwar die Löslichkeit, gleichzeitig nahm die Toxizität weiter zu. Die  $IC_{50}$ -Werte für Octanoyl-Phalloidin ( $4,38 \times 10^{-5}$  M bis  $8,31 \times 10^{-5}$  M), Myristoyl-Phalloidin ( $9,01 \times 10^{-6}$  M bis  $1,56 \times 10^{-5}$  M) und Oleoyl-Phalloidin ( $2,14 \times 10^{-6}$  M bis  $2,70 \times 10^{-6}$  M) liegen je nach Länge der aliphatischen Kette um mindestens den Faktor ca. 10 bis 1000 unter dem natürlich vorkommenden Phalloidin. Sobald die Derivatisierung zum lipophilen Derivat an der Position 7 anstatt über eine Esterfunktion über eine Säureamidfunktion stattfindet, wie es in den strukturell sonst identischen Verbindungen Benzoyl-Amino-Phalloidin-II und Oleoyl-Amino-Phalloidin-II der Fall ist, sinkt die Cytotoxizität bei vergleichbarer Aktinaffinitäten deutlich (siehe Tabelle 4.3). Das Ellman-Amino-Phalloidin-II reiht sich in die Gruppe der schwach lipophilen Derivate ein und ist dementsprechend schwach toxisch. Die reaktive Disulfidgruppe hatte offenbar bezüglich einer Toxizitätserhöhung keine Wirkung.

Innerhalb der Gruppe der Derivate trojanischer Peptide (siehe Abbildung 4.18 B) ist das Tat-SS-Phalloidin die am meisten toxische Variante ( $3 \times 10^{-6}$  M bis  $6 \times 10^{-6}$  M). Auch die Bindung des kationischen Peptids Arg<sub>8</sub> schränkte die Proliferation deutlich ein ( $7 \times 10^{-6}$  M bis  $1 \times 10^{-5}$ ), während das ungeladene Kaposi-Peptid nur geringe Toxizität zeigte ( $2 \times 10^{-4}$  M bis  $3 \times 10^{-4}$  M).

Die polymeren Phallotoxin-Derivate zeigten im Vitalitätstest ein differenziertes Bild: Konjugationsprodukte des Poly-Lysins an die Carboxylgruppe des  $\beta$ -Hydroxyl-Aspartat<sup>2</sup> im Phallacidin zeigten schon im Bindungsassay schlechte Aktinaffinität, gleichzeitig war hier die Hemmung der Proliferation gering ( $9 \times 10^{-5}$  M bis  $3 \times 10^{-4}$  M). Dabei gab es keinen Unterschied zwischen der L- bzw. D-Lysin-Variante (siehe Abbildung 4.19 A). Eventuell ist dies darauf zurückzuführen, daß bei höheren Konzentrationen der Poly-Lysinderivate die Eigentoxizität des polymeren Trägers für die Proliferationshemmung verantwortlich ist und nicht die Stabilisierung der Aktinfilamente durch das gebundene Phallotoxin. In der Literatur gibt es Hinweise, daß, bezogen auf die Phalloidinkonzentration, ab ca.  $10^{-4}$  M die Toxizität des Kations durch Induktion von Nekrose (Strand *et al.*, 2001) überwiegt. Die Bindung des Poly-L-Lysyl-Restes über eine Säureamidfunktion an das  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> lieferte mit dem Poly-L-Lys-CONH-Phalloidin eine deutlich giftigere Verbindung ( $4 \times 10^{-6}$  M bis  $5 \times 10^{-6}$  M) als die Poly-D-Form, die bei gleicher Konjugation das Zellwachstum um den Faktor 10 weniger hemmte ( $4 \times 10^{-5}$  M bis  $5 \times 10^{-5}$  M). Nach Einführung einer Disulfidbrücke ist das Poly-D-Lys-SS-Phalloidin ( $2 \times 10^{-6}$  M bis  $4 \times 10^{-6}$  M) jedoch ebenso toxisch wie das Poly-L-

Lys-SS-Phalloidin ( $2 \times 10^{-6}$  M bis  $3 \times 10^{-6}$  M), das wiederum nur geringfügige Abweichung vom Poly-L-Lys-CONH-Phalloidin ohne reduzierbaren Linker zeigt (siehe Abbildung 4.19 B).

Die MPEG-Toxine ohne kationische Ladungen hemmen das Zellwachstum deutlich weniger. Innerhalb dieser Gruppe korreliert die Toxizität direkt mit der Länge der Polyethylenglykolkette. MPEG<sub>810</sub>-SS-Phalloidin besitzt IC<sub>50</sub>-Konzentrationen von  $1 \times 10^{-4}$  M bis  $2 \times 10^{-4}$  M, MPEG<sub>5200</sub>-SS-Phalloidin von  $5 \times 10^{-5}$  M bis  $8 \times 10^{-5}$  M und MPEG<sub>22600</sub>-SS-Phalloidin als giftigste Variante von  $1 \times 10^{-5}$  M. Die Folsäure im Folat-MPEG<sub>3350</sub>-SS-Phalloidin wirkt sich verschlechternd auf die Toxizität ( $4 \times 10^{-4}$  M bis  $5 \times 10^{-4}$  M). Eine Eigentoxizität des Polyethylenglykols konnte nicht nachgewiesen werden.

Das proteingebundene Albumin-SS-Phalloidin, daß nach Aufnahme in das Cytoplasma durch Reduktion eine Aktinaffinität entwickeln könnte, zeigte keinerlei toxische Wirkung. Eine Aufnahme in die verwendeten Zellkultursysteme scheint damit unwahrscheinlich. Ebenfalls nahezu ungiftig ist das anionische FITC-Phalloidin. Eine zweite Derivatisierung dieses fluoreszierenden Phallotoxins durch Ölsäure führte zum FITC-Oleoyl-Phalloidin; ein positiver Effekt auf die Proliferationshemmung durch diese Erhöhung der Hydrophobizität im Molekül blieb aus, die IC<sub>50</sub>-Konzentration entspricht nahezu der Verbindung ohne Fettsäure. Als ebenfalls fluoreszierendes aber kationisches Toxin, konnte für das TRITC-Phalloidin eine relativ hohe Cytotoxizität gezeigt werden ( $9 \times 10^{-6}$  M bis  $1 \times 10^{-5}$  M). Auch hier konnte die Einführung der lipophilen Ölsäure die Toxizität nicht weiter erhöhen.

Zur weiteren Bestimmung der Wachstumshemmung wurde neben dem genannten MTT-Cytotoxizitätsassay auch eine IC<sub>50</sub>-Bestimmung über den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin durchgeführt. Im wesentlichen stimmten die ermittelten Konzentrationen mit denen der MTT-Versuche überein. Für einige Substanzen lagen die IC<sub>50</sub>-Werte geringfügig niedriger.

Für die giftigsten synthetischen Phallotoxine wurde die Proliferationsshemmung für weitere Zelllinien bestimmt (Tabelle 4.3). Bei diesen Kulturen handelte es sich um Populationen leukämischer Zelllinien, darunter einer chronisch myelogenen Leukämie (K562; Granulozyten), einer akuten promyelocytischen Leukämie (HL-60) und von B-Zell Lymphomen (Daudi/human bzw. MethA/murin). Die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen in diesen Tumorzelllinien waren durchweg mit denen der Maus-Fibroblastenkultur vergleichbar. Keines der Toxine fiel in irgendeiner der Kulturen durch eine hohe Spezifität auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: IC<sub>50</sub>-Konzentrationen in Zellkulturen nach MTT-Cytotoxizitätsassay

Toxin-Derivat	IC <sub>50</sub> -Cytotoxizitätskonzentrationen [mol/l]						
	MF/LDB	Jurkat	Hela	K562	HL-60	Daudi	MethA
Phalloidin	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>
Phalloidin	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>
α-Amanitin	1,01 x 10 <sup>-6</sup>	9,31 x 10 <sup>-7</sup>	1,23 x 10 <sup>-6</sup>	1,03 x 10 <sup>-6</sup>	8,42 x 10 <sup>-7</sup>	9,78 x 10 <sup>-7</sup>	1,96 x 10 <sup>-6</sup>
Chondramide A	9,65 x 10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-
Amino-Phalloidin-II	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>
Ellman-Amino-Phalloidin-II	9,87 x 10 <sup>-5</sup>	1,62 x 10 <sup>-4</sup>	9,34 x 10 <sup>-5</sup>	1,78 x 10 <sup>-4</sup>	2,14 x 10 <sup>-4</sup>	1,63 x 10 <sup>-4</sup>	9,52 x 10 <sup>-5</sup>
Salicyl-Phalloidin	3,64 x 10 <sup>-4</sup>	9,63 x 10 <sup>-5</sup>	2,83 x 10 <sup>-4</sup>	2,44 x 10 <sup>-5</sup>	8,25 x 10 <sup>-5</sup>	9,98 x 10 <sup>-5</sup>	9,14 x 10 <sup>-5</sup>
Benzoyl-Phalloidin	9,22 x 10 <sup>-5</sup>	9,44 x 10 <sup>-5</sup>	9,81 x 10 <sup>-5</sup>	2,56 x 10 <sup>-5</sup>	9,03 x 10 <sup>-5</sup>	7,04 x 10 <sup>-5</sup>	1,03 x 10 <sup>-4</sup>
Octanoyl-Phalloidin	4,38 x 10 <sup>-5</sup>	3,76 x 10 <sup>-5</sup>	8,31 x 10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-
Myristoyl-Phalloidin	1,08 x 10 <sup>-5</sup>	9,01 x 10 <sup>-6</sup>	1,56 x 10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-
Oleoyl-Phalloidin	2,50 x 10 <sup>-6</sup>	2,14 x 10 <sup>-6</sup>	2,70 x 10 <sup>-6</sup>	2,19 x 10 <sup>-6</sup>	2,96 x 10 <sup>-6</sup>	3,93 x 10 <sup>-6</sup>	4,62 x 10 <sup>-6</sup>
Benzoyl-Amino-Phalloidin	6,93 x 10 <sup>-4</sup>	5,99 x 10 <sup>-4</sup>	4,44 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-
Oleoyl-Amino-Phalloidin	8,83 x 10 <sup>-4</sup>	6,30 x 10 <sup>-4</sup>	6,72 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-
Tat-SS-Phalloidin	3,75 x 10 <sup>-6</sup>	3,35 x 10 <sup>-6</sup>	6,47 x 10 <sup>-6</sup>	4,44 x 10 <sup>-6</sup>	5,92 x 10 <sup>-6</sup>	4,28 x 10 <sup>-6</sup>	7,56 x 10 <sup>-6</sup>
Arg <sub>8</sub> -SS-Phalloidin	1,12 x 10 <sup>-5</sup>	7,34 x 10 <sup>-6</sup>	9,21 x 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-
Kaposi-SS-Phalloidin	3,33 x 10 <sup>-4</sup>	2,18 x 10 <sup>-4</sup>	3,18 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-

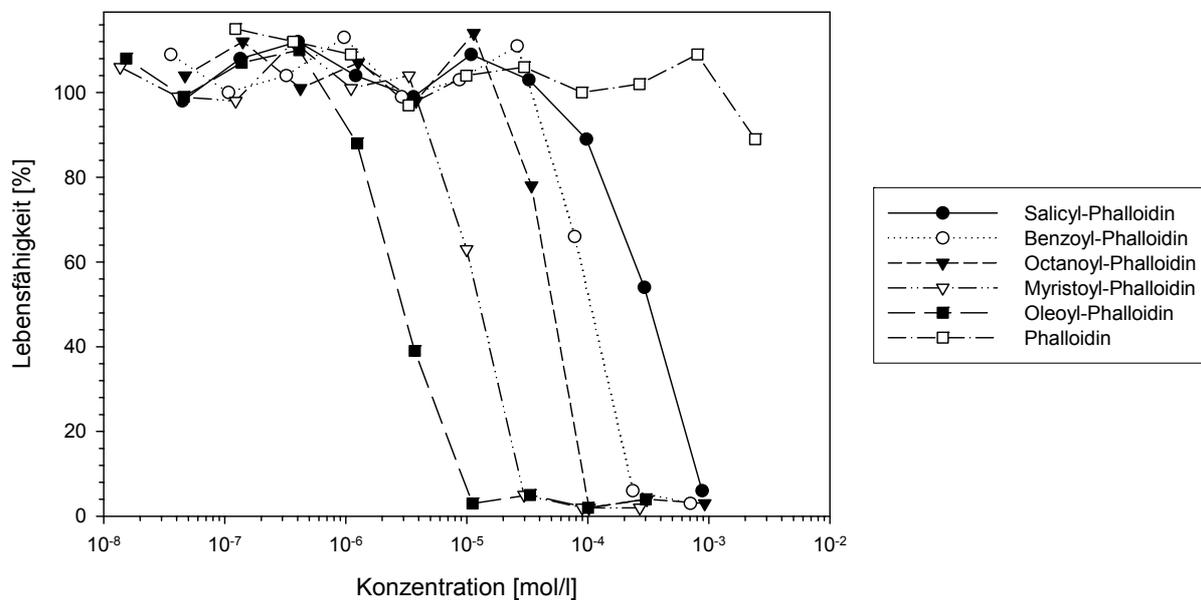
**Tabelle 4.3 (Fortsetzung): IC<sub>50</sub>-Konzentrationen in Zellkulturen nach MTT-Cytotoxizitätsassay**

Toxin-Derivat	IC <sub>50</sub> -Cytotoxizitätskonzentrationen [mol/l]						
	MF/LDB	Jurkat	Hela	K562	HL-60	Daudi	MethA
Poly-L-Lys-SS-Phalloidin	3,09 x 10 <sup>-6</sup>	1,56 x 10 <sup>-6</sup>	2,23 x 10 <sup>-6</sup>	4,37 x 10 <sup>-6</sup>	1,90 x 10 <sup>-6</sup>	1,67 x 10 <sup>-6</sup>	2,41 x 10 <sup>-6</sup>
Poly-D-Lys-SS-Phalloidin	3,57 x 10 <sup>-6</sup>	1,70 x 10 <sup>-6</sup>	4,07 x 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-
Poly-L-Lys-CONH-Phalloidin	4,68 x 10 <sup>-6</sup>	3,99 x 10 <sup>-6</sup>	5,32 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-
Poly-D-Lys-CONH-Phalloidin	5,40 x 10 <sup>-5</sup>	3,70 x 10 <sup>-5</sup>	4,98 x 10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-
Poly-L-Lys-Phallacidin	1,25 x 10 <sup>-4</sup>	9,31 x 10 <sup>-5</sup>	2,22 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-
Poly-D-Lys-Phallacidin	3,44 x 10 <sup>-4</sup>	9,54 x 10 <sup>-5</sup>	2,49 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-
MPEG <sub>810</sub> -SS-Phalloidin	1,67 x 10 <sup>-4</sup>	9,77 x 10 <sup>-5</sup>	2,31 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-
MPEG <sub>5200</sub> -SS-Phalloidin	7,68 x 10 <sup>-5</sup>	5,01 x 10 <sup>-5</sup>	7,30 x 10 <sup>-5</sup>	6,44 x 10 <sup>-5</sup>	9,31 x 10 <sup>-5</sup>	8,42 x 10 <sup>-5</sup>	6,82 x 10 <sup>-5</sup>
MPEG <sub>22600</sub> -SS-Phalloidin	9,98 x 10 <sup>-6</sup>	9,93 x 10 <sup>-6</sup>	1,09 x 10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-
Albumin-SS-Phalloidin	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>	> 10 <sup>-3</sup>
Folat-MPEG <sub>3350</sub> -SS-Phalloidin	5,61 x 10 <sup>-4</sup>	4,11 x 10 <sup>-4</sup>	4,09 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-
FITC-Phalloidin	9,26 x 10 <sup>-4</sup>	7,42 x 10 <sup>-4</sup>	9,69 x 10 <sup>-4</sup>	-	-	-	-
TRITC-Phalloidin	1,09 x 10 <sup>-5</sup>	9,31 x 10 <sup>-6</sup>	1,04 x 10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-
FITC-Oleoyl-Phalloidin	2,81 x 10 <sup>-4</sup>	9,91 x 10 <sup>-4</sup>	1,05 x 10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-
TRITC-Oleoyl-Phalloidin	1,23 x 10 <sup>-5</sup>	8,01 x 10 <sup>-6</sup>	1,44 x 10 <sup>-5</sup>	-	-	-	-

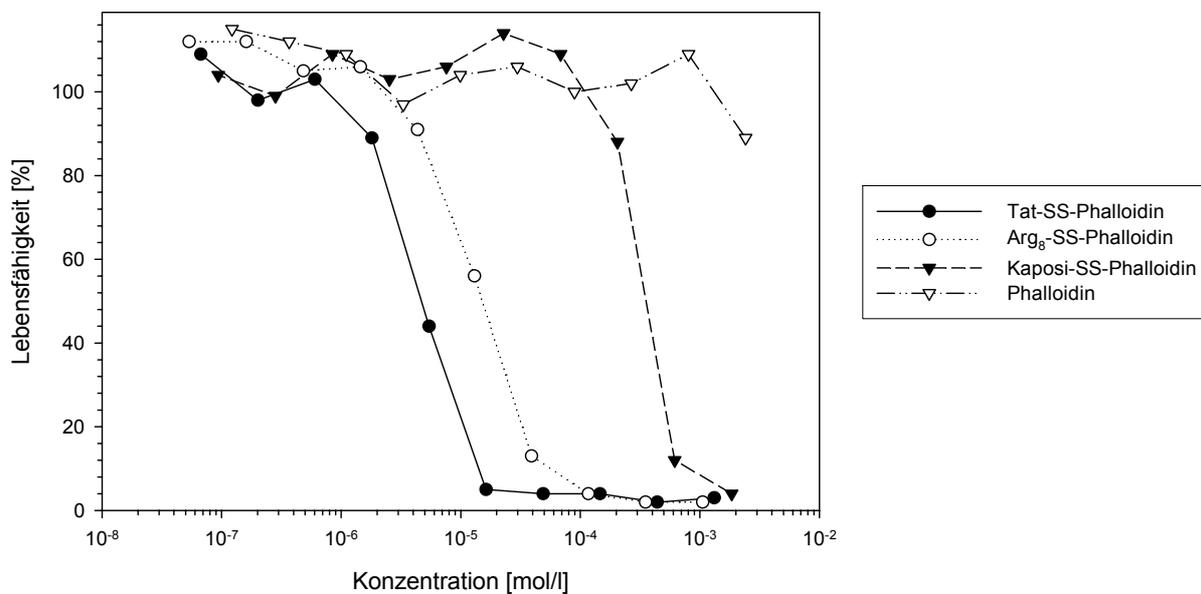
In einem colorimetrischen Test mit MTT wurde die Proliferation verschiedener Zellkulturen in Abhängigkeit verschiedener Toxinkonzentrationen bestimmt. Anhand der Wachstumskurven konnte nach Anpassung an die sigmoidale Funktion  $y = V_{\max} / (1 + (x / IC_{50}))$  die Konzentration bestimmt werden, bei der das Wachstum zu 50 % gehemmt ist.

Abbildung 4.18: MTT-Proliferationsassays in Mausfibroblasten-Zellkultur

A



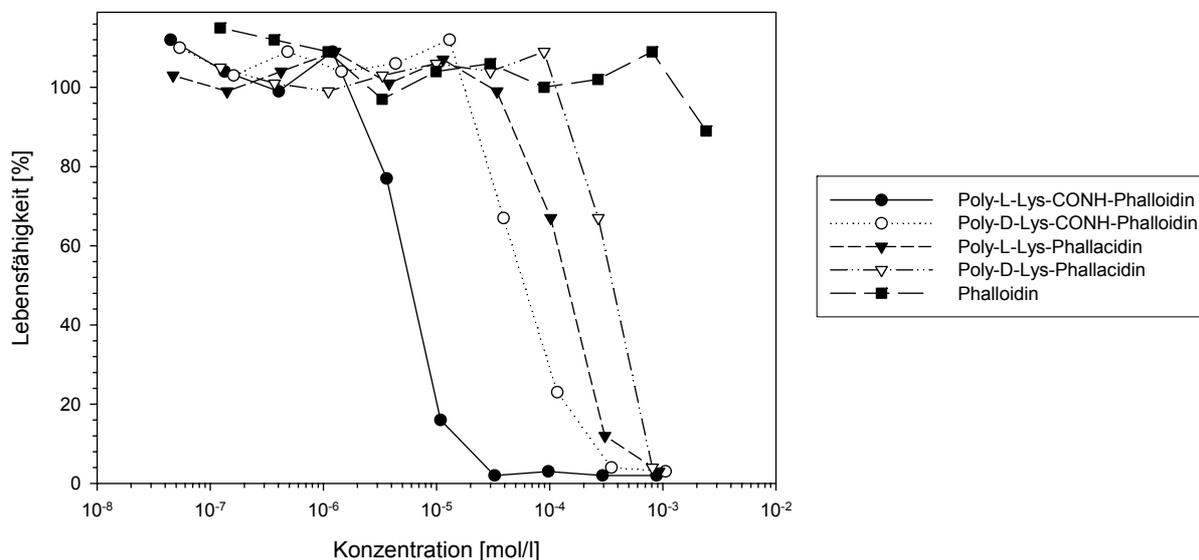
B



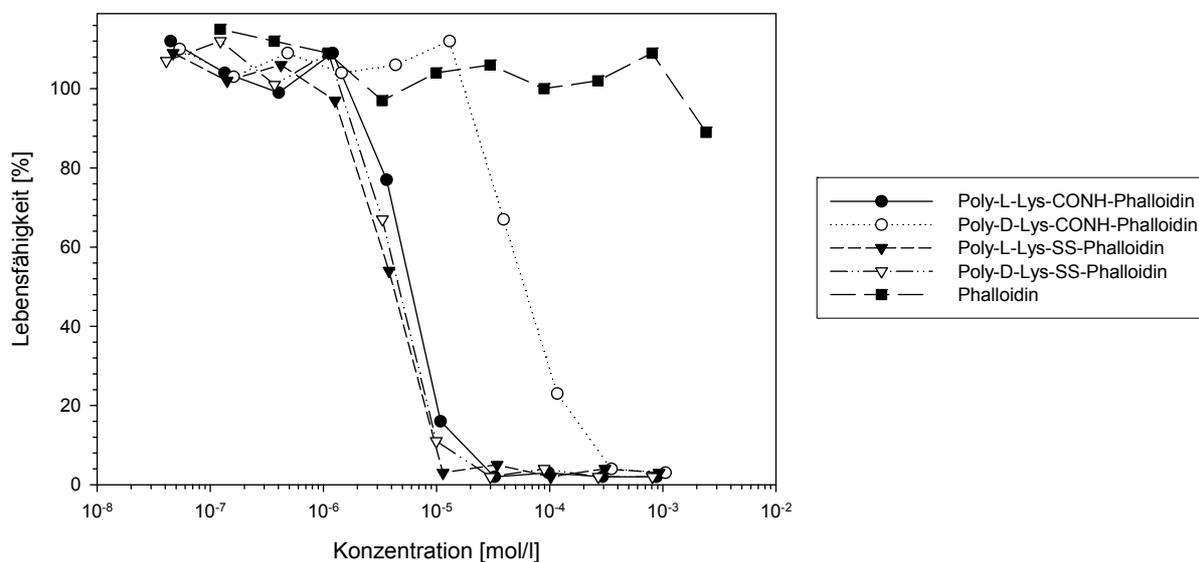
Die Proliferation der MF/LDB-Zelllinie in Abhängigkeit verschiedener Toxinkonzentrationen wurde durch MTT-Assay bestimmt. Hierfür wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/well in einer 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät. Die Messung der Vitalität erfolgte 72h nach Zugabe der Toxine. **A:** Lipophile Toxinderivate. Die Cytotoxizität steigt mit der Lipophilie bzw. bei den Konjugaten der Fettsäuren mit der Länge der aliphatischen Seitenkette. **B:** Toxinderivate trojanischer Peptide. Die beiden kationischen Peptide Tat und Arg<sub>5</sub> erhöhen die Toxizität gegenüber dem hydrophoben Kaposi-Peptid um den Faktor 30 bis 100.

Abbildung 4.19: MTT-Proliferationsassays in Mausfibroblasten-Zellkultur

A



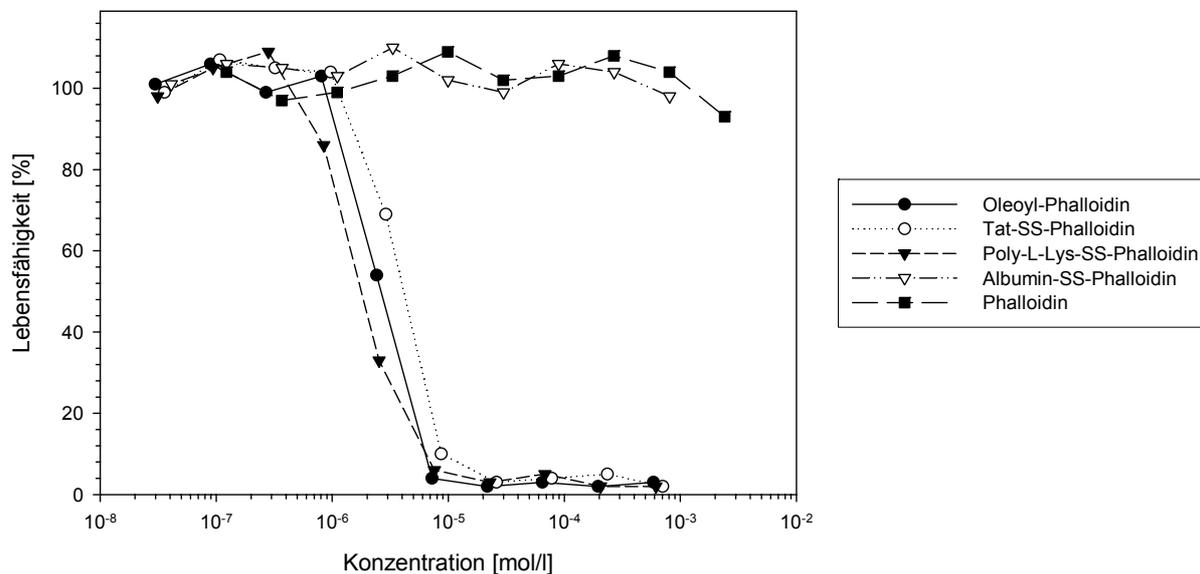
B



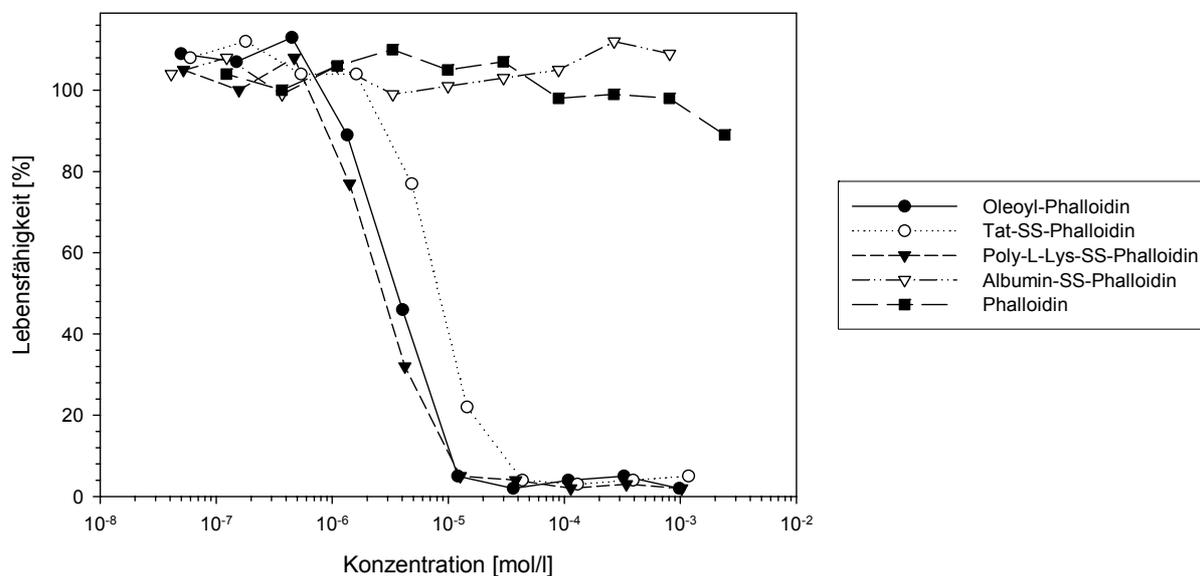
MTT-Cytotoxizitätsassay in MF/LDB-Zellkulturen nach 72h (siehe auch Abbildung 4.18) weiterer Toxinkonjugate. **A:** Poly-Lysin-Derivate, die aus der Konjugation des Polymers mit der Carboxylgruppe an Position im Phalloidin hervorgegangen sind (Poly-L(-D)-Lys-Phalloidin), zeigen nur niedrige Toxizität im Vergleich zu Derivaten, die durch eine Konjugation an Position 7 synthetisiert wurden (Poly-L(-D)-CONH-Phalloidin). **B:** Das Poly-L-Lysin-Toxin ist bei Bindung über eine Säureamidfunktion an  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> deutlich toxischer als als das Poly-D-Lysin-Derivat. Die Einführung eines Disulfidlinkers stellt jedoch eine nahezu gleichwertige Giftigkeit her.

Abbildung 4.20: MTT-Proliferationsassays in Jurkat- und Hela-Zellkultur

A



B



Vergleich der am meisten toxischen Phallotoxin-Derivate im MTT-Proliferationsassay nach 72h (siehe auch Abbildung 4.18) in weiteren Zellkulturen. **A:** Vergleich von Vertretern der lipophilen Toxine, der Derivate trojanischer Peptide, der polymergebundenen Konjugate und der proteingekoppelten Verbindungen in Jurkat-Zellkulturen. **B:** Vergleich der derselben Toxin in Hela-Zellkulturen.

### 4.7.2 Aufnahmekinetik der Toxine

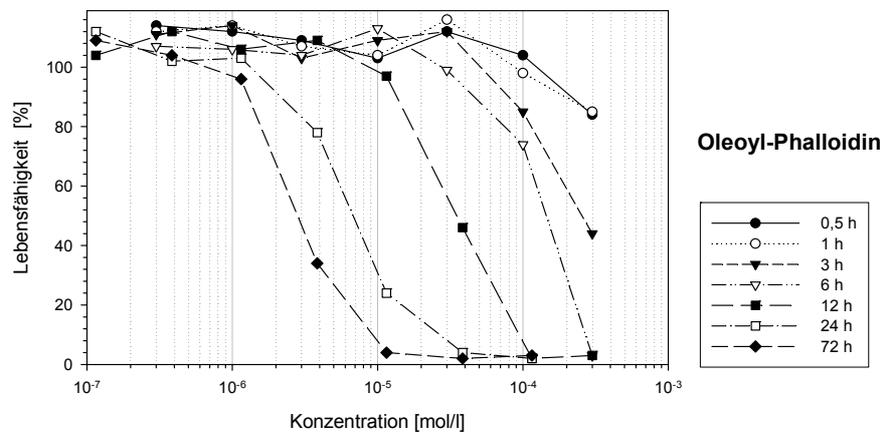
Anhand der Vitalitätsbestimmung über MTT-Assay lassen sich keine Aussagen über die Aufnahmegeschwindigkeit und den Mechanismus der Toxinaufnahme gewinnen. Daher wurde, neben der Bestimmung der  $IC_{50}$ -Konzentrationen nach 72h, die Cytotoxizität der synthetischen Phallotoxinderivate auch in Abhängigkeit der Inkubationsdauer untersucht. Hierfür wurden konfluente MF/LDB-Zellkulturen ( $2 \times 10^4$  Zellen/well) mit unterschiedlichen Konzentrationen der Toxinderivate in Mikrotiterplatten versetzt und nach definierten Zeiten das gifthaltige Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und toxinfreies Medium zugesetzt. Nach insgesamt 72h Stunden Wachstum wurde die Zellvitalität und damit die  $IC_{50}$ -Konzentration mithilfe des MTT-Assays bestimmt. Die gefundene  $IC_{50}$ -Konzentration enthält die Giftmenge, die innerhalb des definierten Zeitraums in das Zellinnere gelangt plus der Toxinmenge, die durch Adhäsion an die Zellmembran gebunden ist und erst in der Zeit nach Wechsel des Mediums in das Cytoplasma gelangt.

Es wurden die jeweils wirksamsten Vertreter der permeabilitäts-erhöhenden Gruppen, also Oleoyl-Phalloidin, Tat-SS-Phalloidin und Poly-L-Lys-SS-Phalloidin, untersucht. Während das lipophile Toxin und das Derivat der trojanischen Peptide innerhalb von 6h nur wenig Aufnahme in und an die Zelle und damit geringe  $IC_{50}$ -Konzentrationen zeigten, entwickelt das an das kationische Polymer gebundene Gift bereits nach kurzer Inkubationsdauer eine hohe Toxizität (siehe Abbildung 4.21). So lag nach 1h Toxinierung die gemessene  $IC_{50}$ -Konzentration nur um den Faktor 5 niedriger als bei einer Inkubation über 72h, nach 2h nur noch um den Faktor 2,5 (siehe Abbildung 4.22). Erstaunlicherweise zeigte das Poly-L-Lys-SS-Phalloidin eine Toxizität bereits nach wenigen Minuten Inkubation, wenn auch bei hoher Konzentration ( $IC_{50}$ -Konzentration ca.  $1 \times 10^{-4}$  M).

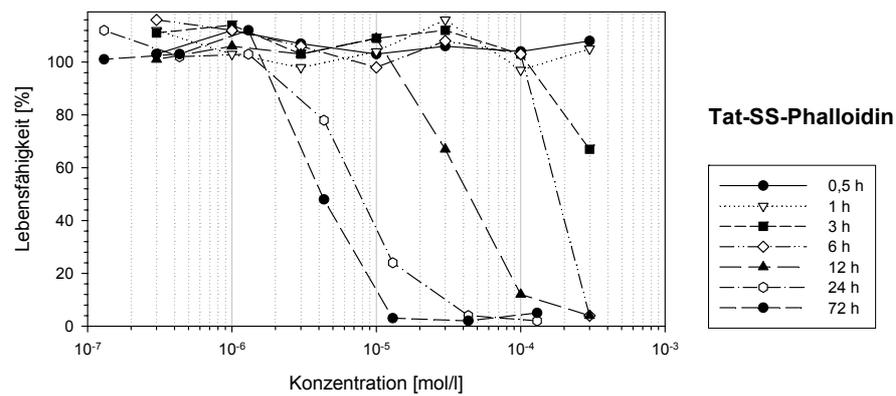
Die Toxizität des Oleoyl-Phalloidins ist nach 6h Inkubation um den Faktor 115 geringer als nach einer Inkubation über 72h; erst nach 24h Toxinierung werden vergleichbare Größenordnungen der  $IC_{50}$ -Konzentrationen erreicht (Faktor 2,5 geringer). Das Tat-SS-Phalloidin zeigte ähnliche Eigenschaften: auch hier entwickelte sich ein Großteil der toxischen Aktivität erst nach einem Zeitraum von 12h bis 24h (siehe Abbildung 4.22).

Abbildung 4.21: Aufnahmekinetik der Toxine in Mausfibroblasten

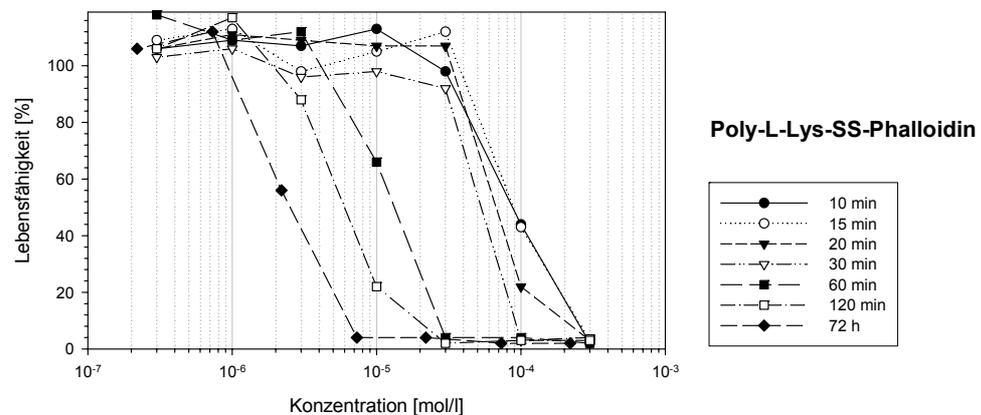
A



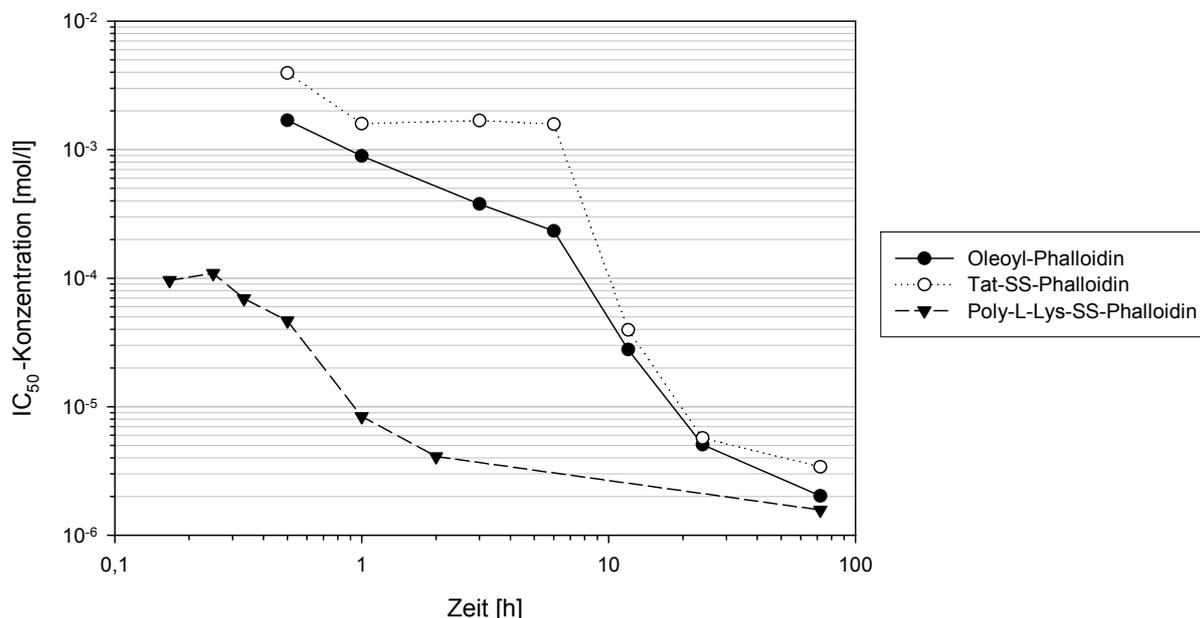
B



C



$IC_{50}$ -Werte nach verschiedener Inkubationsdauer für Oleoyl-Phalloidin (A), Tat-SS-Phalloidin (B) und Poly-L-Lys-SS-Phalloidin (C) in Mausfibroblasten MF/LDB. Zellen wurden in  $10^{-4}$  M Konzentration ausgesät und nach 24h ( $t=0$ ) mit unterschiedlichen Toxinkonzentrationen inkubiert. Nach den angegebenen Zeitperioden wurde das toxische Medium entnommen und durch toxisches freies Medium ersetzt. Nach 72h wurde die Proliferation mit Hilfe des MTT-Assay kontrolliert.

Abbildung 4.22: Änderung der IC<sub>50</sub>-Konzentration mit der Inkubationsdauer von Toxinderivaten

Anhand der Kurven aus 4.21 wurden die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen der membrangängigen Phallotoxine in Abhängigkeit der Inkubationsdauer bestimmt  $y = V_{\max} / (1 + (x / IC_{50}))$ . Im Graph sind diese IC<sub>50</sub>-Werte gegen die Zeit aufgetragen.

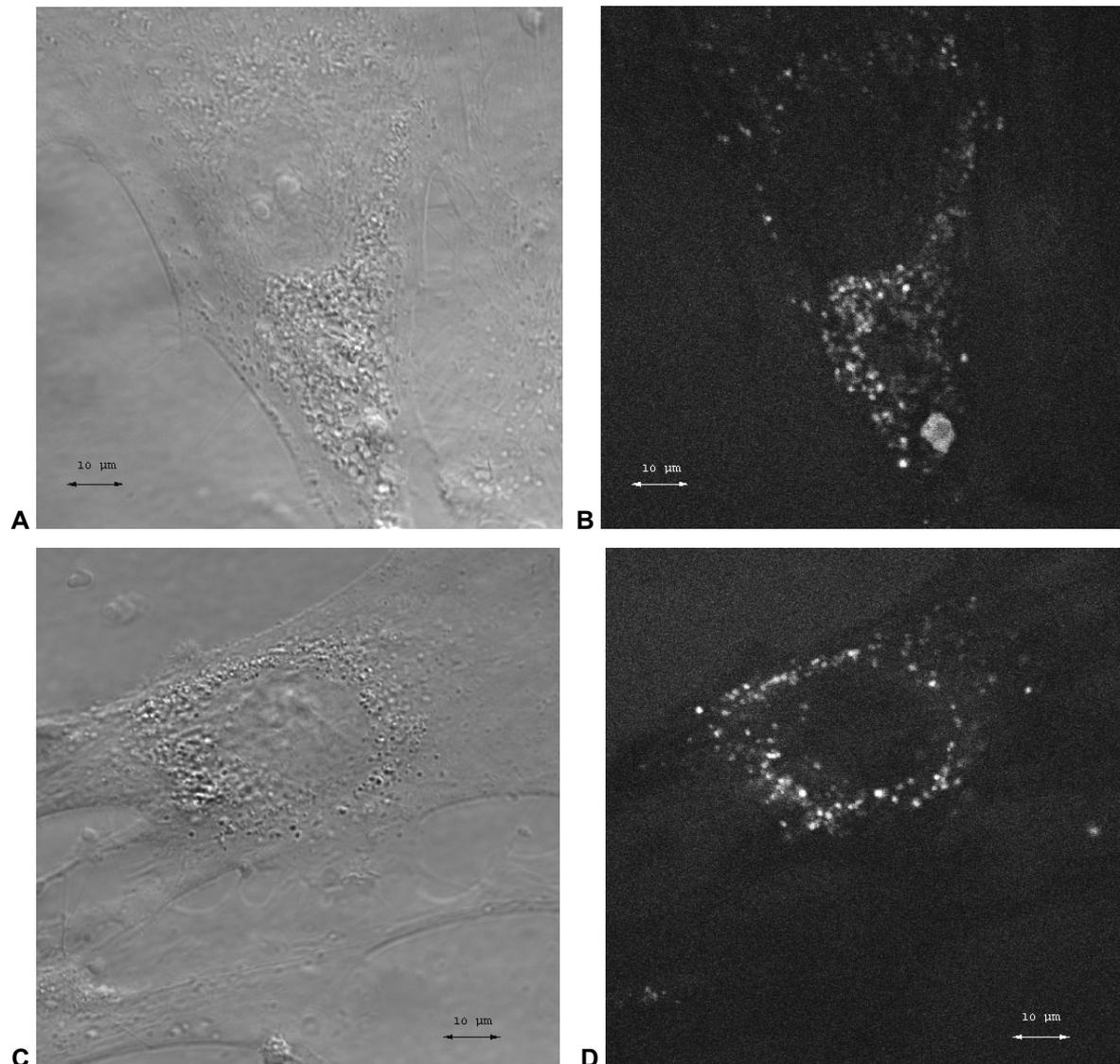
## 4.8 Mikroskopische Studien

Nach erfolgreicher Synthese membrangängiger und cytotoxischer Phallotoxinderivate sollten deren Aufnahmemechanismen und Auswirkungen auf die Zellstruktur bzw. das Mikrofilament-System durch mikroskopische Studien näher untersucht werden. Hierfür wurden die permeabilitäts-erhöhenden Liganden Ölsäure, Tat-Peptid, Arg<sub>8</sub>-Peptid und Poly-L(-D)-Lysin durch Umsetzung mit den Farbstoffen Fluorescein und Tetramethylrhodamin fluoreszenz-markiert und ihre Aufnahme in das Zellinnere von Mausfibroblasten (MF/LDB) durch Beobachtung der lebenden Zellen im konfokalen Lasermikroskop kinetisch untersucht. Alle fluoreszierenden Konjugate wurden in Konzentrationen von 0.1 mg/ml im Kulturmedium gelöst, die Ölsäurederivate mußten aufgrund ihrer Löslichkeitsprobleme im wäßrigen Milieu in DMSO (Endkonzentration 1 %) vorgelöst werden.

---

**Abbildung 4.23: Inkorporation der fluoreszierenden Carrier-Verbindungen in Mausfibroblasten**


---



Aufnahme von Mausfibroblasten MF/LDB *in vivo* durch konfokale Lasermikroskopie (Leica Microsystems) 6h nach Zugabe von 0.1 mg/ml Oleoyl-Fluorescein (**A, B**) bzw. 0.1 mg/ml Tat-Tetramethylrhodamin (**C, D**) in der Auflichtmikroskopie (**A, C**) bzw. in der Fluoreszenzmikroskopie (**B, D**). Aufnahme 512x512 Pixel, Objektiv HCX PL APO CS 100.0x1.40 OIL, Excitation Beam Splitter FW DD 488/543.

---

Erste Bilder der Zellen nach 1h zeigten keine Fluoreszenz, d.h. keine Aufnahme der Verbindungen in das Zellinnere. Nach 6h erschien jedoch unabhängig vom verwendeten Liganden Fluoreszenz in Vesikeln (siehe Abbildung 4.23), die wahrscheinlich dem endosomal-lysosomalen Zellkompartiment zuzuordnen sind. Eine direkte Färbung des Cytoplasma konnte bei keiner Trägerverbindung gezeigt werden. Die Verteilung der Vesikel innerhalb der Zelle konzentrierte sich um den perinukleären Bereich, eine Doppelfärbung mit Tetramethylrhodamin- und Fluorescein-Verbindungen unterschiedlicher Art, z.B. Oleoyl-

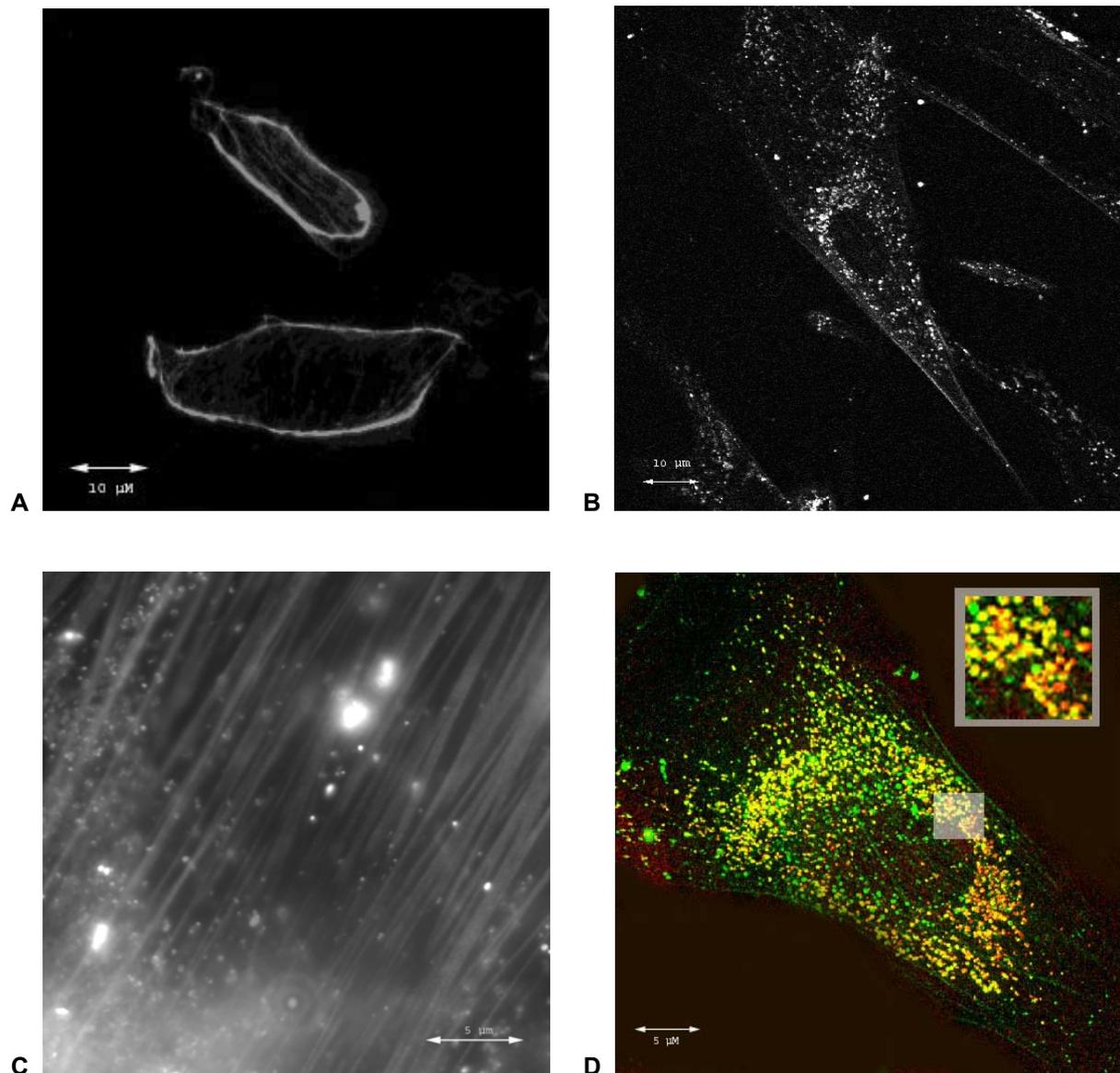
FITC und Tat-TRITC, zeigte, daß die verschiedenen Konjugate gleichzeitig in identischen cytoplasmatischen Einschlüssen zu finden waren. Auch eine unterschiedliche Aufnahme des Poly-L-Lysin gegenüber dem Poly-D-Lysin, wie sie aus den unterschiedlichen Cyto-toxizitäten der polymeren Phallotoxinderivate abzuleiten war, konnte nicht bestätigt werden.

Für weitergehende Untersuchungen wurden fluoreszierende Toxine in  $10^{-5}$  M bis  $10^{-3}$  M Konzentrationen im Medium gelöst und auch hier die Aufnahme in das Zellinnere durch konfokale Lasermikroskopie ausgewertet. Mit anionischem FITC-Phalloidin inkubierte MF/LDB-Zellen zeigten nach 6h keine Fluoreszenz, auch nach 24h konnte selbst bei höchster Konzentration keine Vesikel-Färbung nachgewiesen werden. Eine zweite Konjugation des FITC-Phalloidin zu Oleoyl-FITC-Phalloidin verbesserte die Zellpenetration kaum, auch hier konnte innerhalb von 24h nur in einigen wenigen Vesikeln geringe Fluoreszenz beobachtet werden. Das kationische TRITC-Phalloidin hingegen zeigte schon bei  $10^{-5}$  M Konzentrationen nach 1h eine Fluoreszenz auf der Zelloberfläche, die sich durch corona-ähnliche, leuchtende Membranbereiche kenntlich machte (siehe Abbildung 4.24 A). Nach 6h enthielten Vesikel deutliche Mengen des Tetramethylrhodamin-Farbstoffs (siehe Abbildung 4.24 B), nach 24h Inkubation war neben den Vesikeln auch das Aktinskelett schwach markiert (siehe Abbildung 4.24 C). Mit zunehmender Inkubationsdauer, insbesondere nach 6h, lieferten Zeitreihen-Aufnahmen den Hinweis auf eine deutliche Einschränkung der Beweglichkeit der Fibroblasten auf dem Coverslide bzw. der Cytoplasmaströmung im Zellinnern. Eine zweite Konjugation des TRITC-Phalloidin mit dem lipophilen Konjugat Ölsäure zum Oleoyl-TRITC-Phalloidin differierte weder in Aufnahmegeschwindigkeit noch in der Stärke der Fluoreszenz in Vesikeln und Cytoplasma. Eine Doppelfärbung der Zellen mit dem TRITC-Phalloidin bzw. Oleoyl-TRITC-Phalloidin und den Fluorescein-markierten permeations-erhöhenden Verbindungen Ölsäure, Poly-L-(-D)-Lysin und Tat-Peptid zeigte in allen Fällen eine rote-grüne Doppelfärbung der Vesikel (siehe Abbildung 4.24 D). Demnach sind sowohl Toxine als auch die Trägerverbindungen in identischen Zelleinschlüssen zu finden, eine Präferenz der unterschiedlichen Verbindungen für bestimmte Kompartimente ist damit auszuschließen.

---

**Abbildung 4.24: Inkorporation von TRITC-Phalloidin in Mausfibroblasten**


---



**A, B, C:** Aufnahme von TRITC-Phalloidin in Mausfibroblasten MF/LDB *in vivo* 1h (**A**), 6h (**B**) und 24h (**C**) nach Zugabe in das Medium (Konzentration  $10^{-5}$  M). Bilder entstanden durch Fluoreszenz-Anregung des Tetramethylrhodamin in konfokaler Lasermikroskopie (Leica Microsystems). **D:** Wie (**B**), gleichzeitige Zugabe von 0.1 mg/ml Fluorescein-Poly-L-Lysin. Tetramethylrhodamin-Kanal wurde in Adobe Photoshop 7.0 nachträglich rot gefärbt, der Fluorescein-Kanal grün dargestellt. Aufnahme 512x512 Pixel, Objektiv HCX PL APO CS 100.0x1.40 OIL, Excitation Beam Splitter FW DD 488/543; Aufnahmen **A**, **C** und **D** zeigen Ausschnittsvergrößerungen.

---

Um mögliche Veränderungen der intrazellulären Aktinfilamente, bedingt durch die Zugabe der membrangängigen Phallotoxinderivate, näher zu untersuchen, wurde das Mikrofilament-Netzwerk von Mausfibroblasten-Zellen MF/LDB nach Fixierung mit TRITC-Phalloidin angefärbt. Parallel dazu wurde die DNA der Kerne durch DAPI gefärbt. Für diese Studien

wurden MF/LDB-Zellen in ungefähr 10 % Konfluenz auf Coverslips ( $\varnothing$  12mm) ausgesät und nach 24h Inkubation verschiedene Phallotoxin-Derivate in ihrer  $IC_{50}$ -Konzentration zugesetzt, um äquitoxische Konzentrationen der Wirkstoffe zu gewährleisten. Neben Oleoyl-Phalloidin, Benzoyl-Phalloidin, Tat-SS-Phalloidin, Poly-L-Lys-SS-Phalloidin wurde auch Chondramide A in den Versuch einbezogen. Phalloidin wurde in  $10^{-3}$  M zugesetzt. Die behandelten Zellen wurden für unterschiedliche Zeitperioden (1h, 6h, 24h, und 48h) inkubiert und mit unbehandelten MF/LDB-Zellen nach Fixierung in Paraformaldehyd, Permeabilisierung und Färbung mit TRITC-Phalloidin und DAPI durch Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop verglichen (siehe 3.5).

Zellen, die mit Phalloidin behandelt waren, bildeten innerhalb der ersten Stunde charakteristische "*Birds nest*"-Strukturen, die durch den Verlust der typischen spindelförmigen Fibroblastenstruktur auffallen und stattdessen eine rundliche Zellform zeigen, die sich durch eine konzentrische Anordnung des Mikrofilamentnetzwerks im Cytoplasma auszeichnet (siehe Abbildung 4.25). In wenigen Fällen konnte eine Doppelkernigkeit (2 %) beobachtet werden, eine morphologische Erscheinung, die bei unbehandelten Zellen während des gesamten Versuchs nicht sichtbar war. Nach 6h zeigten die mit Phalloidin behandelten Zellen eine starke Vergrößerung (ca. 100 %) des Volumens, das Aktinfilament besaß büschel-artige Strukturen, die einzelnen Stressfibers waren gut erkennbar. Trotz Toxinierung nahm die Zelldichte nach 24h bzw. 48h zu (Zellzahl ca. verdoppelt bzw. vervierfacht), die *Riesenzellen* fielen durch extreme Vergrößerungen der DAPI-gefärbten Kernbereiche auf (Abbildung 4.25).

MF/LDB-Mausfibroblasten, die mit den Phallotoxinderivaten Oleoyl-Phalloidin und Benzoyl-Phalloidin vergiftet wurden, zeigten als lipophile Toxine untereinander eine sehr ähnliche morphologische Veränderung innerhalb des Beobachtungszeitraums. Innerhalb von 1h kam es zu geringen Auflösungen des Mikrofilament-Netzwerks (diffus), ein Effekt der sich innerhalb der nächsten 48h verstärkte und schließlich zu einem vollkommenen Verlust der geordneten intrazellulären Aktinfilament-Strukturen führte (Abbildung 4.25). Charakteristisch war dabei die Bildung von *Aktinpatches* und kondensierten F-Aktinarealen insbesondere in perinukleären Bereichen. Nach 48h lagen ca. 5-15 % der Zellen in binukleärer Form vor. Eine Vergrößerung des Zellvolumens bzw. der Zellkerne konnte nicht beobachtet werden.

Mit Tat-SS-Phalloidin und Poly-L-Lys-SS-Phalloidin inkubierte Zellen zeigten in den mikroskopischen Studien erkennbare Differenzen gegenüber den lipophilen Derivaten. Charakteristisch war das Auftreten eines übernormalen *Aktin-Cortex* unterhalb der Membranoberfläche. Nach 1h waren ebenfalls *perinukleäre Aktinpatches* sichtbar, doch

deutlicher ausgeprägt als bei den lipophilen Derivaten und teilweise so dicht, daß der DAPI-gefärbte Kern verdeckt schien (Abbildung 4.26). In einigen Fällen entwickelten die Zellen eine *Sternform*, und schrumpften innerhalb von sechs Stunden deutlich im Volumen (*Zwergzellen*), dabei ging der *Aktin-Cortex* verloren. Bereits nach 24h war das Aktinfilament nahezu vollständig und strukturlos um den Kern kondensiert. Die Fluoreszenzstärke war im Vergleich mit unbehandelten Zellen deutlich herabgesetzt, ein Hinweis darauf, daß Bindungsstellen für das nach der Fixierung eingesetzte TRITC-Phalloidin zu großen Teilen durch die membrangängigen Toxine besetzt waren. Ein Zustand der ebenso nach 48 Stunden beobachtet wurde. In vielen Fällen waren abgelöste, aktinhaltige Vesikel sichtbar, ein Teil der Zellen (10 %) besaß Doppelkerne. Die Proliferation war gegenüber unbehandelten Zellen deutlich niedriger.

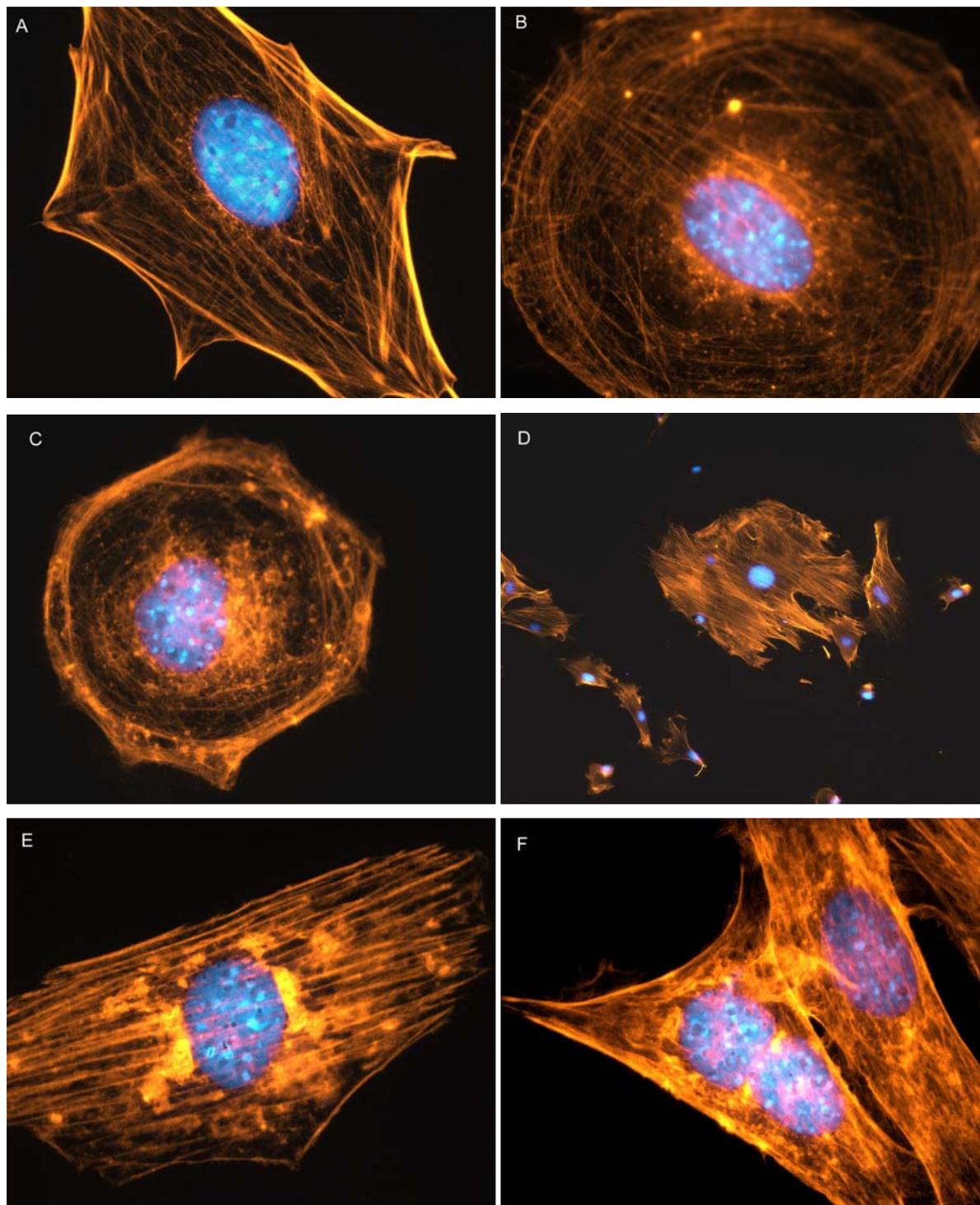
Chondramid A zeigte eine ähnliche Veränderung des Mikrofilamentsystems während der Inkubation mit Mausfibroblasten wie die beiden kationischen Phallotoxine. Allerdings waren die toxischen Effekte stärker, eventuell auch aus dem Grund daß eine äquitoxische Konzentration schwer zu definieren ist und die Dosierung zu hoch war. Nach 1h waren *Aktinpatches* und der *Aktin-Cortex* deutlich erkennbar, die Zellfluoreszenz lag deutlich unterhalb der Leuchtdichte unbehandelter Zellen. Nach 6h waren die meisten Zellen auf ca. ein Fünftel der ursprünglichen Größe geschrumpft, in einigen Fällen waren abgelöste Vesikel erkennbar. Die Kernstrukturen, teilweise binukleär, waren von einem dichten Aktinkondensat umgeben. Nach 24h bzw. 48h war ein Teil der Zellen abgelöst, der Rest der Fibroblasten zeigte die *Zwergform*.

Neben Mausfibroblasten MF/LDB wurden auch Mausfibroblasten der *NIH/3T3*-Zelllinie und Rattenfibroblasten der *Rat2*-Zelllinie mit den membrangängigen Toxinen inkubiert und nach Fixierung mit fluoreszierenden Phalloidinen und Propidiumiodid gefärbt. In der Fluoreszenzmikroskopie konnten sehr ähnliche Strukturverluste des Mikrofilament-Netzwerks beobachtet werden, wie zuvor für die MF/LDB-Zellen beschrieben (siehe Abbildung 4.26). Charakteristisch war jedoch das höhere Aufkommen binukleärer Zellen (ca. 30-40 %). Bei Toxinkonzentrationen der membrangängigen Derivaten, die um den Faktor 10 höher lagen als die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte, war kaum mehr Färbung durch fluoreszierende Phalloidine möglich.

---

**Abbildung 4.25: Fluoreszenzmikroskopie fixierter Mausfibroblasten nach Toxinierung (A)**


---



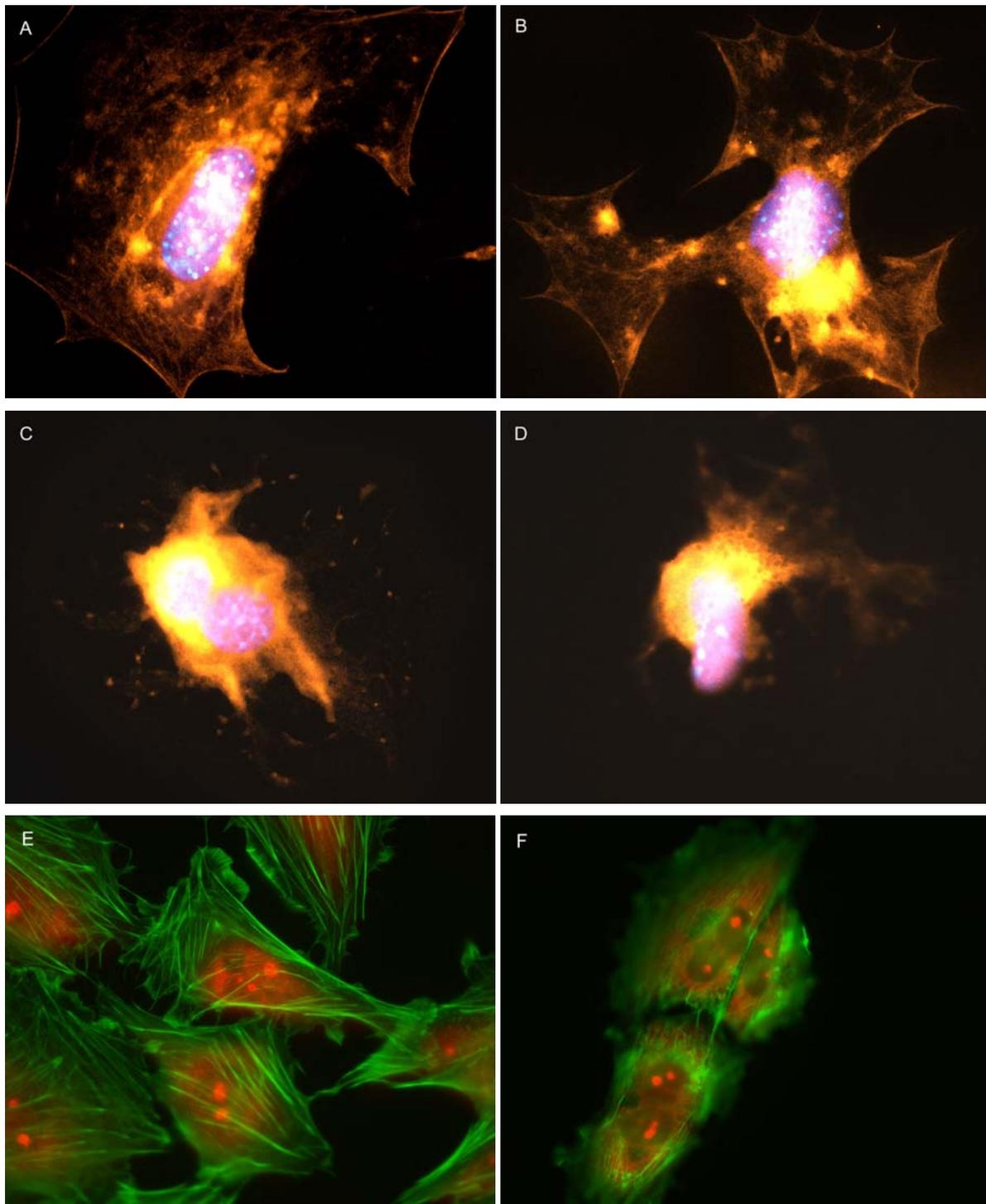
Mausfibroblasten MF/LDB wurden in Paraformaldehyd fixiert, permeabilisiert und mit TRITC-Phalloidin und DAPI gefärbt. Die mikroskopischen Bilder (Zeiss Axiovert) wurden mit einer 12-Bit Graustufen-Kamera aufgenommen und die Tetramethylrhodamin-Fluoreszenz orange-rot bzw. die DAPI-Fluoreszenz blau coloriert (Adobe Photoshop 7.0). (A) unbehandelte Zellen (1000x Vergrößerung). (B) *Birdsnestzelle* nach 1h Inkubation mit Phalloidin  $10^{-3}$  M (1000x). (C) *Birdsnestzelle* nach 6h Inkubation mit Phalloidin  $10^{-3}$  M (1000x). (D) *Riesenzellen* mit vergrößerten Kernstrukturen nach 48h Inkubation mit Phalloidin  $10^{-3}$  M (100x). (E) *Perinukleäre Aktinpatches* nach 6h Inkubation mit Oleoyl-Phalloidin bei  $IC_{50}$ -Konzentration (1000x). (F) *Perinukleäre Aktinpatches* bei vollständigem Verlust der Mikrofilamentstruktur nach 24h Inkubation mit Oleoyl-Phalloidin bei  $IC_{50}$ -Konzentration. Teilweise Doppelkernigkeit (1000x Vergößerung).

---

---

**Abbildung 4.26: Fluoreszenzmikroskopie fixierter Mausfibroblasten nach Toxinierung (B)**


---



**A-D:** Fixierte und permeabilisierte Mausfibroblasten MF/LDB, die mit TRITC-Phalloidin und DAPI gefärbt wurden. **(A)** Perinukleäre Aktinpatches 6h nach Zugabe des Tat-SS-Phalloidin (1000x). **(B)** Sternzelle 6h nach Zugabe von Tat-SS-Phalloidin ( $IC_{50}$ -Konz.). **(C)** Kondensation des Mikrofilaments um den Kernbereich, Reduktion der Zellgröße und Doppelkernbildung 48h nach Zugabe von Tat-SS-Phalloidin ( $IC_{50}$ -Konz.; 1000x). **(D)** Starke Aktinkondensation um den Kernbereich bereits 6h nach Zugabe des Chondramid A ( $IC_{50}$ -Konz.; 1000x). **E-F:** Fixierte und permeabilisierte Rattenfibroblasten *Rat2*, die mit AlexaGreen®-Phalloidin und Propidiumiodid gefärbt wurden. **(E)** Zellen 12h nach Zugabe von Tat-SS-Phalloidin ( $1/10 IC_{50}$ -Konz.) zeigen Mikrofilamentstrukturen wie Stressfibers; teilweise Doppelkerne (250x). **(F)** Aktinkondensation 12h nach Zugabe von Tat-SS-Phalloidin ( $IC_{50}$ -Konz.) und schwache Färbung mit AlexaGreen®-Phalloidin (250x); binukleäre Zellen (ca. 30 %).

---

## 4.9 Apoptose-Versuche

Nach Zugabe von Oleoyl-Phalloidin, Benzoyl-Phalloidin, Tat-Phalloidin und Poly-L-Lys-SS-Phalloidin konnten im Lichtmikroskop morphologische Veränderungen wie das Schrumpfen der Zellen sowie Vesikelbildung beobachtet werden (siehe 4.10), die charakteristisch sind für programmierten Zelltod. Anhand verschiedener Versuche sollte geprüft werden, ob durch die Zugabe der membrangängigen Phallotoxine Tod durch Apoptose eintritt.

### 4.9.1 Versuche mit Annexin-V-FLUOS

Annexin-V ist ein Antikoagulationsprotein, das bevorzugt an negativ geladenen Phospholipiden bindet. Während früher apoptischer Prozesse wird die Phospholipid-Assymmetrie gestört, was zu einem verstärktem Aufkommen von Phosphatidylserin auf der Außenseite der cytoplasmatischen Membran führt. Hierdurch wird es für eine Bindung von Annexin zugänglich, was wiederum für eine Apoptose-Detektion genutzt wurde.

Jurkat-Zellen wurden mit den Phallotoxinen Oleoyl-Phalloidin, Tat-SS-Phalloidin und Poly-L-Lys-Phalloidin, dem RNA-Polymerase-II-hemmenden Toxin  $\alpha$ -Amanitin aus *Amanita phalloides* und dem Apoptose-induzierenden Camptothecin für unterschiedliche Zeitperioden inkubiert, gewaschen und mit Annexin-V-Fluorescein und Propidiumiodid markiert. Die Zellen wurden im Durchflußcytometer durch Bestimmung der Lichtstreuung (*Forward Scatter*, *Sideward Scatter*) und der Fluoreszenzstärke analysiert.

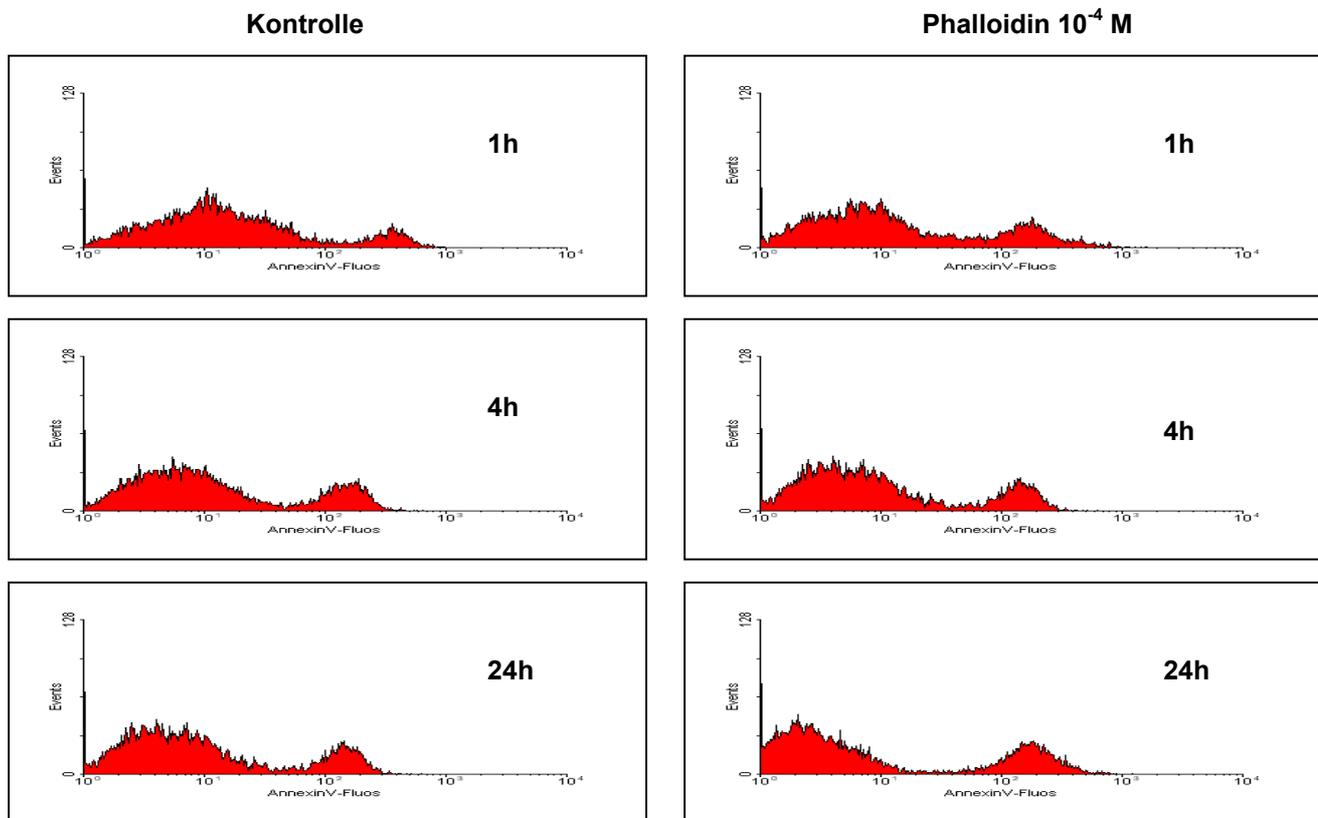
Für das natürlich vorkommende Phalloidin zeigte sich bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M keine Erhöhung der Fluoreszenz gegenüber unbehandelten Kontrollzellen. Im Beobachtungszeitraum von 24h konnte im Durchflußcytometer weder eine Apoptose durch gesteigerte Bindung von Annexin-V-Fluorescein (siehe Abbildung 4.27) noch eine Nekrose durch Färbung mit Propidiumiodid gezeigt werden.

Anders verhielten sich die cytotoxischen Phalloidine Oleoyl-Phalloidin (siehe Abbildung 4.28), Benzoyl-Phalloidin, Tat-SS-Phalloidin (alle in  $10^{-4}$  M Konzentration eingesetzt) und Poly-L-Lys-SS-Phalloidin ( $10^{-5}$  M). Diese Toxine zeigten innerhalb einer Stunde geringe

---

**Abbildung 4.27: Bindung von Annexin-V-FITC an Jurkat-Zellen nach Inkubation mit Phalloidin**


---



1 x 10<sup>6</sup> Jurkat-Zellen/ml wurden in Medium bzw. Medium/10<sup>-4</sup> M Phalloidin für 24h inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten (hier abgebildet: 1h, 4h, 24h) wurden die Zellen gewaschen und mit Annexin-V-FITC inkubiert. Im BD FACS-II wurde jeweils die Fluorescein-Fluoreszenz von 10.000 Zellen gemessen.

---

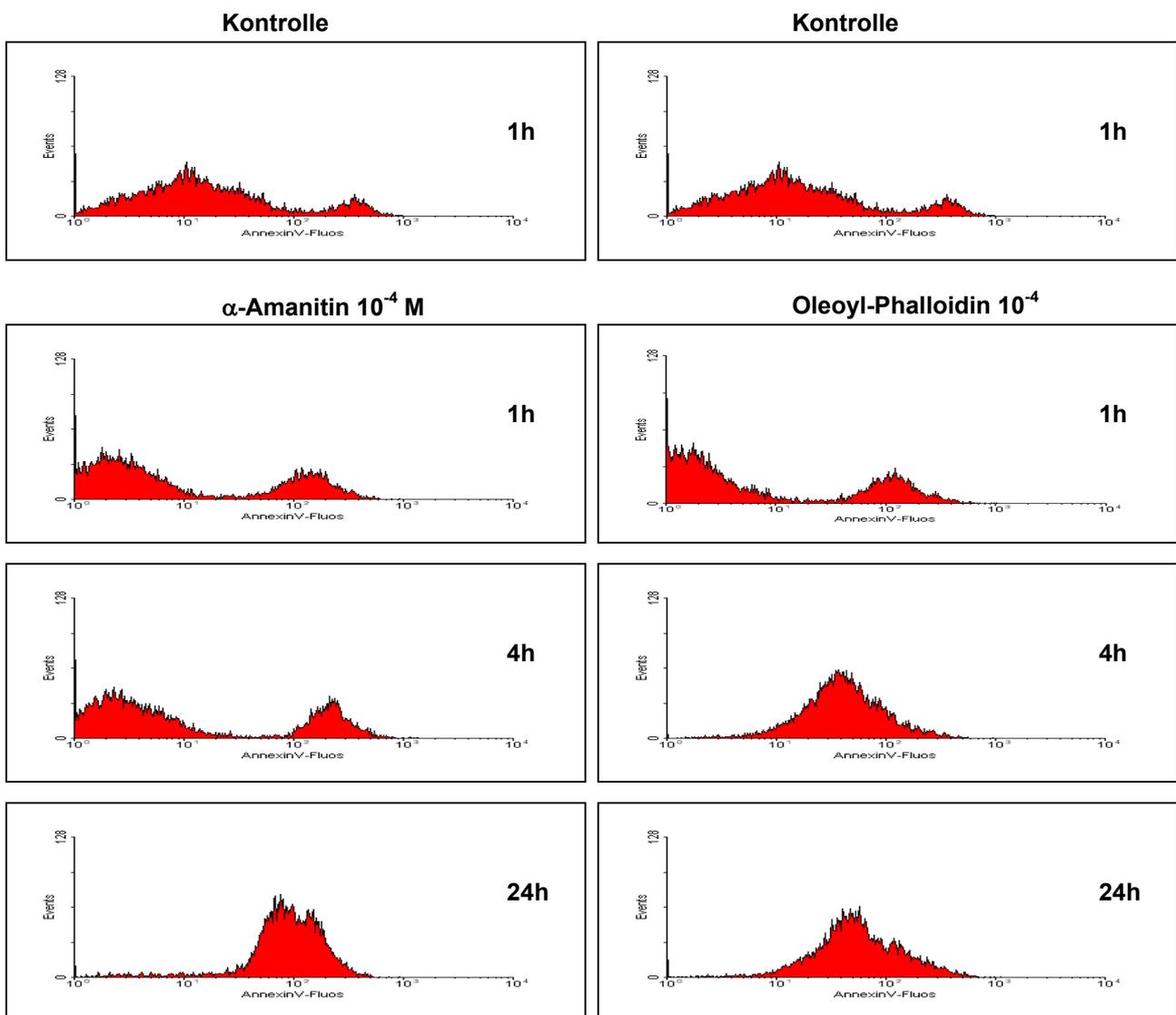
Zunahme der Fluorescein-Fluoreszenz, nach 4h Stunden war nahezu die gesamte Zellpopulation in einem Stadium erhöhter Annexin-V-Bindung. Dies änderte sich innerhalb von 24h nicht, allerdings konnte nach dieser Zeit eine ebenfalls erhöhte Intensität der Propidiumiodid-Fluoreszenz gezeigt werden, was auf eine zunehmende Zahl nekrotischer Zellen hindeutete. Wurde Poly-L-Lys-SS-Phalloidin in Konzentrationen > 10<sup>-5</sup> M eingesetzt, zeigte sich bereits innerhalb der ersten Stunde massive Zunahme sowohl der Fluorescein-Fluoreszenz als auch der Propidiumiodid-Fluoreszenz. Eventuell verminderte die hohe Konzentration des Polykations die Membranstabilität und führte dadurch in kurzer Zeit zur Zellyse und damit zur Bindung von Annexin-V und Propidiumiodid.

Im Vergleich zu Phalloidin wurde auch  $\alpha$ -Amanitin getestet, dessen Toxizität auf einer Bindung an RNA-Polymerase-II beruht. Es zeigte gegenüber den membrangängigen Phallotoxinen bei 10<sup>-4</sup> M Konzentration einen etwas langsameren Verlauf der Apoptose (siehe Abbildung 4.28). Innerhalb der ersten 4h war die Zunahme der Fluoreszenz durch Bindung von Annexin-V-Fluorescein gering. Nach 24h hingegen befand sich nahezu die gesamte

Zellpopulation in einem apoptotischem Zustand. Starke Propidiumiodidfärbung zeigte gleichzeitig, daß viele Zellen bereits nekrotisch waren.

Die Toxizität des Topoisomerase-II-Inhibitors Camptothecin führt in kurzer Zeit (4h) zum Erscheinen des Phosphatidylserins auf der Zellaußenseite und damit zur Bindung von Annexin-V. Nach 24h trat vollständiger Zelltod ein.

**Abbildung 4.28: Annexin-V-FITC-Bindung nach Inkubation mit Oleoyl-Phalloidin und Amanitin**



Jurkat-Zellen wurden mit Oleoyl-Phalloidin ( $10^{-4}$ M) und  $\alpha$ -Amanitin vergiftet und nach unterschiedlichen Zeiten mit Annexin-V-FITC inkubiert. Durch Durchflußcytometrie konnte die Fluoreszenzstärke von jeweils 10.000 Zellen bestimmt werden.

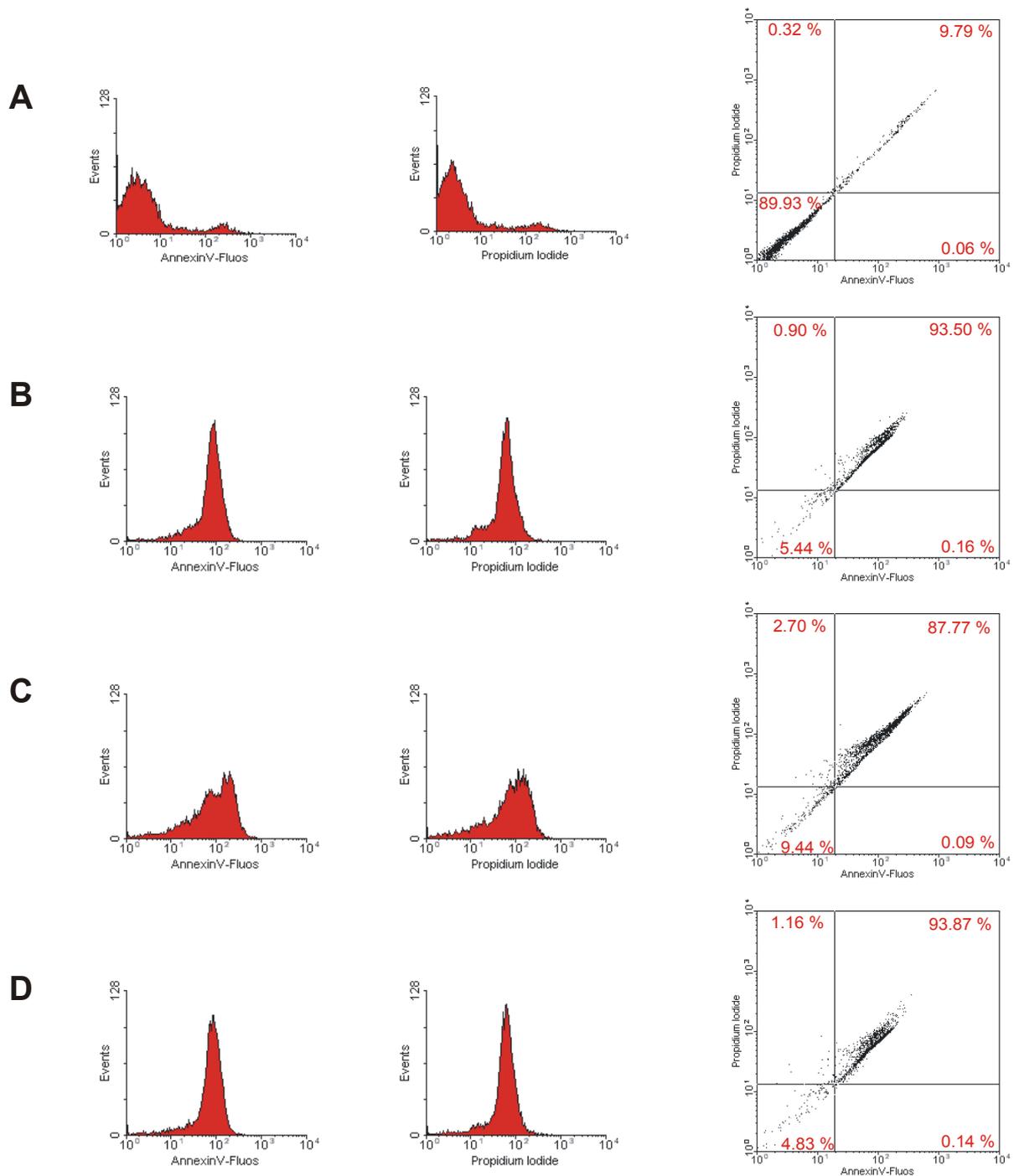
## 4.9.2 Apoptose-Versuche mit Caspase-Inhibitoren

Anhand der Versuche mit Annexin-V-FITC konnte eine Apoptose von Jurkat-Zellen nach Behandlung mit membrangängigen Phalloidinen gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob die Apoptose durch Phallotoxine von einer Aktivierung durch Caspasen abhängig ist, wurden Jurkat-Zellen mit den Caspase-Peptidinhibitoren Z-VAD-fmk und DEVD-cho behandelt. Hierfür wurden gleichzeitig mit Zugabe von Tat-SS-Phalloidin ( $1 \times 10^{-5}$  M) die membrangängigen Inhibitoren Z-VAD-fmk und DEVD-cho in Konzentrationen von jeweils  $10 \mu\text{M}$  dem Zellkultur-Medium zugesetzt. Nach 24h wurden durch Färbung mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid die prozentualen Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen im FACS-Zähler ermittelt. Diese Daten wurden mit Ergebnissen verglichen, die aus einer Vergiftung mit Tat-SS-Phalloidin ohne Caspase-Inhibitoren stammten.

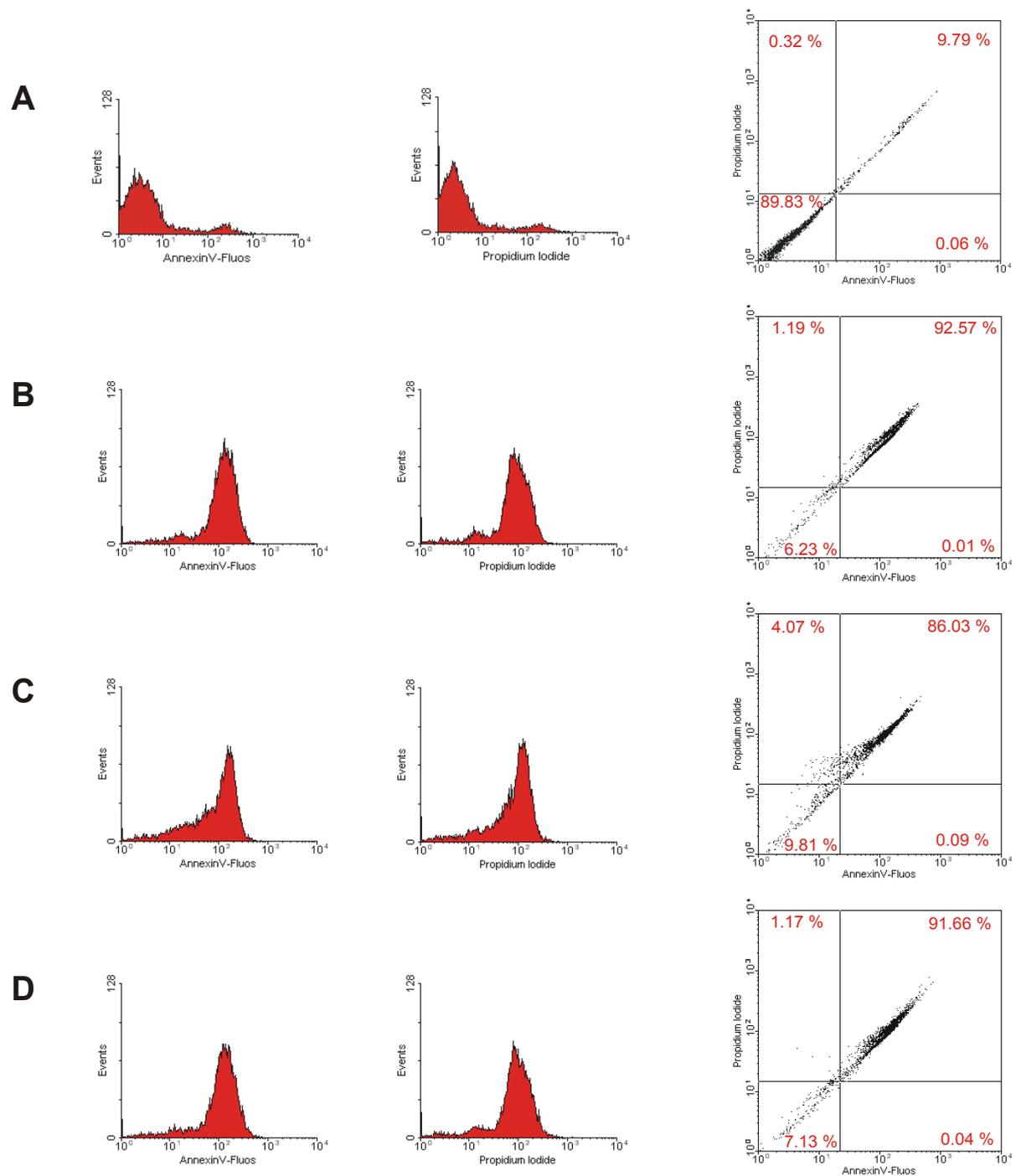
In der Kontrolle waren 89,93 % der Zellen ohne Schädigung, 9,79 % der Zellen waren nekrotisch (siehe Abbildung 4.29). Die Kultur, die mit  $1 \times 10^{-5}$  M Tat-SS-Phalloidin und ohne Inhibitor inkubiert wurde, zeigte nur 5,44 % der Zellen ohne Schädigung, 93,50 % der Zellen waren nekrotisch. Bei gleichzeitiger Zugabe des Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk war die Zahl ungeschädigter Zellen nach 24h mit 9,44 % geringfügig höher, der Caspase-Inhibitor DEVD-cho zeigte dagegen keine Reduktion der Giftigkeit des Tat-SS-Phalloidin (4,88 % ungeschädigte Zellen).

Neben Tat-SS-Phalloidin wurden die Zellen weiterhin mit dem RNA-Polymerase-II hemmenden  $\alpha$ -Amanitin vergiftet (siehe Abbildung 4.30). Auch hier waren nur noch 6,23 % der Zellen nach 24h ungeschädigt. Ebenso zeigte auch hier nur Z-VAD-fmk eine Reduktion der toxischen Wirkung, sodaß nach gleicher Inkubationsdauer noch 9,81 % der Zellen ungeschädigt waren. Eine Reduktion der Amanitin-Toxizität konnte durch Zugabe von DEVD-cho nicht beobachtet werden (7,13 % ungeschädigte Zellen).

Abbildung 4.29: Einfluß von Caspase-Inhibitoren auf die Vergiftung mit Tat-SS-Phalloidin



$2 \times 10^6$  Jurkat-Zellen/ml wurden für 24h bei  $37^\circ\text{C}/5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert und anschließend mit Annexin-V-Fluos Staining-Kit (Roche) behandelt. Hierzu wurde jeweils 1ml Zellsuspension zentrifugiert (200g für 5min), mit PBS gewaschen und in 100 $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer mit 2 $\mu\text{l}$  Annexin-V-Fluos Labeling Reagenz und 2 $\mu\text{l}$  Propidiumiodid-Lösung für 15min bei RT gefärbt. Im FACS-Zähler wurde nach Zugabe von 500 $\mu\text{l}$  Inkubationspuffer die Fluorescein- und Propidiumiodid-Fluoreszenz ausgewertet. **A:** Zellen ohne Toxin und ohne Caspase-Inhibitor. **B:** Zellen mit  $1 \times 10^{-5}$  M Tat-SS-Phalloidin. **C:** Zellen mit  $1 \times 10^{-5}$  M Tat-SS-Phalloidin und  $10\mu\text{M}$  Z-VAD-fmk. **D:** Zellen mit  $1 \times 10^{-5}$  M Tat-SS-Phalloidin und  $10\mu\text{M}$  DEVD-cho.

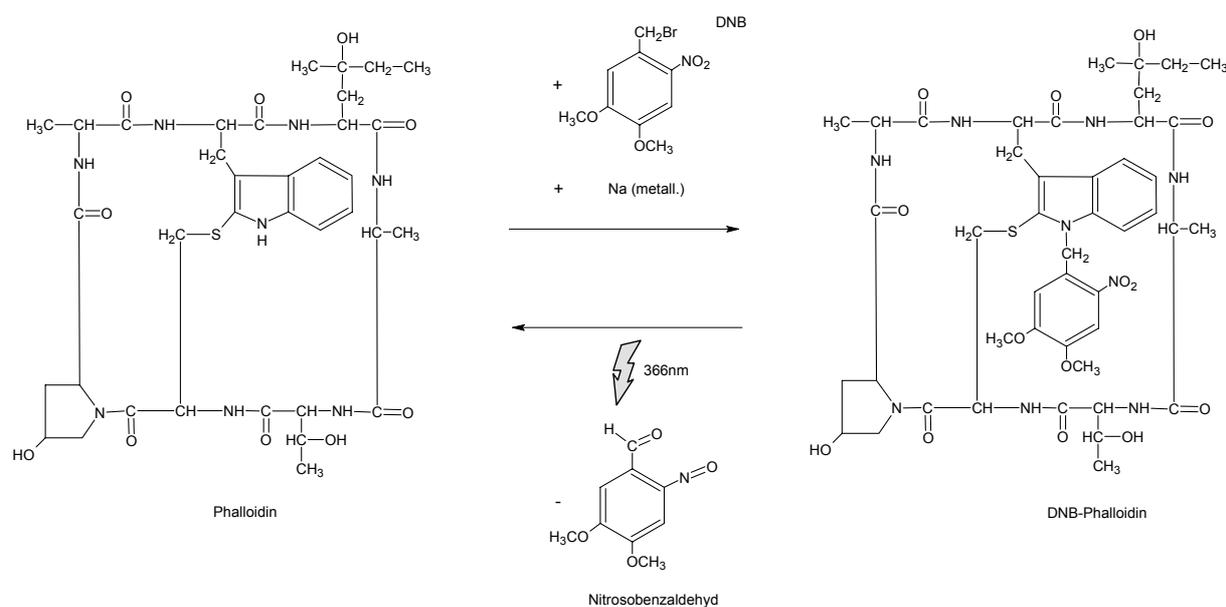
Abbildung 4.30: Einfluß von Caspase-Inhibitoren auf die Vergiftung mit  $\alpha$ -Amanitin

Färbung von Jurkat-Zellen mit Annexin-V-Fluos Staining-Kit (Roche) und Auswertung im FACS-Zähler wie in Abbildung 4.29 beschrieben. **A:** Zellen ohne Toxin und ohne Caspase-Inhibitor. **B:** Zellen mit  $5 \times 10^{-6}$  M  $\alpha$ -Amanitin. **C:** Zellen mit  $5 \times 10^{-6}$  M  $\alpha$ -Amanitin und  $10 \mu\text{M}$  Z-VAD-fmk. **D:** Zellen mit  $5 \times 10^{-6}$  M  $\alpha$ -Amanitin und  $10 \mu\text{M}$  DEVD-cho.

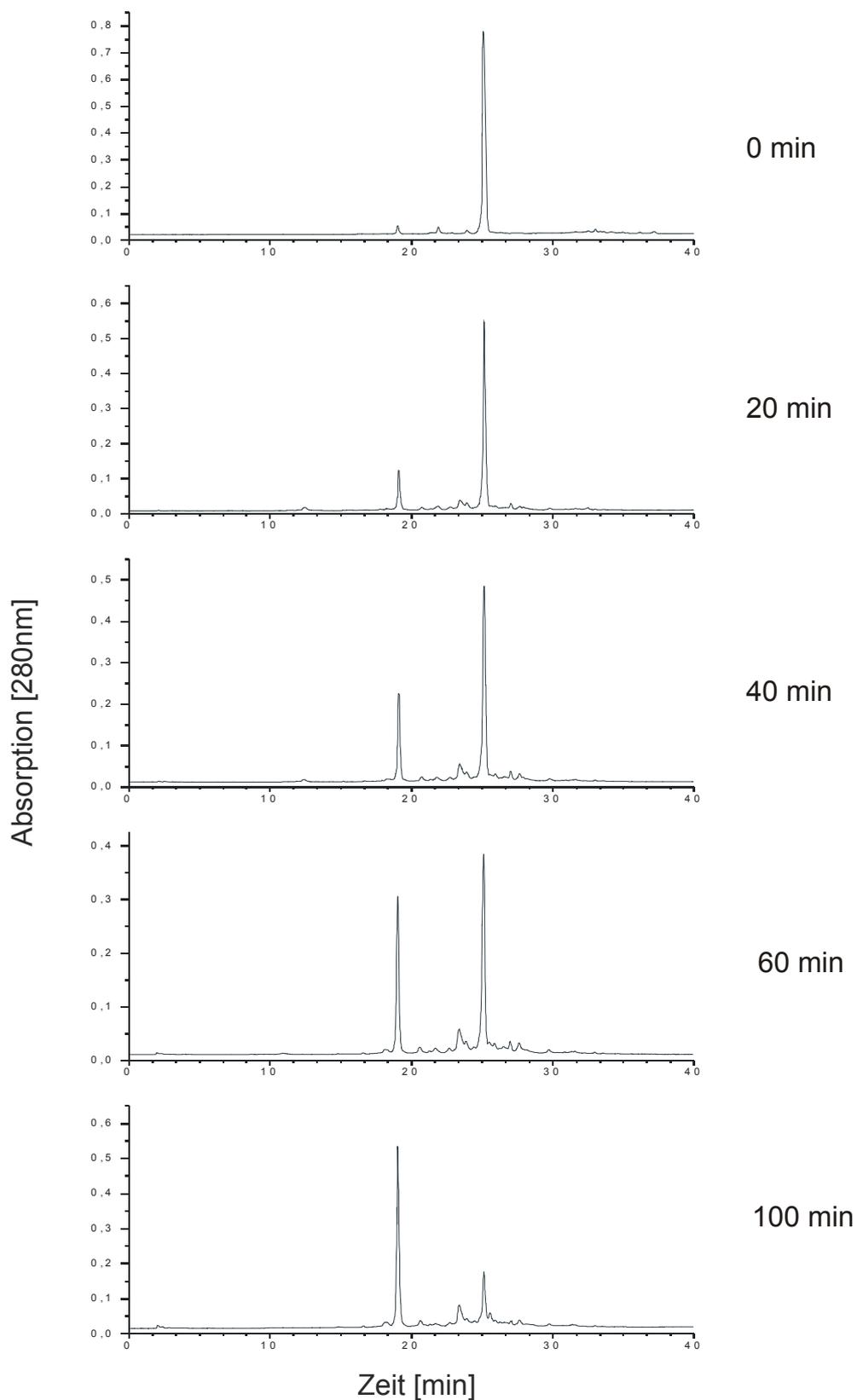
## 4.10 Herstellung und Aktivierung eines photosensitiven Phallotoxins

Aus früheren Aktinaffinitäts-Versuchen war bekannt, daß eine Derivatisierung der Indolyl-Gruppe des Tryptophans der Phallotoxine nicht-bindende Konjugate lieferte. Durch Umsetzung des Tryptophans mit DNB (4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide) gelang die Einführung einer im UV-Bereich photoaktivierbaren Nitrobenzyl-Gruppe (siehe 3.2.7; Abbildung 4.31). Zur Überprüfung der Spaltfähigkeit wurde 1mg/ml DNB-Phalloidin in PBS in einer Mikrotiterplatte mit UV-Licht (366nm) belichtet und die Toxinlösung nach bestimmten Zeitperioden in einer Reversed Phase C<sub>18</sub>-HPLC analysiert (siehe Abbildung 4.32).

Abbildung 4.31: Synthese des photosensitiven DNB-Phalloidin



Die Synthese des DNB-Phalloidin erfolgt durch Umsetzung von Phalloidin mit DNB (4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl bromide) in Ammoniak unter Zugabe von Na *metall.*, was nach Solvatisierung des freierwerdenden Elektrons (Blaufärbung) zur Bildung des Amids und damit zur Reduktion der Indolyl-Gruppe im Tryptophan führt, die im folgenden den Brom-aktivierten Kohlenstoff im DNB angreift. Das Produkt setzt durch eine intramolekulare Umlagerung bei UV-Belichtung ein *ortho*-Nitrosobenzaldehyd frei, und kann als Phalloidin wieder seine Aktinaffinität ausbilden.

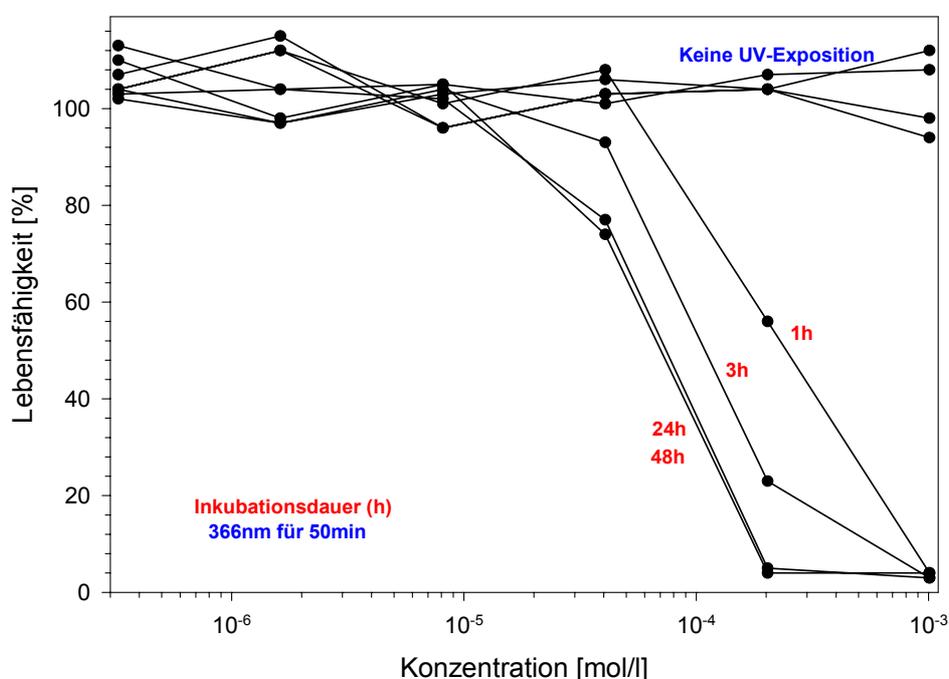
**Abbildung 4.32: HPLC-Analyse der DNB-Phalloidin-Spaltung im UV-Licht**

Freisetzung des Phalloidin durch Belichtung einer 1mg/ml DNB-Phalloidin-Lösung (PBS) in einer Mikrotiterplatte im UV-Licht (2x15 Watt;  $\lambda_{\text{max}}=366\text{nm}$ ). Substanzlösung (20 $\mu\text{g}$ ) wurde vor (0min) und während der Belichtung (20min, 40min, 60min, 100min) über eine Reversed Phase  $\text{C}_{18}$ -HPLC getrennt. Das DNB-Phalloidin eluierte nach 25,13min, das Phalloidin nach 19,09min.

Durch die HPLC-Säulenläufe konnte gezeigt werden, daß nach 60min ca. 40 % des DNB-Phalloidin zu Phalloidin umgesetzt waren, nach 100min waren ca. 90 % umgesetzt. Die Freisetzung des Phalloidin zeigte weder Intermediate noch konnten in nennenswerter Menge Nebenprodukte beobachtet werden. Die Gesamtausbeute (Integration aller Peaks) nahm dabei mit der Zeit ab, nach 100min konnten nur noch 75 % der Substanz in der HPLC nachgewiesen werden. Eventuell beruht dies auf einer Änderung der Extinktion bei 280nm durch die Photolyse.

Zur Untersuchung der Spaltbarkeit *in vivo* wurden  $1,6 \times 10^6$  Zellen/ml in der Mikrotiterplatte ausgesät und nach Absiedelung DNB-Phalloidin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Nach jeweils 1h, 3h, 24h und 48h wurde das toxische Medium abgezogen und durch Medium ohne Toxin ersetzt. Nach dem Mediumwechsel wurde der eine Teil der Zellkultur ultravioletter Strahlung ausgesetzt, der andere blieb im Dunkeln. Die Belichtung geschah bei RT außerhalb des Brutschranks für 50min im Abstand von 10cm zur Lampe (2x15 Watt). Nach UV-Exposition wurden die Zellen bis zur 72. Stunde weiterinkubiert und schließlich die Proliferation im MTT-Assay kontrolliert (siehe Abbildung 4.33).

**Abbildung 4.33: MTT-Cytotoxizitätsassay DNB-Phalloidin behandelter Mausfibroblasten**



MTT-Cytotoxizitätsassay von Mausfibroblasten MF/LDB nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des DNB-Phalloidin für 1h, 3h, 24h und 48h. Die eine Hälfte der Zellen wurde anschließend für 50min im UV belichtet, die andere Hälfte nicht. Nach insgesamt 72h wurde die Zellproliferation im ELISA-Reader nach Reduktion des Tetrazoliumfarbstoffs bestimmt.

---

Bei Zellen, die dem UV-Licht nicht ausgesetzt waren, wurde keine Proliferationshemmung beobachtet, unabhängig von der Dauer der Inkubation mit DNB-Phalloidin. Zellen hingegen, die einer ultravioletten Strahlung ausgesetzt waren, zeigten bereits nach 1h Inkubation eine Einschränkung der Vitalität. Es konnte nach dieser Zeit eine  $IC_{50}$ -Konzentration von  $2,0 \times 10^{-4}$  M bestimmt werden. Nach 3-stündiger Inkubation in DNB-Phalloidin stieg die Toxizität um den Faktor 2 ( $1,0 \times 10^{-4}$  M) an, nach 24h um den Faktor ca. 3.5 ( $5,9 \times 10^{-5}$  M). Eine weitere Verlängerung der Exposition gegenüber DNB-Phalloidin steigerte die Toxizität nicht mehr signifikant ( $5,4 \times 10^{-5}$  M). Ebenso konnte eine Erhöhung der Belichtungsdauer über 50min hinaus nicht ohne deutliche Schädigung der Zellpopulationen durchgeführt werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Aktinbindung als Voraussetzung für Cytotoxizität

Die Natur kennt eine Vielzahl von Toxinen, welche die Dynamik des Aktin-Cytoskeletts modulieren. Dabei kann das Aktin-Cytoskelett durch Stabilisierung oder Destabilisierung der Filamentform beeinflusst werden. Zu den Toxinen, die eine Destabilisierung des Aktins bewirken, gehören die Cytochalasine. Sie zerstören Filamente durch Bindung des monomeren G-Aktins. Die Phallotoxine, die am längsten bekannte Gruppe Aktin-stabilisierender Gifte, besitzen dagegen eine hohe Affinität zum F-Aktin. So hat Phalloidin einen  $K_D$ -Wert von  $3 \times 10^{-8}$  M. Durch die Einführung verschiedener Liganden am Phalloidin wird die Affinität zum Aktin meist reduziert. Ein Assay auf der Basis von Muskelaktin, gebunden an radioaktiv markiertes  $^3\text{H}$ -Desmethylphalloin, ermöglichte durch Konkurrenz um den Bindungsort die relative Affinität modifizierter Toxine im Vergleich zu Phalloidin zu bestimmen.

Wir fanden, daß mit zunehmender Größe des Liganden die Affinität an das Aktin deutlich abnahm. Kleine Liganden, wie Benzoesäure (MW=122; C<sub>7</sub>) und Salicylsäure (MW=138; C<sub>7</sub>) reduzierten die Affinität zum Aktin nur um den Faktor 1,2 bis 1,3. Obwohl ein Octanoyl-Phalloidin eine fast identische Molekularmasse (MW=144; C<sub>8</sub>-Rest) hat, bindet es um den Faktor 8 schlechter als Phalloidin. Eine mögliche Ursache dieser Differenz könnte die kompakte Struktur der aromatischen Reste sein, die eine geringere sterische Hinderung verursacht. Die Octansäure hat im Vergleich zu den aromatischen Säuren im gestreckten Zustand eine deutlich größere Raumbeanspruchung. Eine Verlängerung der aliphatischen Kette auf C<sub>14</sub> (Myristoylsäure; MW=226) bzw. C<sub>18</sub> (Oleoylsäure; MW=282) ließ die Aktinaffinität des gebundenen Phallotoxins um den Faktor 14 bzw. 24 sinken. Die nochmals deutlich größeren trojanischen Peptide mit einer molaren Masse von 1653 Da (Arg<sub>8</sub>), 1902 Da (Kaposi) und 1946 Da (Tat) schließlich binden 59-, 83- und 40-mal schlechter als Phalloidin. Eine Abhängigkeit der Aktinaffinität von der molaren Masse wurde auch in der Reihe der Polyethylenglykole beobachtet. MPEG<sub>810</sub>-Phalloidin bindet 35-mal schlechter als Phalloidin, MPEG<sub>5200</sub>-Phalloidin ca. 67-mal schlechter. Das makromolekulare MPEG<sub>22600</sub>-Phalloidin ebenso wie Human-Serumalbumin-Phalloidin (66 kDa) besitzen praktisch keine Affinität mehr gegenüber Phalloidin (< 1 %). Diese Daten zeigen deutlich, daß insbesondere die molekulare Größe bei Liganden unterschiedlicher chemischer Struktur den entscheidenden

Faktor für die Affinität des konjugierten Toxins am Filament darstellt. Die chemische Struktur der Liganden ist im Vergleich dazu von untergeordneter Bedeutung.

Dies gilt nicht, wenn die chemische Struktur des Liganden Ladungen enthält. Das zeichnete sich schon in der Reihe der trojanischen Peptide ab, innerhalb derer das weitgehend neutrale Kaposi-Toxin bei vergleichbarer molekularer Masse nur etwas halb so gut bindet wie das Tat-Toxin, das sechs Arginin-Reste enthält (siehe oben). Noch deutlicher wird die Bedeutung der positiven Ladungen bei den polymeren Verbindungen. So binden die Poly-Lysin-Toxine trotz ihrer Größe von 25 kDa nur um den Faktor 2-3 schlechter als freies Phalloidin und besitzen damit eine ca. 30-50-mal höhere Affinität zum Muskelaktin als das ungeladene MPEG<sub>22600</sub>-Phalloidin von vergleichbarer molekularer Masse. Da der isoelektrische Punkt des  $\alpha$ -Aktins  $pI = 5,2$  beträgt, das Aktinfilament also überschüssige negative Ladung hat, besteht die Möglichkeit elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen den kationischen Lysingruppen und dem Protein. Auf die bloße elektrostatische Wirkung der polykationischen Polymere deutet hin, daß die Konfiguration des Polymers, Poly-D-Lysin oder Poly-L-Lysin, keinen Einfluss auf die Phalloidin-Bindung hatte. Ein ähnlicher Effekt konnte bei den fluoreszierenden Phalloidinen beobachtet werden, wo Tetramethylrhodamin-Phalloidin etwa die gleiche Affinität wie Phalloidin hatte, das anionische Fluorescein-Phalloidin dagegen nur ein Zehntel dieser Affinität besaß.

Bei gleicher Größe und Ladung des Liganden spielt die Art der chemischen Verknüpfung mit dem Toxin keine Rolle für die Affinität zum Aktin. Das zeigte sich bei der Einführung des Benzoylrestes, der im Benzoyl-Phalloidin als Ester oder im Benzoyl-Amino-Phalloidin als Amid vorliegt. Beide Verbindungen hatten nahezu identische Affinität zum Aktin. Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch die beiden entsprechenden Derivate der Ölsäure, die ebenso eine einheitliche Bindung am Filament zeigten. Ähnlich unbedeutend für die Affinität war der Austausch einer  $-CH_2-CH_2-$ Gruppe gegen eine  $-S-S-$ Gruppe. Poly-L-Lys-SS-Phalloidin besaß eine nahezu gleichwertige Bindungskonstante wie Poly-D-Lys-CONH-Phalloidin. Gleiches galt für die beiden D-konfigurierten Polymere. Über eine  $-S-S-$ Gruppe gebunden waren auch die Derivate trojanischer Peptide und der Polyethylenglykole, von denen wir annahmen, daß ein Disulfidlinker auch hier keinen Einfluß auf die Aktin-Bindung hat. Der Sinn der  $-S-S-$ Gruppe liegt in einer effizienten Freisetzung des bioaktiven Toxins im reduktiven Milieu des Cytoplasmas. Wir haben diese intrazelluläre Reduktion *in vitro* vorweggenommen und diese Substanzen mit und ohne DTT-Zugabe auf ihre Aktin-Affinität im Vergleich zu Phalloidin bestimmt. Da in allen Fällen nach Reduktion ein identisches Thiolderivat des Phalloidin

gebildet wird, fanden wir Meßwerte, die im Rahmen der Versuchsanordnung als identisch gelten können (Faktor 2,3 bis 3,1 schlechter als Phalloidin).

Neben Größe und Ladung hatte die Position des Liganden im Toxinmolekül entscheidenden Einfluß auf die Filamentbindung. Erfolgte die Konjugation eines Liganden an das  $\beta$ -Hydroxyl-Aspartat<sup>2</sup> des Phallacidins, so war dies schädlicher für die Affinität als eine Substitution am  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup>. Poly-L-Lys-Phallacidin mit dem Polymer an Position 2 bindet zB. ca. 8-mal schlechter als Poly-L-Lys-CONH-Phalloidin mit dem Polymer an Position 7. Eine Erklärung hierfür ist die auf verschiedenem Wege erbrachte Erkenntnis, daß  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> der Bindungsstelle des Phalloidins am Aktin abgewandt ist. Die Position des  $\beta$ -Hydroxyl-Aspartat<sup>2</sup> liegt dagegen näher an der Kontaktzone; dementsprechend wirkt sich eine Derivatisierung an dieser Seitenkette negativer auf die Bindung des Toxins aus als in Position 7. Dies deckt sich mit Ergebnissen früherer Arbeiten der Forschungsgruppe (Wieland, 1986), die verschiedenste Umsetzungen mit chemischen Strukturen an der  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup>-Seitenkette durchführte. So wurde die Hydroxylgruppe der Seitenkette selektiv acetyliert (Faulstich & Wieland, 1971) und tosyliert (Wieland & Rehbinder, 1963). Die Monoacyl- bzw. Monotosyl-Produkte zeigten dabei nur leicht reduzierte Affinitäten am Aktin verglichen mit Phalloidin. Auch aus den Daten der Kleinwinkel-Röntgenbeugung von orientierten Aktin/Phalloidin-Gelen konnte die Relevanz der verschiedenen Toxinbereiche an der Aktinbindung gezeigt werden. Durch computergestützte Energieminimierungs-Algorithmen wurde errechnet, daß vermutlich eher die Bereiche des Tryptophanrings und der Hydroxyprolin-Seitenkette im Toxinpeptid am direkten Kontakt mit dem polymeren Filament beteiligt sind (Lorenz *et al.*, 1993). Die verlorene Aktinaffinität nach Derivatisierung der Indolylgruppe des Tryptophans während der Synthese des photoaktiven DNB-Phalloidin in der vorliegenden Arbeit bestätigt dies ebenfalls. Auch die Ergebnisse von Bindungsstudien mit einem Undecagold-Phalloidin am Aktin (Steinmetz *et al.*, 1998), wobei die Substitution dieses Restes ebenfalls am  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> erfolgte, zeigten, daß selbst sterisch äußerst ungünstige Liganden an diese Seitenkette gekoppelt werden können.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sind die Größe, die Ladung und die Position des Liganden am Toxin von entscheidender Bedeutung für die Aktinaffinität. Dabei beeinflusst eine Substitution an Position 7 des Phallotoxins die Affinität am wenigsten, hier verträgt das System selbst große Liganden. Aber auch am  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup> ist die Größe der Substitution nicht unbegrenzt, nachdem wir gefunden haben, daß ab einem Molekulargewicht des Liganden von ca. 20 kDa die Bindung am Aktin unter 1 % gegenüber Phalloidin absinkt.

Weiterhin konnten wir zeigen, daß, unabhängig von der Größe, kationische Reste in dieser Position die Affinität erhöhen.

## 5.2 Erhöhung der Membrangängigkeit durch lipophile Liganden

Die natürlichen Phallotoxine besitzen trotz der hohen Affinität zu Mikrofilamenten nur geringe Cytotoxizität, ausgenommen in Zellen, die ein phalloidin-spezifisches Transportsystem besitzen wie zB. Hepatocyten. Grund dafür ist die schlechte Membrangängigkeit der Phallotoxine. In dieser Arbeit gelang es die Membrangängigkeit der Phallotoxine durch Konjugation mit permeabilitätserhöhenden Liganden erheblich zu verbessern, sodaß sie auch in Zellen ohne spezifisches Transportsystem eindringen. Die Menge des in die Zellen eingedrungenen Toxins wurde indirekt als Cytotoxizität bestimmt. Aus der Cytotoxizität und der zuvor ermittelten relativen Bindungsaffinität am Muskelaktin ließ sich die Membrangängigkeit der verschiedenen semisynthetischen Konjugate abschätzen.

In einer ersten Gruppe wurde die Lipophilie der Phallotoxine durch Bindung an Benzoesäure, Salicylsäure, Octansäure, Myristoylsäure und Ölsäure erhöht. Wir konnten zeigen, daß alle diese Derivate im Vergleich zu Phalloidin eine deutlich erhöhte cytotoxische Wirkung auf Mausfibroblasten, Hela-Zellen und Jurkat-Zellen hatten. Aus den Ergebnissen der Proliferationsversuche (Tabelle 4.3), nach denen sich  $IC_{50}$ -Konzentrationen zwischen  $3,64 \times 10^{-4}$  M (Salicyl-Phalloidin) und  $2,5 \times 10^{-6}$  M (Oleoyl-Phalloidin) ergaben, und den Meßwerten der Aktinaffinitätsbestimmungen (Tabelle 4.2), lassen sich für die Konjugate der aromatischen Aminosäuren nur leicht erhöhte Membrangängigkeiten (Phalloidin = 1) zwischen Faktor 4 (Salicyl-Phalloidin) und Faktor 14 (Benzoyl-Phalloidin) ermitteln, während die Fettsäure-Konjugate eine Erhöhung um 185 (Octanoyl-Phalloidin) bis 9500 (Oleoyl-Phalloidin) besitzen. Eine mögliche Erklärung ist, daß die erhöhte Toxizität der Fettsäure-Toxine gegenüber den Konjugaten aromatischer Säuren in einer direkten Beziehung zum größeren Oktanol-Wasser-Koeffizienten der Fettsäure-Toxine steht.

Das Ölsäure-Aminophalloidin, in welchem die aliphatische Kette über eine Säureamidfunktion am Peptid gebunden ist, weist bei vergleichbarer Aktinaffinität (siehe oben) eine um den Faktor 50 erniedrigte Cytotoxizität gegenüber dem homologen Derivat mit Säureesterfunktion auf. Dies läßt den Schluss zu, daß die Cytotoxizität auch von der Art der chemischen Kopplung des Liganden am Toxin abhängig ist. Eine Freisetzung des Liganden

vom Toxin scheint für eine hohe Toxizität notwendig. Diese Freisetzung durch Hydrolyse verläuft bei einem Ester schneller als bei einem Amid. Einen Beweis für die These, daß hohe Cytotoxizität die Freisetzung des Toxins voraussetzt, lieferten die Ergebnisse aus den Versuchen mit einem weiteren Ölsäurederivat, das zwischen Säureamid-Gruppe und Ölsäure-Rest einen Disulfidlinker trug, also eine Gruppe, die in den Zellen reduktiv gespalten wird. Tatsächlich besitzt das Oleoyl-SS-Aminophalloidin eine fast ebenso hohe Cytotoxizität wie das Esterderivat (ca. 1,8 weniger toxisch). Demnach ist in der Zelle die Hydrolyse des Esters viel schneller als die Hydrolyse des Amids und eine reduktive Spaltung der -S-S-Gruppen unter Freisetzung des Toxins möglich.

Die in diesen Versuchen erzielte Verbesserung der Membrangängigkeit durch Erhöhung der Lipophilie wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. So verfügen diverse Peptide und Proteine als Konjugate mit hydrophoben Liganden und Lipiden, zB. Fettsäuren und aromatischen Säuren, eine deutlich erhöhte Membrangängigkeit (Hashimoto *et al.*, 1989; Honeycutt *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1997; Wong & Toth, 2001; Hussey & Peterson, 2002). Selbst äußerst hydrophile Strukturen, wie *antisense*-Oligonucleotide, zeigen eine mehrfach erhöhte Permeabilität nach Bindung lipophiler Liganden (Boutorin *et al.*, 1989; Letsinger *et al.*, 1989; Shea *et al.*, 1990; Vlassov *et al.*, 1994). Aber auch bei dem von sich aus schon hydrophoben Paclitaxel, einer Mikrotubuli-stabilisierenden Verbindung, konnte durch weitere Erhöhung der Lipophilie die Zellaufnahme nochmals verbessert werden (Bradley *et al.*, 2001).

Ähnlich wie das Paclitaxel, ein hydrophobes Mikrotubuli-stabilisierendes Toxin, das von sich aus Membranen durchdringen kann, kennt die Natur auch hydrophobe Aktin-stabilisierende Toxine, die leicht in Zellen eindringen können. In diese Gruppe gehören die Peptide und Depsipeptide Jasplakinolid (Scott *et al.*, 1988) aus dem marinen Schwamm *Jaspis johnstonii*, die Chondramide (Kunze *et al.*, 1995) aus dem Myxobacterium *Chondromyces crocatus* und das Dolastatin 11 (Bai *et al.*, 2001) aus dem Mollusken *Dolabella auricularia*. Nach bisherigen Erkenntnissen besitzen das Jasplakinolid (Bubb *et al.*, 1994) und die Chondramide (Holzinger & Lutz-Meindl, 2001) bei vergleichbarer Affinität dieselbe oder eine ähnliche Bindungsstelle am Aktin wie Phalloidin. Dolastatin 11 hingegen bindet an einer anderen Stelle im Filament. Vermutlich haben alle diese Substanzen aufgrund ihrer Lipophilie und damit verbundenen guten Membrangängigkeit eine hohe Cytotoxizität bei mikro- bis nanomolaren Konzentrationen. Wir haben in dieser Arbeit Chondramid bzw. Jasplakinolid direkt mit dem am stärksten wirkenden, lipophilen Phalloidinderivat, dem Oleoyl-Phalloidin,

verglichen und zwar in physikochemischer wie biologischer Hinsicht. Während das Oleoyl-Phalloidin in der DC einen  $R_F$ -Wert von 0,68 besitzt und damit deutlich lipophiler ist als das Phalloidin mit  $R_F$  0,33, zeigen Chondramide und Jasplakinolid  $R_F$ -Werte von  $> 0,90$ . Diese Reihenfolge der Lipophilie spiegelt sich in der Cytotoxizität wider, wo Oleoyl-Phalloidin zwischen dem nicht-toxischen Phalloidin und den hochgiftigen Chondramiden bzw. Jasplakinolid liegt (siehe Tabelle 4.3). Trotz ihrer guten Permeabilität werden Jasplakinolid, Chondramide und Dolastatin 11 in der molekularbiologischen Forschung aufgrund ihrer schlechten Verfügbarkeit und Aufarbeitung sowie fehlender Fluoreszenzmarkierung im Vergleich zu Phallotoxinen selten verwendet.

Die Abhängigkeit der Permeabilität und damit auch der Cytotoxizität von der Lipophilie zeigte sich auch innerhalb der Reihe der hier verwendeten hydrophoben Phallotoxin-Konjugate. Die Lipophilie wurde dabei über den Oktanol-Wasser-Koeffizienten bestimmt, der ein direktes Maß für die Lipophilie einer Substanz ist. Es wurde eine direkte Korrelation des Koeffizienten zur Toxizität beobachtet (siehe Tabelle 4.1 bzw. Tabelle 4.3). Dies deckt sich mit der Aussage von Palm *et al.* (1996), daß unter Beachtung einer einzigen physikochemischen Eigenschaft, der Lipophilie, eine gute Korrelation zumindest für eine Serie von homologen Verbindungen, hier Phallotoxine mit einem hydrophoben Liganden, möglich ist. Aber auch für strukturell verschiedene Verbindungen lassen sich nach Krämer (1999) experimentell ermittelte Verteilungskoeffizienten mit der Permeabilität über Caco-2 Zellmembranen vergleichen. Dabei zeigten insbesondere Verbindungen mit log D-Werten zwischen 0 und 3 eine gute Membrangängigkeit, während die Verbindungen mit log D  $> -1$  über schlechte Permeationseigenschaften verfügten. Dies entspricht trotz teilweise differierender experimenteller Methoden den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Phallotoxine, wie das natürliche Phalloidin und Phallacidin, mit Verteilungskoeffizienten zwischen -1 und -2 sind trotz hoher Aktinaffinität nicht cytotoxisch, während die Gifte mit Koeffizienten zwischen +1 und +2 Toxizitäten im milli- bis mikromolaren Bereich zeigen. Daß die deutlich erhöhte Toxizität des Oleoyl-Derivates verglichen mit dem Myristoyl-Toxin nicht nur auf die leicht erhöhte Lipophilie, sondern auch auf die durch die Doppelbindung Raum-bedingte, kompaktere Struktur zurückzuführen ist, kann nur vermutet werden.

Ein Nachteil, den alle lipophilen Phallotoxinen aber auch Jasplakinolid und Chondramide gemeinsam haben, ist die schlechte Löslichkeit im wäßrigen Milieu. Eine Verwendung im Zellkultursystem war jedoch durch Zugabe von DMSO (1 %) und Ultraschallbehandlung möglich.

---

### 5.3 Erhöhung der Membrangängigkeit durch trojanische Peptide und kationische Polymere

Seit gut einer Dekade kennt man Proteine von denen man annimmt, daß sie über einen Weg in das Cytoplasma von Zellen gelangen, der von Energie und Transportproteinen unabhängig ist. Erste Arbeiten zu diesem Thema erschienen nach der gelungenen Reinigung des HIV-1 Tat-Proteins (Frankel & Pabo, 1988; Green & Loewenstein, 1988), das nach Zugabe in die Zellkultur die Zellmembran und die Kernhülle durchquerte und die Transkription viraler Gene transaktivierte. Später wurden weitere Proteine, wie das *Drosophila* Antennapedia-Protein (Derossi *et al.*, 1994) und das Herpes Simplex Virus (HSV-1) Strukturprotein VP22 (Elliott und O'Hare, 1997) entdeckt, die die Zellmembran in Abwesenheit eines spezifischen Transportweges permeierten. Durch eingehendere Untersuchungen wurden spezifische Domänen innerhalb der Aminosäuresequenz dieser Proteine gefunden, die für diese Eigenschaften verantwortlich waren und daher den Namen "*protein transduction domains*" (PTDs) erhielten. Diese PTDs bestehen aus 10-30 Aminosäuren und sind reich an basischen Aminosäuren, insbesondere an Arginin und Lysin (Vives *et al.*, 1997; Fawell *et al.*, 1994). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß sie nicht nur die viralen Proteine über Zellmembranen transportieren, sondern eine Vielzahl von Verbindungen nach Kopplung an andere biologisch aktive Komponenten in die Zelle zu transportieren vermochten. So konnten zB. Antikörper und Enzyme, aber auch andere Proteine, diverse Wirkstoffe und sogar Liposomen und supermagnetische Eisenpartikel mit einem Durchmesser von 40nm, an die PTD gebunden, effektiv transduziert werden (Fawell *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1993; Allinquant *et al.*, 1995; Rothbard *et al.*, 2000; Torchilin *et al.*, 2001).

Durch Bindung an Phallotoxine sollten die transduktiven Eigenschaften der PTDs auch eine effiziente Aufnahme dieser Toxine in Zellen gewährleisten. In dieser Arbeit konnte das Antennapedia-Peptid aus *Drosophila* aufgrund synthetischer Probleme nicht an das Toxingerüst gekoppelt werden. Eventuell befindet sich die aktive Thiolgruppe der PTD in einer sterisch gehinderten Position, sodaß ein Thiol-Disulfidaustausch nicht möglich war. Erfolgreich war dagegen die Herstellung des Tat-Phalloidins (siehe Abbildung 4.9), wo die Sequenz 48-57 des Tat-Peptides, die die vollständige basische Region und das "*nuclear localization signal*" (NLS) des HIV-Transaktivierungsproteins Tat umfaßt, in hoher Ausbeute über eine Disulfidbrücke des zusätzlich eingeführten acetylierten Cysteinylglycerins gebunden werden konnte. Da sich Tat-PTD durch einen hohen Gehalt an Arginin-Resten (6

---

Arg in Tat<sup>48-57</sup>) auszeichnet, wollten wir überprüfen, ob die besondere Membranpenetrations-Eigenschaft möglicherweise eine Folge der angehäuften basischen Aminosäuren ist, daß also die herausragenden Eigenschaften der sogenannten trojanischen Peptiden eventuell auf ihren kationischen Charakter zu reduzieren seien. Daher wurde parallel ein Arg<sub>8</sub>-Rest über einen identischen Linker an das Toxingerüst gekoppelt. Neben diesen kationischen Peptiden wurde eine andere Aminosäuresequenz an Phallotoxine gebunden, die der hydrophoben Region des Signalpeptides des Kaposi "*fibroblast growth factor*" (K-FGF) entspricht (siehe Abbildung 4.9). Hier bestehen 8 von 16 Aminosäuren aus Valin und Leucin, bei den anderen Aminosäure-Resten handelt es sich um Alanin und Prolin (Lin *et al.*, 1995). Diese Sequenz wurde u.a. an eine Vielzahl von Caspase-Peptidinhhibitoren gebunden, die inzwischen kommerziell erhältlich sind (siehe zB. Calbiochem, San Diego).

Obwohl die Aktinaffinität im Bindungsassay ca. 40-mal (Tat-SS-Phalloidin) bzw. ca. 60-mal (Arg<sub>8</sub>-SS-Phalloidin) schlechter war als bei freiem Phalloidin, zeigten beide kationischen Derivate bei hervorragender Löslichkeit im wäßrigen Milieu eine hohe Cytotoxizität. Wir erklären die hohe Aktivität durch eine vollständige Reduktion des Disulfidlinkers in der Zelle. Das Tat-Konjugat war mit mindestens 260-fach erhöhter Toxizität in Mausfibroblasten gegenüber Phalloidin nochmals deutlich giftiger als das Arg<sub>8</sub>-Derivat (ca. 90-fach erhöht). Daraus kann man schließen, daß die kationischen Gruppen des Tat-Peptids einen entscheidenden Beitrag an der erhöhten Permeabilität der Konjugate haben. Dieser Befund deckt sich zB. mit diversen, durch Mutationen gewonnenen Sequenzen, die zeigten, daß eine Substitution der basischen Reste gegen Alanin, im Tat<sup>49-57</sup>-Fluorescein-Peptid mit einer deutlich reduzierten Aufnahmeeffizienz verbunden war (Wender *et al.*, 2000). Wender *et al.* konnten in derselben Arbeit, die auf einer cytometrischen Auswertung der Fluoreszenzstärke in Jurkat-Zellen beruhte, sogar zeigen, daß L-Arg<sub>9</sub> eine 20-mal effizientere Proteintransduktion als das Tat-Peptid<sup>49-57</sup> besaß und ein D-Arg<sub>9</sub> sogar 100-mal effizienter war als das L-konfigurierte Peptid. In einer neueren Arbeit (Rothbard *et al.*, 2002) verwendete die gleiche Forschungsgruppe Peptid-Decamere mit mindestens sieben Arginin-Resten, wobei Peptide, die innerhalb der Arginin-Kette mit anderen Aminosäuren alternierten, eine bessere Penetration zeigten als ein L-Arg<sub>9</sub>-Peptid, das nur aus Arginin-Resten bestand. Diese neueren Resultate stehen in sehr gutem Einklang mit den hier erhaltenen Ergebnissen. Auch hier zeigte das Tat-SS-Phalloidin, das gleichfalls über weitere Aminosäuren innerhalb seiner Arginin-Reste verfügt, eine etwa 3-mal bessere Aufnahmeeffizienz als das reine Arg<sub>8</sub>-Derivat. Entscheidend ist in beiden Fällen jedoch das Vorhandensein der Arginin-Gruppen bzw. derer positiven Ladung. Wender *et al.* (2000) berichteten, daß kationische Peptide, die Histidin,

Lysin und Ornithin enthalten, über eine deutlich schlechtere Penetration verfügten und führten dies auf strukturelle Eigenheiten der Guanidiniumkopfgruppe zurück. Eventuell sollte man jedoch auch berücksichtigen, daß nur das Arginin in dieser Reihe von Aminosäuren über ein permanentes Kation in allen pH-Bereichen verfügt und daher einzig die Ladungsdichte für die Aufnahme verantwortlich sein könnte.

Im Kaposi-SS-Phalloidin ist die Bindung an Aktin noch geringer als bei den kationischen Derivaten (ca. Faktor 80 schlechter als Phalloidin). Geht man auch hier von einer Spaltung des identischen S-S-Linkers aus, so kann man aus der wesentlich höheren IC<sub>50</sub>-Konzentration und der damit verbundenen geringen Cytotoxizität, die nur wenig höher ist als die des Phalloidins, auf eine nur geringe Permeationsverbesserung durch dieses Peptid schließen. Dies entspricht neueren Ergebnissen von Fischer *et al.* (2002), die eine geringere Aufnahme und cytometrische Nachweisbarkeit von diversen Fluorophor-markierten Kaposi-FGF-Peptiden zB. gegenüber Anntenapedia-Homeodomänen-Peptiden zeigten (Faktor 3-4 schlechter). Ein weiterer Nachteil des Kaposi-Peptides ist neben seiner aufwendigeren Synthese die schlechte Löslichkeit im wäßrigen Medium.

Man kann eine strukturelle Analogie zwischen den vorwiegend über seine kationischen Reste wirkenden Tat-Peptide und den polymeren (MW = 4,000 - 200,000) kationischen Aminosäuren Lysin, Ornithin und Arginin ziehen. Diese homopolymeren Kationen dringen ebenfalls in Zellen (Ryser, 1967; Emi *et al.*, 1997) ein. Es wurde beobachtet, daß Polylysin eine Vielzahl von Biomolekülen, wie Albumin und Meerrettich-Peroxidase (Polylysin MW = 6700) (Shen & Ryser, 1978), aber auch Methothrexat (Polylysin MW = 70,000) (Ryser & Shen, 1978), Oligonucleotide (Polylysin MW = 14,000) (Leonetti *et al.*, 1990) und Adenoviren (Polylysin MW = 20,500) (Mulders *et al.*, 1998), effizient in Zellen befördern kann. Weiterhin wurden Polylysin Peptoid-Derivate für "*gene delivery*" genutzt (Murphy *et al.*, 1998). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden Poly-Ornithin-Konjuagte des  $\beta$ -Amanitins und Phalloidins synthetisiert, die eine hohe Cytotoxizität gegenüber zB. CHO-Zellen besaßen (Bermbach & Faulstich, 1990; Göck, 1991 nicht publiziert).

Durch die Verwendung des Polylysins gelang es uns, Phalloidin an ein kationisches Polymer mit deutlich geringerer Eigentoxizität zu binden. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der Cytotoxizität nicht nur von der Kopplungsposition am Toxingerüst, sondern auch von der Linkerstruktur und der Konfiguration des Polymers. Es wurde beobachtet, daß polymere Derivate, bei denen die  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup>-Seitenkette (Phalloidin-Derivate) substituiert wurde, deutlich giftiger waren als solche bei denen  $\beta$ -Hydroxyl-Aspartat<sup>2</sup> (Phallacidin-

Derivate) zur Bindung genutzt wurde. Dieser Effekt war unabhängig von der Konfiguration des Polymers (siehe Tabelle 4.3). Der Grund für die niedrigere Cytotoxizität der  $\beta$ -Hydroxyl-Aspartat<sup>2</sup>-konjugierten Toxine beruht vermutlich auf der deutlich niedrigeren Aktinaffinität im Vergleich zu den  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup>-konjugierten Toxinen und weniger auf der differierenden Permeation. Innerhalb der  $\delta,\gamma$ -Dihydroxyleucin<sup>7</sup>-konjugierten Gruppe wurden Toxine mit und ohne Disulfidlinker verwendet. Sowohl Poly-L-Lys-CONH-Phalloidin und Poly-L-Lys-SS-Phalloidin, als auch Poly-D-Lys-SS-Phalloidin verfügen über eine hohe Cytotoxizität (mindestens ca. 200-300 mal höher als Phalloidin), während das Poly-D-Lys-CONH-Phalloidin überraschenderweise um den Faktor ca. 10 weniger giftig ist. Da alle vier Verbindungen ähnliche schlechte Aktinaffinitäten haben, kann man daraus schließen, daß eine Hydrolyse katalysiert durch Trypsin-ähnliche Enzyme für die Spaltung des Poly-L-Lysins verantwortlich ist. Eine analoge Hydrolyse des D-konfigurierten Polylysins ist nicht zu erwarten. Sobald jedoch ein Disulfidlinker vorhanden ist, ist auch eine Abspaltung des Toxins vom D-Polymer durch Reduktion möglich. Eine ähnliche Beobachtung machten Laurent *et al.* (1998), die Versuche mit Plasmid-DNA durchführten, die mit Poly-L-Lysin oder Poly-D-Lysin komplexiert war. Die Plasmid-DNA war dabei *in vivo* (Rattenleber) weniger von Degradation betroffen wenn sie mit D-Polymer assoziiert war, als wenn sie an das L-Stereoisomer gebunden war. Auch hier wurde daraus geschlossen, daß nur eine Metabolisierung des Poly-L-Lysins stattfindet.

Seit etwa 20 Jahren werden Protein- und Peptid-Wirkstoffe "pegyliert", indem sie an Polyethylenglykol-Ketten (PEG) unterschiedlicher Länge gebunden werden. Hierdurch wurde die Spaltung durch proteolytische Enzyme erschwert, die kurze Zirkulations-Halbzeit verlängert, die Ausschüttung über die Nieren verlangsamt und die Immunogenität herabgesetzt (Roberts *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2001; Bailon *et al.*, 1998). Zudem ermöglichten diese Reste ein Tumor-Targeting aufgrund des sogenannten EPR-Effekts ("*enhanced permeability and retention*"; siehe unten). PEG besitzt geringe Eigentoxizität und wird vom Körper über die Nieren (< 30 kDa) oder Faeces (> 20 kDa) ausgeschieden. In den eigenen Versuchen nach Kopplung mit Phallotoxine konnte mit zunehmender Kettenlänge eine Toxizität in Mausfibroblasten beobachtet werden. MPEG<sub>22600</sub>-SS-Phalloidin zeigte sich mindestens 100-mal toxischer als Phalloidin und 10-mal toxischer als MPEG<sub>810</sub>-SS-Phalloidin, MPEG<sub>5200</sub>-SS-Phalloidin lag, wie zu erwarten, ungefähr in der Mitte. Da die PEG-Derivate teilweise mehr als 100-mal schlechter am Aktinfilament binden, ist auch hier von einer Freisetzung des Toxins durch Reduktion der S-S-Gruppe auszugehen.

## 5.4 Aufnahme durch Endocytose

Die Plasmamembran ist eine dynamische Struktur, die das intrazelluläre Milieu von der Umgebung trennt, die aber den Eintritt und Austritt von Molekülen in geregelter Weise gestattet. Während kleine Moleküle wie Aminosäuren, Zucker und Ionen die Membran über Pumpen und Kanäle passieren, sind für die Aufnahme von Proteinen und Peptiden vier Typen von Mechanismen bekannt. Dazu gehören die (1) hoch-spezifische, rezeptor-abhängige Endocytose, (2) die adsorptions-abhängige Endocytose von Molekülen, die auf der Zelloberfläche haften, (3) die nicht-spezifische Flüssigphasen-Endocytose von Verbindungen, die in der extrazellulären Flüssigkeit gelöst sind und (4), nur auf bestimmten Zellen wie zB. Hepatocyten und intestinalen Endothelzellen, der carrier-abhängige Transport kleiner Peptide (Gardner, 1994; Heyman *et al.*, 1990; Kumagai *et al.*, 1987; Partridge *et al.*, 1991; Sai *et al.*, 1998; Conner & Schmid, 2003). In letzter Zeit erschien eine Vielzahl von Publikationen, die einen weiteren Aufnahmemechanismus über die PTDs beschreiben, d.h. von Peptiden mit einer Länge von 9 bis 30 Aminosäuren, die anscheinend über die Fähigkeit verfügen die Plasmamembran zu durchqueren, selbst wenn sie konjugiert sind mit Peptiden, Proteinen, Oligonucleotiden, Plasmiden und nanometer-großen Partikeln.

Die PTD-Sequenzen varriieren von hydrophob bis deutlich hydrophil und penetrieren überraschenderweise alle die zelluläre Membran über einen energie-unabhängigen Mechanismus (Green & Lowenstein, 1988; Frankel & Pabo, 1988; Joliot *et al.*, 1991; Elliott & O'Hare, 1997; Prochiantz, 2000). Dabei ist der genaue Prozess der Aufnahme bis heute ungeklärt: eine rezeptor-abhängige Endocytose wurde auf den Befund hin ausgeschlossen, daß D-Aminosäure-Peptide genauso effizient sind wie die L-konfigurierten Gegenstücke (Mitchell *et al.*, 2000). Nahezu alle Zellen nahmen dabei die Peptide bzw. ihr Cargo in einem temperatur-unabhängigen Mechanismus auf, d.h. es wurde zwischen 37°C und 4°C keine Differenz festgestellt (Vives, Brodin *et al.*, 1997; Vives, Granier *et al.*, 1997; Futaki *et al.*, 2001; Polyakov *et al.*, 2000). Nur in einer Arbeit (Mitchell *et al.*, 2000) wurde in Jurkat-Zellen eine etwas geringere Effizienz bei 3°C gegenüber 23°C beobachtet. Eine Reduktion des ATP-Pools in der Zelle durch Behandlung mit Natriumazid und 2-Desoxy-D-Glucose hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die Transporteffizienz. Da Endocytose ein Energie-abhängiger Mechanismus ist, ging man bisher davon aus, daß es sich um eine direkte Membranpenetration handeln könnte (Derossi *et al.*, 1996; Derossi *et al.*, 1998; Schwarze *et al.*, 2000). Es wurde schließlich ein Internalisierungsmodell auf der Basis invertierter Micellen entwickelt.

---

In dieser Arbeit wurde die Aufnahme der trojanischen Peptide in Mausfibroblasten MF/LDB durch Toxizitätskinetiken und Konfokal-Mikroskopie unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Liganden untersucht und der Aufnahme von Oleoyl- und Polylysyl-Verbindungen gegenüber gestellt. Im Unterschied zu allen bisherigen Arbeiten zu diesem Thema erfolgte hierbei erstmals die Quantifizierung der Internalisierungseffizienz von Konjugaten trojanischer Peptide über die Bioaktivität des Liganden, die Cytotoxizität, und nicht über eine Bestimmung der Fluoreszenzstärke entsprechender Konjugate im FACS-Gerät. Letztere Methode unterscheidet nicht zwischen internalisierten und an der Oberfläche adsorbierten Molekülen, während Cytotoxizität durch Phallotoxine die Internalisation voraussetzt. Zudem erfolgten die Beobachtungen im Mikroskop nicht an MeOH- oder Formaldehyd-fixierten Zellen, sondern im lebenden System.

Die Versuche zur Aufnahmekinetik waren so ausgelegt, daß mit Toxin-Konjugaten inkubierte Mausfibroblasten nach bestimmten Zeiten (siehe Kapitel 4.7.2) vom Medium befreit und in PBS gewaschen wurden. Nach 72h wurde die Hemmung der Proliferation bestimmt. Sie beruht nicht nur auf der Toxinmenge, die innerhalb der Inkubationszeit in das Zellinnere gelangt war, sondern auch auf der Menge, die innerhalb der Inkubationszeit an die Zellmembran gebunden hatte, durch den Waschschrift mit PBS nicht entfernt wurde und erst in der Folge internalisiert wurde. Zur Überraschung war der toxische Effekt des Tat-SS-Phalloidin sehr gering und erreichte erst 12h nach Zugabe des Toxins in das Medium einen Bruchteil (ca. 10 %) des Wertes einer 72-stündigen Toxinierung. Dies steht im starken Widerspruch zu den oben genannten Arbeiten, die eine Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Konjugaten innerhalb weniger Minuten in das Cytoplasma und sogar in den Kernbereich beobachteten. In den mikroskopischen Studien an lebenden Mausfibroblasten (siehe Kapitel 4.8) konnte gezeigt werden, daß TRITC- bzw. FITC-markiertes Tat-Peptid zunächst an die Zellmembran binden und daher im konfokalen Schnitt innerhalb weniger Minuten einen fluoreszierenden, corona-ähnlichen Kranz an der Membran bilden, um dann innerhalb der ersten 6h in Vesikel-Strukturen zu erscheinen. Ebenso wurden die anderen Fluoreszenz-markierten, kationischen Permeations-Enhancer Arg<sub>8</sub> und Poly-L(-D)-Lysin, aber auch die lipophile Ölsäure in vergleichbarem zeitlichen Verlauf in Vesikeln beobachtet, wobei aufgrund der Doppelfärbungen gezeigt werden konnte, daß die Aufnahme aller Verbindungen in identische zelluläre Kompartimente erfolgte. Da in den mikroskopischen Studien die Bildung der fluoreszierenden Vesikel zumindest für die trojanischen Peptid-Konjugate und die Ölsäure-Derivate deutlich schneller war als das Auftreten cytotoxischer Effekte, und die Polylysyl-Derivate trotz identischer Fluoreszenz-Beobachtungen deutlich

schneller ihre Giftwirkung entfalten, lassen sich folgende Schlüsse für die Effizienz der Permeations-erhöhenden Strukturen ziehen:

Entscheidend ist zunächst eine hohe Affinität der Verbindungen zur Zellmembran, unabhängig davon ob diese Bindung nun auf hydrophoben Wechselwirkungen der Membran mit einem lipophilen Liganden (zB. Ölsäure) beruht, oder auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen kationischen Komponenten (zB. Polylysin, Tat-Peptid, Arg<sub>8</sub>-Peptid) und dem negativ geladenen Lipid-Bilayer. Hierbei kommt es innerhalb kurzer Zeit zur Ausbildung eines dynamischen Gleichgewichts zwischen Medium und Zelloberfläche. Die höhere Cytotoxizität der Polylysyl-Toxine bereits nach kurzen Inkubationszeiten ließe sich demnach nicht durch die schnellere Aufnahme in die Zelle erklären, sondern durch die vielfachen elektrostatischen Wechselwirkungen der polymeren Kationen mit der Membran, die das dynamische Gleichgewicht der Polykationen ganz auf die Seite der Zelloberfläche verlagern und so eine sehr effiziente Endocytose gestatten. Konjugate der Ölsäure und des Tat-Peptids, die nach den Beobachtungen der Fluoreszenzmikroskopie in vergleichbarer Zeit in Vesikeln erscheinen, hätten aufgrund der weniger effizienten Membranbindung eine geringere Endocytoserate, und daher eine langsamere Toxizitätskinetik. Da alle Verbindungen trotz vollkommen unterschiedlicher Struktur und physikochemischer Eigenschaften in identischen Vesikeln gefunden wurden, kann man eine nicht-spezifische, adsorptive Endocytose als Internalisierungs-mechanismus postulieren. Bei identischem Mechanismus der Aufnahme resultiert demnach die Effizienz der Verbindungen in erster Linie auf einer hohen Membranaffinität.

Von vergleichbarer Bedeutung für die Cytotoxizität ist jedoch auch die effiziente chemische Abspaltung des bioaktiven Liganden und dessen Übertritt aus dem endocytotisch bzw. lysosomalen Kompartiment in das Cytoplasma. In den letzten beiden Punkten liegt wahrscheinlich die Erklärung für das verzögerte Erscheinen des cytotoxischen Effektes verglichen mit der frühen Bildung Fluoreszenz-markierter Vesikel im Zellinnern. Dies wird gestützt durch die Mikroskopie von Zellen, die mit Tetramethylrhodamin-Phalloidin inkubiert wurden. Dieses wird aufgrund seines kationischen Charakters, und im Gegensatz zu dem anionischen Fluorescein-Phalloidin, zunächst ebenfalls innerhalb 1h an der Zellmembran, nach 6h in endosomalen Kompartimenten gefunden und erscheint erst nach 12h bis 24h als Färbung von Mikrofilamenten im Cytoplasma. Die Relevanz einer effektiven Freisetzung aus den Vesikeln spiegelt sich auch aus den Versuchen mit Poly-L-Lysin-CONH-Phalloidin und Poly-D-Lysin-CONH-Phalloidin wider, wobei nur das L-konfigurierte Isomer durch Proteolyse Trypsin-ähnlicher Enzyme in niedermolekulare, biologisch aktive Phalloidin-

---

Derivate gespalten werden kann und über hohe Cytotoxizität verfügt. Über den Mechanismus der Freisetzung des niedermolekularen Toxins aus den Vesikeln kann aufgrund der Versuchsanordnung keine Aussage getroffen werden.

Der aus früheren Arbeiten formulierte Mechanismus einer direkten Transduktion der trojanischen Peptide über die Zellmembran wird durch diese Ergebnisse in Frage gestellt (Vives *et al.*, 1997; Derossi *et al.*, 1996; Futaki *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Mitchell, 2000; Wender *et al.*, 2000). Alle früheren Versuche beruhten im Gegensatz zu den hier vorgestellten *in vivo*-Studien auf der Verwendung von Fluoreszenz-markierten Verbindungen in Zellen, die mit Formaldehyd oder MeOH fixiert waren. Erst kürzlich konnte beobachtet werden, daß eine Fixierung von Zellen mit MeOH zu einer artifiziellen, nukleären Assoziation des VP22-Proteins, das ebenfalls über eine PTD verfügt, an Histon H1 führt (Lundberg & Johansson, 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß ein cytotoxischer Effekt des Tat-SS-Phalloidin erst nach 12h bis 24h eintritt, während nach Fixierung identisch behandelter Zellen in Paraformaldehyd und Färbung des Mikrofilaments mit Tetramethylrhodamin-Phalloidin bereits nach 1h bis 6h eine Schädigung der Aktinstrukturen im Cytoplasma zu beobachten ist. Lebende Zellen, die mit Tetramethylrhodamin-Tat oder Fluorescein-Tat inkubiert waren, besaßen innerhalb dieser Dauer jedoch keine cytoplasmatische Fluoreszenz, sondern nur Färbung in endosomalen Kompartimenten. Demnach scheint es durch den Prozess der Fixierung zu einer Freisetzung des Tat-Peptides bzw. dessen Konjugates aus den Vesikeln zu kommen. Eventuell wurde aufgrund seiner kationischen Ladung durch Wechselwirkung mit den negativen Nukleinsäuren auch deswegen bisher immer eine rasche Kernlokalisation beobachtet.

Desweiteren sollte man bei den bisherigen Versuchen mit fluoreszierenden, trojanischen Peptidkonjugaten den Aspekt mit einbeziehen, daß in der FACS-Analyse eine Bindung an der Zellmembran der Substanzen nicht von einer Internalisierung der Fluorochrome unterschieden werden kann. Dies würde erklären, weshalb die Aufnahme nach kurzer Zeit bei 37°C wie bei 4°C als auch bei Reduktion des ATP-Pools der Zelle identisch erschien. Tatsächlich bestätigt eine aktuelle Arbeit von Richard *et al.* (2003) diesen Befund, da hier erstmals eine Trypsinierung der Zellen vor FACS-Analyse durchgeführt wurde, was vermutlich direkt zur Spaltung des Peptides führte. Nach Abspaltung des Membran-gebundenen Fluorochroms konnte eine Verschlechterung der Aufnahme bei 4°C gegenüber 37°C als auch bei Auslöschung des ATP-Pools gemessen werden. Die Autoren dieses Artikels kommen

schließlich ebenfalls zu dem Ergebnis, daß die Auswertungen der Versuche nur eine endocytotische Aufnahme der PTDs zulassen.

Gegen eine endocytotische Aufnahme spricht trotz dieser neuen Erkenntnisse weiterhin die Tatsache, daß selbst große Proteine wie die  $\beta$ -Galactosidase oder Nanopartikel in das Cytoplasma transportiert wurden. Nach dem physikalisch-chemischen Grundverständnis läßt sich eine Permeation solcher Strukturen über die Membran eines endosomalen Vesikels nur schwer verstehen. Eventuell werden geringe Mengen von Verbindungen bei der Fusion von Vesikeln freigesetzt oder Vesikel werden aufgelöst und geben ihren Inhalt frei.

## 5.5 Änderung der Zellmorphologie und Mikrofilamentstruktur

Fluoreszierende Phallotoxine eignen sich aufgrund ihrer hohen Bindungs-Spezifität hervorragend zur Färbung des Aktinfilaments in Zellen. Aufbauend auf den Erkenntnissen zur Erhöhung der Zellaufnahme (siehe oben) wurden Phallotoxinverbindungen hergestellt, die die Eigenschaften der Aktin-Visualisierung mit einer effizienten Membranpermeabilität verbinden sollten. Dazu wurden Phallotoxine synthetisiert, die sowohl über eine fluorochrome Gruppe als auch einen Permeations-erhöhenden Liganden verfügten. Die Produkte TRITC-Oleoyl-Phalloidin und FITC-Oleoyl-Phalloidin unterschieden sich in Quantität und Qualität der Zellaufnahme allerdings kaum von den "nur-fluoreszierenden" Verbindungen TRITC-Phalloidin und FITC-Phalloidin ohne Permeations-Enhancer.

Das kationische TRITC-Phalloidin zeigte sich nach Zugabe in das Medium innerhalb weniger Stunden durch rot-fluoreszierende, endosomale Vesikel im Innern von Mausfibroblasten. Auch das TRITC-Oleoyl-Phalloidin, das neben der fluorophoren Gruppe an Position 2 den Liganden Ölsäure an Position 7 trägt, zeigte eine ähnlich effiziente Aufnahme in die Zellen. Dabei gelangte das TRITC-Oleoyl-Phalloidin weder schneller noch in größeren Mengen in die Zellen als TRITC-Phalloidin ohne Permeations-Enhancer. Das kationische Tetramethylrhodamin im TRITC-Phalloidin scheint aufgrund seiner Ladung für eine endocytotische Aufnahme ausreichend. Eine zusätzliche Oleoylgruppe im TRITC-Oleoyl-Phalloidin verbessert offenbar die Aufnahme nicht, da sich vermutlich die Permeations-erhöhenden Effekte von kationischer Ladung und lipophilem Ligand bei der Membrananlagerung kompensieren oder aber die enzymatische Freisetzung der Ölsäure aufgrund sterischer Hinderung durch das Tetramethylrhodamin in der Zelle nicht effizient ist.

---

Das anionische FITC-Phalloidin zeigte sich im Gegensatz zu den kationischen TRITC-Phallootoxinen erst ca. 24h nach Zugabe in das Medium durch schwach grün-fluoreszierende Vesikel im Zellinnern. Dies entspricht der Annahme (siehe oben), daß anionische Verbindungen nur geringe Wechselwirkungen mit der ebenfalls anionischen Zellmembran zeigen und daher die Adhäsion und die Aufnahme in die Zelle gering ist. Wider unserer Erwartung besaß auch das FITC-Oleoyl-Phalloidin, das neben dem Fluorescein an Position 2 die Ölsäure an Position 7 trägt, trotz Permeabilitäts-erhöhendem Liganden eine sehr geringe Membrangängigkeit. Die Fluoreszenz im endosomalen Kompartiment war bei FITC-Oleoyl-Phalloidin nur geringfügig gegenüber FITC-Phalloidin erhöht. Vermutlich neutralisiert beim FITC-Oleoyl-Phalloidin die elektrostatische Abstoßung des anionischen Fluoresceins von der negativ-geladenen Zellmembran die lipophilen Wechselwirkungen der Oleoylgruppe mit dem Lipid-Bilayer.

Für eine Untersuchung morphologischer Veränderungen *in vivo* eignen sich die FITC-Phallootoxine aufgrund fehlender Membrangängigkeit nicht. Doch auch die beiden TRITC-Derivate sind trotz guter Permeabilität nur bedingt verwendbar. Zum einen ist die Dauer von mehreren Stunden zwischen Zugabe in das Medium und Färbung des Filamentsystems durch die Aufnahme über ein endocytotisches System für gängige zellbiologische Fragestellungen zu lang. Außerdem führt die Endocytose zu einer kräftigen Hintergrundfärbung durch fluoreszierende Vesikel, sodaß der geringe Anteil des Toxins, der in das Cytoplasma gelangt ist, nicht mehr erkannt wird.

Um die Veränderungen des Mikrofilamentssystems nach Zugabe von membrangängigen Phallootoxinen zu untersuchen, konnten aus diesen Gründen keine fluoreszierenden und gleichzeitig membrangängigen Phallootoxine für eine Beobachtung lebender Zellen verwendet werden. Stattdessen wurden Zellen mit nicht-fluoreszierenden, membrangängigen Phallootoxinen vergiftet, fixiert, permeabilisiert und das veränderte Mikrofilamentsystem durch TRITC-Phalloidin bzw. Alexa-Green®-Phalloidin (Molecular Probes) gefärbt. Damit war eine Beobachtung *in vivo* ausgeschlossen, gleichzeitig jedoch eine Colorierung der Nukleinsäuren und damit insbesondere des nukleären Bereiches durch DAPI bzw. Propidiumiodid möglich.

Die Wirkung Aktin-stabilisierender Agenzien auf das Mikrofilamentsystem wurden bisher *in vivo* bzw. in fixierten Zellen untersucht. Für die *in vivo*-Versuche wurden fluoreszierende Phalloidine durch invasive Methoden in das Zellinnere gebracht. So konnte durch

Mikroinjektion fluoreszierender Phallotoxine Stressfaser-Strukturen in Fibroblasten (Wehland & Weber, 1977; Wehland & Weber, 1980; Wehland & Weber, 1981; Wang, 1987) und die Aktinverteilung während der Cytokinese (Hamaguchi & Mabuchi, 1982; Terasaki, 1996) beobachtet werden. Mithilfe von Elektroporation gelang eine Untersuchung der morphologischen Veränderungen durch fluoreszierende Phallotoxine in *Dictyostelium*-Amoeben (Lee *et al.*, 1998). Neben diesen Versuchen in lebenden Systemen wurden membrangängige, Aktin-stabilisierende Gifte in fixierten Zellen genutzt. Dazu wurden Zellen mit Jasplakinolid (Lee *et al.*, 1998; Sawitzky *et al.*, 1999), Dolastatin 11 (Bai *et al.*, 2001) und Cyclochlorotin (Ohmi *et al.*, 2001) vergiftet und die Auswirkungen auf das Mikrofilamentsystem nach Fixierung durch Färbung mit fluoreszierenden Phallotoxinen beobachtet.

Ein überraschender morphologischer Befund nach Vergiftung von Zellen durch Aktin-stabilisierende Reagenzien ist eine Disintegration der geordneten Filamentstrukturen, insbesondere der Aktin-Bündel (*bundles*), obwohl die Verbindungen Phalloidin, Jasplakinolid und Dolastatin 11 *in vitro* und *in vivo* Filamente stabilisieren und demnach eher ein Schutz der geordneten Strukturen erwartet wird. Eine mögliche Erklärung liegt eventuell darin, daß Zellen für den Erhalt geordneter Aktin-Strukturen eine permanente Reparatur von Filamenten benötigen, die durch Scherkräfte gebrochen werden. Diese Erneuerung der Filamente könnte in toxisierten Zellen aufgrund der geringeren Konzentration an freien Aktin-Monomere nur noch bedingt stattfinden (Faulstich *et al.*, 1977; Estes *et al.*, 1981). Alternativ könnten Filament-stabilisierende Gifte auch mit Aktin-Bindeproteinen um Bindungsplätze konkurrieren, und so ebenfalls die beobachteten Effekte auslösen. Außer Frage steht, daß es sich bei den beobachteten, disintegrierten Strukturen ebenfalls um filamentöses Aktin handelt, da sonst eine Färbung durch Tetramethylrhodamin-Phalloidin unmöglich gewesen wäre.

Um einen möglichst äquitoxischen Effekt zu gewährleisten, wurden alle Gifte mit Ausnahme des natürlichen Phalloidins in der zuvor ermittelten IC<sub>50</sub>-Konzentration eingesetzt. Aufgrund des gleichen Wirkmechanismus der Toxine wurde von einer qualitativ ähnlichen Veränderung der Zellstruktur durch die Vergiftung ausgegangen, die sich nur im zeitlichen Verlauf durch die verschiedenen Permeations-erhöhenden Liganden unterscheiden sollte. Zur Überraschung zeigten die verschiedenen Gifte jedoch qualitativ deutlich voneinander abweichende Wirkungen auf die Zellen. So änderte sich durch die Vergiftung mit Phalloidin die spindelartige Form typischer Fibroblasten innerhalb kurzer Zeit (1h) in rundliche *Birdsnest*-Zellen. Diese vergrößerten sich nach 24h zu *Riesenzellen*, die über ein Vielfaches des

ursprünglichen Zellvolumens verfügten. Eventuell beruht dies auf dem Umstand, daß Phalloidin aufgrund der fehlenden Cytotoxizität nicht in der  $IC_{50}$ -Konzentration dem Medium zugesetzt wurde, sondern in  $10^{-3}$  M Konzentration. Da das Aktinfilament der Fibroblasten weiterhin erhalten schien, die Zellform sich jedoch änderte, scheint dieser Effekt weniger aus einer Aktin-Stabilisierung des Toxins hervorzugehen, sondern vielmehr auf osmotischem Stress oder einer Membranschädigung durch die hohe Toxin-Konzentration zu beruhen.

Durch lipophile Derivate und Tat-SS-Phalloidin bildeten sich im Cytoplasma unstrukturierte Aktinaggregate. Dabei war die Kinetik der Entstehung solcher Aktin-*Patches* deutlich von der Art der Phalloidin-Derivate abhängig. Bei dem lipophilen Benzoyl-Phalloidin bzw. Oleoyl-Phalloidin zeigten sich solche Strukturen erst ca. 24h nach Zugabe in das Medium, während das Tat-SS-Phalloidin diese *Patches* bereits 1h bis 6h nach Zugabe bildete. Der Grund für diesen Unterschied könnte in der Fixierung durch Paraformaldehyd liegen, das (siehe oben) zu einer Freisetzung des Tat-Peptids aus endosomalen Vesikeln führt und daher zu einer Verfälschung der Beobachtungen beitragen könnte. Gegen diesen Aspekt spricht, daß die Veränderung des Cytoskeletts bei Tat-SS-Phalloidin zunächst im Bereich des Aktin-Cortex erkennbar ist, der direkt unter der Zellmembran liegt. Eine Veränderung des Mikrofilaments zuerst in der Zellperipherie wäre mit einer Vesikel-Freisetzung alleine nicht erklärbar. Hingegen könnte ein direkter Membranübertritt kleiner Toxin-Mengen diesen Effekt verursachen. Allerdings wären Veränderungen auch zuerst in den Bereichen erkennbar, die den größten Aktin-Turnover in der Zelle besitzen. Dazu zählt sicherlich die Peripherie mit dem Cortex, der an der Zellbewegung und Adhäsion maßgeblich beteiligt ist.

Die Bildung von Aktin-Aggregaten im Cytoplasma bei der Toxinierung mit membrangängigen Phallootoxinen ähnelt sehr stark den Veränderungen in Zellen, die mit vergleichbaren Mikrofilament-stabilisierenden Agenzien wie Jasplakinolid (Lee *et al.*, 1998), Dolastatin 11 (Bai *et al.*, 2001) und Chondramid (siehe Kapitel 4.8) behandelt wurden. Auch durch Mikroinjektion (Wehland & Weber, 1981) und Elektroporation (Lee *et al.*, 1998) in die Zellen eingeführte fluoreszierende Phalloidine bildeten ähnliche morphologische Strukturen. Die Verteilung der Aktinaggregate scheint dabei keineswegs zufällig, sondern konzentriert sich in allen Fällen auf den posterioren und perinukleären Bereich der Zelle. Eventuell resultiert diese Akkumulation des Aktins aus der rückwärts-gerichteten, cytoplasmatischen Strömung (*cortical flow*), die während der Wanderung der Fibroblasten auf dem Substrat beobachtet wird (Abercrombie, *et al.*, 1971; Fisher *et al.*, 1988).

Neben den Veränderungen des Cytoskeletts zeigte sich, daß ein gewisser Teil der Fibroblasten durch Vergiftung mit membrangängigen Phallootoxinen nach 24h binukleär war. Diese

Beobachtung wurde ebenfalls mit Zellen gemacht, die mit anderen Aktin-Modulatoren behandelt wurden (Watabe *et al.*, 1996; Harrigan *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 2001). Es ist wahrscheinlich, daß bei diesen Zellen die Ausbildung der Teilungsfurche gehindert ist, an der das Aktin maßgeblich beteiligt ist, d.h. daß die membrangängigen Phallotoxine die Cytokinese blockieren.

Nach Inkubation von Mausfibroblasten mit membrangängigen Phallotoxinen zeigte sich, daß die Aktin-Färbung durch Tetramethylrhodamin-Phalloidin gegenüber nicht-vergifteten Zellen nach Fixierung deutlich schwächer war. Durch Erhöhung der Konzentration des membrangängigen Phallotoxins über die  $IC_{50}$ -Konzentration hinaus verschlechterte sich die Fluoreszenzfärbung nach Fixierung nochmals. Dieser Effekt scheint unabhängig vom Fluoreszenzfarbstoff zu sein, denn auch eine Aktin-Färbung mit AlexaGreen®-Phalloidin bei vergifteten, fixierten Rat2-Zellen war schwächer als bei nicht-vergiftenden Zellen. Infolge dieses Effekts konnte bei Verwendung einer ca. zwanzigfachen  $IC_{50}$ -Konzentration ( $1 \times 10^{-4}$  M) von Tat-SS-Phalloidin in Rat2-Zellen nach 12h nur noch schwache Färbung mit AlexaGreen®-Phalloidin beobachtet werden. Das würde bedeuten, daß bei Toxin-Konzentrationen dieser Größenordnung nahezu alle Phalloidinbindungsstellen am Aktin-Filament besetzt sind und aufgrund der sehr kleinen Dissoziationsgeschwindigkeits-Konstanten die Gleichgewichtseinstellung äußerst langsam verläuft. Man geht generell von einer totalen Aktinkonzentration von 10 mg/ml in kultivierten Zellen aus, wobei ca. 50 % davon in depolymerisierter Form vorliegt. Die totale Aktin-Konzentration in F-Form liegt bei ca.  $1,2 \times 10^{-4}$  M. Bei vollständiger Besetzung aller Bindungsstellen, müßte man, ausgehend von einem 1:1-Komplex, von einer ebenfalls  $1,2 \times 10^{-4}$  M Konzentration an Tat-SS-Phalloidin im Cytoplasma ausgehen. Demnach hätte sich bei einer  $1 \times 10^{-4}$  M Giftkonzentration im Medium nahezu ein Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und extrazellulärer Flüssigkeit eingestellt. Berücksichtigt man bei diesen Beobachtungen weiterhin die  $IC_{50}$ -Konzentration des Tat-Toxins, die ca. um den Faktor 20 darüber liegt, bedeutet dies, daß für den Zelltod durch Aktinstabilisierung ein beträchtlicher Teil des Filamentsystems durch Toxin fixiert werden muss.

Im Laufe dieser Arbeit wurden auch die Amanitin-Toxine von *Amanita phalloides* mit Permeations-Enhancern wie Ölsäure konjugiert. Diese Toxine besitzen aufgrund ähnlicher Peptidstruktur eine ähnliche Membrangängigkeit, sind dabei aber bis zu 1000-mal toxischer (Oleoyl-Amanitin ca.  $1 \times 10^{-9}$  M) als die Phallotoxine. Hierin spiegelt sich wider, daß das Zielmolekül der Amanitine, die RNA-Polymerase II, um den Faktor 1000-mal weniger

---

konzentriert in der Zelle vorliegt als F-Aktin, und die Bindung eines einzigen Amanitins die Funktion einer Polymerase zum Erliegen bringt.

## 5.6 Apoptose durch Stabilisierung des Aktinfilaments

Apoptose ist ein physiologischer Mechanismus, der für den "programmierten Zelltod" in verschiedenen Stadien von Entwicklung, Verletzung und Reparatur verantwortlich ist (Wyllie *et al.*, 1980; Steller, 1995). Wichtige Komponenten des Cytoskeletts, einschließlich Aktin, Mikrotubuli, und Cytokeratin werden während dieses Vorgangs abgebaut (Janmey, 1998). Das Aktin wird dabei vermutlich direkt über Caspasen oder indirekt über Calpain gespalten (Kayalar *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1989), allerdings gibt es auch Hinweise auf Zelllinien, in denen dies nicht unbedingt der Fall sein muss (Song *et al.*, 1997). Caspase-3 spaltet ebenfalls das Protein Gelsolin, das entstandene Produkt trennt Aktinfilamente auf ("*severing*") und führt zu den morphologischen Änderungen apoptotischer Zellen (Kothakota *et al.*, 1997). Die Spaltung und Aktivierung des Aktin-assoziierten Proteins Gas2 durch "Interleukin-1-converting Enzym"-ähnlichen Proteasen bewirkt eine Zerstörung des Aktin-Cytoskeletts (Brancolini *et al.*, 1995; Sgorbissa *et al.*, 1999). Die Expression des Aktins wird zudem durch Regulierung Aktin-codierender Gene gehemmt (Guenal *et al.*, 1997). Das Aktin-Targeting ist damit am Verlust der Zellform während apoptotischer Prozesse beteiligt.

Es gibt vermehrt Anzeichen, daß eine Zerstörung von Cytoskelett-Proteinen selbst die Induktion des Zelltods auslösen kann. So führt ein Defekt im Mikrotubuli-Turnover durch Taxol und Vincristin über Phosphorylierung von Raf1 und Bcl-2 zur Apoptose (Blagosklonny *et al.*, 1997; Haldar *et al.*, 1997).

In analoger Weise kann eine Störung des Aktin-Cytoskeletts direkt zur Apoptose führen oder beitragen. Posey und Bierer (1999) beobachteten, daß Jasplakinolid eine durch Cytokin-Entzug ausgelöste Apoptose in CTLL-20 T-Lymphozyten verstärkte. Ebenfalls erhöhte dieses Aktin-stabilisierende Toxin eine induzierte Apoptose in der Ba/F3-Zelllinie durch Reduktion von Wachstumsfaktoren (Posey und Bierer, 1999). In zwei Arbeiten konnte die Apoptose unmittelbar durch Jasplakinolid ausgelöst werden. Rao *et al.* (1999) entdeckten, daß eine Apoptose in HL-60-Zellen 4h bis 24h nach Zugabe von Jasplakinolid eintrat. Die Zellen bildeten ausgeprägtes "*membrane blebbing*", allerdings war die normalerweise bei Apoptose eintretende Verkleinerung des Kernbereichs gering. White *et al.* (2001) zeigten den pro-

grammierten Zelltod, induziert durch das stabilisierende Aktin-Toxin Jasplakinolid und durch das Filament-destabilisierende Cytochalasin D, in primären Atemwegs-Epithelzellen und in der Atemwegs-Zelllinie 1HAEO<sup>-</sup> innerhalb von 5h. Die Apoptose, detektiert durch Fluoreszenz-Markierung im TUNEL-Assay, konnte durch die Caspase-Inhibitoren z-VAD-fmk und Ac-DEVD-cho aber nicht durch Inhibition des Fas-Rezeptor (CD95) gehemmt werden. Während die Cytochalasin D-induzierte Apoptose von einer Spaltung der Pro-Caspase-8 begleitet wurde, galt dies nicht für Jasplakinolid-induzierte Apoptose. Beide Toxine induzierten jedoch den den "*death-inducing signaling complex*" (DISC). Überraschend führten beide Toxine jedoch nicht zur Apoptose in MDCK-Zellen.

Die Frage, ob das ebenfalls Aktin-stabilisierende Phalloidin ebenso wie Jasplakinolid einen Zelltod durch Apoptose auslösen kann, war bisher aufgrund der schlechten Membrangängigkeit des Toxins nicht zu beantworten. Zwar wurde beobachtet, daß primäre Hepatocyten nach Vergiftung durch Phallotoxine ein ähnliches "*membrane blebbing*" bilden wie HL-60-Zellen nach Vergiftung mit Jasplakinolid, doch ein direkter Nachweis von Apoptosemarkern konnte bisher nicht gezeigt werden. In dieser Arbeit wurden semisynthetische, cytotoxische Phallotoxine dem Medium von Jurkat-Zellen, einer humanen T-Zelllinie, zugesetzt, und die Zellen durch Annexin-V-Fluorescein-Bindung auf einen Flipflop-Prozess von Phosphatidylserin, einem Marker fühler apoptotischer Prozesse, im FACS untersucht. Durch Gegenfärbung mit Propidiumiodid konnten nekrotische von apoptotischen Zellen differenziert werden.

Die membrangängigen Toxine Oleoyl-Phalloidin ( $1,0 \times 10^{-4}$  M), Tat-SS-Phalloidin ( $1,0 \times 10^{-4}$  M) und Poly-L-Lys-SS-Phalloidin ( $1,0 \times 10^{-5}$  M) zeigten nach 1h leicht erhöhte Annexin-V-Bindung, nach 4h waren schon nahezu alle Zellen (>80%) in einer apoptotischen Phase. Die Ergebnisse dieses Experiments decken sich zeitlich mit den Jasplakinolid-Beobachtungen von White *et al.*, die eine Apoptose nach 5h bei ca. 25% der Atemwegs-Epithelzellen nachwiesen. Allerdings handelt es sich bei dem dort verwendeten TUNEL-Assay um einen Nachweis, der eine wesentlich spätere Phase der Apoptose, die DNA-Spaltung, detektiert. Auch die verwendete Jasplakinolid-Konzentration ( $1,0 \times 10^{-6}$  M) war um den Faktor 10 bzw. 100 niedriger als in den vorliegenden Versuchen. Daraus erklärt sich eventuell der deutlich höhere Anteil apoptotischer Zellen der eigenen Arbeit. White *et al.* konnten zudem einen Dosis-Wirkungs-Zusammenhang erkennen. Eine Steigerung der Jasplakinolid-Konzentration auf  $3,0 \times 10^{-6}$  M erhöhte den Apoptoseanteil auf ca. 30%.

Interessant erscheint weiterhin, daß eine Propidiumiodid-Färbung der Jurkat-Zellen deutlich verzögert (24h) nach der Annexin-V-Färbung (4h) eintritt. Dies entspricht den Beobachtungen der Cytotoxizitäts-Assays mit MTT und  $^3\text{H}$ -Thymidin. Nach Freisetzung aus endocytotischen Vesikeln scheinen die Zellen sehr schnell in einen apoptotischen Zustand überzugehen. Nekrose tritt jedoch erst deutlich später ein.

Da das natürliche Phalloidin bei  $10^{-4}$  molarer Konzentration in Jurkat-Zellen über keine Cytotoxizität verfügt, konnte wie erwartet weder eine Apoptose noch ein Zelltod durch Nekrose beobachtet werden. Die Fluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesene Entstehung von *Riesenzellen* konnte anhand der Zellviabilität nicht erfaßt werden und scheint damit zumindest innerhalb des Beobachtungszeitraums keinen Einfluß auf die Proliferation zu haben.

Verglichen mit den Toxinen  $\alpha$ -Amanitin und Camptothecin, war der Annexin-V-Assay der membrangängigen Phallotoxine zeitlich eher vergleichbar mit dem lipophilen Topoisomerase-I-Inhibitor Camptothecin als mit dem RNA-Polymerase-II-Inhibitor  $\alpha$ -Amanitin. Letzteres zeigte einen zeitlich langsamerer Verlauf der Apoptose, d.h. der Marker Phosphatidylserin erschien, verglichen mit einer Vergiftung durch membrangängige Phallotoxine, deutlich später auf der Membranoberfläche.

Der Verlauf der Apoptose konnte durch Inhibition der Caspase-Proteasen in dieser Arbeit nur wenig beeinflußt werden. So konnte nach Inkubation mit Tat-SS-Phalloidin der prozentuale Anteil lebender Jurkat-Zellen mit dem Peptid Z-VAD-fmk von 5% auf ca. 10% erhöht werden. Die Zugabe von DEVD-cho hatte dagegen keinen Einfluß auf den Verlauf der Vergiftung. Da Z-VAD-fmk Caspase-1, Caspase-4, Caspase-7 und insbesondere die zentrale Caspase-3 blockiert, also Caspasen der Gruppen I und II, läßt sich anhand der Meßwerte eine Beteiligung dieser Enzyme am Zelltod vermuten. Das in diesen Versuchen unwirksame DEVD-cho hemmt Caspase-6, Caspase-7, Caspase-8, Caspase-10 und ebenfalls Caspase-3, inhibiert damit Caspasen der Gruppe II und Gruppe III. Eventuell läßt sich aus diesen Daten eine besondere Beteiligung der Caspasen aus Gruppe I schließen. Insgesamt scheint die Apoptose nach Aktin-Stabilisierung jedoch nicht allein auf der Aktivität von Caspasen zu beruhen, sondern es spricht aufgrund der geringen Reduktion der Giftigkeit unter Anwesenheit der Caspase-Inhibitoren vieles dafür, daß ein Caspase-unabhängiger Weg an der Ausbildung der Apoptose mitbeteiligt ist.

---

## 5.7 Zellspezifität der Phallotoxin-Derivate als Ansatz therapeutischer Behandlungen

In der klinischen Therapie haben sich Mikrotubuli-stabilisierende Agenzien als Wirkstoffe zur Hemmung der Tumor-Proliferation etabliert. Hierzu zählen insbesondere die Taxane (Wani *et al.*, 1971), Naturstoffe aus der Rinde der Eibe. Sie binden an  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin und stabilisieren die polymere Form. Unter der Wirkung von Taxanen bilden Zellen keine normale mitotische Spindel mehr aus und verharren in der G<sub>2</sub> bzw. M Phase. In den letzten Jahren haben zwei Taxane, Paclitaxel, ein Naturprodukt aus *Taxus brevifolia*, und Docetaxel, ein semisynthetisches Produkt aus *Taxus baccata*, klinische Anwendung gefunden (Gelmon, 1994; He *et al.*, 2001). Wie es scheint, ist die langsam und erst über Tage (24-72h) einsetzende toxische Wirkung der Taxane zur Tumorthherapie besser geeignet als die sofort eintretende, akut toxische Wirkung von MT-depolymerisierenden Agenzien. Auch von letzteren sind seit Jahren viele bekannt (z.B. Vinca-Alkaloide, Podophyllotoxin, Colchizin etc.), die jedoch in weit geringerem Maße zur Tumorthherapie herangezogen wurden. In analoger Weise könnten Mikrofilament-stabilisierende Agenzien wie Phallotoxine als Cytotoxica wichtiger sein als Mikrofilament-zerstörende Agenzien (zB. Cytochalasin). Obwohl Mikrofilamente für eine Proliferation unabdingbar sind, werden Aktinfilament-stabilisierende Toxine in der Tumorthherapie bisher jedoch nicht eingesetzt.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit bewirkt die Stabilisierung des Aktins durch membrangängige Phallotoxine eine Hemmung der Cytokinese und führt zum apoptotischen Zelltod in verschiedenen Tumorzelllinien. Die Cytotoxizität der Phallotoxin-Derivate auf der Basis lipophiler Liganden sowie kationischer Peptide und Polymere wurde für die Zelllinien MF/LDB-Mausfibroblasten, Jurkat, Hela, K562, HL-60, Daudi und MethA gezeigt. Die Giftwirkung war bei allen sieben Kulturen vergleichbar, die IC<sub>50</sub>-Konzentration lag durchweg innerhalb einer Größenordnung. Obwohl die antiproliferative Wirkung das therapeutische Potential der Aktinfilament-stabilisierenden Gifte aufdeckt, gibt es keine Anzeichen für eine spezifische Wirkung der membrangängigen Phallotoxin-Derivate in den hier verwendeten Tumorzelllinien. Die fehlende Spezifität der membrangängigen Phallotoxine beruht vermutlich auf dem identischen Aufnahmemechanismus aller Derivate über adhäsive, nicht-spezifische Endocytose in das Innere von Zellen (siehe oben).

Die pharmakologische Forschung kennt inzwischen eine Vielzahl von Peptide und Proteine, die wie die hier verwendeten Phallotoxine über eine biologische Aktivität verfügen, die sie als

potentielle Therapeutika, insbesondere als Antitumor-Verbindungen, prädestinieren. Im Unterschied zu Viren und Bakterien besitzen Krebszellen jedoch kaum molekulare Zielorte, die vom Organismus als fremd erkannt werden. Die cytotoxische Antitumor-Therapie beschränkt sich daher bis heute in den meisten Fällen auf die erhöhte Proliferationsrate von Krebszellen. Sie nutzt Wirkstoffe, die an der DNA, dem Tubulin oder an Enzymen angreifen, die, wie zB. die Topoisomerasen, für eine DNA-Replikation notwendig sind. Die therapeutische Nutzung dieser Verbindungen ist daher oft durch unzureichendes Targeting sowie durch Aufnahme auch in gesundes Gewebe eingeschränkt. Die Unzulänglichkeiten gegenwärtig eingesetzter Cytostatica sind damit eine Folge ihrer Dosis-abhängigen, toxischen Nebeneffekte.

In den letzten Jahrzehnten wurden diverse Anstrengungen unternommen, cytotoxische Wirkstoffe an Carrier-Verbindungen zu konjugieren, die eine selektive Akkumulation im Tumor ermöglichen sollten. So z.B. Immunokonjugate von Cytotoxinen, die gegen Tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind und daher ein spezifisches Targeting erreichen sollten (Dubowchik & Walker, 1999). Die Internalisierung Antikörper-gebundener Immunotoxine erfolgt über Rezeptor-abhängige Endocytose (Kato *et al.*, 1996; Mellman, 1996). Die Limitierung dieser Endocytose als Eintrittsweg von Wirkstoffen in die Zellen hängt von solchen Faktoren wie Oberflächendichte der Antigene, Internalisierungsrate und Re-Expression ab (Kato & Sugiyama, 1997). Für eine Vielzahl verwendeter Antigene ist insbesondere die Internalisierungsrate sehr gering. Für eine Antitumor-Therapie unter Verwendung von Phalloxinen schien daher ein Stoffwechsel-spezifisches Targeting erfolgsversprechender.

Ein Folat-Phalloxin-Konjugat nutzt die Gegebenheit, daß der Folsäure-Rezeptor auf einer Vielzahl von Tumoren, eingeschlossen bestimmte Ovar- und Gehirntumore, überexprimiert wird (Campbell *et al.*, 1991; Garin-Chesa *et al.*, 1993) und daher ein Zielort für Folsäure-konjugierte Wirkstoffe darstellen könnte. Die herausragende Eigenschaft des Folsäure-Rezeptors liegt in seiner Fähigkeit ungewöhnlich große Liganden, die an Folsäure gebunden sind, zu transportieren (Leamon & Low, 1991; Leamon & Low, 1992). So wird das Makromolekül Ferritin-Folat (443 kDa) vom Rezeptor erkannt und in die Zelle aufgenommen. Folsäure-Rezeptoren bilden nach Bindung der Folsäure Cluster an einem sog. "uncoated pit" (Caveola). Nach Endocytose werden kleine Moleküle - wie zB. die Folsäure - nicht zum lysosomalen Kompartiment translociert, sondern in das Cytosol (Kamen *et al.*, 1988). Somit besitzen die Caveolae potentielle Vorteile als Targets für Wirkstoffe. Das hier verwendete Folat-MPEG<sub>3350</sub>-Phalloidin besitzt einen Polyethylenglykol-Linker, der eine

effiziente Reinigung der aktivierten Folsäure ermöglichte. Desweiteren wird durch die Erhöhung der molekularen Größe die Ausschüttung des Konjugats über die Nieren in zukünftigen *in vivo* Experimenten reduziert. Zwischen dem Phalloidin-Rückgrat und dem Polyethylenglykol enthält das Derivat einen Disulfidlinker, der im Cytosol durch die hohe Konzentration reduzierender Thiole eine Freisetzung vom Carrier gewährleisten sollte.

In Mausfibroblasten und Jurkat-Zellen besaß Folat-MPEG<sub>3350</sub>-SS-Phalloidin unter Verwendung eines Folsäure-freien Mediums eine IC<sub>50</sub>-Konzentration von  $4 \times 10^{-4}$  M bis  $5 \times 10^{-5}$  M. Damit ist es weniger giftig als ein vergleichbares MPEG-Phalloidin ohne Folsäure. In SKOV3-Zellen, einer Tumorzelllinie, die den Folat-Rezeptor überexprimiert, lag die IC<sub>50</sub>-Konzentration bei  $3,2 \times 10^{-4}$  M. Demnach wurde keine Zellspezifität für Folat-MPEG<sub>3350</sub>-SS-Phalloidin für diese Zelllinie beobachtet. Der Grund hierfür ist eventuell in der unzureichenden Reinigung des Toxinproduktes nach der Synthese zu finden, da hier ein großer Anteil freier Folsäure zu finden war, die für eine kompetitive Bindung am Rezeptor verantwortlich sein könnte. Zudem scheint es möglich, dass das Transportpotential des Folsäurerezeptors oder die Menge der Rezeptoren auf der Zelloberfläche nicht ausreichend Toxin in das Zellinnere transportieren können, insbesondere im Hinblick auf die hohe Aktinkonzentration und die damit verbundene große Phalloidinmenge, die für eine Vergiftung notwendig ist.

Zwei weitere Konjugate, die für eine Akkumulation in Tumorgewebe in Frage kommen, sind die MPEG-Phalloidine und das HSA-Phalloidin. Es ist heute bekannt, daß lang-zirkulierende Makromoleküle, wie Albumin, Polymer-Konjugate, polymere Micellen und Liposomen, passiv im Gewebe solider Tumore aufgrund des sog. EPR-Effekts ("*enhanced permeability and retention effect*") akkumulieren. Intravenös applizierte Wirkstoff-Carrier-Systeme auf Basis dieser Verbindungen zeigten eine Konzentration im Tumor, die bis zu 70-fach gegenüber dem freien Wirkstoff erhöht war. Der EPR-Effekt beruht zum einen auf der desorganisierten Struktur des tumoralen Vaskularsystems mit seinem uneinheitlichen Endothelium, was zu einer Hyperpermeabilität zirkulierender Makromoleküle führt, und zum anderen auf dem Fehlen einer ausreichenden Lymph-Drainage im Tumor, was zur makromolekularen Akkumulation beiträgt. Albumin dient zudem als Stickstoff- und Energie-Quelle für Tumorgewebe und wird daher von Tumorzellen bevorzugt aufgenommen. Dies konnte anhand von radioaktiv-markierten Albumin-Derivaten im Walker-56-Carcinom, Novikoff-Hepatom, C6-Gliom und Duning Prostata Adenocarcinom gezeigt werden (Stehle *et al.*, 1997). Inzwischen befinden sich Fluoreszenz-markierte und Metothrexitat-konjugierte Albumine im präklinischen Einsatz.

In den eigenen Cytotoxizitäts-Versuchen zeigten die MPEG-Phallotoxine eine Toxizität, die vermutlich auf den Ethanol-ähnlichen Charakter des Polymeres zurückzuführen ist. Dabei stieg die Giftigkeit mit der Kettenlänge des Polymeres an ( $9 \times 10^{-6}$  M bis  $2 \times 10^{-4}$  M). Beim Vergleich der verschiedenen, eingesetzten Zelllinien (MF/LDB-Mausfibroblasten, Hela und Jurkat) konnte keine Spezifität beobachtet werden. Das HSA-Phalloidin erwies sich hingegen in allen Kulturen als ungiftig. Gegenüber geladenen Polymeren wie Polylysin besitzt es keinen basischen pI, d.h. eine unspezifische Affinität ist vermutlich nicht möglich, was seine nicht vorhandene Cytotoxizität erklärt. Eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme über das Albumin scheint weder bei Fibroblasten noch bei den anderen Zelllinien stattzufinden. Eventuell ist allerdings die Internalisierungsrate für einen toxischen Effekt des Phallotoxins zu gering. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die verwendeten Kultursysteme bzw. der *in vitro* Versuchsaufbau keineswegs die Bedingungen eines Tumorgewebes *in vivo* nachbilden können. Daher erscheint hier insbesondere das nicht-toxische HSA-Phalloidin als geeignete Verbindung für weitere Untersuchungen in tierischen Modellen.

## 5.8 Ausblick

In dieser Arbeit konnte durch Einführung lipophiler Substituenten, kationische Peptide und verschiedene Polymere die Membrangängigkeit der Phallotoxine deutlich erhöht werden. Eine weitere Steigerung der Zellinternalisierung könnte möglich sein durch eine Kopplung an lipophile Reste wie Sphingolipide, eine Optimierung der Arginin-Kettenlänge, oder die Verwendung weiterer trojanischer Peptide, wie zB. der PTD aus dem VP-22 Protein, die hier nicht untersucht wurden. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß eine Pegylierung des Polylysins dessen Eigentoxizität deutlich reduzieren kann. Die Konjugation eines Phalloidins an ein Polymer dieser Art könnte aufgrund der guten Membrangängigkeit des Poly-L-Lys-SS-Phalloidins für molekularbiologische Fragestellungen Bedeutung gewinnen. Wichtiger erscheint jedoch unter therapeutischen Gesichtspunkten eine Tumorbehandlung durch Aktinstabilisierende Agenzien. Daß Phalloidinderivate prinzipiell dazu in der Lage sind, wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Aufgrund der potentiellen Lebertoxizität des Wirkstoffs ist jedoch ein spezifisches „*delivery*“ unerlässlich. Neben dem Folsäure-Rezeptor kennt man eine Vielzahl weiterer Rezeptoren, die für ein effektives Targeting in Frage kämen, zB. EGF-Rezeptor, LDL-Rezeptor oder der Transferrin-Rezeptor. Eine Bindung des Phalloidins an die jeweiligen Liganden erscheint vielversprechend. Desweiteren sollten einige hier vorgestellte

Gifte, wie das HSA-Phalloidin, auf ihre *in vivo* Toxizität untersucht werden. Bei entsprechend geringer Lebergiftigkeit, die durch die vollkommen veränderte physikochemische Charakteristik zu erwarten ist, könnte sich im Tumor-Tiermodell ein therapeutisches Fenster zur Behandlung von Tumoren auf tun.

## 6 Literatur

Abercrombie M.; Heaysman J. E. & Pegrum S. M. (1971). **The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella.** *Exp. Cell Res.* **67**: 359-367

Allinquant B.; Hantraye P.; Mailleux P.; Moya K.; Bouillot C. & Prochiantz A. (1995). **Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro.** *J. Cell Biol.* **128**: 919-927

Anderson D. C.; Nichols E.; Manger R.; Woodle D.; Barry M. & Fritzberg A. R. (1993). **Tumor cell retention of antibody F<sub>ab</sub> fragments is enhanced by an attached HIV TAT protein-derived peptide.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**: 876-884

Anwer M. S.; Kroker K. & Hegner D. (1976). **Cholic acid uptake into isolated rat hepatocytes.** *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**: 1477-1486

Bai R.; Verdier-Pinard P.; Gangwar S.; Stessman C. C.; McClure K. J.; Sausville E. A.; Pettit G. R.; Bates R. B. & Hamel E. (2001). **Dolastatin 11, a marine depsipeptide, arrests cells at cytokinesis and induces hyperpolymerization of purified actin.** *Mol. Pharmacol.* **59**(3): 462-469

Bermbach U. & Faulstich H. (1990). **Epidermal growth factor labeled beta-amanitin-poly-L-ornithine: preparation and evidence for specific cytotoxicity.** *Biochemistry* **29**: 6839-6845

Blagosklonny M. V.; Giannakakou P.; el-Deiry W. S.; Kingston D. G.; Higgs P. I.; Neckers L. & Fojo T. (1997). **Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death.** *Cancer Res.* **57**: 130-135

Boutorin A. S.; Guskova L. V.; Ivanova E. M.; Kobetz N. D.; Zarytova V. F.; Ryte A. S.; Yurchenko L. V. & Vlassov V. V. (1989). **Synthesis of alkylating oligonucleotide derivatives containing cholesterol or phenazinium residues at their 3'-terminus and their interaction with DNA within mammalian cells.** *FEBS Lett.* **254**(1-2): 129-132

Bradford M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

Bradley M. O.; Swindell C. S.; Anthony F. H.; Witman P. A.; Devanesan P.; Webb N. L.; Baker S. D.; Wolff A. C. & Donehower R. C. (2001). **Tumor targeting by conjugation of DHA to paclitaxel.** *J. Control Release.* **74**(1-3): 233-236

Brancolini C.; Benedetti M. & Schneider C. (1995). **Microfilament reorganization during apoptosis: the role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases.** *EMBO J.* **14**: 5179-5190

Brown S. B.; Bailey K. & Savill J. (1997). **Actin is cleaved during constitutive apoptosis.** *Biochem J.* **323**: 233-237

- 
- Bubb M. R.; Senderowicz A. M.; Sausville E. A.; Duncan K. L. & Korn ED (1994). **Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin.** *J. Biol. Chem.* **269**(21): 14869-14871
- Campbell I. G.; Jones T. A.; Foulkes W. D. & Trowsdale J. (1991). **Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer.** *Cancer Res.* **51**: 5329-5338
- Chen Z.; Naito M.; Mashima T. & Tsuruo T. (1996). **Activation of actin-cleavable interleukin 1beta-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells.** *Cancer Res.* **56**: 5224-5229
- Chik J. K.; Lindberg U. & Schutt C. E. (1996). **The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution.** *J. Mol. Biol.* **263**(4): 607-623
- Clarke M. & Spudich J. A. (1977). **Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination.** *Ann. Rev. Biochem.* **46**: 797-822
- Cochet-Meilhac M. & Chambon P. (1974). **Animal DNA-dependent RNA polymerases, II. Mechanism of the inhibition of RNA-polymerases B by amatoxins.** *Biochim. Biophys. Acta* **353**: 160-184
- Conner S. D. & Schmid S. L. (2003). **Regulated portals of entry into the cell.** *Nature* **422**: 37-44
- Dancker P.; Low I.; Hasselbach W. & Wieland T. (1975). **Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin.** *Biochim. Biophys. Acta* **400**(2): 407-414
- Danielsson L. G. & Zhang Y. H. (1994). **Mechanized determination of n-octanol/water partition constants using liquid-liquid segmented flow extraction.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**(12): 1475-1481
- Derossi D.; Joliot A. H.; Chassaing G. & Prochiantz A. (1994). **The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes.** *J. Biol. Chem.* **269**: 10444-10450
- Derossi D.; Calvet S.; Trembleau A.; Brunissen A.; Chassaing G. & Prochiantz A. (1996). **Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent.** *J. Biol. Chem.* **271**: 18188-18193
- Derossi D.; Chassaing G. & Prochiantz A. (1998). **Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery.** *Trends Cell Biol.* **8**: 84-87
- DeVries J. X.; Schäfer A. J.; Faulstich H. & Wieland T. (1976). **Protection of actin from heat denaturation by various phallotoxins.** *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**: 1139-1143
- DeVries J. X. & Wieland T. (1978). **Influence of phallotoxins and metal ions on the rate of proteolysis of actin.** *Biochemistry* **17**: 1965-1968

---

Dubowchik G. M. & Walker M. A. (1999). **Receptor-mediated and enzyme-dependent targeting of cytotoxic anticancer drugs.** *Pharmacol. Ther.* **83**: 67-123

Elliott G. & O'Hare P. (1997). **Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein.** *Cell* **88**: 223-233

Elzinga M.; Collins J. H.; Kuehl W. M. & Adelstein R. S. (1973). **Complete amino acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**: 2678-2691

Emi N.; Kidoaki S.; Yoshikawa K. & Saito H. (1997). **Gene transfer mediated by polyarginine requires a formation of big carrier-complex of DNA aggregate.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**: 421-424

Estes J. E.; Selden L. A. & Gershman L. C. (1981). **Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin.** *Biochemistry* **20**: 708-712

Faulstich H. & Wieland T. (1971). **Relation of toxicity and conformation of phallotoxins as revealed by optical/rotatory dispersions studies.** *Eur. J. Biochem.* **22**: 79-86

Faulstich H.; Brodner O.; Walch S. & Wieland T. (1975). **Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes. XLIV. Über Phallisacin und Phallacin, zwei neue saure Phallotoxine und einige Amide des Phallacidins.** *Liebigs Ann. Chem.* **1975**: 2324-2330

Faulstich H.; Schäfer A. J. & Weckauf M. (1977). **The dissociation of the phalloidinactin complex.** *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**: 181-184

Faulstich H.; Buku A.; Bodenmüller H. & Wieland T. (1980). **Virotoxins: actin-binding cyclic peptides of *Amanita virosa* mushrooms.** *Biochemistry* **19**: 334-343

Faulstich H.; Jahn W. & Wieland T. (1980). **Silybin inhibition of amatoxin uptake in the perfused rat liver.** *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* **30**: 452-454

Faulstich H.; Zobeley S.; Rinnerthaler G. & Small J. V. (1988). **Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin.** *J. Muscle Res. Cell Motil.* **9(5)**: 370-383

Fawell S.; Seery J.; Daikh Y.; Moore C.; Chen L. L.; Pepinsky B. & Barsoum J. (1994). **Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**: 664-668

Fischer R.; Waizenegger T.; Kohler K. & Brock R. (2002). **A quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import.** *Biochim. Biophys. Acta* **1564(2)**: 365-374

Fisher G.W.; Conrad P. A.; DeBiasio R. L. & Taylor D. L. (1988). **Centripetal transport of cytoplasm, actin, and the cell surface in lamellipodia of fibroblasts.** *Cell Motil. Cytoskeleton* **11**: 235-247

Fiume L. & Stirpe F. (1966). **Decreased RNA content in mouse liver nuclei after intoxication with  $\alpha$ -amanitin.** *Sperimentale* **115**: 288-297

- Fling S. P. & Gregerson D. S. (1986). **Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris-buffer system without urea.** *Anal. Biochem.* **155**: 83-88
- Floersheim, G. L.; Weber O.; Tschumin P. & Ulbrich M. (1982). **Die klinische Knollenblätterpilzvergiftung (*Amanita phalloides*): prognostische Faktoren und therapeutische Maßnahmen. Eine Analyse anhand von 205 Fällen.** *Schweiz. Med. Wochenschr.* **112**: 1164-1177
- Föllmann W.; Petzinger E. & Kinne R. K. H. (1990). **Alteration of bile acid and bumetanide uptake during culturing of rat hepatocytes.** *Am. J. Physiol.* **258**: C700-C712
- Frankel A. D. & Pabo C. O. (1988). **Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus.** *Cell* **55**: 1189-1193
- Frimmer M.; Kroker R. & Porstendorfer I. (1974). **The mode of action of phalloidin. Demonstration of rapid deformation of isolated hepatocytes by scanning electron microscopy.** *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **287**: 395-398
- Futaki S.; Suzuki T.; Ohashi W.; Yagami T.; Tanaka S.; Ueda K. & Sugiura Y. (2001). **Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery.** *J. Biol. Chem.* **276**: 5836-5840
- Gaertner A.; Ruhnau K.; Schroer E.; Selve N.; Wanger M. & Wegner A. (1989). **Probing nucleation, cutting and capping of actin filaments.** *J. Muscle Res. Cell Motil.* **10(1)**: 1-9
- Gardner M. L. (1994). **Absorption of intact proteins and peptides.** *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by L. R. Johnson. New York: Raven, p. 1795-1820
- Garin-Chesa P.; Campbell I.; Saigo P. E.; Lewis J. L. Jr.; Old L. J. & Rettig W. J. (1993). **Trophoblast and ovarian cancer antigen LK26. Sensitivity and specificity in immunopathology and molecular identification as a folate-binding protein.** *Am. J. Pathol.* **142**: 557-567
- Gelmon K. (1994). **The taxoids: paclitaxel and docetaxel.** *Lancet* **344**: 1267-1272
- Green M. & Loewenstein P. M. (1988). **Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein.** *Cell* **55**: 1179-1188
- Guenal I.; Risler Y. & Mignotte B. (1997). **Down-regulation of actin genes precedes microfilament network disruption and actin cleavage during p53-mediated apoptosis.** *J. Cell Sci.* **110**: 489-495
- Hagenbuch B.; Stieger B.; Foguet M.; Lübbert H. & Meier P. J. (1991). **Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10629-10633
- Hagenbuch B. & Meier P. J. (1994). **Molecular cloning, chromosomal localization and functional characterization of a human liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter.** *J. Clin. Invest.* **93**: 1326-1331

---

Hagenbuch B. & Meier P. J. (2003). **The superfamily of organic anion transporting polypeptides.** *Biochim. Biophys. Acta* **1609**: 1-18

Haldar S.; Basu A. & Croce C. M. (1997). **Bcl2 is the guardian of microtubule integrity.** *Cancer Res.* **57**: 229-233

Hamaguchi Y. & Mabuchi I. (1982). **Effects of phalloidin microinjection and localization of fluorescein-labeled phalloidin in living sand dollar eggs.** *Cell Motil.* **2**: 103-113

Harrigan G. G.; Yoshida W. Y.; Moore R. E.; Nagle D. G.; Park P. U.; Biggs J.; Paul V. J.; Mooberry S. L.; Corbett T. H. & Valeriote FA. (1998). **Isolation, structure determination, and biological activity of dolastatin 12 and lyngbyastatin 1 from *Lyngbya majuscula*/Schizothrix calcicola cyanobacterial assemblages.** *J. Nat. Prod.* **61**: 1221-1225

Head J. F. & Swamy N. (2002). **Ray Crystal Structure of the Complex between Actin and Human Vitamin D-Binding Protein at 2.5 Å Resolution.** *Biochemistry* **41(29)**: 9015-9020

Harris J. M.; Martin N. E. & Modi M. (2001). **Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics.** *Clin. Pharmacokinet.* **40**: 539-551

He L.; Orr G. A. & Horwitz S. B. (2001). **Novel molecules that interact with microtubules and have functional activity similar to Taxol.** *Drug Discov. Today* **6**: 1153-1164

Heijn M. (1994). **Characterization of ATP-dependent organic anion transport.** Dissertation (Amsterdam).

Heyman M.; Crain-Denoyelle A. M.; Nath S. K. & Desjeux J. F. (1990). **Quantification of protein transcytosis in the human colon carcinoma Caco-2.** *J. Cell. Physiol.* **143**: 391-395

Holmes K. C.; Popp D.; Gebhard W. & Kabsch W. (1990). **Atomic model of the actin filament.** *Nature* **347**: 44-49

Holzinger A. & Lutz-Meindl U. (2001). **Chondramides, novel cyclodepsipeptides from myxobacteria, influence cell development and induce actin filament polymerization in the green alga *Micrasterias*.** *Cell Motil. Cytoskeleton* **48(2)**: 87-95

Honeycutt L.; Wang J.; Ekrami H. & Shen W. C. (1996). **Comparison of pharmacokinetic parameters of a polypeptide, the Bowman-Birk protease inhibitor (BBI), and its palmitic acid conjugate.** *Pharm. Res.* **13(9)**: 1373-1377

Houk T. W. & Ue K. (1974). **The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods.** *Anal. Biochem.* **62(1)**: 66-74

Howard T. H. & Oresajo C. O. (1985). **A method for quantifying F-actin in chemotactic peptide activated neutrophils: study of the effect of tBOC peptide.** *Cell Motil.* **5(6)**: 545-557

Hussey S. L. & Peterson B. R. (2002). **Efficient delivery of streptavidin to mammalian cells: clathrin-mediated endocytosis regulated by a synthetic ligand.** *J. Am. Chem. Soc.* **124(22)**: 6265-6273

- 
- Huxley H. E. (1969). **The mechanism of muscle contraction.** *Science* **164**: 1356-1366
- Inoue M.; Kinne R.; Tran T. & Arias I. M. (1982). **Taurocholate transport by rat liver sinusoidal membrane vesicles: evidence of sodium.** *Hepatology* **2**: 572-579
- Jainchill J. L.; Aaronson S. A. & Todaro G. J. (1969). **Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells.** *J. Virol.* **4(5)**: 549-553
- Janmey P. A. (1998). **The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling.** *Physiol. Rev.* **78**: 763-781
- Joliot A.; Pernelle C.; Deagostini-Bazin H. & Prochiantz A. (1991). **Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 1864-1868
- Kabsch W.; Mannherz H. G.; Suck D.; Pai E. F. & Holmes K. C. (1990). **Atomic structure of the actin:DNase I complex.** *Nature* **347(6288)**: 37-44
- Kamen B. A.; Wang M. T.; Streckfuss A. J.; Peryea X. & Anderson R. G. (1988). **Delivery of folates to the cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor that recycles.** *J. Biol. Chem.* **263**: 13602-13609
- Kato Y. & Sugiyama Y. (1997). **Targeted delivery of peptides, proteins, and genes by receptor-mediated endocytosis.** *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **14**: 287-331
- Kayalar C.; Ord T.; Testa M. P.; Zhong L. T.; Bredesen D. E. (1996). **Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**: 2234-2238
- Kedinger C.; Gniazdowski M.; Mandel J. L.; Gissinger F. & Chambon P. (1970).  **$\alpha$ -Amanitin a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **38**: 165-171
- Kirschner M. W. (1980). **Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo.** *J. Cell Biol.* **86(1)**: 330-334
- Korn E. D. (1978). **Biochemistry of actomyosin dependent cell motility (a review).** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 588-599
- Korn E. D. (1982). **Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells.** *Physiol. Rev.* **62(2)**: 672-737
- Kothakota S.; Azuma T.; Reinhard C.; Klippel A.; Tang J.; Chu K.; McGarry T. J.; Kirschner M. W.; Kohts K.; Kwiatkowski D. J. & Williams L. T. (1997). **Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis.** *Science* **278**: 294-298
- Krämer S. D. (1999). **Absorption prediction from physicochemical parameters.** *Pharm. Sci. Tech. Today* **2(9)**: 373-380

- 
- Kullak-Ublick G. A.; Stieger B.; Hagenbuch B. & Meier P. J. (2000). **Hepatic transport of bile salts.** *Semin. Liver Dis.* **20**: 273-292
- Kumagai A. K.; Eisenberg J. B. & Pardridge W. M. (1987). **Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a  $\beta$ -endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries.** *J. Biol. Chem.* **262**: 15214-15219
- Kunze B.; Jansen R.; Sasse F.; Hofle G. & Reichenbach H. (1995). **Chondramides A approximately D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties.** *J. Antibiot. (Tokyo)* **48(11)**: 1262-1266
- Laemmli U. K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* **227**: 680-685
- Laurent N.; Wattiaux-De Coninck S.; Mihaylova E.; Leontieva E.; Warnier-Pirotte M. T.; Wattiaux R. & Jadot M. (1999). **Uptake by rat liver and intracellular fate of plasmid DNA complexed with poly-L-lysine or poly-D-lysine.** *FEBS Lett.* **443**: 61-65
- Lazarides E. & Weber K. (1974). **Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71(6)**: 2268-2272
- Leamon C. P. & Low P. S. (1991). **Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5572-5576
- Leamon C. P. & Low P. S. (1992). **Cytotoxicity of momordin-folate conjugates in cultured human cells.** *J. Biol. Chem.* **267**: 24966-24971
- Lee E.; Shelden E. A. & Knecht D. A. (1998). **Formation of F-actin aggregates in cells treated with actin stabilizing drugs.** *Cell Motil. Cytoskeleton* **39**: 122-133
- Leist N.; Gantner F.; Naumann H.; Bluethmann H.; Vogt K.; Brigelius-Flohe R.; Nicotera P.; Volk H. D. & Wendel A. (1997). **Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins.** *Gastroenterology* **112(3)**: 923-934
- Leonetti J. P.; Degols G. & Lebleu B. (1990). **Biological activity of oligonucleotide-poly(L-lysine) conjugates: mechanism of cell uptake.** *Bioconjug. Chem.* **1**: 149-153
- Letsinger R. L.; Zhang G. R.; Sun D. K.; Ikeuchi T. & Sarin P. S. (1989). **Cholesteryl-conjugated oligonucleotides: synthesis, properties, and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86(17)**: 6553-6556
- Lin J. C.; Lin S. C.; Mar E. C.; Pellett P. E.; Stamey F. R.; Stewart J. A. & Spira T. J. (1995). **Is Kaposi's-sarcoma-associated herpesvirus detectable in semen of HIV-infected homosexual men?** *Lancet.* **346**: 1601-1602
- Löw I.; Dancker P. & Wieland T. (1976). **Stabilization of actin polymer structure by phalloidin: ATPase activity of actin induced by phalloidin at low pH.** *FEBS Lett.* **65**: 358-360

- 
- Lorenz M.; Popp D. & Holmes K. C. (1993). **Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm.** *J. Mol. Biol.* **234**: 826-836
- Lundberg M. & Johansson M. (2002). **Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**: 367-371
- Lynen F. & Wieland U. (1938). **Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. IV. Kristallisation von Phalloidin.** *Liebigs Ann. Chem.* **533**: 93-117
- Maruyama K. & Tsukagoshi K. (1984). **Effects of KCl, MgCl<sub>2</sub>, and CaCl<sub>2</sub> concentrations on the monomer-polymer equilibrium of actin in the presence and absence of cytochalasin D.** *J. Biochem. (Tokyo)* **96(3)**: 605-611
- Matschinsky F. & Wieland O. (1960). **Die Wirkung des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin auf die isolierte Rattenleber.** *Biochem. Z.* **333**: 48-61
- McLaughlin P. J.; Gooch J. T.; Mannherz H. G. & Weeds A. G. (1993). **Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing.** *Nature* **364(6439)**: 685-692
- Meier P. J.; Sztul E. S.; Reuben A. & Boyer J. L. (1984). **Structural and Functional Polarity of Canalicular and Basolateral Plasma Membrane; Vesicles Isolated in High Yield from Rat Liver.** *The Journal of Cell Biology* **98**: 991-1000
- Meier P. J.; Eckhardt U.; Schroeder A.; Hagenbuch B. & Stieger B. (1997). **Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver.** *Hepatology* **26**: 1667-1677
- Mellman I. (1996). **Endocytosis and molecular sorting.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**: 575-625
- Miller F. & Wieland O. (1967). **Elektronenmikroskopische Untersuchungen der leber von Maus und Ratte bei akuter Phalloidin-Vergiftung.** *Virchow's Arch. Path. Anat.* **343**: 83-99
- Mitchell A. (2000). **...and from repair to remodelling.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**: 7
- Miyamoto Y.; Kuroda M.; Munekata E. & Masaki T. (1986). **Stoichiometry of actin and phalloidin binding: one molecule of the toxin dominates two actin subunits.** *J. Biochem. (Tokyo)* **100(6)**: 1677-1680
- Mornet D. & Ue K. (1984). **Proteolysis and structure of skeletal muscle actin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81(12)**: 3680-3684
- Münter K.; Mayer D. & Faulstich H. (1986). **Characterization of a transporting system in rat hepatocytes. Studies with competitive and non-competitive inhibitors of phalloidin transport.** *Biochim. Biophys. Acta* **860**: 91-98

---

Mulders P.; Pang S.; Dannull J.; Kaboo R.; Hinkel A.; Michel K.; Tso C. L.; Roth M. & Beldegrun A. (1998). **Highly efficient and consistent gene transfer into dendritic cells utilizing a combination of ultraviolet-irradiated adenovirus and poly(L-lysine) conjugates.** *Cancer Res.* **58**: 956-961

Murphy J. E.; Uno T.; Hamer J. D.; Cohen F. E.; Dwarki V. & Zuckermann R. N (1998). **A combinatorial approach to the discovery of efficient cationic peptoid reagents for gene delivery.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 1517-1522

Neuhaus J. M.; Wanger M.; Keiser T. & Wegner A. (1983). **Treadmilling of actin.** *J. Muscle Res. Cell Motil.* **4(5)**: 507-527

Ohmi K.; Enosawa S.; Nonomura Y.; Tatsuno T. & Ueno Y. (2001). **Acceleration of actin polymerization and rapid microfilament reorganization in cultured hepatocytes by cyclochlorotin, a hepatotoxic cyclic peptide.** *Toxicon.* **39**: 303-308

Otterbein L. R.; Graceffa P. & Dominguez R. (2001). **The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state.** *Science* **293**: 708-711

Palm K.; Luthman K.; Ungell A. L.; Strandlund G. & Artursson P. (1996). **Correlation of drug absorption with molecular surface properties.** *J. Pharm. Sci.* **85(1)**: 32-39

Pardridge W. M. & Boado T. J. (1991). **Enhanced cellular uptake of biotinylated antisense oligonucleotide or peptide mediated by avidin, a cationic protein.** *FEBS Lett.* **288**: 30-32

Patel D. J.; Tonelli A. E.; Pfaender P.; Faulstich H. & Wieland T. (1973). **Experimental and calculated conformational characteristics of the bicyclic heptapeptide phalloidin.** *J. Mol. Biol.* **79**: 185-196

Petzinger E. & Frimmer M. (1984). **Driving forces in hepatocellular uptake of phalloidin and cholate.** *Biochim. Biophys. Acta* **778**: 539-548

Petzinger E. & Frimmer M. (1988). **Comparative investigations on the uptake of phallotoxins, bile acids, bovine lactoperoxidase and horse radish peroxidase into rat hepatocytes in suspension and in cell cultures.** *Biochim. Biophys. Acta* **937**: 135-144

Pollard T. D. & Mooseker M. S. (1981). **Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores.** *J. Cell Biol.* **88(3)**: 654-659

Pollard T. D. & Cooper J. A. (1986). **Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions.** *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 987-1035

Pollard T. D.; Blanchoin L. & Mullins R. D. (2000). **Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**: 545-576

Polyakov V.; Sharma V.; Dahlheimer J. L.; Pica C. M.; Luker G. D. & Piwnicka-Worms D. (2000). **Novel Tat-peptide chelates for direct transduction of technetium-99m and rhenium into human cells for imaging and radiotherapy.** *Bioconjug. Chem.* **11**: 762-771

- Posey S. C. & Bierer B. E. (1999). **Actin stabilization by jasplakinolide enhances apoptosis induced by cytokine deprivation.** *J. Biol. Chem.* **274**: 4259-4265
- Prochiantz A. (2000). **Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**: 400-406
- Rao J. Y.; Jin Y. S.; Zheng Q.; Cheng J.; Tai J. & Hemstreet G. P. 3rd. (1999). **Alterations of the actin polymerization status as an apoptotic morphological effector in HL-60 cells.** *J. Cell Biochem.* **75**: 686-697
- Reichen J. & Paumgartner G. (1976). **Uptake of bile acids by perfused rat liver.** *Am. J. Physiol.* **231**: 724-742
- Richard J. P.; Melikov K.; Vives E.; Ramos C.; Verbeure B.; Gait MJ.; Chernomordik L. V. & Lebleu B. (2003). **Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake.** *J. Biol. Chem.* **278**: 585-590
- Roberts M. J.; Bentley M. D. & Harris J. M. (2002). **Chemistry for peptide and protein PEGylation.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**: 459-476
- Rothbard J. B.; Garlington S.; Lin Q.; Kirschberg T.; Kreider E.; McGrane P. L.; Wender P. A. & Khavari P. A. (2000). **Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation.** *Nat. Med.* **6**: 1253-1257
- Rothbard J. B.; Kreider E.; VanDeusen C.L.; Wright L.; Wylie B. L. & Wender P. A. (2002). **Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake.** *J. Med. Chem.* **45**: 3612-3618
- Ryser H. J. (1967). **A membrane effect of basic polymers dependent on molecular size.** *Nature* **215**: 934-936
- Ryser H. J. & Shen W. C. (1978). **Conjugation of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells.** *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **75**: 3867-3870
- Sai Y.; Kajita M.; Tamai I.; Kamata M.; Wakama J.; Wakamiya T. & Tsuji A. (1998). **Intestinal absorption of fluorescence-derivatized cationic peptide 001-C8-NBD via adsorptive-mediated transcytosis.** *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 1305-1309
- Sambrook J.; Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2<sup>nd</sup> edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sawitzky H.; Liebe S.; Willingale-Theune J. & Menzel D. (1999). **The anti-proliferative agent jasplakinolide rearranges the actin cytoskeleton of plant cells.** *Euro. J. Cell Biol.* **78**: 424-433
- Sawitzky H.; Hanfstingl U. & Faulstich H. (2003). **Growth inhibition and changes in morphology and actin distribution in *Acetabularia acetabulum* by phalloidin and phalloidin derivatives.** *Protoplasma* **220**: 209-218
- Scherer *et. al.* (1953). *J. Exp. Med.* **97**: 695

---

Schneider U.; Schwenk H. U. & Bornkamm G. (1977). **Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.** *Int. J. Cancer* **19**: 621-626

Schroeder T. E. (1973). **Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70(6)**: 1688-1692

Schutt C. E.; Myslik J. C.; Rozycki M. D.; Goonesekere N. C. & Lindberg U. (1993). **The structure of crystalline profilin-beta-actin.** *Nature* **365(6449)**: 810-816

Schwarz L. R.; Burr R.; Schwenk M.; Pfaff E. & Greim H. (1975). **Uptake of taurocholic acid into isolated rat liver cells.** *Eur. J. Biochem.* **55**: 617-623

Schwarz L. R. & Barth C. A. (1979). **Taurocholate uptake by adult hepatocytes in primary culture.** *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360**: 1117-1120

Schwarze S. R.; Hruska K. A. & Dowdy S. F. (2000). **Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?** *Trends Cell Biol.* **10**: 290-295

Scott V. R.; Boehme R. & Matthews T. R. (1988). **New class of antifungal agents: jasplakinolide, a cyclodepsipeptide from the marine sponge, *Jaspis* species.** *Antimicrob. Agents Chemother.* **32(8)**: 1154-1157

Seeger R.; Scharrer H. & Haupt M. (1973): **Phallolysin, ein hochmolekulares Toxin aus *Amanita phalloides*.** *Experientia* **29**: 829

Seifart K. H. & Benecke B. J. (1975). **DNA-dependent RNA polymerase C. Occurrence and localization in various animal cells.** *Eur. J. Biochem.* **53**: 293-300

Selden L. A.; Estes J. E. & Gershman L. C. (1983). **The tightly bound divalent cation regulates actin polymerization.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116(2)**: 478-485

Sgorbissa A.; Benetti R.; Marzinotto S.; Schneider C. & Brancolini C. (1999). **Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro: implications for microfilament reorganization during apoptosis.** *J. Cell Sci.* **112**: 4475-4482

Shea R. G.; Masters J. C. & Bischofberger N. (1990). **Synthesis, hybridization properties and antiviral activity of lipid-oligodeoxynucleotide conjugates.** *Nucleic Acids Res.* **18(13)**: 3777-3783

Shen W. C. & Ryser H. J. (1978). **Conjugation of poly-L-lysine to albumin and horseradish peroxidase: a novel method of enhancing the cellular uptake of proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 1872-1876

Sheterline P.; Clayton J. & Sparrow J. C. (1998). **Actin.** *Oxford Univ. Press, New York, ed. 4*

Smith, A. H. (1978). **Poisonous mushrooms: Their habitat, geographic distribution and physiological variation within species.** *Rumack B. H., Salzman E. (eds) Mushroom poisoning: diagnosis and treatment. CRC Press, West Palm Beach, FL, 59-66*

- 
- Song Q.; Wei T.; Lees-Miller S.; Alnemri E.; Watters D. & Lavin M. F. (1997). **Resistance of actin to cleavage during apoptosis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 157-162
- Spudich J. A. & Watt S. (1971). **The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin.** *J. Biol. Chem.* **246(15)**: 4866-4871
- Steinmetz M. O.; Stoffler D.; Müller S. A.; Jahn W.; Wolpensinger B.; Goldie K. N.; Engel A.; Faulstich H. & Aebi U. (1998). **Evaluating atomic models of F-actin with an undecagold-tagged phalloidin derivative.** *J. Mol. Biol.* **276(1)**: 1-6
- Stehle G.; Wunder A.; Sinn H.; Schrenk H. H.; Schutt S.; Frei E.; Hartung G.; Maier-Borst W. & Heene D. L. (1997). **Pharmacokinetics of methotrexate-albumin conjugates in tumor-bearing rats.** *Anticancer Drugs* **8**: 835-844
- Steller H. (1995). **Mechanisms and genes of cellular suicide.** *Science* **267**: 1445-1449
- Still W. C.; Kahn M. & Mitra A. (1978). **Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution.** *J. Org. Chem.* **43(14)**: 2923-2925
- Straub F. B. & Feuer G. (1989). **Adenosinetriphosphate. The functional group of actin. 1950.** *Biochim. Biophys. Acta* **1000**: 180-195
- Suzuki T.; Futaki S.; Niwa M.; Tanaka S.; Ueda K. & Sugiura Y. (2002). **Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides.** *J. Biol. Chem.* **277**: 2437-2443
- Tanghe, L. J.; Simons, D. M. (1973). ***Amanita phalloides* in the Eastern United States.** *Mycologia* **LXV**, 99-108
- Terasaki M. (1996). **Actin filament translocations in sea urchin eggs.** *Cell Motil. Cytoskeleton* **34**: 48-56
- Tobacman L. S. & Korn E. D. (1983). **The kinetics of actin nucleation and polymerization.** *J. Biol. Chem.* **258(5)**: 3207-3214
- Torchilin V.P.; Rammohan R.; Weissig V. & Levchenko T. S. (2001). **TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **98**: 8786-8791
- Tuchweber B.; Kovacs K.; Khandekar J. D. & Garg B. D. (1973). **Peliosis-like changes induced by phalloidin in the rat liver.** *J. Med.* **4**: 327-340
- Vandekerckhove J.; Deboen A.; Nassal M. & Wieland T. (1985). **The phalloidin binding site of F-actin.** *EMBO J.* **4**: 2815-2818
- van Troys M.; Vandekerckhove J. & Ampe C. (1999). **Structural modules in actin binding proteins: towards a new classification.** *Biochim. Biophys. Acta* **1448(3)**: 323-348

---

Vives E.; Brodin P. & Lebleu B. (1997). **A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus.** *J. Biol. Chem.* **272**: 16010-16017

Vlassov V. V.; Balakireva L. A. & Yakubov L. A. (1994). **Transport of oligonucleotides across natural and model membranes.** *Biochim. Biophys. Acta* **1197**(2): 95-108

Wang Y. L. (1985). **Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling.** *J. Cell. Biol.* **101**(2): 597-602

Wang Y. L. (1987). **Mobility of filamentous actin in living cytoplasm.** *J. Cell Biol.* **105**: 2811-2816

Wang C. L.; Wang L. W.; Xu S. A.; Lu R. C.; Saavedra-Alanis V. & Bryan J. (1989). **Localization of the calmodulin- and the actin-binding sites of caldesmon.** *J. Biol. Chem.* **266**: 9166-9172

Wani M. C.; Taylor H. L.; Wall M. E.; Coggon P. & McPhail A. T. (1971). **Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*.** *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 2325-2327

Watabe S.; Wada S.; Saito S.; Matsunaga S.; Fusetani N.; Ozaki H. & Karaki H. (1996). **Cellular changes of rat embryonic fibroblasts by an actin-polymerization inhibitor, bistheonellide A, from a marine sponge.** *Cell Struct. Funct.* **21**: 199-212

Wegner A. & Engel J. (1975). **Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments.** *Biophys. Chem.* **3**(3): 215-225

Wegner A. (1976). **Head to tail polymerization of actin.** *J. Mol. Biol.* **108**(1): 139-150

Wehland J.; Osborn M. & Weber K. (1977). **Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5613-5617

Wehland J. & Weber K. (1980). **Distribution of fluorescently labeled actin and tropomyosin after microinjection in living tissue culture cells as observed with TV image intensification.** *Exp. Cell Res.* **127**: 397-408

Wehland J. & Weber K. (1981). **Actin rearrangement in living cells revealed by microinjection of a fluorescent phalloidin derivative.** *Eur. J. Cell Biol.* **24**: 176-183

Weiss E.; Sterz I.; Frimmer M. & Kroker R. (1973). **Electron microscopy of isolated rat hepatocytes before and after treatment with phalloidin.** *Beitr. Pathol.* **150**: 345-356

Wender P. A.; Mitchell D. J.; Pattabiraman K.; Pelkey E. T.; Steinman L. & Rothbard J. B. (2000). **The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**: 13003-13008

Wieland H. & Witkop B. (1940). **Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. V. Zur Konstitution des Phalloidins.** *Liebigs Ann. Chem.* **543**: 171-183

---

Wieland H. & Hallermayer R. (1941). **Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. VI. Amanitin, das Hauptgift des Knollenblätterpilzes.** *Liebigs Ann. Chem.* **548**: 1-18

Wieland T. & Reh binder D. (1963). **Über die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes. XXIII. [<sup>35</sup>S]-Markierung und chemische Umwandlungen an einer Seitenkette des Phalloidins.** *Liebigs Ann. Chem.* **670**: 149-157

Wieland T. & Gebert U. (1966). **Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes. XXX. Strukturen der Amanitine.** *Liebigs Ann. Chem.* **700**: 133-148

Wieland T. & Govindan V. M. (1974). **Phallotoxins bind to actins.** *FEBS Lett.* **46**: 351-353

Wieland T.; deVries J. X.; Schäfer A. & Faulstich H. (1975). **Spectroscopic evidence for the interaction of phalloidin with actin.** *FEBS Lett.* **54**: 73-75

Wieland T. & Faulstich H. (1978). **Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide, the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms.** *Crit. Rev. Biochem.* **5**: 185-260

Wieland T. & Faulstich H. (1979). **The phalloidin story.** *Frontiers in bioorganic chemistry and molecular biology. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York,* 97-112

Wieland T.; Beijer B.; Seeliger A.; Dabrowski J.; Zanotti G.; Tonelli A. E.; Gieren A.; Dederer B.; Lamm V. & Hädicke E. (1981). **Über die Inhaltsstoffe des grünen Knollenblätterpilzes. LIX. Die Raumstruktur der Phallotoxine.** *Liebigs Ann. Chem.* **1981**: 2318-2334

Wieland, T. (1986). **Peptides of poisonous *Amanita* mushrooms.** *Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, Tokyo.*

Wong A. Toth I. (2001). **Lipid, sugar and liposaccharide based delivery systems.** *Curr. Med. Chem.* **8(9)**: 1123-1136

Woodrum D. T.; Rich S. A. & Pollard T. D. (1975). **Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method.** *J. Cell Biol.* **67(1)**: 231-237

Wulf E.; Deboben A.; Bautz F. A.; Faulstich H. & Wieland T. (1979). **Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4498-4502

Wyllie A. H.; Kerr J. F. & Currie A. R. (1980). **Cell death: the significance of apoptosis.** *Int. Rev. Cytol.* **68**: 251-306

Zanotti G.; Birr C. & Wieland T. (1978). **Synthesis of monocyclic and bicyclic peptides of tryptathionine and glycine.** *Int. J. Peptide Protein Res.* **12**: 204-216

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ama	Amanitin
APHD	Amino-Phalloidin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bzw.	beziehungsweise
cpm	<i>counts per minute</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s modified Eagle`s Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), Ellman`s Reagenz
DTT	1,4-Dithio-DL-Threitol
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
h	Stunde
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HSA	Humanserumalbumin
kDa	Kilodalton
min	Minute
MW	<i>molecular weight</i> , molare Masse
$K_d$	Dissoziationskonstante
NTB <sup>-</sup>	2-Nitro-5-thiobenzoat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PHD	Phalloidin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RP	<i>Reversed Phase</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPDP	N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat

---

sog.	sogenannten
s.u.	siehe unten
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen

Für die Darstellung der Aminosäuren wurden folgende Symbole benutzt:

Alanin	A (Ala)	Leucin	L (Leu)
Arginin	R (Arg)	Lysin	K (Lys)
Asparagin	N (Asn)	Methionin	M (Met)
Asparaginsäure	D (Asp)	Phenylalanin	F (Phe)
Cystein	C (Cys)	Prolin	P (Pro)
Glutamin	Q (Gln)	Serin	S (Ser)
Glutaminsäure	E (Glu)	Threonin	T (Thr)
Glycin	G (Gly)	Tryptophan	W (Trp)
Histidin	H (His)	Tyrosin	Y (Tyr)
Isoleucin	I (Ile)	Valin	V (Val)