

Entwicklung und Charakterisierung
monoklonaler Antikörper
zum Nachweis von
Furanolabdanditerpenen
und Triterpenen vom Oleanol-Typ

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn

vorgelegt von

Kerstin Marlene Gisela Brand
aus Kassel

Bonn, 2002

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Priv.Doiz. Dr. W. Knöss
2. Referentin: Prof. Dr. G. König

Tag der Promotion: 29.05.2002

Nächtliches Gebet

Herr des Himmels und der Erde, dass ich täglich älter werde,
dass ich eines Tages alt bin, später tot und schließlich kalt bin,
weißt du besser noch als ich. Lieber Gott, bewahre mich
vor dem Drang, zu allen Fragen jederzeit etwas zu sagen
und belehrend einzugreifen. Hilf mir, nicht so abzuschweifen,
und statt vieler Einzelheiten rasch die Pointe auszubreiten.

Ich gehör' zu den Gesunden. Hind're mich, in schweren Stunden,
wenn mich mal Weh-Wehchen quälen, ständig davon zu erzählen.
Wollen andere mir schildern, lang und breit, in bunten Bildern,
welche Krankheiten sie stören, hilf mir, freundlich zuzuhören.
Weiter: And'rer Leute Dingen meine Ordnung aufzuzwingen,
diese Sucht, mich einzumischen, bitte ich dich wegzuwischen.

Hilf mir, Farbe zu bekennen, und beim Namen klar zu nennen,
was geändert werden müßte. Laß, falls ich es nicht mehr wüßte,
jenen Groschen in mir klimren: Sogar ich kann mich mal irren.
Laß mich niemals mürrisch werden. Laß mich Freude hier auf Erden
an den schönen Dingen zeigen, mich vor anderen verneigen.
Statt der Kanten und der Ecken laß ihr Können mich entdecken.
Lobend sollt' ich's dann erwähnen. Amen jetzt. Ich bin am Gähnen.

Nach einem Gebet der hl. Theresa von Avila,
Bearbeitung von Daniel Dickopf

Abkürzungen	5
1 Einleitung	7
1.1 Monoklonale Antikörper	7
1.2 Terpene	13
1.2.1 Marrubiin aus <i>Marrubium vulgare</i> L.	16
1.2.2 Saponine und Oleanolsäure	19
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Lösungsmittel und Chemikalien	23
2.2 Puffer und Reagenzien	24
2.3 Isolierung, qualitative und quantitative Analyse der Isoprenoide.....	25
2.3.1 Extraktion der Furanolabdanditerpene aus <i>Marrubium vulgare</i>	25
2.3.2 Gewinnung von ¹⁴ C-Marrubiin.....	27
2.3.3 Herstellung von Drogenextrakten.....	27
2.3.4 Dünnschichtchromatographie.....	28
2.3.5 Densitometrie	28
2.3.6 MS	28
2.3.7 Methoden zur Messung von [¹⁴ C]	29
2.3.8 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	30
2.3.9 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR).....	30
2.4 Proteinbiochemische Methoden	31
2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	31
2.4.2 Proteinreinigung	32
2.4.3 Gel-Elektrophorese.....	33
2.4.4 MALDI-TOF	35

2.5	Derivatisierungen der Isoprenoide	36
2.5.1	Reduktion mit LiAlH ₄	36
2.5.1.1	Umsetzung von Marrubiin zu Marrubenol.....	36
2.5.1.2	Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylalkohol.....	36
2.5.2	Alkalische Lactonspaltung.....	37
2.5.3	Veresterung von Terpenalkoholen mit Carbonsäuren	37
2.5.3.1	Umsetzung von Marrubenol zu Marrubensuccinat.....	37
2.5.3.2	Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylsuccinat.....	38
2.5.3.3	Umsetzung von Marrubenol bzw. Oleanolsäure zu den entsprechenden Monoacetaten	38
2.5.4	Synthese von Proteinkonjugaten nach dem gemischten Anhydridverfahren... 39	
2.6	Immunologie	40
2.6.1	Immunisierung und Gewinnung der mAK-Zell-Linien	40
2.6.2	Reinigung der mAK.....	41
2.6.3	Direkter Nachweis der mAK-Bindung	42
2.6.4	ELISA	42
2.6.5	Kompetitiver ELISA	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Furanolabdanditerpene	47
3.1.1	Strategie	47
3.1.2	Isolierung von Marrubiin aus <i>Marrubium vulgare</i>	49
3.1.3	Synthese geeigneter Zielstrukturen für die Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Labdanditerpene	50
3.1.3.1	Reduktion von Marrubiin zu Marrubenol	50
3.1.3.2	Alkalische Hydrolyse des Marrubiins.....	51
3.1.3.3	Kopplung des Marrubenols mit Bernsteinsäureanhydrid.....	52
3.1.3.4	Identifizierung der Produkte der Derivatisierungsreaktionen.....	53
3.1.3.5	Darstellung der Proteinkonjugate für die Immunisierung.....	55
3.1.3.5.1	Proteinkopplung nach der Methode des gemischten Anhydrids.....	55
3.1.3.5.2	Charakterisierung der Proteinkonjugate.....	56

3.1.4	Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Furanolabdanditerpene	64
3.1.4.1	Direkter Nachweis der Antikörperbindung	66
3.1.4.2	Screening der etablierten Zell-Linien	67
3.1.5	Optimierung des Testsystemes ELISA.....	71
3.1.6	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen Furanolabdanditerpene und erste Anwendung	76
3.1.6.1	Checkpoint-Titration	78
3.1.6.2	Kompetitionen	81
3.1.6.3	Anwendungsmöglichkeiten	85
3.2	Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen pentazyklische Triterpene.....	87
3.2.1	Strategie	87
3.2.2	Synthese geeigneter Zielstrukturen für die Immunisierung und Antikörper- Charakterisierung	88
3.2.3	Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Oleanolsäure	93
3.2.3.1	Immunisierung mit Oleanolsäure-Konjugaten	95
3.2.3.2	Immunisierung mit Oleanylsuccinat-Konjugaten.....	96
3.2.4	Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen Triterpene.....	97
3.2.4.1	Checkpoint-Titration	97
3.2.4.2	Kompetitiver ELISA	99
3.2.4.3	Anwendungsmöglichkeiten	105
4	Diskussion.....	111
4.1	Monoklonale Antikörper gegen Furanolabdanditerpene.....	111
4.1.1	Monoklonale Antikörper gegen Marrubiin.....	111
4.1.2	Anwendung der monoklonalen Antikörper gegen Furanolabdanditerpene....	116
4.2	Monoklonale Antikörper gegen pentacyclische Triterpene	121
4.2.1	Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Oleanolsäure	121
4.2.2	Monoklonale Antikörper gegen Triterpene	126
4.2.3	Anwendung der monoklonalen Antikörper gegen Triterpene.....	128

5	Zusammenfassung	131
6	Literatur	133
7	Pharmakologische Untersuchungen der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Furanolabdanditerpene und deren Derivatisierungsprodukten <i>in vivo / in vitro</i>	149
8	Spektrenanhang.....	161
9	Danksagung.....	205

Abkürzungen

(m)AK	(monoklonaler) Antikörper
ABTS	2,2-Azino-di-(3-ethyl)-benzothiazolin-sulfonsäure
APS	Ammoniumpersulfatlösung
ATP,ADP	Adenosintriphosphat und -diphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin = Rinderserumalbumin
CHCl ₃	Chloroform
CoA	Coenzym-A
COX	Cyclooxygenase
DC	Dünnschichtchromatographische Untersuchung
DCM	Dichlormethan
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DXR	1-Deoxyxylulose-Reduktoisomerase
DXS	1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase
EI	Electron Impact Ionisation
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FLD	Furanolabdanditerpene
GRK ₂	G-Protein-Rezeptorkinase 2
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
i.p.	intraperitoneal
IC ₅₀	Konzentration mit 50% Hemmung
IgG	Immunglobulin
IPP	Isopentenyl-diphosphat
kDa	Kilo Dalton
KOH	Kaliumhydroxid
LC	Säulenchromatographische Trennung
LiAlH ₄	Lithiumaluminiumhydrid
LOX	Lipoxygenase

Abkürzungen

mAK	monoklonale Antikörper
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight
MeOH	Methanol
MEP	2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MIN	Marrubiin
MS	Massenspektrometrie
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Nuclear resonance Spectroscopy
OL	Oleanolsäure
Olsuc	Oleanylsuccinat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglycol
RIA	Radio-Immuno-Assay
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THF	Tetrahydrofuran
THY	Thyroglobulin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 Einleitung

1.1 Monoklonale Antikörper

Paul Ehrlich, einer der Pioniere der Immunologie, postulierte Rezeptoren (Antikörper) als Sekretionsprodukte der Zellen des Immunsystems. Er erkannte die selektive Bindung der „magic bullets“ an schädliche Strukturen (s. Abb. 1.1) und sagte ihnen einen vielfältigen Nutzen in der Bekämpfung verschiedenster Krankheiten voraus (Ehrlich, 1904).

Heutzutage ist die Kenntnis von Antikörpern und ihre Anwendung aus dem Gebiet der Infektiologie ebenso wenig wegzudenken wie aus der Transplantationsmedizin, der Onkologie, der Kardiologie und der Therapie rheumatoider und allergischer Erkrankungen (Park et al., 2001; Zündorf et al., 1998).

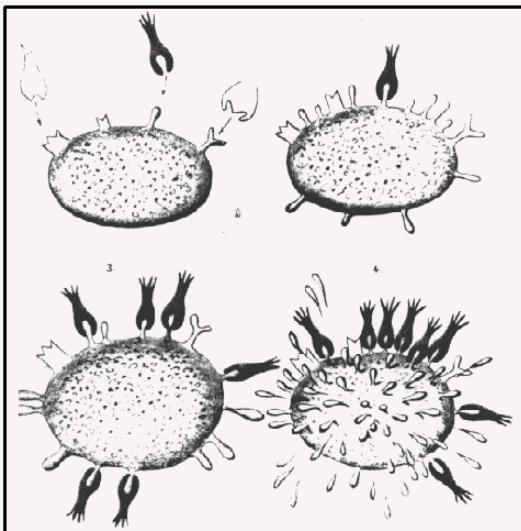


Abb. 1.1 Aussehen und Wirkungsweise von Immunglobulinen in der Sicht von Paul Ehrlich (1854 – 1915).

Die aus einer frühen Publikation des Wissenschaftlers stammende Grafik (in: Ehrlich, 1904) zeigt die Anheftung der „magic bullets“ und gibt bereits einen Hinweis auf die Spezifität der Strukturen.

(von:http://www.molbiol.ox.ac.uk/www/pathology/_tig/new1/mabth.html)

Antikörper sind, strukturell betrachtet, γ -Immunglobuline (Ig), die aus vier Untereinheiten gebildet werden. Zwei leichte und zwei schwere Ketten (L-Kette = light chain, H-Kette = heavy chain) sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Der schematische Aufbau sowie die räumliche Darstellung der Antikörper ist in Abb. 1.2 dargestellt. Zwischen H- und L-Kette liegen zwei Antigen-Bindungsstellen, die den oberen Bereich des Fab-Teils (fragment of antigen-binding) bilden. Der dritte Teil des Moleküls, der ausschließlich von Abschnitten der H-Ketten gebildet wird, ist gleich gestaltet. Er wird deswegen als Fc-Teil (constant fragment) bezeichnet.

1. Einleitung

Man unterscheidet verschiedene Subtypen der Immunglobuline (Ig) nach der Größe der H-Ketten. IgM sind für die primäre Immunantwort verantwortlich. Sie treten häufig in Pentameren auf. IgA, die in Dimeren vorkommen, sind die dominierende Antikörperklasse in seromukösen Sekreten. IgD und IgE bilden besonders kleine Antikörperfraktionen. Beide sind auf der Oberfläche von Immunzellen verankert, auf B-Lymphozyten bzw. Basophilen und Mastzellen. IgG bilden die Hauptmenge an Antikörpern und stellen das körpereigene Reservoir für die Reaktion auf Sekundärinfektionen dar.

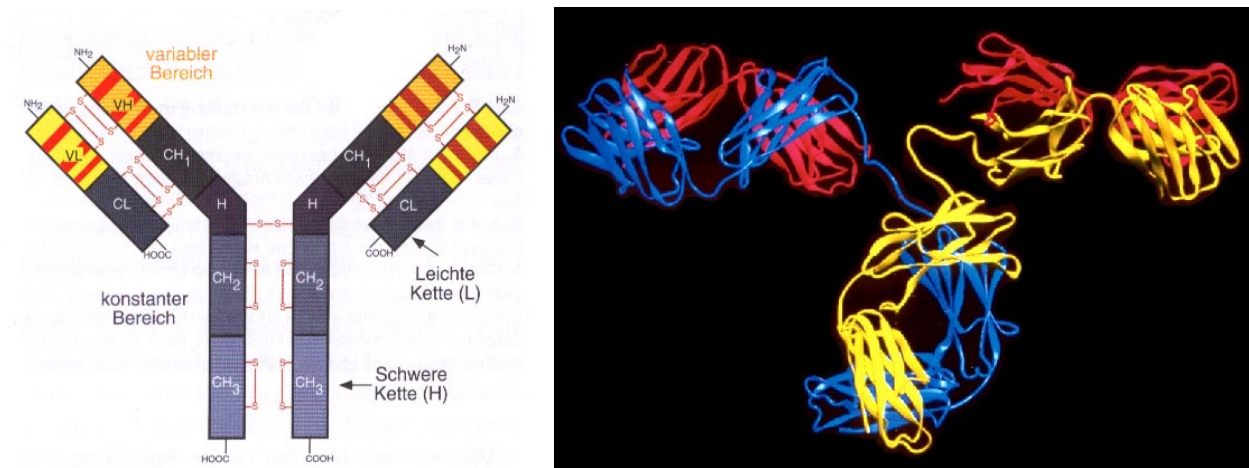


Abb. 1.2 Aufbau eines IgG-Moleküls. Links der schematische Aufbau (Dingermann, 1999), rechts die räumliche Darstellung des Proteins (<http://www.ari.unimelb.edu.au/labs/slb>). Der variable Bereich (links, orange) bildet die Antigenerkennungsstelle.

Die Nutzung der Antikörper begann mit der Gabe von Serumfraktionen, später von gereinigten Antikörperfraktionen, die aus immunisierten Individuen gewonnen wurden. In einem nächsten Schritt wurden künstliche Antigene für die Bildung von Antikörpern eingesetzt (Ehrlich, 1904).

Ein injiziertes Molekül, das im Körper immunogen wirken soll, muss in der Regel eine Molekülgröße von mehr als 1000 Da aufweisen (Erlanger, 1980). Landsteiner (1945) konnte als erster Forscher Antikörper gegen ein kleineres, selbst nicht immunogenes Molekül erzeugen, indem er die Zielstruktur kovalent mit einem Trägermolekül verband und diese Konjugate in Tiere injizierte. Das gewonnene Serum enthielt unter anderem die gewünschten Antikörper. Er prägte auch den Begriff des Haptens als den Teil des Konjugates aus Zielstruktur und Trägerprotein, der vom Antikörper gebunden wird (Young, 1984). Es wurden verschiedenste Methoden entwickelt, die gewünschten Antikörper aus dem Serum zu reinigen, wie z.B. die Fällung mit einem unlöslichen Proteinkonjugat (Szafran et al., 1969).

Die „Antikörper-Revolution“ (Cambrosio et al., 1995) wurde von Köhler und Milstein eingeleitet, die 1975 immunkompetente B-Lymphozyten mit Zellen eines Milzzell-Tumors (Myelom-Zellen) verschmolzen (Köhler et al., 1975). Die resultierenden Hybridom-Zellen konnten im Gegensatz zu den ursprünglichen B-Lymphozyten über lange Zeit kultiviert werden. Die Kultur einzelner Zellen zeigte, dass diese in der Lage waren, sich zu vermehren und dass jede Hybridom-Zell-Linie einen definierten monoklonalen Antikörper sekretierte. Damit war die Menge an Antikörpern, die aus einer Immunisierung gewonnen werden konnte, nicht mehr begrenzt. Die Immunglobuline mussten nicht mehr aus dem Serum eines immunisierten Tieres isoliert werden. Sie konnten aus dem Kulturüberstand der wachsenden Klone fortlaufend gewonnen werden. Zusätzlich war eine Selektion der gewünschten Antikörper aus dem Gesamtbestand möglich geworden. Die Forscher erhielten für die Entwicklung der monoklonalen Antikörper 1984 den Nobelpreis.

Durch eine Kombination der Immunisierungsmethode Landsteiners und der Generierung monoklonaler Antikörper entstand die Möglichkeit, Immunglobuline spezifisch gegen ein quasi wählbares Antigen zu generieren und in Zellkultur in fast beliebiger Menge zu produzieren.

Die Nutzung von Immunglobulinen als Werkzeug der Analyse, zur qualitativen und quantitativen Bestimmung verschiedenster Antigene, begann schon vor der Entdeckung der monoklonalen Antikörper. Die Autoren verwendeten das polyklonale Serum. Der erste kompetitive Immuno-Assay wurde von Yalow et al. (1959) zur Bestimmung von Insulin durchgeführt. Vorteil des neuen Verfahrens war die damals sehr hohe Empfindlichkeit. In den folgenden Jahren fand eine stürmische Entwicklung statt. Nachteil der damaligen RIA (Radio-Immuno-Assays) war die Notwendigkeit der Verwendung teurer und ggf. instabiler Isotope und der hohe apparative Aufwand.

Zu Beginn der 70er Jahre entstanden die heute eingesetzten Enzym-Immuno-Assays, bei denen an das Immunglobulin ein reaktionsfähiges Enzym gekoppelt ist (van Weemen et al., 1971; Engvall et al., 1971; Rubenstein et al., 1972). Dieses Enzym steuert eine Farbreaktion und macht so den Einsatz von Isotopen überflüssig.

Monoklonale Antikörper sind aus der Pharmakotherapie und der medizinischen Analytik heute nicht mehr wegzudenken (Park et al., 2001). Das bekannteste Beispiel sind die auf einer Antikörper-Reaktion basierenden Schwangerschaftstests (Newton, 1993). Die Zahl der Naturstoffe, die zur Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper bislang eingesetzt wurden, ist jedoch im Vergleich zur Zahl der Antikörper gegen Proteine als Zielstrukturen gering (Weiler, 1990). Im Fokus standen dabei bisher besonders biogene Arzneistoffe wie Morphin, Codein, Tetrahydrocannabinolsäure (THC), Digitonin und Ginsenoside (s. Tab. 4.3.1).

Die Antikörper wurden hierbei zunächst z.B. zur Bestimmung toxischer Metabolite eingesetzt. Fab-Fragmente monoklonaler Antikörper gegen Digoxin dienen als Antidot in der Therapie einer Digitalis-Vergiftung (Lechat et al., 1984). Weiterhin wurden monoklonale Antikörper entwickelt, die es gestatten, die Abbauprodukte verschiedener Halluzinogene wie Opiate und Tetrahydrocannabinol aus Körperflüssigkeiten nachzuweisen.

Pflanzeninhaltsstoff	Art	Quelle
Mistlelectine	<i>Viscum spec.</i>	Tonevitsky et al., 2002
Marrubiin	<i>Marrubium vulgare L.</i>	Brand et al., 2001
Riddelliin	<i>Senecio spec.</i>	Lee et al., 2001
Ginsenosid Rf	<i>Panax ginseng C.A.Mayer</i>	Nah et al., 2000
Squalen		Maytas et al., 2000
Sennosid A	<i>Rheum ssp.</i>	Morinaga et al., 2000
Crocin	<i>Crocus sativus L.</i>	Xuan et al., 1999
Ginsenosid Rb1	<i>Panax ginseng C.A.MAYER</i>	Tanaka et al., 1999
Retrorsin	<i>Petasites hybridus GAERTNER</i>	Zündorf et al., 1998
Morphin	<i>Papaver somniferum L.</i>	Glasel et al., 1983 ; Rahbarizadeh et al., 2000
Aflatoxin M ₁	<i>Aspergillus spec.</i>	Holtzapple et al., 1996
Codein	<i>Papaver somniferum L.</i>	Shoyama et al., 1996
Solamargin	<i>Solanum spec.</i>	Ishiyama et al., 1996
Thebain	<i>Papaver somniferum L.</i>	Shoyama et al., 1996
Δ ¹ -THC	<i>Cannabis sativa L.</i>	Tanaka et al., 1996
Taxol	<i>Taxus brevifolia NUTT.</i>	Grothaus et al., 1995
Forskolin	<i>Coleus forskohlii BRIQ.</i>	Sakata et al., 1994
Colchicin	<i>Colchicum autumnale L.</i>	Edmond Rouan et al., 1989
Vinblastin	<i>Vinca spec.</i>	Potarotti et al., 1985
Aflatoxin B _{2a}	<i>Aspergillus flavus</i>	Lau et al., 1981
Digoxin	<i>Digitalis lanata EHRH.</i>	Zalcborg et al., 1983; Kehayov et al., 1990

Tab. 1.1 Eine Auswahl biogener Pflanzeninhaltsstoffe, gegen die monoklonale Antikörper generiert wurden.

In den letzten Jahren treten jedoch mehr und mehr rein analytische Fragestellungen, wie z.B. die Wertbestimmung von Drogenmaterial, in den Vordergrund. Monoklonale Antikörper sind hierfür aufgrund ihrer großen Spezifität und Sensitivität besonders geeignet. Der Nachweis mit Hilfe monoklonaler Antikörper kann hierbei zur Selektion möglichst hoher Mengen gewünschter Inhaltsstoffe wie Taxol aus *Taxus brevifolia* (Grothaus et al., 1995) ebenso eingesetzt werden wie zur Gehaltsbestimmung toxikologisch relevanter Substanzen, zum Beispiel der Aflatoxine (Lau et al., 1981 und Holtzapfle et al., 1996) oder der Pyrrolizidinalkaloide (Zündorf et al., 1998).

Die Anwendung monoklonaler Antikörper zur Naturstoffanalyse ist, z.B. im Rahmen eines kompetitiven ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), apparativ einfach und kostengünstig. Bei den monoklonalen Antikörpern handelt es sich um Bindungspartner mit einer erstaunlichen Feinspezifität. Die Bindung ist an die räumliche Struktur des Zielmoleküls gebunden. Strukturell ähnliche Verbindungen können z.B. bei der Änderung der Konformation eines einzigen Stereozentrums mit deutlich geringerer Affinität gebunden werden (Got et al., 1997). Hochaffine monoklonale Antikörper können Assoziationskonstanten bis in den piko-, ggf. sogar femtomolaren Bereich aufweisen. Diese zählen damit zu den stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen (Adam, 2000).

Zudem bieten die Immunglobuline die Chance, dem ursprünglichen System, in diesem Fall der Pflanze, „ein Stück näher zu rücken“. Anders als mit den gängigen Methoden der instrumentellen Analyse ist hier der Nachweis der Zielstruktur im Pflanzenmaterial selbst ebenso möglich wie in Extrakten oder, bezogen auf pharmakologische Untersuchungen, im tierischen Gewebe.

Einer der Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Knöss ist die Untersuchung der Biogenese von Isoprenoiden (Reuter, 1999), besonders von Marrubiin. Marrubiin ist ein Furanolabdanditerpen aus *Marrubium vulgare* L. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper kann es möglich sein, je nach gewähltem Zielmolekül die Zielstruktur Marrubiin bis in den subzellularen Raum hinein zu verfolgen. Das „Werkzeug“ der monoklonalen Antikörper kann also ein wichtiges Mittel zum Nachweis der Furanolabdanditerpene und ihrer Vorstufen bieten. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper können Untersuchungen zur Biosynthese, dem Speicherort und der Metabolisierung von Marrubiin in differenzierten und undifferenzierten Systemen durchgeführt werden.

Zusätzlich gestatten sie bei geringem apparativen Aufwand ein rasches Screening von Pflanzen und deren Teile und Zubereitungen auf die entsprechenden Zielstrukturen, die Furanolabdanditerpene. In einem ersten Ansatz wurde Marrubiin als Zielstruktur zur Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen einen Naturstoff ausgewählt.

Zusätzlich zum spezifischen Nachweis einzelner Moleküle ist jedoch auch eine Gruppenbestimmung von Substanzen möglich, die sich in Teilen ihrer Struktur gleichen. Deckt sich dieser gemeinsame Anteil mit dem vom Antikörper fokussierten Epitop, können die Antikörper im Rahmen eines Screenings auch zur Gruppenuntersuchung von Molekülen genutzt werden. Für einen zweiten Ansatz wurde daher Oleanolsäure, ein Triterpen, gewählt. Oleanolsäure bildet die Basis vieler Saponine vom Oleanol-Typ. Monoklonale Antikörper gegen Oleanolsäure bieten die Möglichkeit, die Saponine einer Pflanze oder Zubereitung als Gruppe zu bestimmen.

1.2 Terpene

Eine der großen Stoffgruppen innerhalb der Naturstoffe bilden die Terpene oder Isoprenoide. Gemeinsam ist ihnen das „aktivierte Isopren“. Die C₅-Körper Isopentenylidiphosphat (IPP) bzw. dessen Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) bilden die Basis aller Terpene, wie in der „Isopren-Regel“ von Ruzicka (1953) veröffentlicht wurde.

Die Bildung dieser C₅-Körper ist der erste von drei biogenetischen Abschnitten, die bei der Bildung eines Terpens ablaufen (Übersicht s. Knöss, 1999). Im zweiten Abschnitt werden die Grundkörper zu aktivierten linearen Zwischenprodukten verknüpft, welche die Verzweigungspunkte zu den unterschiedlichen Terpenklassen bilden. Im dritten Abschnitt wird schließlich dieses Grundgerüst bis hin zum einzelnen Terpen, dem Endprodukt verändert.

Der erste der drei Abschnitte, die Synthese des C₅-Körpers, kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen:

Der Mevalonat-Acetat-Weg wurde in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts als erster der beiden Wege entdeckt. Er wurde im Rahmen der Sterol-Biosynthese in Lebergewebe und Hefen aufgeklärt. Hierbei kondensieren zunächst zwei Moleküle Acetyl-CoA in einer Claisen-Kondensation zu Acetoacetyl-CoA. Durch die Anlagerung eines dritten Moleküls Acetyl-CoA entsteht 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA. Im nächsten Schritt der Reaktion wird mit Hilfe der HMG-CoA-Reductase Mevalonsäure gebildet. Unter ATP-Verbrauch wird Mevalonsäure phosphoryliert und decarboxyliert. Es entsteht IPP, das über eine Isomerase im Gleichgewicht mit DMAPP steht (s. Abb. 1.3).

Der zweite, Mitte der 90er Jahre von zwei Arbeitsgruppen fast parallel postulierte und beschriebene Weg (Rohmer et al., 1993; Schwarz, M., 1994) wird nach einem der Schlüsselmetabolite 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat als MEP-Weg bezeichnet. Er ist der entwicklungsgeschichtlich jüngere Biosyntheseweg und findet bei höheren Pflanzen in den Plastiden statt (Rohmer, 1998), während der Mevalonat-Acetat-Weg dem Zytoplasma zugerechnet wird. Zwischen beiden Kompartimenten gibt es wahrscheinlich einen begrenzten Austausch, dessen Ablauf und Umfang noch nicht näher aufgeklärt werden konnten.

1. Einleitung

Glycerinaldehyd und Pyruvat kondensieren unter Beteiligung des Kofaktors Thiamindiphosphat unter der Katalyse der 1-Deoxyxylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat. Aus diesem Zwischenprodukt entsteht unter dem Einfluss der 1-Deoxyxylulose-Reduktoisomerase (DXR) das 2-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (Kuzuyama et al., 1998). Über weitere Zwischenstufen, u.a. unter Beteiligung von Cytidin und der Enzyme *IspD*, *IspE* und *IspF* (s. Abb. 1.3.) führt auch dieser Biosyntheseweg letztendlich zu IPP und DMAPP (Zusammenfassung s. Eisenreich et al., 2001). Die letzten Schritte der Biogenese sind noch nicht bekannt; kürzlich wurden zwei beteiligte Enzyme *GcpE* und *LytB* identifiziert (Altincicek, 2001 a und b).

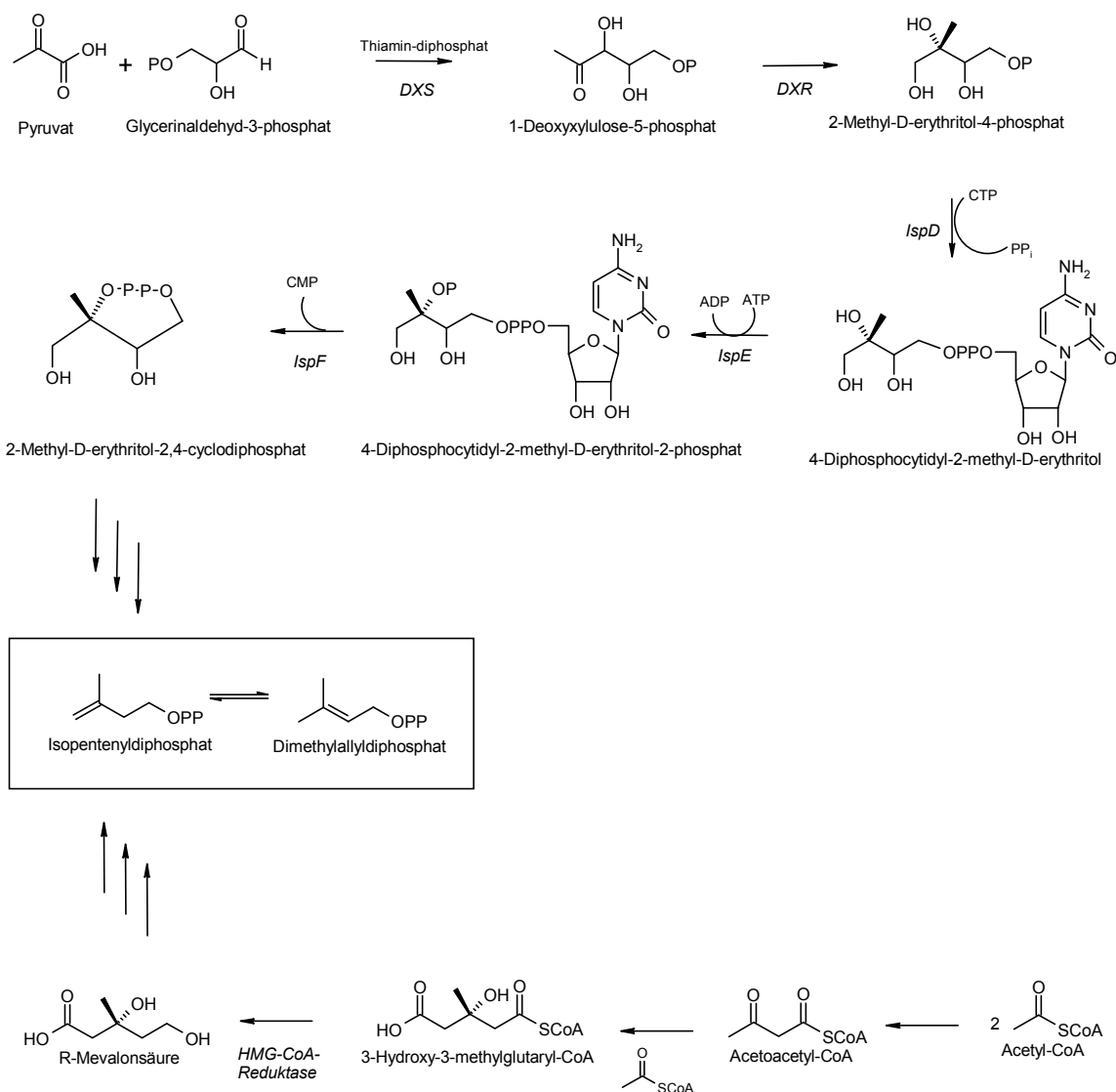


Abb. 1.3 Erste Schritte der Biosynthese von IPP bzw. DMAPP Die Biosynthese des „aktiven Isoprens“ erfolgt teilweise über den MEP-Weg (oben), teilweise über den Acetat-Mevalonat-Weg (unten) (nach Lichtenthaler (1998) und Reuter et al. (2002) mit Modifikationen).

Mehrere C₅-Bausteine werden im zweiten Abschnitt der Terpenbiogenese zu den aktivierten Vorstufen von Mono-, Sesqui- und Diterpenen (Geranyldiphosphat, Farnesyldiphosphat, Geranylgeranyldiphosphat) zusammengesetzt. Diese linearen Vorstufen (s. Abb. 1.4) bilden die Verzweigungspunkte des Terpenstoffwechsels. Die Verknüpfungen verlaufen dabei immer „Kopf-Schwanz“, es tritt also eine 1,4-Verknüpfung ein. Zwei Moleküle Farnesyldiphosphat können nun aber auch „Kopf-Kopf“ kondensieren, es entsteht das Squalen der Triterpene. Bei Kondensation zweier Moleküle Geranylgeranyldiphosphat gelangt man zu Phytoen, der „Muttersubstanz“ der Tetraterpene.

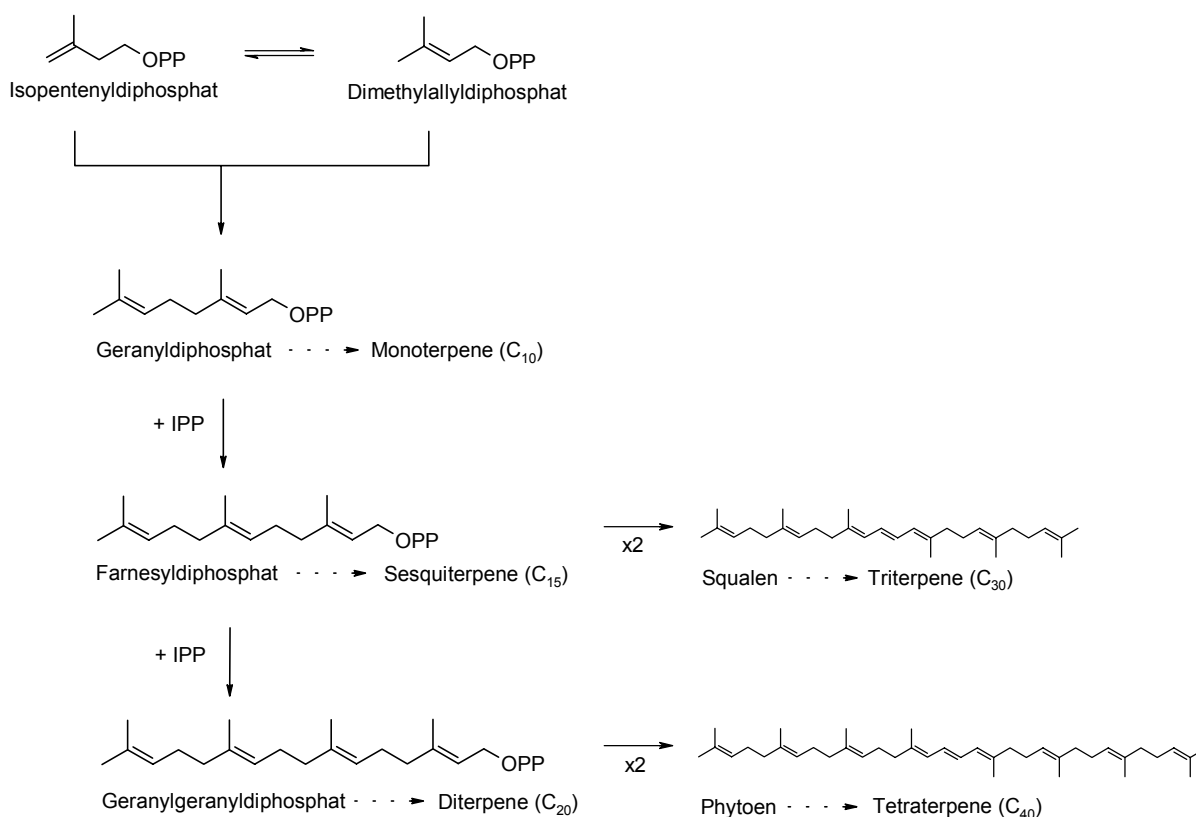


Abb. 1.4 Zweiter Abschnitt der Biosynthese von Terpenen: Die Isoprenbausteine werden miteinander verknüpft. Geranyldiphosphat, Farnesyldiphosphat und Geranylgeranyldiphosphat entstehen durch sukzessive Anlagerung von IPP. Tri- bzw. Tetraterpene entstehen durch die Zusammenlagerung zweier Farnesyl- bzw. Geranylgeranyldiphosphatmoleküle.

Der dritte Abschnitt der Biogenese des einzelnen Isoprenoids verläuft individuell. Ein Beispiel ist mit der Biogenese des Marrubiins in Abschnitt 1.2.1. beschrieben. Insgesamt wurden bislang mehr als 30.000 verschiedene Terpene beschrieben (Buckingham, 1998). Terpene kommen sowohl im Primär-, als auch im Sekundärstoffwechsel vor. Im Primärstoffwechsel treten z.B. die Sterole als Bausteine biologischer Membranen oder das Phytol der Seitenkette des Chlorophylls auf.

1.2.1 Marrubiin aus *Marrubium vulgare* L.

Marrubium vulgare, der weiße Andorn, ist eine alte Arzneipflanze, die bereits im Mittelalter verwendet wurde. Die Anwendung ist z.B. bei Dioskurides, Hildegard v. Bingen und Matthiolus beschrieben (zusammengefasst bei Benedum et al., 1994). Die Autoren verwenden das Kraut besonders bei Husten und Schleim in der Brust. *Marrubii herba* wird in der heutigen Phytotherapie relativ wenig eingesetzt. Die Monographie der Kommission E nennt als Anwendungsgebiete Katarrhe der Luftwege, Appetitlosigkeit und dyspeptische Beschwerden (Bundesanzeiger vom 01.02.1990, Nr. 22a). Zur Zeit wird der Entwurf einer Monographie „*Marrubii herba*“ überarbeitet, die in das Europäische Arzneibuch aufgenommen werden soll (Knöss, pers. Mitteilung).



Abb. 1.5 *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae), weißer Andorn.

Das Kraut schmeckt ebenso wie die Teezubereitung sehr bitter. In Australien wurde *Marrubium vulgare* eingebürgert; aufgrund seiner Bitterkeit wird es vom Vieh nicht abgegrast und bedroht daher die Weideflächen (Ainsworth, 1999). Diese Bitterwirkung beruht wahrscheinlich überwiegend auf Marrubiin, einem Furanolabdanditerpen, das in der Regel in einer Menge von etwa 1 mg / g im getrockneten Kraut enthalten ist.

Die Bitterwirkung soll für die Linderung bei dyspeptischen Beschwerden ebenso verantwortlich sein wie eine choloretische Wirkung der Marrubiinsäure, die durch Hydrolyse des Lactonringes aus Marrubiin entsteht (Krejci et al., 1959). Eine zum Wirkungsbild passende relaxierende Wirkung am isolierten Muskel von Magen, Ileum, Duodenum und Uterus verschiedener Tiere wurde von Schlemper et al. (1996) *in vitro* nachgewiesen.

Zur Anwendung bei Atemwegserkrankungen fand sich in der neueren Literatur lediglich eine deskriptive ethnopharmakologische Arbeit aus Italien, die eine positive Wirkung von *Marrubium vulgare* bei Asthma propagiert (Ballero et al., 1998).

M. vulgare wird besonders in der mittelamerikanischen Volksmedizin genutzt. Daher wurden Zubereitungen aus *Marrubium vulgare* in zwei Untersuchungen zu hypoglykämischen Eigenschaften traditioneller Arzneipflanzen in Mexiko bzw. Brasilien aufgenommen. In beiden Fällen wurde ein positiver Effekt auf den Blutglucosespiegel der untersuchten Tiere nachgewiesen (Ramos et al., 1992 und Novaes et al., 2001).

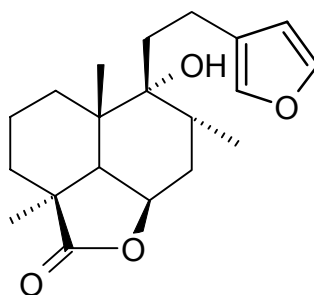


Abb. 1.6 Marrubiin

Marrubiin wurde bereits 1908 isoliert (Gordin, 1908). In den 50er und 60er Jahren des letzten Jahrhunderts war Marrubiin als nicht-flüchtiges und „robustes“ Diterpen mit fünf Stereozentren das Ziel verschiedener Arbeitsgruppen, die mittels Derivatisierungs- und Abbaureaktionen (Burn et al., 1957; Hardy et al., 1957; Appleton et al., 1967; Popa et al., 1968; Fulke et al., 1968) sowie frühen NMR-Experimenten (Wheeler et al., 1967; Stephens et al., 1970; Mangoni et al., 1968 und 1972) die absolute Konformation des Furanolabdanditerpens ermittelten.

Die Biosynthese der Isoprenoide am Beispiel des Marrubiins ist einer der Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Knöss (s. Abb. 1.7). Durch Inkorporationsversuche konnte nachgewiesen werden, dass die Isoprenbausteine des Furanolabdanditerpens aus dem MEP-Weg stammen (Knöss et al., 1997). Es wurden weitere Untersuchungen zu frühen Schritten der Terpenbiogenese (Pena Eversberg, 1998) und zu einer Terpensynthase in *Marrubium vulgare* (Zamponi, 2002) durchgeführt.

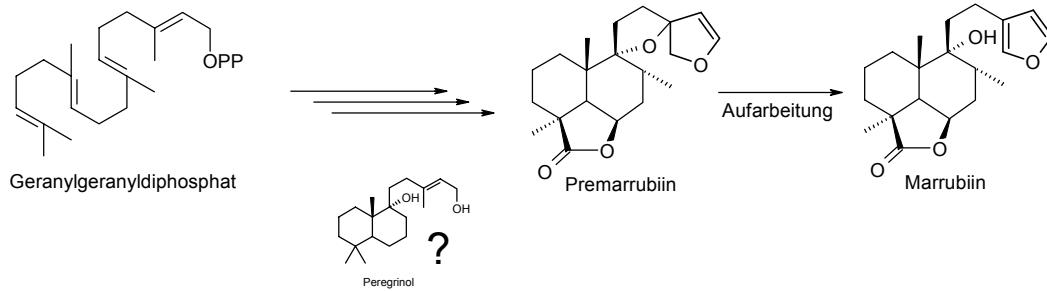


Abb. 1.7 Biosynthese des Marrubiins aus Geranylgeranyldiphosphat. Aus GGPP entsteht in verschiedenen bislang nicht genauer charakterisierten Schritten Premarrubiin. Gegen Ende des Vegetationszyklus geht das instabile Premarrubiin in Marrubiin über. Lopez et al. (1998) vermuten, dass Peregrinol ein Zwischenprodukt in der Biosynthese darstellen könnte.

Das Diterpen Marrubiin liegt erst gegen Ende der Vegetationsperiode in größeren Mengen in *Marrubium vulgare* vor. Unter der Verarbeitung des Pflanzenmaterials geht die instabile Vorstufe Premarrubiin in Marrubiin über.

Lopez et al. (1998) isolierten aus Drüenschuppen von *Marrubium vulgare* Peregrinol. Die Autoren vermuten, dass dieses Labdan eines der Zwischenprodukte in der Biosynthese von Marrubiin darstellen könnte, was bislang jedoch nicht nachgewiesen wurde. Lopez et al. vermuten den Ort der Synthese von Marrubiin in den sekretorischen Drüsen der Blattoberfläche. Aufgrund der Biosynthese über den MEP-Weg ist der erste Schritt, die Zyklisierung, wahrscheinlich in Plastiden lokalisiert. Die folgenden Schritte bis hin zum Premarrubiin sind noch nicht charakterisiert. Auch der genaue Ort der Speicherung der Furanolabdane ist noch unbekannt.

1.2.2 Saponine und Oleanolsäure

Die bei der Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Furanolabdanditerpene entwickelten Methoden und gewonnenen Erfahrungen sollten zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen eine weitere Zielstruktur aus der Gruppe der Terpene genutzt werden. Bei der Auswahl der Substanz spielten diesmal besonders pharmazeutisch-analytische Gesichtspunkte eine Rolle. Eines der „Stiefkinder“ der Arzneibuchanalytik sind Saponine. Das Sapogenin Oleanolsäure wurde als Zielstruktur vorgesehen.

Saponine sind pflanzliche Glykoside, die im wesentlichen durch gemeinsame Eigenschaften wie das Schaumbildungsvermögen, die Hämolyse von Erythrozyten und die Komplexbildung mit Cholesterol charakterisiert werden (Wulff, 1968). Diese Eigenschaften beruhen auf dem amphiphilen Charakter der Moleküle, bestehend aus einem polaren glykosidischen Teil und einem apolaren Aglykon. Man unterscheidet Monodesmoside mit einer Zuckerkette und Bidesmoside, die zwei Zuckerketten tragen (Bader, 1994).

Eine HPLC-Bestimmung ermöglicht in vielen Fällen eine Einzelbestimmung verschiedener Saponine, ist aber zur Gesamtbestimmung eines komplexen Saponingemisches mit z.T. mehreren Dutzend Einzelkomponenten nicht immer geeignet. Zudem sind die Analysen apparate- und kostenaufwändig (Adam, 2000). Zur Bestimmung von Gesamtsaponinfraktionen werden biologische Wertbestimmungen wie der wenig genaue Hämolytische Index herangezogen. Hierbei wird die hämolytische Wirkung auf Erythrozyten mit der eines Standardsaponins verglichen. Nicht minder ungenau ist die sogenannte Schaumprobe, bei der die Menge und Stabilität eines durch mechanische Einwirkung entstandenen Schaums über der emulgierend wirkenden Saponin-Drogenlösung beurteilt wird.

Saponine bzw. saponinhaltige Drogen werden in vielfältiger Weise in der Phytotherapie eingesetzt. Hierbei wird zumeist Rückgriff auf die antiödematösen, antiphlogistischen, venentonisierenden, diuretischen, expectorierenden und broncholytischen Eigenschaften der Saponine genommen (Lacalle-Dubois et al., 1996). Die Verbindungen werden nach der Art ihres Aglykons, dem sogenannten Sapogenin, eingeteilt (Römpp, 1997). Man findet bei Pflanzen Steroidsaponine, die ein von Cholesterol abgeleitetes Spirostan- oder Furostan-Grundgerüst zeigen, und Triterpensaponine, die häufig dem Oleanol- seltener dem Ursol- oder Dammaran-Grundtyp angehören (s. Abb. 1.8). Einige Autoren rechnen auch die Steroidalkaloidglykoside zu den Saponinen (Teuscher, 1990). Unter allen diesen Gruppen haben die Triterpene vom Oleanoltyp sowohl absolut als auch in der Gruppe der arzneilich verwendeten Saponine den größten Anteil.

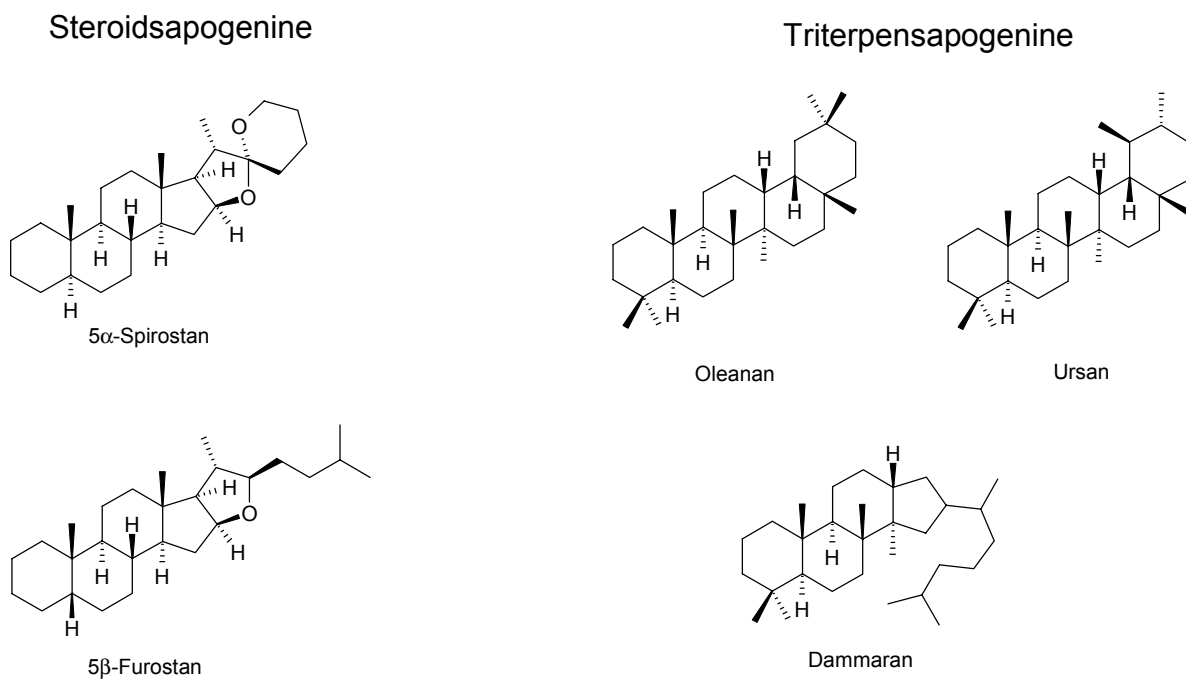


Abb. 1.8 Grundkörper der Sapogenine. Die Aglyka der Saponine werden in Steroidsapogenine (links) und Triterpensapogenine (rechts) unterteilt. Steroidsapogenine können zum Spirostan- oder Furostan-Typ gehören. Bei Triterpensaponinen werden Oleanol-, Ursol- und Dammaran-Typ unterschieden.

Oleanolsäure (Struktur s. Abb. 1.9) ist in freier Form ebenso weit in der Natur verbreitet wie als Sapogenin der Triterpensaponine (Liu, 1995). Die Biosynthese der Triterpene wie auch der Sterole geht von Squalen aus (Price et al., 1987). Wie auch die Sterole haben auch die Triterpene selbst verschiedenste biologische Effekte. Es wird berichtet, dass Oleanolsäure, bedingt durch die Strukturähnlichkeit mit Cholesterol, in der Lage sei, überhöhte Blutfettwerte zu senken (Ma, 1986). Oleanolsäure soll weiterhin hepatoprotektiv (Liu et al., 1995) und ebenso wie Glycyrrhetinsäure ulcusprotectiv wirken (Farina et al., 1998). Der Bernsteinsäurehalbester der Glycyrrhetinsäure war unter dieser Indikation bis vor kurzer Zeit im deutschen Arzneimittelschatz, auch Oleanylsuccinat bzw. dessen Synthese sind patentiert.

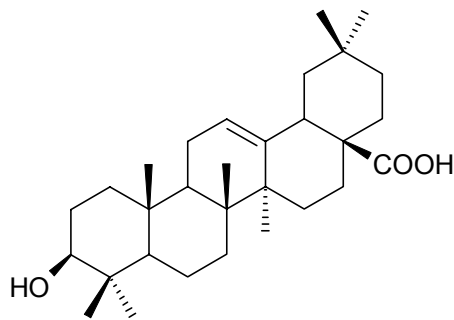


Abb. 1.9 Oleanolsäure

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Biogenese von Marrubiin in der Arzneipflanze *Marrubium vulgare* ist einer der Forschungsschwerpunkte der Arbeitsgruppe Knöss. Ziel dieser Arbeit war es, monoklonale Antikörper als ein präzises und sensitives Werkzeug zum Nachweis dieses Furanolabdanditerpens, seiner Vorstufen und gegebenenfalls verwandter Strukturen herzustellen.

Hierfür musste zunächst ein geeignetes „Antigen“ gefertigt werden, um das relativ kleine Diterpenmolekül dem Immunsystem des zu immunisierenden Tieres, in diesem Fall einer Maus, zugänglich zu machen. Nach der Darstellung eines geeigneten Proteinkonjugates sollte die Immunisierung und Generierung der monoklonalen Antikörper in Zusammenarbeit mit Dr. Ilse Zündorf, Frankfurt, durchgeführt werden. Geeignete Antikörper der etablierten Hybridom-Linien sollten in einem apparativ einfachen und kostengünstigen ELISA selektiert werden. Das System sollte optimiert, die Zell-Linien charakterisiert und das von den monoklonalen Antikörpern jeweils erkannte Epitop näher bestimmt werden.

Die Methoden, die bei der Bearbeitung dieses Projektes entwickelt wurden, sollten dann auf eine zweite Substanz aus der Klasse der Terpene übertragen werden. Hierfür wurde das Triterpen Oleanolsäure gewählt, das als „Muttersubstanz“ einer großen Gruppe von Triterpensaponinen ein breites Spektrum potentieller Zielstrukturen umfasst. Entsprechend sollte das Proteinkonjugat so gestaltet werden, dass eine möglichst große Gruppe an Triterpenen einerseits, andererseits gegebenenfalls auch Oleanolsäure selbst spezifisch bestimmt werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungsmittel und Chemikalien

Chemikalien:

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad „zur Analyse“. Die Bezugsquellen der im Rahmen der Synthese und dem ELISA verwendeten Substanzen sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Substanz	Bezugsquelle
D-[¹⁴ C]-Glucose, spez. Aktivität 3,46 mCi / mmol 1,4-[¹⁴ C]-Bernsteinsäureanhydrid, 10,9 mCi / mmol	Dupont NEC
Chlorameisensäureisobutylester Dioxan, wasserfrei Tributylamin	Fluka
Milchpulver „fettfrei“	Frema
Anisaldehyd Bernsteinsäureanhydrid Digitoxigenin Furan-3-carbonsäure Kaliumhydroxid Natriumchlorid Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O Phosphorsäure (85%ig) Vanillin	Merck
Aktivkohle	Riedel-de Haën
ABTS	Roche
Anti-Maus IgG, whole molecule, Peroxidase conjugate (A-8924) Cholesterol Bovines Serumalbumin Bovines Thyroglobulin 4-Dimethylaminopyridin Glycyrrhetinsäure Lithiumaluminiumhydrid Mercaptoethanol Oleanolsäure	Sigma

Tab. 2.1 Im Rahmen dieser Arbeit zur Synthese und im ELISA eingesetzten Substanzen.

Lösungsmittel:

Aceton, Chloroform (CHCl₃), Dichlormethan (DCM), Ethanol (EtOH), Isopropanol, Methanol (MeOH), n-Hexan und Ethylacetat entstammten Hochschul-Lieferungen mit dem Reinheitsgrad „technisch rein“ und wurden vor der Verwendung destilliert.

MeOH für die HPLC (Fluka) hatte den Reinheitsgrad „zur Analyse“.

Das verwendete entmineralisierte Wasser wurde mit der Wasseraufbereitungsanlage „Milli-Q-Reagent Water“ der Fa. Millipore, Eschborn, gewonnen.

2.2 Puffer und Reagenzien

Die verwendeten Puffer und Reagenzien wurden in Tabelle 2.2 zusammengefasst:

Bezeichnung	Bestandteile	Herstellung / Hinweise
PBS-Puffer	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 5,8 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,53 g NaCl 8,76 g Aqua demin. ad 1000,0 ml	pH = 7,4
Farbpuffer ELISA	Na Acetat 13,6 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 6,1 g Aqua demin. ad 1000,0 ml	pH = 4,2 Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.
Färbelösung ELISA	Farbpuffer ELISA 25 ml ABTS-Reagenz 3 mg H ₂ O ₂ 30% 7µl	Die Färbelösung wurde vor Gebrauch stets frisch zubereitet.
Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz	Anisaldehyd 0,5 ml Eisessig 10 ml Methanol 85 ml H ₂ SO ₄ conc. 5 ml	Das Reagenz wurde bei 4°C gelagert.
Bradford-Reagenz	Coomassie® Brilliant Blue G 250 (Fa. Serva, Heidelberg) 100 mg EtOH (95%ig) 50 ml H ₃ PO ₄ (85%ig) 100 ml Aqua demin. ad 1000,0 ml	Das Reagenz wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch filtriert.

Tab. 2.2 Puffer und Reagenzien

2.3 Isolierung, qualitative und quantitative Analyse der Isoprenoide

2.3.1 Extraktion der Furanolabdanditerpene aus *Marrubium vulgare*

Das Pflanzenmaterial von *Marrubium vulgare* L. wurde im Garten des Instituts für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn angebaut. Es wurden jeweils die Blätter und jungen Triebspitzen geerntet. Getrocknetes Pflanzenmaterial „*Marrubii herba*“ wurde von der Fa. Caelo bezogen.

Extraktion:

Das Frischpflanzen- oder Drogenmaterial wurde mit einer Schere grob zerkleinert. Das Pflanzenmaterial wurde in kaltem Aceton (10 ml / g Material) mit einem Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, Staufen) fein zerkleinert. Unter gelegentlichem Umrühren wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur extrahiert. Feste Bestandteile wurden abfiltriert. Dem Rohextrakt wurde der größte Anteil an Chlorophyll durch eine Behandlung mit Aktivkohle (0,5 g / 100 ml Rohextrakt) entzogen.

Reinigung der FLD - analytisch:

a) selektive Anreicherung der FLD

Die zu trennenden Extrakte wurden bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in MeOH / Wasser (8:2) aufgenommen. Die FLD lösten sich in diesem Gemisch vollständig.

Die FLD wurden mit Festphasenextraktionsröhrchen (RP-18-Material) der Fa. Baker, „Bakerbond spe 7020-01“ mit einem Säulenvolumen von 1 bzw. 6 ml getrennt:

- 1) Konditionierung: 3ml MeOH
3ml MeOH / H₂O (8:2)
- 2) Probenaufgabe: 1ml Probe gelöst in MeOH / H₂O (8:2)
- 3) Waschen: 1ml MeOH / H₂O (8:2)
- 4) Elution: 1ml MeOH
1ml CHCl₃

Die polaren Fraktionen (2 + 3) enthielten die FLD, unpolare Verbindungen wurden erst mit Methanol bzw. Chloroform eluiert.

b) Trennung der FLD

Die bei der Anreicherung erhaltenen FLD-reichen Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand in CHCl_3 / n-Hexan (6:4) aufgenommen. Die FLD wurden an Festphasenextraktionsröhrchen (Kieselgel-Material) der Fa. Baker, „Bakerbond spe 7086-01“ mit einem Säulenvolumen von 1 bzw. 3 ml getrennt:

- 1) Konditionierung: 3ml CHCl_3
3ml CHCl_3 / n-Hexan (6:4)
- 2) Probenaufgabe: 1ml Probe gelöst in CHCl_3 :n-Hexan (6:4)
- 3) Waschen: 1ml CHCl_3 / n-Hexan (6:4)
- 4) Elution: 1ml CHCl_3
1ml CHCl_3 / Methanol (1:1)
1ml Methanol

Reinigung der FLD (präparativ):

Der mit Aktivkohle vorgereinigte Rohextrakt wurde am Vakuum zur Trockne eingeeengt und der verbleibende Rückstand in CHCl_3 / n-Hexan (4:6) gelöst. Die Substanzen wurden mittels einer Kieselgelsäule (300mm x 24 mm, Kieselgel 60 der Fa. Merck, Korngröße 0,040-0,063 mm) präparativ getrennt. Die Säule wurde mit Chloroform und CHCl_3 / n-Hexan (4:6) konditioniert, die Elution mit einem Stufengradienten von CHCl_3 / n-Hexan (4:6) in mehreren Stufen bis CHCl_3 , weiter mit CHCl_3 / Methanol (9:1) bis zu reinem Methanol fortgesetzt. Es wurden zwischen 20 und 80 Fraktionen zu je 10 ml gesammelt und dünnschichtchromatographisch untersucht. Falls erforderlich, wurden die FLD durch weitere säulenchromatographische Trennungen mit noch feineren Abstufungen und größerer Fraktionenzahl weiter aufgetrennt.

2.3.2 Gewinnung von ^{14}C -Marrubiin

Eine 8-10 Wochen alte Pflanze von *Marrubium vulgare* L. wurde gewaschen und von alten Blättern und Wurzeln befreit. Die frisch angeschnittenen Sprosssteile wurden in modifiziertem MS / 2-Medium (ohne Zucker, ohne Hormone, pH = 5,8) unter Zugabe von 25 μCi ^{14}C -Glucose 10 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Das getrocknetet Blattmaterial wurde mit einer Schere grob zerschnitten und in einem Porzellanmörser unter Zugabe von 3 ml Aceton fein zermahlen. Die Suspension wurde mit Aceton auf 20 ml aufgefüllt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur extrahiert.

Nach Filtration und Konzentrieren bei reduziertem Druck wurde der Rückstand analog den in Abschnitt 2.2 beschriebenen Methoden aufgearbeitet.

2.3.3 Herstellung von Drogenextrakten

Acetonischer Extrakt

Furanolabdanditerpene wurden mit Hilfe eines acetonischen Extraktes aus dem Pflanzenmaterial extrahiert. Hierfür wurde das Material mit 10 ml kaltem Aceton pro g Pflanzenmaterial versetzt und mit einem Ultra-Turrax fein zerkleinert. Nach 30 Minuten Extraktion unter gelegentlichem Umrühren wurden die Drogenreste abfiltriert. Der Extrakt wurde bei 4°C gelagert.

Ethanolischer Extrakt

Das getrocknete Pflanzenmaterial verschiedener Saponin- bzw. Triterpen-reicher Arzneipflanzen wurde gepulvert. Je 0,5 g des Materials wurden mit 5 ml 70%igem Ethanol (V / V) 10 Minuten lang unter Rückfluss extrahiert. Das klare Filtrat wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert (Wagner et al., 1983).

Wässriger Extrakt

Für erste Untersuchungen zum Furanolabdanditerpengehalt verschiedener Arzneipflanzen wurde das entsprechende getrocknete Pflanzenmaterial 5 Minuten lang in 10 mg entmineralisiertem Wasser pro g Pflanzenmaterial gekocht. Nachdem die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden feste Bestandteile abfiltriert und die Extrakte bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.3.4 Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographische Trennung (DC) der FLD:

Für die DC der FLD wurden DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck verwendet. Als Fließmittel wurde CHCl₃ / MeOH (95:5), für DC von Marrubenolsuccinat CHCl₃ / MeOH (80:20) verwendet. Die DC-Platten wurden mit Vanillin / Schwefelsäurereagenz besprüht, 5 Minuten lang auf 120°C erhitzt und bei Tageslicht detektiert (Knöss, 1997).

Dünnschichtchromatographische Trennung (DC) der Triterpene:

Die Triterpene wurden mit DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck getrennt. Als Fließmittel wurde CHCl₃ / MeOH (95:5) eingesetzt.

Die Platten wurden nach dem Entwickeln getrocknet und mit Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz gleichmäßig besprüht (Wagner et al., 1983). Die Platten wurden 5 Minuten auf 120°C lang erhitzt und bei Tageslicht detektiert.

2.3.5 Densitometrie

Quantitative Bestimmung der FLD mit einem DC-Scanner:

Zur Quantifizierung der FLD wurden die DC-Platten nach der Trennung gleichmäßig mit Vanillin-Schwefelsäurereagenz besprüht und 5 Minuten auf 120°C lang erhitzt. Die Platten wurden 24 Stunden lang dunkel gelagert. Danach wurde die Absorption in den einzelnen Banden bei 527 nm mit Hilfe des DC-Scanners Camag TLC II bestimmt. Die Menge an FLD wurde durch Vergleich mit verschiedenen Verdünnungen eines Marrubiin-Standards (Auftragungsmengen zwischen 0,5 µg und 2,0 µg) bestimmt.

2.3.6 MS

Alle EI-Messungen (70 eV), in dieser Arbeit wurden im Institut für Chemie der Universität Bonn an einem Finnigan MAT 8430 von Herrn Dr. Eckhardt, Frau C. Sondag und Frau K. Peters aufgenommen.

2.3.7 Methoden zur Messung von [¹⁴C]

Radio-Scanner für die DC

Radioaktiv markierte Reaktionsprodukte wurden auf Dünnschichtchromatogrammen mit Hilfe eines Radioscanner LB2722 (Fa. Berthold, Bad Wilbach) in Verbindung mit dem Ratemeter LB2031 (Fa. Berthold, Bad Wilbach) untersucht.

Parameter:

Hochspannung:	x 3
Spannung:	927 V
Sensitivität:	1 x 10 ¹ cps
Energie / Zeit konst.:	10 s

Szintillationszähler

Lösungen bzw. Suspensionen radioaktiv markierter Reaktionsprodukte wurden im Szintillationscocktail OptiPhase „HighSafe“3 (Fa. Wallac, Turku, Finnland) mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers 1409 (Fa. Wallac, Turku, Finnland) mit der Software 1400 DAS, Version 1.8 und dem Drucker E620 (Fa. Facit, Åtvidaberg, Schweden) analysiert.

Parameter:

Zählmodus:	dpm
Quenchindex:	SQP(E)
Isotop:	[¹⁴ C]
Meßdauer:	300 sec
Wiederholungen pro Messung:	1
Durchgänge:	1
Replikate (Probenmittelung):	-
2 sigma %:	0,01%
Minimum cpm:	0,00 (Überprüfungszeit: 10 sec)
Spez. Bibliothek der Isotope:	Wallac [¹⁴ C]
Meßgefäßtyp :	diffus
Flüssigsystem :	HighSafe
Weiterer Modus :	Chemiluminiszenzkorrektur
Spektrum :	Beta

2.3.8 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Pumpe:	HPLC-Pumpe 64 (Fa. Knauer, Berlin)
Detektor:	Photodioden-Array-UV / Vis-Detektor (Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan)
Säulen:	
Vorsäule:	30 mm x 4 mm (Edelstahl, Fa. Knauer, Berlin)
Trennsäule:	250 mm x 4 mm (Edelstahl, Fa. Machery-Nagel, Düren)
Stationäre Phase:	
Vorsäule:	Perisorp RP-8 (Fa. Merck, Darmstadt)
Trennsäule:	Nucleosil 120-5 C 18 (Fa. Machery-Nagel, Düren)
Mobile Phase:	MeOH / Wasser (7:3)
Angaben zur Durchführung:	
Elution:	isokratisch
Flußgeschwindigkeit:	2 ml / Minute
Druck:	6,0-8,0 MPa
Trenndauer:	ca. 20 Minuten (je nach Probe)

2.3.9 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

Gerät:	Bruker Advance DPX 300MHz
Software:	XWinNMR 2.61
Lösungsmittel:	CDCl ₃ (99,8%, Deutero GmbH, Kastellaun)
	CD ₃ OD (99, 8% Deutero GmbH, Kastellaun)

Referenzabgleich:

CDCl ₃	¹ H und ¹³ C: 7,26 ppm bzw. 77,0 ppm
CD ₃ OD	¹ H und ¹³ C: 3,35 ppm bzw. 30,50 ppm
C ₆ D ₆	¹ H und ¹³ C: 7,20 ppm bzw. 128,0 ppm

Es wurden die Daten aus den folgenden Experimenten herangezogen:

¹H, ¹³C und DEPT 135.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Methode nach Bradford (1976) wurde zur quantitativen Bestimmung von Proteinen und Proteinkonjugaten eingesetzt. Die Bestimmungen wurden entweder in Küvetten oder in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Küvetten

100 µl der Untersuchungslösung wurden in einer Polystyren-Küvette (Greiner) mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm mit einem Spektralphotometer (UVIKON 810, Fa. Kontron, München) gegen einen Blindwert aus 100 µl H₂O mit 1 ml Bradford-Reagenz gemessen.

Mikrotiterplatten

Je 10 µl der Untersuchungslösung und 100 µl Bradford-Reagenz wurden in eine Vertiefung einer Greiner PS Microplatte (96 well) gegeben und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Blindwert wurde entsprechend mit 10µl Wasser und 100µl Reagenz bestimmt. Die Absorption der Proben wurde in einem SLT Rainbow-Mikrotiterplattenreader gemessen.

Eine Standard-Verdünnungsreihe wurde erstellt, indem 1-10 µg des BSA bzw. Thyroglobulin in 1µg-Schritten in jeweils 1000 µl H₂O gelöst wurden. Die Proben der Verdünnungsreihe wurden ebenfalls mit der entsprechenden Menge Bradford-Reagenz 5 Minuten lang inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt.

2.4.2 Proteinreinigung

Dialyse

Das zu reinigende Protein (z.B. Proteinkonjugate nach Abschnitt 2.5.4) wurde in Dialyseschläuche Zellutrans Roth[®] (Flachbreite 10 mm, Nominale Filtrierleistung 6,000 kDa) transferiert und gegen Wasser (2 L / 5 ml Produkt) bei 4°C 4 Tage lang dialysiert. Das Wasser wurde nach jeweils 8 Stunden gewechselt. Die Vollständigkeit der Dialyse wurde durch Dünnschichtchromatographie der Produktlösung überprüft. Bei Ansätzen mit radioaktiv markierter Bernsteinsäure wurde zusätzlich die Menge ¹⁴C-Bernsteinsäure in der Spüllösung bestimmt.

Größenausschlußchromatographie

Das zu reinigende Proteinkonjugat wurde in einer Konzentration von ca. 3 mg / ml in PBS gelöst. Die Lösung wurde über eine Probenschleife auf eine Sephadex-A-25-Säule aufgetragen.

Säule:	Durchmesser:	1,0 cm
	Länge:	24 cm
Füllmaterial:	Sephadex A25	
V _{tot} :	19 ml	
Flussrate:	2 ml / Minute	
Detektion:	Software UNICORN [™]	
	Bestimmung der Leitfähigkeit, UV-Absorption (215 nm)	

Die Säule war an ein Äkta-FPLC-System (Fa. Amershon, Freiburg) angeschlossen. Als Fließmittel wurde PBS verwendet. Große Proteine wie das zu separierende Proteinkonjugat diffundieren beim Durchlaufen der Säule seltener in die Poren der Polymermatrix und eluieren deshalb vor den niedermolekularen Begleitsubstanzen. Mit Hilfe eines Probensammlers (Amershon Frac-900) wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Der Proteingehalt der Proben wurde mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford überprüft und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt.

2.4.3 Gel-Elektrophorese

Zur Analyse der Proteinkonjugate wurde ein SDS-Proteingel nach Lämmli (1970) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einer Kammer zur vertikalen Elektrophorese (ThermoQuest EC120 mini vertical gel system) in Verbindung mit einem Spannungsgeber DESAGA PS 600 durchgeführt. Als Molekulargewichts-Marker wurde ein Standard-Coctail eingesetzt.

Probenvorbereitung:

Loading Mix: 6 mM TRIS-HCl 10% Glycerin 3% Mercaptoethanol 0,01% Bromphenolblau	Elektrophorese-Puffer: TRIS: 7,5 g Glycin: 38,5 g SDS: 2,5 g H ₂ O: ad 2500 ml
--	--

Die Proben (2-5 µg Protein) wie auch der Molekulargewichtsmarker wurden in 1,5 ml Reaktionsröhrchen („Eppendorf-Caps“) mit „Loading Mix“ 5 Minuten lang im Wasserbad zum Sieden erhitzt und danach wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Gelvorbereitung:

6% Trenngel: H ₂ O: 5,3 ml 30% Acrylamid-Mix: 2,0 ml 1,5M TRIS (pH= 8,8): 2,5 ml 10% SDS 0,1 ml 10% Ammoniumpersulfatlg. 0,1 ml TEMED 8 µl	3% Sammelgel: H ₂ O: 6,0 ml 40% Acrylamid-Mix: 0,75ml Sammelgelpuffer: 2,5 ml APS 20% 75 µl TEMED 15 µl
--	--

Die Gelelektrophoresekammer wurde entsprechend den Vorgaben der Firma ThermoQuest zusammengesetzt und die Gelschablone zunächst mit dem 6%igen Trenngel gefüllt. Die Oberfläche wurde mit n-Butanol bedeckt, um eine gleichmäßig glatte Oberfläche und Luftabschluss zu erreichen. Die Polymerisation war nach 60 Minuten abgeschlossen.

2. Material und Methoden

Die n-Butanolschicht wurde entfernt und die Schablone vorsichtig mit entmineralisiertem Wasser gespült. Danach wurde der Innenraum der Schablone vorsichtig, ohne die Schicht des Trenngels zu verletzen, mit einem Stück Zellstoff getrocknet.

Der Taschenformer („Taschenkamm“) wurde in die Schablone eingepasst und das frisch vorbereitete Sammelgel bis an den oberen Rand der Zinken des Formers luftblasenfrei gegossen. Die anschließende Polymerisation des Sammelgels war nach 20 Minuten abgeschlossen.

Elektrophorese

Der Taschenformer wurde vorsichtig abgezogen und die gebildeten Taschen mit Elektrophoresepuffer gespült, um Gelreste zu entfernen. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben sowie der Molekulargewichtsmarker in die entsprechenden Taschen pipettiert.

Die Gelkammer wurde daraufhin geschlossen und ein Strom von 25 mA pro eingesetztem Gel angelegt. Die Elektrophorese war beendet, sobald das Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte. Nach dem Öffnen der Kammer wurde das Gel vorsichtig von der Gelschablone gelöst.

Detektion der Proteinbanden

Das Gel wurde 60 Minuten lang in einer Petrischale in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Danach wurde die Färbelösung dekantiert und zweimal mit einer kleinen Menge Entfärbelösung nachgespült. Das Gel wurde bis zum gewünschten Grad entfärbt, so dass die Proteinbanden als blaue Zonen aus der klaren Gelmatrix hervortraten.

Das Gel wurde zur Konservierung in dem Vakuumtrocker SLAB Unigel-Dryer 4050 bei 70°C 3 Stunden lang auf Gel-Blotting-Papier aufgezogen.

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>		<u>Entfärbelösung:</u>	
Coomassie Blue®	1,0 g	Eisessig	190 ml
Eisessig	75 ml	MeOH	500 ml
MeOH	500 ml	H ₂ O	ad 2000 ml
H ₂ O	ad 1000 ml		

2.4.4 MALDI-TOF

Die MALDI-TOF-Analysen der Proteinkonjugate wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sandhoff von Frau H. Hupfer und Herrn J. Hörnschemeyer erstellt. Die Bestimmungen wurden mit einem TOF Spec E (Micromass) durchgeführt.

Die Proben (ca. 20 pmol / μ l) wurden in Acetonitril / Wasser (60:40) gelöst und mit 0,1% TFA versetzt. Als Matrix diente Sinapinsäure, ebenfalls in Acetonitril / Wasser (60:40) gelöst. Je 1 μ l Probe und Matrix wurden zusammen auf den Träger pipettiert. Mit dem Trocknen kristallisieren beide Substanzen gemeinsam aus.

BSA (Durchschnittsmasse = 66.431 Da) wurde als externer Standard eingesetzt und als zweiter Punkt neben der zu untersuchenden Substanz auf dem Träger aufgetragen.

2.5 Derivatisierungen der Isoprenoide

2.5.1 Reduktion mit LiAlH_4

2.5.1.1 Umsetzung von Marrubiin zu Marrubenol

Die Reduktion von Marrubiin zu Marrubenol wurde nach den Vorschriften von Popa et al. (1968) mit kleineren Modifikationen durchgeführt. In einem mit Magnetrührer, Tropftrichter und Rückflußkühler mit Calciumchloridrohr versehenen 200 ml Kolben wurde eine Lösung von 0,38 g (10 mmol) LiAlH_4 in 30 ml wasserfreiem THF vorgelegt. Zu dieser Lösung wurde langsam und unter Rühren eine Lösung von 158 mg (0,5 mmol) Marrubiin in 20 ml wasserfreiem THF getropft. Die Lösung reagierte 60 Minuten lang bei Raumtemperatur.

Dann wurde unter Eiswasserkühlung so lange tropfenweise kaltes Wasser zugegeben, bis die Lösung beim Eintropfen keinen Wasserstoff mehr abgab und komplett weiß wurde. Das gebildete Aluminiumhydroxid wurde abfiltriert und der Rückstand mit zweimal 30 ml THF und zweimal 30 ml DCM gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt und der Rückstand in 10 ml DCM aufgenommen. Die trübe Lösung wurde durch ein mit 2 ml Chloroform konditionierten Festphasenextraktionsröhrchen (Kieselgel-Material) der Fa. Baker, „Bakerbond spe 7086-01“ gegeben und mit 10 ml DCM nachgespült. Reste von Aluminiumhydroxid wurden auf diese Weise entfernt.

2.5.1.2 Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylalkohol

Oleanolsäure wurde zu Oleanylalkohol nach der gleichen Methode reduziert wie Marrubiin zu Marrubenol. Zu 0,38 g (10 mmol) LiAlH_4 in 20 ml wasserfreiem THF wurden langsam und unter Rühren 23 mg (0,05 mmol) Oleanolsäure in 10 ml wasserfreiem THF getropft. Die Lösung reagierte 120 Minuten lang bei Raumtemperatur.

Oleanylalkohol fiel bei der Wasserzugabe mit dem Aluminiumhydroxid größtenteils aus. Der Rückstand wurde daher je zweimal mit 30 ml DCM und 30 ml n-Hexan gewaschen. Die Lösungen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 10 ml DCM aufgenommen. Reste von Aluminiumhydroxid wurden wiederum durch Filtration durch ein Festphasenextraktionsröhrchen (Kieselgel-Material) der Fa. Baker, „Bakerbond spe 7086-01“ entfernt.

2.5.2 Alkalische Lactonspaltung

Marrubiin wurde entsprechend den Angaben von Hardy et al. (1957) hydrolysiert: 6 mg (0,05 mmol) Marrubiin wurde mit 10 ml 2M ethanolischer KOH eine Stunde lang unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit 10 ml Wasser verdünnt.

Die Lösung wurde mit Hilfe von 5N HCl stark angesäuert und die ausfallende Marrubiinsäure durch Ausschütteln mit DCM gewonnen. Die Lösung wurde mehrfach mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

2.5.3 Veresterung von Terpenalkoholen mit Carbonsäuren

2.5.3.1 Umsetzung von Marrubenol zu Marrubenolsuccinat

Für die Umsetzung von Marrubenol zu dem entsprechenden Succinat wurden zu einer Lösung von 33 mg (0,1 mmol) Marrubenol in 20 ml DCM 12 mg (1,2 mmol) Bernsteinsäureanhydrid und 7 mg (0,6 mmol) 4-Dimethylaminopyridin gegeben. Die Lösung wurde 12 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Der Hauptteil der entstehenden Bernsteinsäure konnte durch Ausschütteln der Lösung mit 3x 20 ml Wasser entfernt werden. Die Reinigung des Marrubenolsuccinates wurde analog der präparativen Reinigung der FLD in Abschnitt 2.3.1 durchgeführt. Die quantitative Bestimmung wurde analog der Bestimmung der FLD (s. Abschnitt 2.3.1) durchgeführt.

Die Reaktion wurde weiterhin mit 1,4-¹⁴C-Bernsteinsäureanhydrid (10µ Ci / 10 mg Bernsteinsäureanhydrid) durchgeführt.

2.5.3.2 Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylsuccinat

Die Umsetzung von Oleanolsäure zu Oleanylsuccinat wurde entsprechend der Synthese von Marrubensuccinat durchgeführt: Eine Mischung aus 23 mg (0,05 mmol) Oleanolsäure, 12 mg (1,2 mmol) Bernsteinsäureanhydrid und 7 mg (0,6 mmol) 4-Dimethylaminopyridin in 10 ml DCM wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt.

Oleanylsuccinat wurde von überschüssiger Bernsteinsäure durch Ausschütteln der DCM-Lösung mit 3x 10 ml Wasser abgetrennt. Oleanylsuccinat wurde von nicht umgesetzter Oleanolsäure durch Säulenchromatographie an einer Kieselgelsäule (Elutionsmittel Hexan / Chloroform 5:5 bis Methanol) gereinigt.

2.5.3.3 Umsetzung von Marrubenol bzw. Oleanolsäure zu den entsprechenden Monoacetaten

In einem 10 ml-Zweihalskolben mit Magnetrührer, Rückflußkühler und Calciumchloridrohr wurden 16 mg (0,05 mmol) Marrubenol bzw. 23 mg (0,05 mmol) Oleanolsäure mit einer Mischung aus 2 ml Essigsäureanhydrid und 3 ml Pyridin versetzt. Die Mischung wurde 12 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt.

Danach wurde das Lösungsmittel vorsichtig im Vakuum entfernt, der Rückstand in 10 ml DCM aufgenommen und das Produkt an einer Kieselgelsäule entsprechend der präparativen Reinigung der FLD (s. Abschnitt 2.3.1) von Begleitstoffen getrennt.

2.5.4 Synthese von Proteinkonjugaten nach dem gemischten Anhydridverfahren

Lösung A:

7,7 mg ($1,2 \times 10^{-4}$ mmol) BSA bzw. 18 mg ($2,7 \times 10^{-5}$ mmol) Thyroglobulin wurden in 1,1 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 96 μ l 1N NaOH auf ca. 10 eingestellt. Anschließend wurden 0,8 ml Dioxan zugefügt und die Lösung auf 10 – 12°C abgekühlt.

Lösung B:

5 mg (0,0115 mmol) Marrubenolsuccinat oder 5,3 mg (0,0115 mmol) Oleanolsäure oder 6,4 mg (0,0115 mmol) Oleanylsuccinat wurden in 1 ml trockenem Dioxan suspendiert. Nachdem die Lösung auf 10 – 12°C abgekühlt wurde, wurden unter Rühren 2,74 μ l (0,0115 mmol) Tri-N-butylamin und anschließend langsam 1,5 μ l (0,0115 mmol) Chlorameisensäureisobutylester zugefügt. Die langsam aufklarende Lösung reagierte bei <12°C 20 Minuten lang.

Unter starkem Rühren wurde Lösung B langsam mit Lösung A versetzt. Die Reaktion wurde 4 Stunden lang bei 10-12°C fortgesetzt. Der Ansatz mit Oleanylsuccinat blieb klar. Im Ansatz mit Marrubenolsuccinat trübte die Lösung über die Zeit ein. Durch Einstellung des pH-Wertes mit 1N NaOH auf ca. 10 konnte die Lösung wieder geklärt werden. Oleanolsäure ist in Wasser schlecht löslich. Der Ansatz mit Oleanolsäure blieb durch nicht umgesetzte Oleanolsäure daher trübe.

Die Produkte wurden mittels Dialyse oder Größenausschlußchromatographie entsprechend den Abschnitten 2.4.2 und 2.4.3. gereinigt und lyophilisiert.

2.6 Immunologie

2.6.1 Immunisierung und Gewinnung der mAK-Zell-Linien

Die Immunisierung von Mäusen mit den hergestellten Proteinkonjugaten wurde in Zusammenarbeit mit I. Zündorf (Frankfurt) durchgeführt: Eine ca. 60 Tage alte Balb / C Maus wurde 4-5 Monate lang intraperitoneal mit dem jeweiligen Proteinkonjugat immunisiert. Zwischen den einzelnen Injektionen lag jeweils ein Abstand von 15-20 Tagen (Zündorf et al., 1998).

Für jede Immunisierung wurden ca. 50 µg Konjugat, entsprechend der Proteinbestimmung nach Bradford, eingesetzt. Das Antigen wurde 1:10 mit AdjuPrime[®] Immune Modulator gemischt und mit PBS auf 200 µl verdünnt. Das Serum wurde regelmäßig in einem ELISA auf eine Aktivität gegen das entsprechende Zielmolekül (d.h. Marrubensuccinat, Oleanylsuccinat oder Oleanolsäure) untersucht. Nach dem Erreichen eines stabilen Titers im Serum wurde eine letzte Injektion gegeben. Die immunisierte Maus wurde drei Tage nach der letzten Injektion unter Anästhesie getötet und die Milz aus dem Körper herauspräpariert. Zusätzlich wurde Kapillarblut gewonnen, dessen Serum als Positivkontrolle für den ELISA diente.

Die Lymphozyten wurden mit DMEM (ohne Zusatz von fetalem Kälberserum) aus dem Milzgewebe herausgewaschen und die Zellen durch Zentrifugation (500 x g, 10 Minuten) gewonnen. Die Erythrozyten wurden durch die tropfenweise Zugabe von 1 ml „red blood cell lysing buffer“ (Sigma) entfernt. Ein Teil der so präparierten Zellen wurde nach der Zugabe von 10% DMSO zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Als Fusionspartner für die Lymphozyten wurden frisch kultivierte NS-1-Zellen X63 AG8 eingesetzt. Die NS-1 Zellen und Lymphozyten wurden 1:1 gemischt. Die Fusion wurde durch die Zugabe von 1 ml PEG 4000 (Gibco) induziert und die Zellen eine Minute lang in einem Wasserbad bei 37°C sanft geschüttelt. Die fusionierten Zellen wurden durch Zentrifugation gewonnen und in DMEM (unter Zusatz von 20% fetalem Kälberserum, 10% „hybridoma enhancing supplement“ (Sigma), 1 x „antibiotics / antimycotics“ (Sigma) und 0,1% Gentamycin (Sigma)) resuspendiert. Nach Inkubation in einer 70 cm²-Kulturflasche (4 Stunden, 37°C) wurden die Zellen auf zehn 96-well Mikrotiterplatten verteilt.

Am darauffolgenden Tag begann die Selektion der Hybridoma-Zellen durch die Zugabe von HAT-Supplement. Nach zweiwöchiger Wachstumszeit wurde der Überstand der einzelnen Zellkulturen in einem ELISA auf Antikörper untersucht, die eine Bindung an das entsprechende Proteinkonjugat der Zielstruktur (d.h. Marrubensuccinat, Oleanylsuccinat oder Oleanolsäure) zeigten.

2.6.2 Reinigung der mAK

Die Reinigung wurde mit Hilfe einer Protein A („high salt“)-Säule nach der Methode von Ey et al. (1978) durchgeführt.

Säule:	Durchmesser:	1,0 cm
	Länge:	5 cm

Füllmaterial:	Protein A
V_{tot} :	1,5 ml

Die Kapazität der Säule betrug für IgG₁ ca. 5 mg / ml V_{tot} . Der Zellkultur-Überstand enthielt durchschnittlich 20 – 50 µg IgG₁ pro ml.

Zellkulturüberstand:	54 ml	
Ionenausgleich:	NaCl:	3.3 M
	Na-Borat:	0,1 M
	pH:	8,9
	Glycin:	1,5 M
Waschlösung 1:	3,0 M NaCl, 50 mM Na-Borat (pH = 8,9)	
Waschlösung 2:	3,0 M NaCl, 10 mM Na-Borat (pH = 8,9)	
Elutionslösung:	100 mM Glycin (pH = 3,0)	
Neutralisationslösung:	1 M TRIS (pH = 8,0)	

Detektion:	Proteinbestimmung nach Bradford
	ELISA

Der Salzgehalt des Kulturüberstandes wurde auf die unter „Ionenausgleich“ angegebenen Werte eingestellt. Die Lösung wurde sukzessive durch die Protein-A-Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend mit 10 Säulenvolumina Waschlösung 1 und 10 Säulenvolumina Waschlösung 2 gespült. Das IgG wurde mit Hilfe des Elutionspuffers von der Säule eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 500 µl gesammelt. Jede Fraktion wurde mit 50 µl Neutralisationslösung versetzt.

2.6.3 Direkter Nachweis der mAK-Bindung

Zum direkten Nachweis der Bindung der Monoklonalen Antikörper wurden je 100 µl des Zellkultur-Überstandes mit 50 µl PBS und 1 µg Marrubiin 4 Stunden lang bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente ein Überstand aus einer Immunisierung mit einem fremden Antigen.

Die Lösung wurde anschließend in ein Microcon-Röhrchen (500 µl, Millipore®) überführt. Durch Zentrifugation (5 min, 13.000 x g) wurde der Antikörper von der Lösung getrennt und das Inkubationsmedium gewonnen.

Der Rückstand über dem Filter wurde zweimal mit je 200 µl PBS gespült und jeweils nachfolgend durch Zentrifugation (10 min, 13.000 x g) abgetrennt.

Nach Zugabe von 50 µl PBS wurde der Filtrerrückstand, der die monoklonalen Antikörper enthielt, zurückgewonnen. Die Lösung wurde mit 50 µl 100 mM Triethylamin (pH = 12) versetzt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck (Fließmittel CHCl₃ / MeOH 80:20) aufgetrennt. In der Startzone, die die monoklonalen Antikörper enthielt, wurde die Menge gebundenen radioaktiv markierten ¹⁴C-Marrubiins mit Hilfe des Szintillationszählers (s. Abschnitt 2.3.7) bestimmt.

2.6.4 ELISA

Die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper basiert auf dem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Hierbei wird die spezifische und sensitive Bindung des Antikörpers an ein Antigen ausgenutzt (s. Abb. 2.7.4.1).

Mikrotiterplatten: Nunc® MaxiSorp 96well Mikrotiterplatten

Detektion: SLT Rainbow-Mikrotiterplattenreader

Eine Lösung des Antigens, in diesem Falle der Proteinkonjugate der Isoprenoide, wurde adhäsiv an die Polystyren-Wände einer Mikrotiterplatte gebunden (= Coating). Das jeweilige Proteinkonjugat wurde hierfür in definierter Konzentration (0,2 – 1 µg / 100 µl PBS / Vertiefung) über Nacht bei 4°C in der Mikrotiterplatte inkubiert. Nicht an die Wand der Vertiefung gebundenes Proteinkonjugat wurde durch zweimaliges Spülen mit je 300 µl PBS entfernt.

Um eine unspezifische Bindung des zu untersuchenden Antikörpers, ebenfalls ein Protein, zu verhindern, wurden nach dem Coaten verbliebene freie Valenzen der Plastikwand der Vertiefungen blockiert (= Blockieren). Hierzu wurde mit 300 µl / Vertiefung einer 5%igen Lösung von fettfreiem Milchpulver (Frema®) in PBS 30 Minuten lang inkubiert. Die überschüssigen Milchproteine wurden durch zweimaliges Spülen mit 300 µl PBS entfernt.

Die auf diese Weise vorbereitete Mikrotiterplatte wurde dann entsprechend den Versuchsanordnungen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Kulturüberstandes der Antikörper-produzierenden Zell-Linien (100 µl / Vertiefung) inkubiert (= AK 1). Die Inkubation wurde nach 1,5 Stunden durch zweimaliges Waschen mit je 300 µl PBS beendet.

Zum Nachweis des gebundenen Antikörpers wurde anschließend mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert, der gegen den Fc-Teil von IgG der Maus gerichtet war (= AK 2). Der käuflich erworbene Antikörper ist an seinem c-terminalen Ende mit Peroxidase konjugiert. Dieser zweite Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 (100 µl / Vertiefung) in PBS eingesetzt. Die Inkubation von 1,5 Stunden Dauer wurde durch zweimaliges Waschen mit je 300 µl PBS beendet.

Die Menge an gebundenem Anti-Maus-Antikörper wurde mit Farbpuffer ELISA (100 µl / Vertiefung) bestimmt (Zusammensetzung der Farblösung s. Abschnitt 2.2). Die Peroxidase des Anti-Maus-Antikörpers setzt das in der Färbelösung enthaltene Wasserstoffperoxid zu Peroxiden um, die mit ABTS® unter Bildung eines grünen Farbstoffes reagierten. Durch photometrische Bestimmung des gebildeten Farbstoffes nach 30 Minuten bei 405 nm (gegen 415 nm) war eine indirekte Bestimmung des primären Antikörpers möglich.

Jeder Versuch wurde in drei verschiedenen Vertiefungen parallel durchgeführt, die Ergebnisse als Mittelwert der drei erhaltenen Einzelbestimmungen ausgedrückt. Zusätzlich wurden auf allen Mikrotiterplatten drei Vertiefungen als Blindwert nur mit der Farblösung inkubiert. Drei weitere Vertiefungen wurden mit Milchpulver blockiert und mit Anti-Maus-Antikörper inkubiert, um die unspezifische Bindung dieses Antikörpers zu bestimmen.

Das Schema der Durchführung eines typischen indirekten ELISA gibt die Abb. 2.1 wieder.

1. Coating

0,2 – 1,0 µg Konjugat / 100 µl PBS / Vertiefung

Inkubation bei 4°C, 12 Stunden lang

→ Waschen mit 2x 300 µl PBS

2. Blockieren

15 mg fettfreies Milchpulver / 300 µl PBS / Vertiefung

Inkubation bei 4°C, 30 Minuten lang

→ Waschen mit 2x 300 µl PBS

3. Inkubation mit dem murinen monoklonalen Antikörper

0,1 – 80 µl des zu untersuchenden Zellkultur-Überstandes oder der Antikörper-Lösung,
aufgefüllt mit PBS auf 100 µl / Vertiefung

Inkubation bei Raumtemperatur, 1,5 Stunden lang

→ Waschen mit 2x 300 µl PBS

4. Inkubation mit Anti-Maus-Antikörper

1:1000 (V / V) Verdünnung des Anti-Maus-Antikörpers (Konjugat mit Peroxidase), 100 µl / Vertiefung

Inkubation bei Raumtemperatur, 1,5 Stunden lang

→ Waschen mit 2x 300 µl PBS

5. Farbreaktion

100 µl Farbpuffer ELISA / Vertiefung

Inkubation bei Raumtemperatur, 30 Minuten lang

Photometrische Bestimmung bei 405 nm (gegen 405 nm)

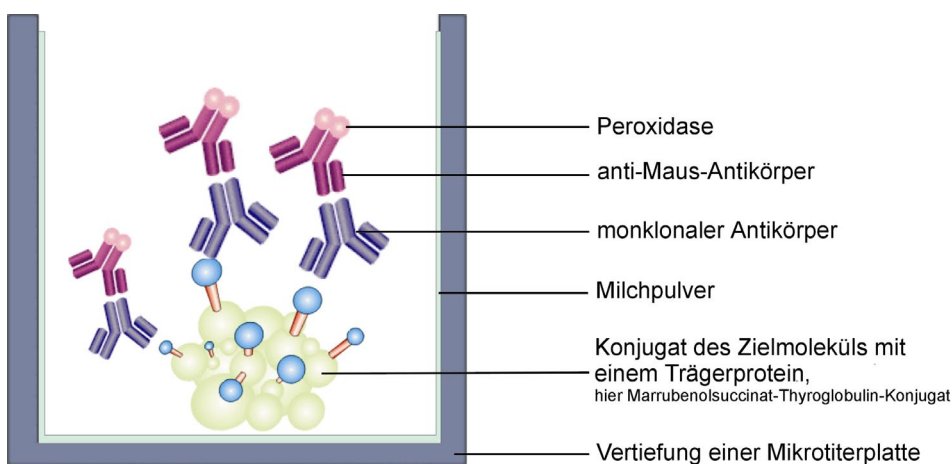


Abb. 2.1 Schema des indirekten ELISA.

2.6.5 Kompetitiver ELISA

Im kompetitiven ELISA wurde die Bindungskonkurrenz zweier ähnlich gestalteter Moleküle um den jeweiligen monoklonalen Antikörper ausgenutzt. Hierfür wurde die Kompetitorsubstanz (0,1 – 60 μmol) mit dem Antikörper (0,5 – 5 μl entsprechend den Ergebnissen der Checkpoint-Titration) in einem 1,5 ml Glas-Fläschchen 90 Minuten lang bei Raumtemperatur vorinkubiert, bevor die Lösung auf die Mikrotiterplatte übertragen wurde. Im kompetitiven ELISA fand die unter Punkt 3. im Schema des indirekten ELISA (s. Abb. 2.1) durchgeführte Inkubation mit der vorinkubierten Mischung aus murinem monoklonalen Antikörper und Kompetitor statt.

Wurde der Kompetitor vom Antikörper gebunden, stand entsprechend weniger Immunglobulin für die Bindung an das immobilisierte Proteinkonjugat zur Verfügung (s. Abb. 2.2) Entsprechend schwächer war die Peroxidase-Reaktion des Anti-Maus-Antikörpers mit dem Farbreagenz. Eine erfolgreiche Kompetition korrelierte also mit einer im Vergleich schwächeren Farbstoffbildung.

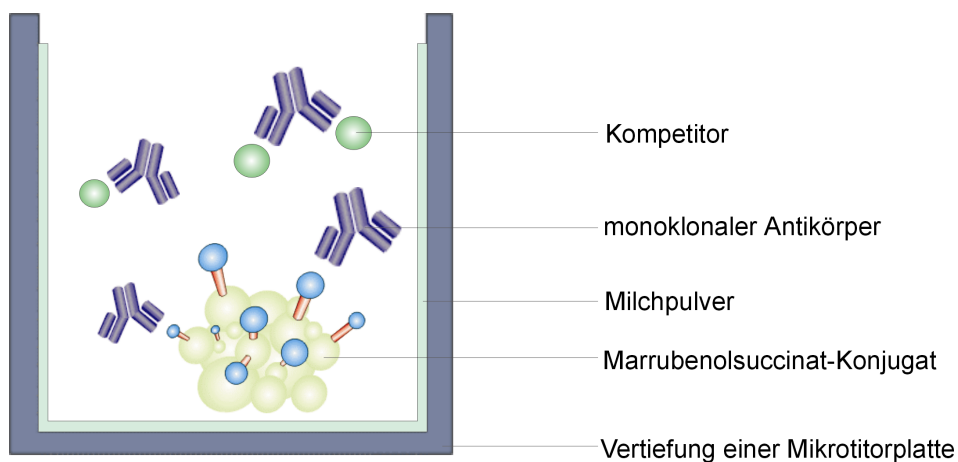


Abb. 2.2 kompetitiver ELISA. Mit Hilfe verschiedener strukturell nahe verwandter Kompetitorsubstanzen ist es möglich, diejenigen Teile des Zielmoleküls zu bestimmen, die als Hapten für den jeweiligen Antikörper fungierten. Wies der Kompetitor dieses Hapten ebenfalls auf, stand bei gemeinsamer Inkubation von Zielmolekül und Kompetitor weniger Antikörper zur Bindung an das immobilisierte Protein-Konjugat zur Verfügung als bei der Verwendung eines Kompetitors ohne die passende Teilstruktur.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Furanolabdanditerpene

3.1.1 Strategie

Die Zielstruktur für die Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper war das Furanolabdanditerpen Marrubiin. Marrubiin hat eine molare Masse von 332 Da und ist damit zu klein um eine immunologische Reaktion in der Maus auszulösen. Marrubiin musste daher in präparativem Maßstab isoliert (s. Abschnitt 3.1.2) und an einen makromolekularen Träger gebunden werden.

Marrubiin selbst enthält keine geeigneten funktionellen Gruppen für diese Kopplung. Da der Furanring als charakteristisches Strukturmerkmal für die Immunisierung erhalten werden sollte, wurde der Lactonring des Moleküls geöffnet (s. Abschnitt 3.1.3). Unter reduktiven Bedingungen wie beispielsweise mit Lithiumaluminiumhydrid entsteht das entsprechende Diol Marrubenol (Popa et al., 1968).

Die primäre Hydroxyfunktion wurde für die Bindung von Bernsteinsäure genutzt. Über die zweite, freie Carboxyfunktion der Bernsteinsäure wurde Marrubenolsuccinat an den makromolekularen Träger gebunden. Bedingt durch die zusätzlich zwischen Protein und Zielmolekül eingeführte Kohlenstoffkette, wurde das Labdan an der Oberfläche des Konjugates präsentiert (s. Abb. 3.1). Die Verwendung eines „Spacers“ verbessert sowohl die Spezifität (Lindner et al., 1972) als auch die Erkennbarkeit des Zielmoleküls (Mould et al., 1977). Succinatspacer wurden in der Konjugation verschiedenster Moleküle an makromolekulare Träger eingesetzt (Diener et al., 1981; Gendloff et al., 1986; Gabor et al., 1995; Zündorf et al., 1998). Alternativ war eine alkalische Ringöffnung zu Marrubiinsäure möglich (Hardy et al., 1957), die jedoch nicht die Vorteile des Succinat-„Spacers“ besitzt.

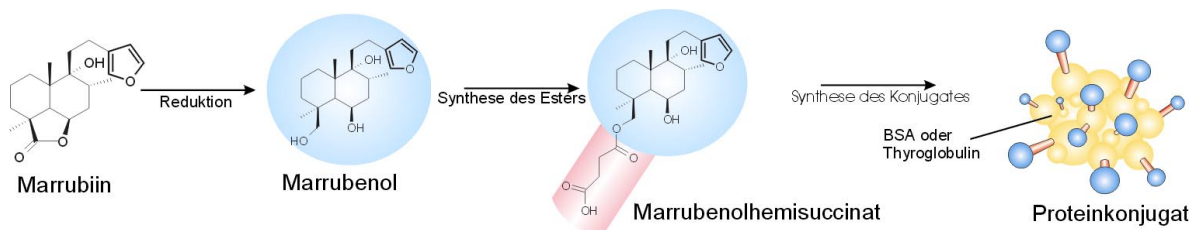


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Konjugatsynthese aus Marrubiin. Marrubiin wurde zu Marrubenol reduziert, mit Bernsteinsäure zum Hemisuccinat verestert und an die Trägerproteine BSA und Thyroglobulin gebunden.

Als makromolekulare Träger wurden zwei tierische Proteine, BSA und Thyroglobulin gewählt. Tierische Proteine eignen sich nach Jaffe et al. (1970) und Walker et al. (1973) als Basis von Konjugaten zur Immunisierung besser als synthetische Makromoleküle wie Poly-L-Lysin. BSA ist das Standardprotein in der Synthese von Konjugaten zur Immunisierung schlechthin (Erlanger, 1980). Ein Konjugat mit einem anderen Trägerprotein wurde für eine erste Charakterisierung der Überstände gewachsener Hybridoma-Klone benötigt. Mit Hilfe dieses Konjugates konnten all diejenigen Zell-Linien selektiert werden, die gegen den Proteinteil des BSA-Konjugates gerichtet waren. Das zweite verwendete Protein sollte daher möglichst keine Ähnlichkeiten mit BSA zeigen. Thyroglobulin wurde bereits u. a. von Bartos et al. (1977) und Zündorf et al. (1998) zur Synthese von Proteinkonjugaten eingesetzt.

Die Kopplung der Zielstruktur Marrubenolsuccinat an die Trägerproteine BSA und Thyroglobulin wurde nach der „Methode des gemischten Anhydrids“ durchgeführt (Wieland et al., 1951 und Boissonnas et al., 1951). Die resultierenden Proteinkonjugate wurden nach verschiedenen Methoden charakterisiert, die eine Abschätzung der Bindungsrate von Marrubenolsuccinatmolekülen an das Trägerprotein-Molekül ermöglichen. Die Betrachtung dieses Verhältnisses ist wichtig, da nur eine genügende Anzahl Zielmoleküle pro Trägerprotein eine gute Ausgangsbasis für die Immunisierung bietet (Erlanger, 1971).

Eines dieser Konjugate (BSA als Trägermolekül) wurde zur Immunisierung einer Balb/C-Maus eingesetzt. Nach Erreichen eines stabilen Antikörper-Titers wurden die Milzzellen aus dem Tier gewonnen und mit Myelom-Zellen fusioniert. Die resultierenden Klone wurden mit Hilfe des HAT-Supplements von nicht umgesetzten Milz- und Myelom-Zellen getrennt (Abschnitt 3.1.3).

Die so etablierten Zell-Linien wurden in einem ersten Screening direkt sowie mit Hilfe eines einfachen ELISA auf eine Bindungs-Aktivität gegen Furanolabdanditerpene untersucht (Abschnitt 3.1.3). Nach Optimierung der im ELISA relevanten Parameter (Abschnitt 3.1.4) erfolgte die Charakterisierung der Antikörper ausgewählter Zell-Linien mit verschiedenen Kompetitoren (Abschnitt 3.1.5).

Aufgrund eines sich etablierenden Kontaktes mit der Arbeitsgruppe von V. Cechinel (Itajai, Brasilien) wurden alle synthetisierten Derivate des Marrubiins (s. Abb. 3.7) zusammen mit verwandten Labdanditerpenen in verschiedenen pharmakologischen *in vivo* und *in vitro*-Modellen untersucht. Die Furanolabdane zeigen eine deutliche antinociceptive Wirkung im Writhing-Test an der Maus. In Kooperation mit verschiedenen Arbeitsgruppen wurden die Substanzen daraufhin in verschiedenen Standard- *in vitro*-Systemen getestet. (s. Abschnitt 7: Pharmakologischer Anhang).

3.1.2 Isolierung von Marrubiin aus *Marrubium vulgare*

Die Furanolabdanditerpene können aus dem Pflanzenmaterial von *M. vulgare* mit 20 ml Aceton pro Gramm Material quantitativ extrahiert werden (Knöss et al., 1998). Im Vergleich zum analytischen Maßstab (bis zu 1 mg pro g Pflanzenmaterial) lag die Ausbeute im präparativen Maßstab deutlich niedriger. Aus 100 g Material wurden bis zu 50 mg Marrubiin erhalten. Die Extraktion war nicht erschöpfend. Zusätzlich ging ein Teil bei der Entfernung des Chlorophylls mit Aktivkohle verloren. Die erhaltenen Furanolabdanditerpene wurden entsprechend Abschnitt 2.3.1. getrennt.

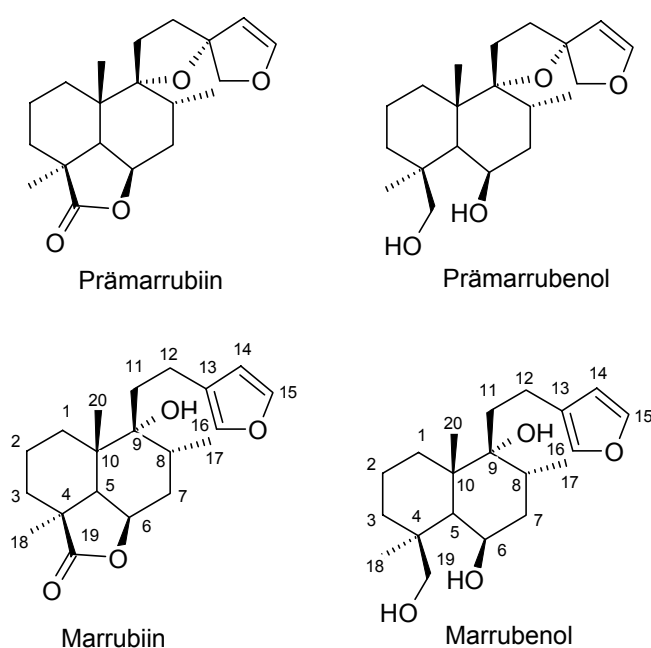


Abb. 3.2 Furanolabdanditerpene aus *Marrubium vulgare*: Prämarrubiin ($9\alpha,13R,15,16$ -Diepoxylabda-14-en-19,16 β -olid), Prämarrubenol ($9\alpha, 13R, 15, 16, -$ Diepoxylabda-14-en), Marrubiin ($15,16$ -Epoxy- 9α -hydroxylabda-13(16),14-dien-19, 6β -olid) und Marrubenol ($15, 16$ -Epoxy- $6\beta, 9\alpha,19\beta$ -trihydroxylabda-13(16),14-dien).

Den größten Anteil am FLD-Spektrum, dessen Hauptbestandteile in Abb. 3.2 dargestellt sind, hatte Marrubiin, gefolgt von Marrubenol. Die im frischen Extrakt noch nachweisbaren Präfurane Prämarrubiin und Prämarrubenol gingen sukzessive in die stabilen Furanverbindungen über.

Das isolierte Marrubiin stimmte im dünnschichtchromatographischen Verhalten mit einer authentischen Probe (Fa. Extrasynthese, Frankreich) überein. Auch die ^1H - bzw. ^{13}C -Spektren zeigten die charakteristischen Signale (s. Abschnitt 8.1).

3.1.3 Synthese geeigneter Zielstrukturen für die Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Labdanditerpene

3.1.3.1 Reduktion von Marrubiin zu Marrubenol

Prämarrubenol, die Vorstufe des Marrubenols, kommt in *M. vulgare* L. vor, jedoch in sehr viel geringeren Mengen als Marrubiin. Daher wurde Marrubenol durch Reduktion von Marrubiin hergestellt. Die Umsetzung wurde entsprechend der Methode von Popa et al. (1968) mit Lithiumaluminiumhydrid durchgeführt (s. Abschnitt 2.5.1). In einem ersten Schritt der Reaktion wird hierbei ein Molekül des Hydrids nucleophil an den Keto-Sauerstoff des Lactons addiert. Durch nukleophile Substitution wird dann der Lactonring gespalten und ein weiteres Molekül Aluminiumhydrid gebunden. Bei der Zugabe von Wasser löst sich dieser Komplex. Marrubenol und Aluminiumhydroxid entstehen (s. Abb. 3.3). Marrubiin wurde unter diesen Reduktionsbedingungen mit einer Ausbeute von über 95% zu Marrubenol umgesetzt.

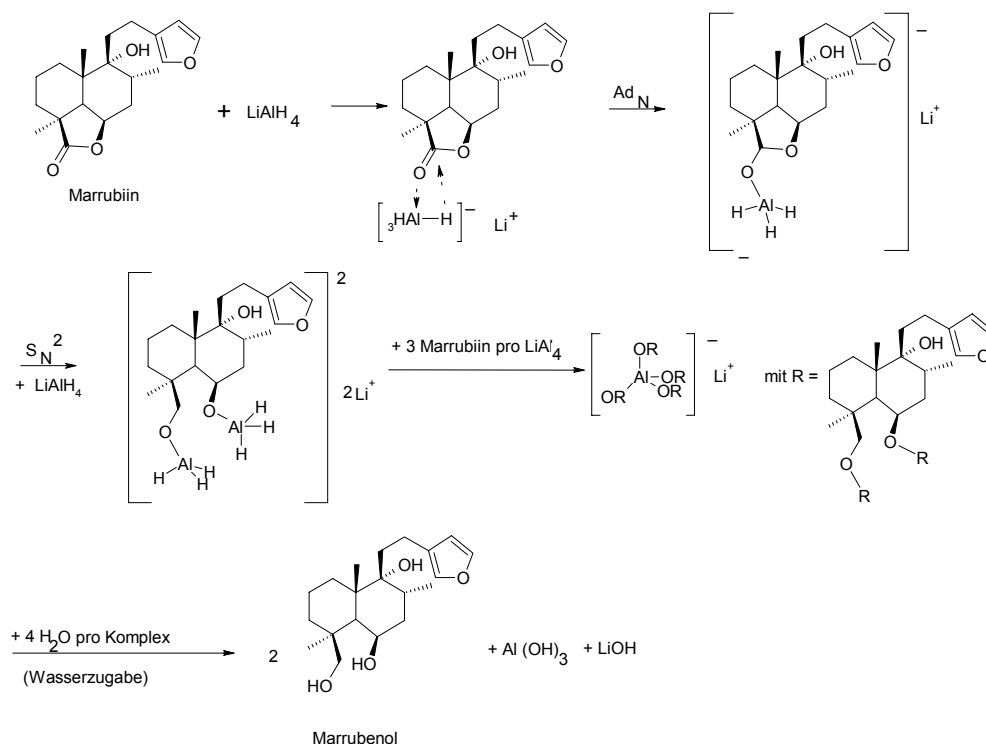


Abb. 3.3 Mechanismus der Reduktion von Marrubiin zu Marrubenol.

Das durch Reduktion gewonnene Marrubenol stimmte im chromatographischen Verhalten mit dem aus *M. vulgare* isolierten Marrubenol überein. Zusätzlich wurde die Identität mit ^1H - und ^{13}C -NMR-Untersuchungen belegt (s. Abschnitt 8.2).

3.1.3.2 Alkalische Hydrolyse des Marrubiins

Marrubiin wurde durch Erhitzen in ethanolischer KOH unter Rückfluss zum Kaliumsalz der Marrubiinsäure umgesetzt (s. Abb. 3.4). Der Reaktionsansatz wurde angesäuert, wodurch die freie Marrubiinsäure aus der Lösung ausfiel. Durch Verteilungschromatographie mit Dichlormethan wurde die Substanz mit über 95% Ausbeute gewonnen. Die Identität der Säure wurde mit Hilfe von NMR- und MS-Experimenten belegt. (s. Abschnitt 8.4).

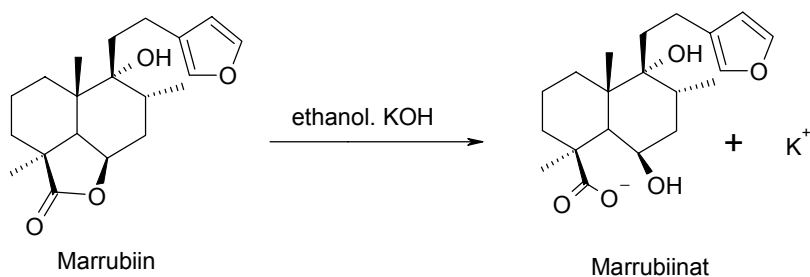


Abb. 3.4 Reaktionsmechanismus der alkalischen Hydrolyse von Marrubiin. Das Lacton wird durch den Einfluss des Alkali gespalten.

Marrubiinsäure war bei der Lagerung in Lösung instabil. Die Substanz neigte zum spontanen Ringschluss zu Marrubiin oder zur Decarboxylierung. Daher wurde Marrubiinsäure am Vakuum zur Trockne eingengt und trocken bei 4°C gelagert.

3.1.3.3 Kopplung des Marrubenols mit Bernsteinsäureanhydrid

Die Synthese von Marrubenolhemisuccinat wurde entsprechend dem Review von Erlanger (1971) durchgeführt. Eine einfache Derivatisierungsreaktion führt den Bernsteinsäurespacer in das Molekül ein. Marrubenol wurde in wasserfreiem THF mit Bernsteinsäureanhydrid verestert, freiwerdende Protonen wurden durch Dimethylaminopyridin (DMAP) gebunden (s. Abb. 3.5).

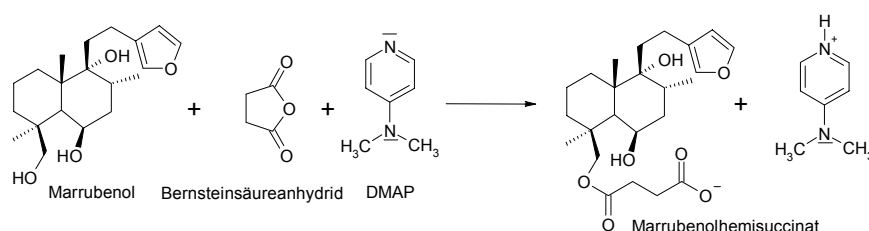


Abb. 3.5 Reaktionsmechanismus der Veresterung von Marrubenol mit Bernsteinsäureanhydrid. Die Reaktion findet in Dichlormethan statt. 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) dient als Protonenfänger.

Die Umsetzung verlief, vermutlich aufgrund sterischer Abschirmung, mit einer relativ geringen Ausbeute von 60%. Marrubenolhemisuccinat wurde mit Hilfe von NMR- und MS-Experimenten identifiziert (s. Abschnitt 8.3). Die Reaktion wurde parallel mit $1,4\text{-}^{14}\text{C}$ -Bernsteinsäureanhydrid durchgeführt. Auf diese Weise wurde die Bindung des radioaktiv markierten Spacers an Marrubenol nachgewiesen, wie DC und Radioscan des Produktes in Abb. 3.6 zeigen. ^{14}C -Marrubenolsuccinat diente der Charakterisierung des Proteinkonjugates.

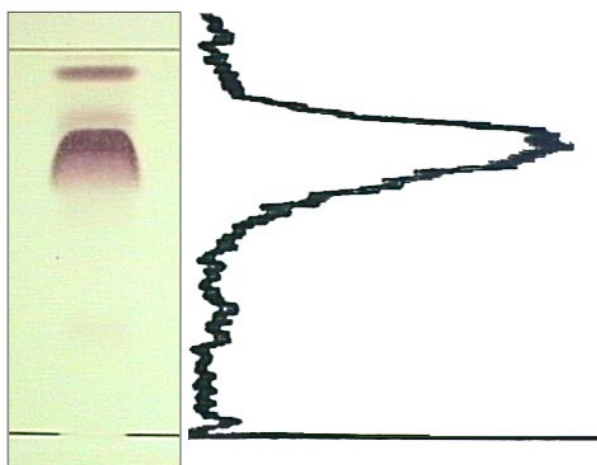


Abb. 3.6 DC und Radioscan des $1,4\text{-}^{14}\text{C}$ -Bernsteinsäureesters des Marrubenols auf einer DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F_{254} mit dem Fließmittel Chloroform:Methanol (8:2), Laufhöhe 6 cm, Detektion mit Vanillin-Schwefelsäurereagenz. Die Fraktion zeigt in der oberen schmalen Bande Reste von Marrubenol.

3.1.3.4 Identifizierung der Produkte der Derivatisierungsreaktionen

Die durchgeführten Synthesen sind in der Abbildung 3.7 zusammengefasst. Alle Produkte wurden dünn-schichtchromatographisch untersucht (s. Abb. 3.8) und mit Hilfe von MS- (s. Tab. 3.1) und NMR-Untersuchungen identifiziert (s. Abschnitt 8: Spektrenanhang).

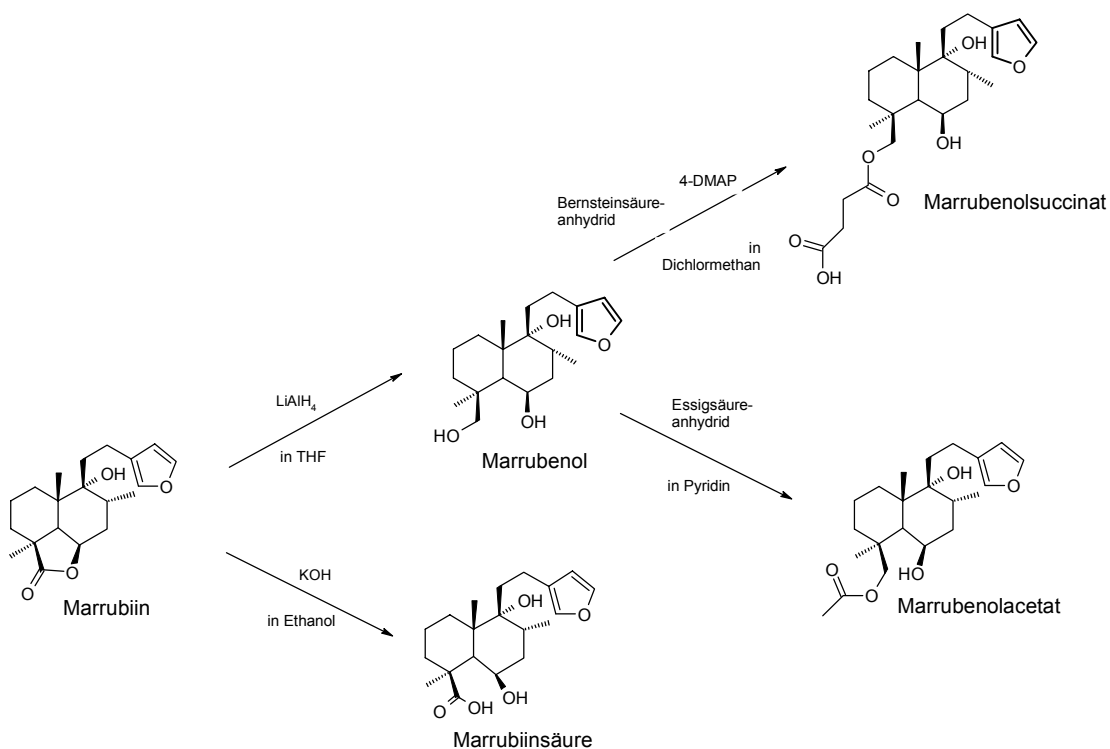


Abb. 3.7 Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Derivatisierungsreaktionen von Marrubiin. Marrubenolsuccinat wurde zur Synthese der Proteinkonjugate eingesetzt. Marrubiin, Marrubenol und Marrubenolsuccinat wurden zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper verwendet, Marrubenolacetat für pharmakologische Untersuchungen. Marrubiinsäure bildet ggf. eine Alternative zu Marrubenolsuccinat bei der Synthese der Proteinkonjugate.

Substanz	Masse	Masse lt. Literatur	Autor
Marrubiin	332,2	332	Knöss, 1996
Marrubenol	336,3		
Marrubenolsuccinat	446,2		
Marrubiinsäure	350,2		

Tab. 3.1 MS-Untersuchung der Derivate des Marrubiins. Alle Substanzen wurden mit Hilfe des EI-Verfahrens untersucht und die gefundenen Massen mit den Literaturwerten verglichen.

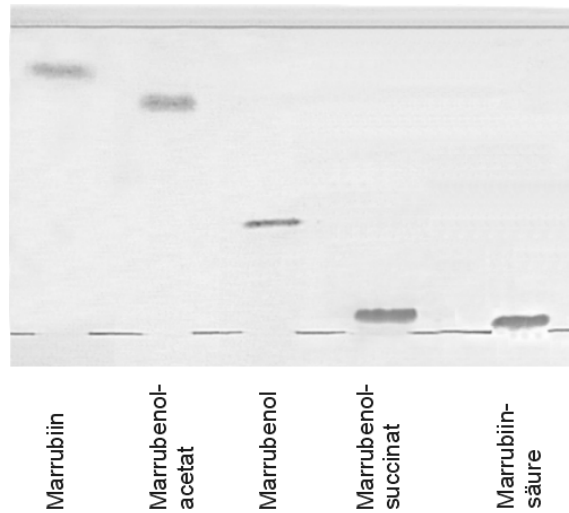


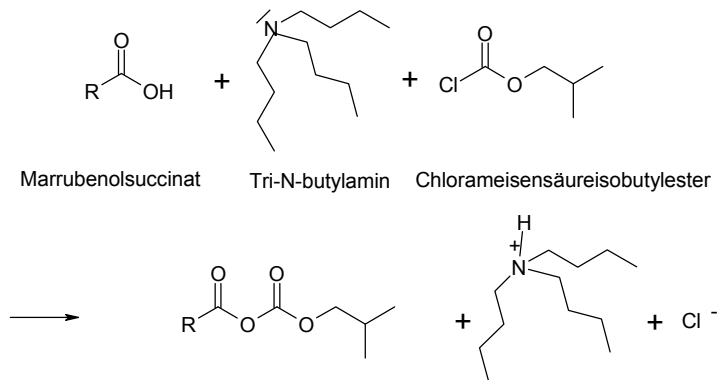
Abb. 3.8 DC der hergestellten Derivate von Marrubiin. Durchführung auf einer DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F₂₅₄ mit dem Fließmittel Chloroform/Methanol (95 : 5), Laufhöhe 6 cm, Detektion mit Vanillin-Schwefelsäurereagenz. Rf-Werte: Marrubiin 0,86; Marrubenolacetat 0,75; Marrubenol 0,36; Marrubenolsuccinat 0,06; Marrubiinsäure 0,04

3.1.3.5 Darstellung der Proteinkonjugate für die Immunisierung

3.1.3.5.1 Proteinkopplung nach der Methode des gemischten Anhydrids

Marrubenolsuccinat wurde nach der Methode des gemischten Anhydrids an bovines Serumalbumin (BSA) bzw. Thyroglobulin (THY) gebunden. Die Methode der Kopplung wurde von Vaughan et al. (1952) zur Peptidsynthese entwickelt, ist aber inzwischen die meistverwendete Methode zur Konjugation Carboxyl-haltiger Haptene an Proteine bzw. des „Enzymlabelings“ (Gendloff et al., 1986).

1. Reaktionsteilschritt:



Reaktion nach der Zugabe der wässrigen Proteinlösung:

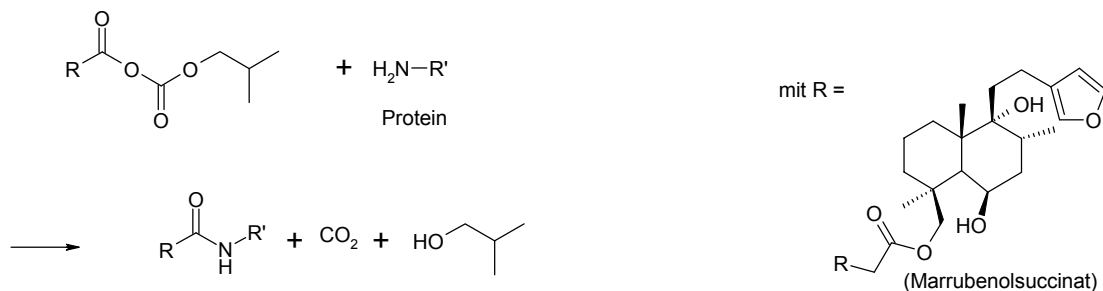


Abb. 3.9 Reaktionsmechanismus der Peptidbindung nach dem gemischten Anhydridverfahren.

In der ersten Teilreaktion wird die Carboxylfunktion des Marrubenolsuccinates durch Chlorameisensäureisobutylester aktiviert. In der zweiten Teilreaktion wird das Terpen nach Zugabe der wässrigen Proteinlösung mit dem jeweiligen Protein verknüpft. Überschüssige Chlorameisensäure wird durch die Wasserzugabe inaktiviert.

Die resultierenden, z.T. trüben Lösungen wurden bei 4°C über mehrere Tage dialysiert. Die Abb. 3.10 zeigt ein Proteinkonjugat vor und nach der Dialyse. Nicht umgesetztes Marrubenolsuccinat wurde durch die Dialyse entfernt. Die gereinigten Konjugate wurden zur Lagerung lyophilisiert. Die Ausbeute der Proteinkopplung wurde mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford bestimmt. Mit BSA als Carrier wurden ca. 35% des eingesetzten Proteins, bezogen auf das dialysierte Produkt, wiedergefunden; bei Thyroglobulin konnten etwa 20% nachgewiesen werden.

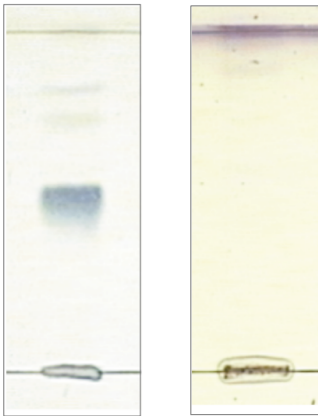


Abb. 3.10 Dünnschichtchromatographie des Marrubenol-succinat-BSA-Konjugates vor (links) und nach (rechts) der Dialyse. Verwendet wurden Kieselgel 60 F₂₅₄-DC-Platten. Fließmittel war Chloroform:Methanol (8:2), Laufhöhe 6 cm, Detektion mit Vanillin-Schwefelsäurereagenz. Die Platten wurden vor der Detektion für 5 Minuten auf 120°C erhitzt (s.Abschnitt 2.3.4).

3.1.3.5.2 Charakterisierung der Proteinkonjugate

Die gebildeten Proteinkonjugate wurden nach verschiedenen Methoden untersucht:

1. Gel-Elektrophorese
2. Quantifizierung mit radioaktiv markierten Vorstufen
3. densitometrische Quantifizierung
4. MALDI-TOF

Ziel dieser Verfahren war es, die Belegungsrate der zur Immunisierung und Charakterisierung eingesetzten Konjugate abzuschätzen. In beiden Fällen ist eine möglichst hohe Menge an Zielmolekülen, die pro Trägermolekül gebunden werden, wünschenswert. Klause et al. (1974) erreichten bereits mit einer Belegungsrate von 5:1 (Zielmolekül : Träger) gute Resultate bei der Immunisierung.

Gel-Elektrophorese

Ein qualitativer Nachweis der erfolgreichen Synthese eines Proteinkonjugates war mit Hilfe von SDS-PAGE möglich. Die Abb. 3.11 zeigt ein solches Proteingel, bei dem die Konjugate von BSA mit Oleanolsäure (OI), Oleanylsuccinat (OI-suc) und Marrubenolsuccinat (Marr-suc) im Vergleich zu reinem BSA eine um ca. 2-3 kDa größere Masse aufweisen.

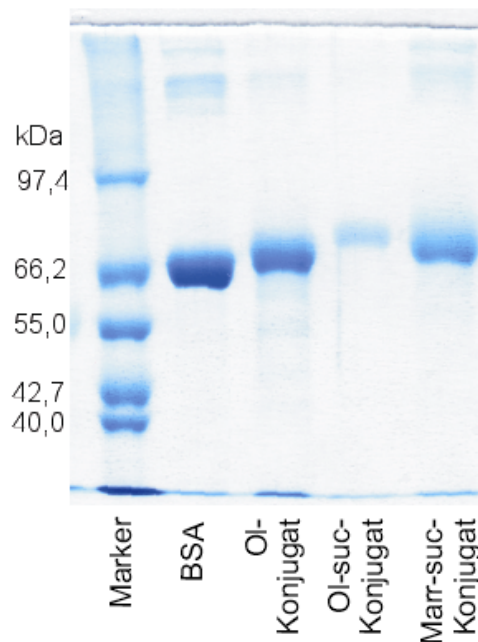


Abb. 3.11 SDS-PAGE der Proteinkonjugate von Bovinem Serumalbumin (BSA) mit den Zielmolekülen Oleanolsäure (OI), Oleanylsuccinat (OI-suc) und Marrubenolsuccinat (Marr-suc). Es wurde mit einem 6%-Trenngel gearbeitet. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Blue detektiert. In allen drei Konjugaten liegt die Molekülgröße um oder über 70 kDa, während BSA erwartungsgemäß bei 66,2 kDa detektiert wurde.

Bestimmung durch Verwendung radioaktiv markierter Vorstufen

Zur Bestimmung des Verhältnisses von Zielmolekül und Trägerprotein im Konjugat wird von vielen Autoren ein radioaktiv markiertes Zielmolekül eingesetzt. Die Verwendung von 1,4-¹⁴C- Succinat (s. Abschnitt 3.1.2.3) ermöglichte eine derartige Bestimmung der Belegungsrate von Marrubenolsuccinat, zum Trägerprotein BSA bzw. Thyroglobulin (s. Tabelle 3.2).

3. Ergebnisse

Es wurden nach der Dialyse 7,3% bzw. 9,4% des eingesetzten Succinates im Produkt gefunden, was einer Bindungsrate von 13:1 (Succinat:Protein) für das BSA-Konjugat und von 82:1 für das Thyroglobulin-Konjugat entspricht. Die Methode unterliegt einer relativ weiten Streuung. Bei einer eventuellen Hydrolyse des Esters aus Bernsteinsäure und Isoprenoid innerhalb des Konjugates verliert das Konjugat die für die Immunisierung gewünschten Zielstrukturen, nicht aber den in diesem Test nachweisgebenden Succinatteil, was zur Überschätzung der tatsächlich gebundenen Menge führt.

	Protein	Absolute Menge an Succinat	Reaktionsansatz	dialysierten Produkt	Anteil gebundenen $1,4\text{-}^{14}\text{C}$ -Succinats	Bindungsrate Succinat:Protein
BSA-Konjugat	$6,9 \times 10^{-8}$ mol	$1,2 \times 10^{-5}$ mol	40,4 kBq	3,0 kBq	7,3 %	13:1
THY-Konjugat	$1,4 \times 10^{-8}$ mol	$1,2 \times 10^{-5}$ mol	41,5 kBq	3,9 kBq	9,4 %	82:1

Tab. 3.2 Bestimmung der Bindungsrate von $1,4\text{-}^{14}\text{C}$ -Succinat an die Trägerproteine BSA und Thyroglobulin. Die Menge an Radioaktivität, die im gesamten Reaktionsansatz gemessen wurde, wurde in Verhältnis zu der Menge gesetzt, die im dialysierten Produkt gefundenen wurde. Der Anteil an ^{14}C , der in das Konjugat eingebaut wird, entspricht im Verhältnis dem Anteil an Gesamtsuccinat, das eingebaut wird. Da die absolute Menge an Succinat bekannt ist, wird die Bindungsrate bestimmbar.

Densitometrische Bestimmung

Die Bestimmung der Menge des an den Proteinträger gebundenen Furanolabdans war grundsätzlich auch mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und nachfolgender Densitometrie möglich. Das Proteinkonjugat wanderte, im Gegensatz zum ungebundenen Anteil an Marrubensuccinat, nicht mit dem Fließmittel und konnte am Start mit Vanillin-Schwefelsäure detektiert werden. Die quantitative Bestimmung wurde analog den Bestimmungen für Marrubiin und Marrubenol durchgeführt: Das entsprechende Konjugat wurde in verschiedenen Konzentrationen auf eine Kieselgel 60 F₂₅₄-DC-Platte aufgetragen und die Intensität der Farbreaktion bei der Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure mit einer Verdünnungsreihe aus Marrubiin verglichen (s. Abschnitt 2.3.4.).

Für das Konjugat aus Marrubenolsuccinat und BSA wurde eine Bindungsrate von ca. 5:1 (FLD:Protein) ermittelt, für das entsprechende Thyroglobulin-Konjugat eine Bindungsrate von ca. 25:1. Die gebundene Furanolabdanmenge ist für die photometrische Bestimmung sehr klein. Auffällig sind die deutlich niedrigeren Werte für die Bindungsraten des Terpenmoleküls nach dieser Methode im Vergleich zu den mittels Isotopenmarkierung erreichten. Fraglich ist zudem, ob die Farbreaktion des gebundenen Marrubenolsuccinats mit der von Marrubiin vergleichbar ist. Da die Reaktion mit Vanillin-Schwefelsäure jedoch über den Furanring stattfindet, ist eine Beeinträchtigung unwahrscheinlich. Die Proteinträger selbst färbten sich mit BSA nicht an.

MALDI-TOF

Die Bestimmung der Bindungsrate von Marrubenolsuccinat an BSA war mit Hilfe des MALDI-TOF unter Verwendung eines sehr kleinen Probenvolumens möglich. Die apparative Ausstattung des Gerätes ließ noch keine Bestimmung oberhalb von 140 kDa zu. Daher war bislang nur die Charakterisierung der BSA-Konjugate möglich. Bei diesen konnte die Zunahme des Molekulgewichts präziser als im SDS-PAGE bestimmt werden.

Die Menge der gebundenen Terpenmoleküle im Konjugat folgt einer statistischen Verteilung, die sich auch im MALDI-TOF-Diagramm widerspiegelte. Für BSA wurde eine durchschnittliche Masse von 66,222 kDa ermittelt (s. Abb. 3.12). Diese Molekülmasse stimmt mit dem theoretischen Wert überein.

Das Konjugat mit Marrubenolsuccinat zeigte eine mittlere Masse von 69.187 kDa (s. Abb. 3.13). Dies entspricht einer Massendifferenz von 2,964 kDa. bzw. einer theoretischen durchschnittlichen Menge von 6,7 Molekülen Marrubenolsuccinat ($M_{r(\text{Marrubenolsuccinat})} = 436 \text{ g / mol}$) pro Carriermolekül.

3. Ergebnisse

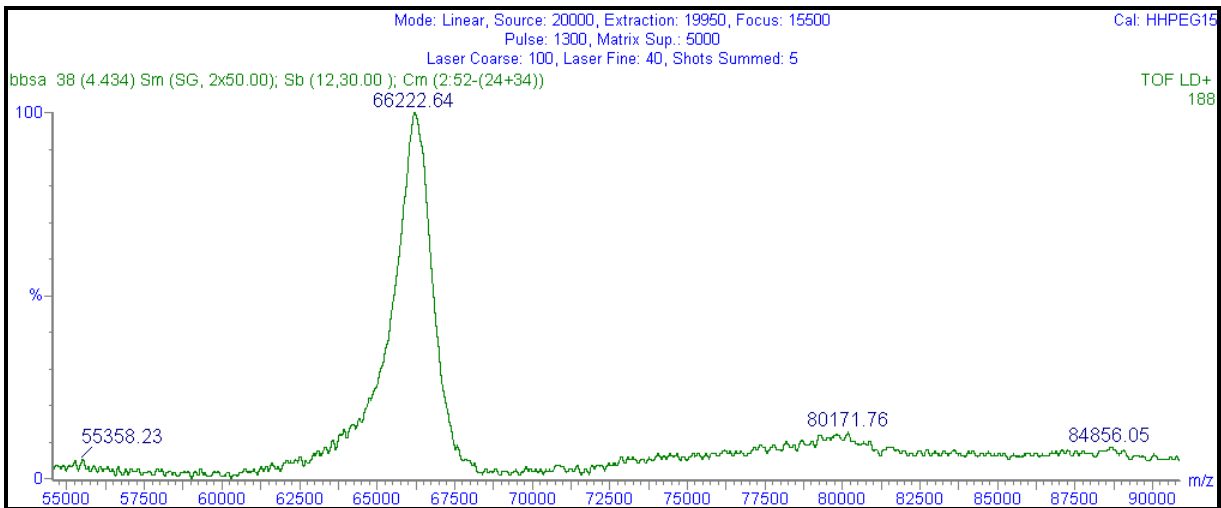


Abb. 3.12 MALDI-TOF-Spektrum zur Bestimmung der Masse des zur Konjugation eingesetzten BSA. Die durchschnittliche Masse entspricht dem erwarteten Wert von 66.222 Da.

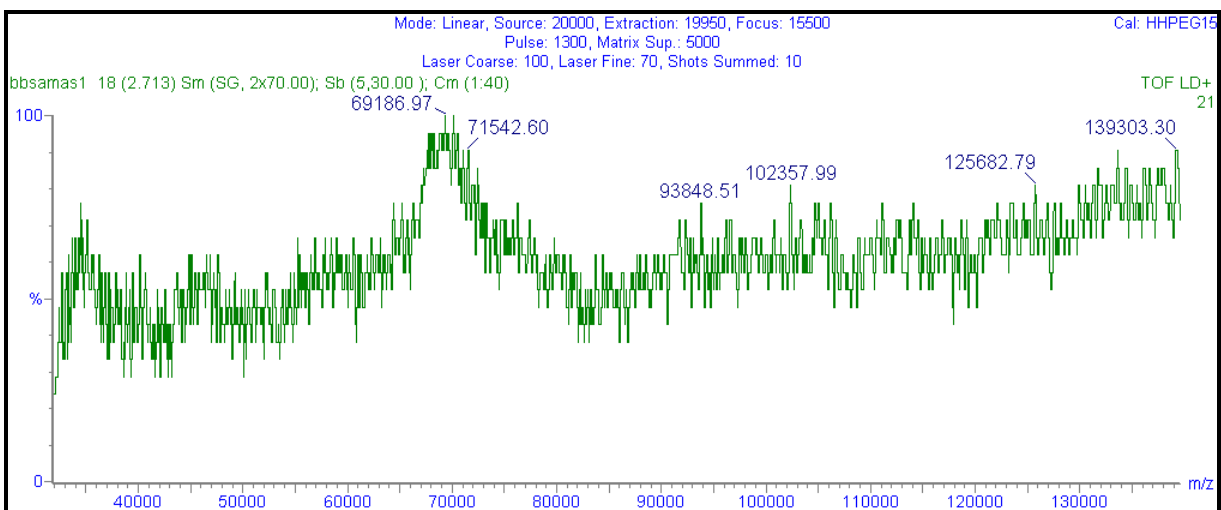


Abb. 3.13 MALDI-TOF-Spektrum zur Bestimmung der Masse des Proteinkonjugates von Marrubensuccinat mit BSA. Die durchschnittliche Masse des Konjugates ist 69.188 Da. Reste von Phosphationen haben die Aufnahmebedingungen in diesem Fall verschlechtert.

Auswertung der Untersuchungen

Die Diskrepanz zwischen der densitometrischen Bestimmung und der unter Verwendung radioaktiv markierter Vorstufen durchgeführten Bestimmung kann unter Einbezug aller Methoden zumindest hypothetisch erklärt werden. Die mit Hilfe der MALDI-TOF-Messung gefundene Massendifferenz von 2,964 kDa muss nicht von Marrubenolsuccinat als ankondensiertem Molekül verursacht werden. Denkbar ist auch eine Spaltung der Esterbindung zwischen Marrubenol und Succinat, wodurch mehr Bernsteinsäure als Isoprenoid am Proteinkonjugat verbleibt.

Unter der Prämisse, dass die Daten der Untersuchungen mit radioaktiv markierten Vorstufen und der per Densitometrie gewonnenen Ergebnisse kombinierbar wären, wäre der Proteincarrier mit durchschnittlich 13 Molekülen Bernsteinsäure und 5 Molekülen Marrubenol bzw. 8 Molekülen Bernsteinsäure und 5 Molekülen Marrubenolsuccinat belegt.

Diese Form der Belegung zeigt im Maldi-TOF eine Massendifferenz von 2.980 Da.

($8 \times 100 \text{ Da} + 5 \times 436 \text{ Da} = 2.980 \text{ Da}$, gemessen 2.964 Da)

Die Esterbindung des Marrubenolsuccinates ist wie eine Sollbruchstelle, die in wässrigem Medium zunehmend hydrolysiert wird bzw. durch Umesterung den Succinatspacer am Protein zurücklässt. Einen weiteren Anteil hat vielleicht auch eine unspezifische Absorption des relativ polaren Marrubenolsuccinates an das Trägerprotein, welches unter der Dialyse wieder freigegeben wird. Diese Überlegungen basieren zwar auf chemischen Grundlagen, die daraus resultierenden Probleme des zunehmenden Verlustes an Zielstruktur wurden jedoch von anderen Autoren, die Proteinkonjugate unter Verwendung eines Bernsteinsäure-Spacers dargestellt haben, nicht erwähnt (Oliver et al., 1968; Lauer et al., 1974; Dixon et al., 1977; Xuan et al., 1999; Zündorf et al., 1998 und Shoyama et al., 1998). Gegebenenfalls ist die Esterbindung auch durch die zweite γ -Hydroxygruppe besonders labil.

Das Ausmaß dieser Verluste an Marrubenol verdeutlichte ein Experiment mit einem weiteren Marrubenolsuccinat-Konjugat, bei dem vor und während der Dialyse Aliquots entnommen wurden. Schon bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung (s. Abb. 3.14) fällt auf, dass das an der Startlinie verbleibende Konjugat zunehmend weniger mit Vanillin-Schwefelsäurereagenz gefärbt wird. Im Proteinkonjugat befindet sich mit fortschreitender Dialyse zunehmend weniger Marrubenolsuccinat. BSA selbst wird mit diesem Reagenz nicht angefärbt.

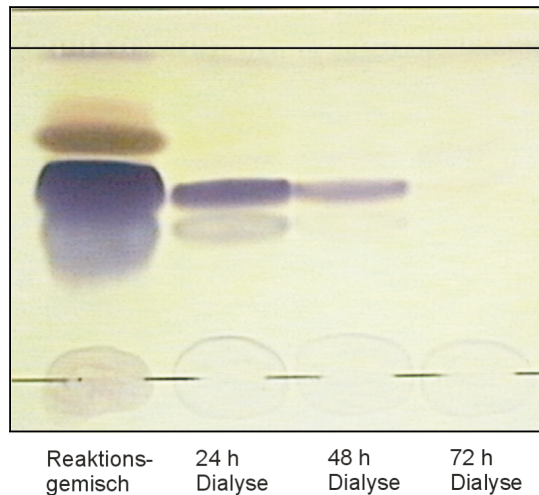


Abb. 3.14 Dünnschichtchromatogramm eines Marrubenosuccinat-Konjugates im Reaktionsansatz und während der Dialyse. Je 20 μl wurden dem Ansatz direkt vor der Dialyse bei 4°C gegen Wasser sowie nach 24, 48 bzw. 72 Stunden entnommen und auf eine Kieselgel 60 F₂₅₄-DC-Platte aufgetragen. Fließmittel und Detektion entsprechend Abschnitt 2.3.4.

Die Verluste an Furanolabdanditerpenen wurden auch mittels MALDI-TOF bestätigt (s. Abb. 3.15). Bereits nach 48 Stunden Dialyse war die gefundene Masse um fast 2 kDa niedriger als zu Beginn, was 5,5 Molekülen Marrubenol entspricht. Diese Menge an Zielmolekül fehlt in den Proteinkonjugaten sowohl bei der Immunisierung als auch bei der Charakterisierung der Proteinkonjugate.

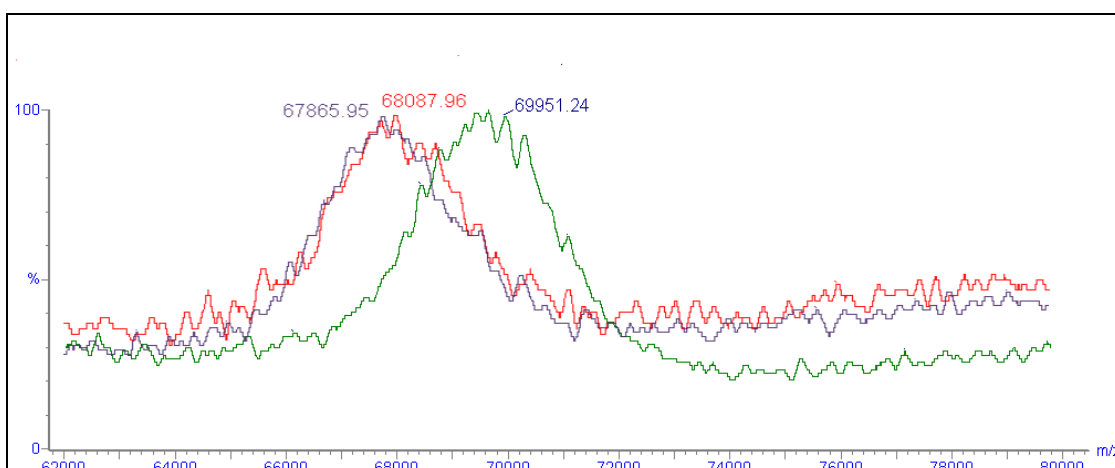


Abb. 3.15 MALDI-TOF-Spektrum zur Bestimmung der Masse eines Marrubenosuccinat-BSA-Konjugates. Die grüne Färbung zeigt das Konjugat vor der Dialyse. Die rot bzw. violett gekennzeichneten Messungen zeigen das Konjugat nach 48 bzw. 72 Stunden Dialyse gegen Wasser.

Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit wurden die mit DC und MALDI-TOF untersuchten Fraktionen zusätzlich in einem ELISA eingesetzt (s. Abschnitt 2.6.4). Gleiche Mengen eines Zellkultur-Überstandes, der Antikörper gegen einen Teil des Furanolabdandmolekül enthielt, wurden mit gleichen Mengen des oben bereits verwendeten Proteinkonjugates vor der Dialyse sowie nach 24 bzw. 48 Stunden Dialyse untersucht. Je 1 μ l der zu untersuchenden Proteinlösung wurde zum Coaten pro Vertiefung eingesetzt. Alle Ansätze wurden mit 5 bzw. 10 μ l des Überstandes der Zell-Linie 6C5 inkubiert. Die Antikörper der Zell-Linie 6C5 binden an Furanolabdanditerpene. Wie die Abb. 3.16 zeigt, banden die Antikörper der Zell-Linie 6C5 in beiden Konzentrationsstufen umso schlechter an das Konjugat, je länger dieses der Dialyse unterworfen worden war. Bei Einsatz 10 μ l 6C5 nahm die gemessene Absorption, die indirekt ein Maß für die gebundene Menge an Marrubenol darstellt, nach 48stündiger Dialyse um 50% ab.

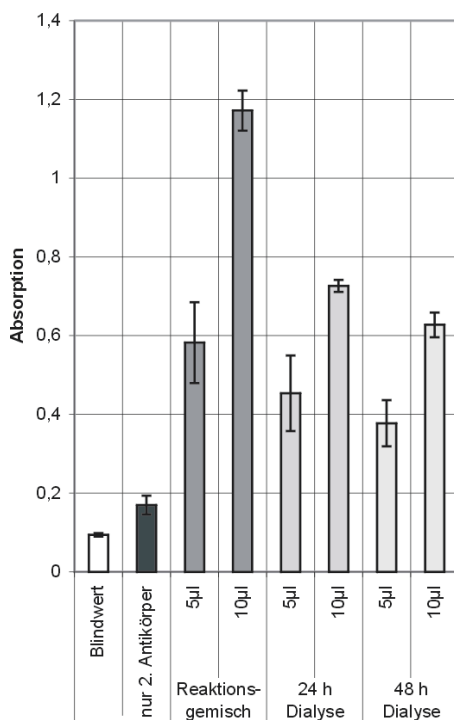


Abb. 3.16 ELISA-Experiment zum Nachweis der Belegung des Marrubenolsuccinat-Konjugates. Je 1 μ l / Vertiefung des Reaktionsansatzes der Proteinkopplungsreaktion und dasselbe Produkt nach 24 bzw. 48stündiger Dialyse gegen Wasser wurden mit dem Antikörper 6C5 detektiert. Zum Nachweis wurden je 5 bzw. 10 μ l des Überstandes der Zell-Linie eingesetzt. Die Antikörper der Zell-Linie 6C5 werden in Abschnitt 3.1.6 charakterisiert.

3.1.4 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Furanolabdanditerpene

Die hergestellten Proteinkonjugate wurden in Zusammenarbeit mit Frau I. Zündorf (Frankfurt) zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Die Immunisierung ist der erste Schritt der Gewinnung monoklonaler Antikörper, die in insgesamt sechs Stufen erfolgt (Dingermann, 1999):

1. Immunisierung der Maus
2. Kultivierung der Myelom-Zell-Linie
3. Gewinnung der Lymphozyten
4. Zellfusion
5. Testen des Kulturüberstandes
6. Expandieren, Klonieren und Konservieren der vorselektierten Hybridoma-Zellen

Die Immunisierung und Kultivierung wurden in Kooperation in Frankfurt (Institut für Pharm. Biologie) durchgeführt, das Screening fand teils in Frankfurt, teils in Bonn statt.

In zwei verschiedenen Ansätzen (Immunisierung A und B) wurden je 50 µg des Marrubenolsuccinat-Thyroglobulin-Konjugates (entsprechend der Proteinbestimmung nach Bradford) je einer Balb/C-Maus intraperitoneal injiziert. Die Immunisierung wurde für 5 Monate fortgeführt, wobei zwischen den einzelnen Immunisierungsinjektionen je 15 bis 20 Tage lagen. Die letzte Immunisierungsinjektion wurde 3 Tage vor der Gewinnung der Milzzellen gegeben (s. Abschnitt 2.6.1). Hierfür wurde die Maus zunächst betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Die Milzzellen wurden durch Auswaschen aus dem Milzgewebe gewonnen.

Die isolierten B-Lymphozyten wurden mit frisch kultivierten NS-1-Zellen X63 AG8 fusioniert. Durch Inkubation mit HAT-Supplement wurden die antikörperproduzierenden Hybridomazellen selektiert. Den zur Fusion verwendeten Myelom-Zellen fehlt durch einen genetischen Defekt die Enzymausstattung, um Purine bzw. Pyrimidine aus den im HAT-Supplement enthaltenen Vorstufen Hypoxanthin und Thymidin zu synthetisieren (H und T des HAT).

Die *de novo* Synthese der Purine und Pyrimidine wird jedoch zusätzlich durch Aminopterin (A des HAT) unterbunden. Aminopterin ist ein Hemmstoff der Tetrahydrofolsäure, die als C₁-Gruppendonator in der Biosynthese der Purine und Pyrimidine dient. Nur Zellen, die unabhängig von der *de novo* Synthese die Basen synthetisieren können und somit nicht den genetischen Defekt der Hybridomzellen enthalten, wachsen in HAT-Supplement. Zellen, die jedoch ohne Anteil der Myelom-Zellen nicht die Wachstumskontrolle verloren haben, sterben entsprechend ihres Zellzyklus im Laufe der Zeit ab. Selektiert werden somit Zellen, die Anteile aus beiden Zell-Typen enthalten (s. Abb. 3.17)

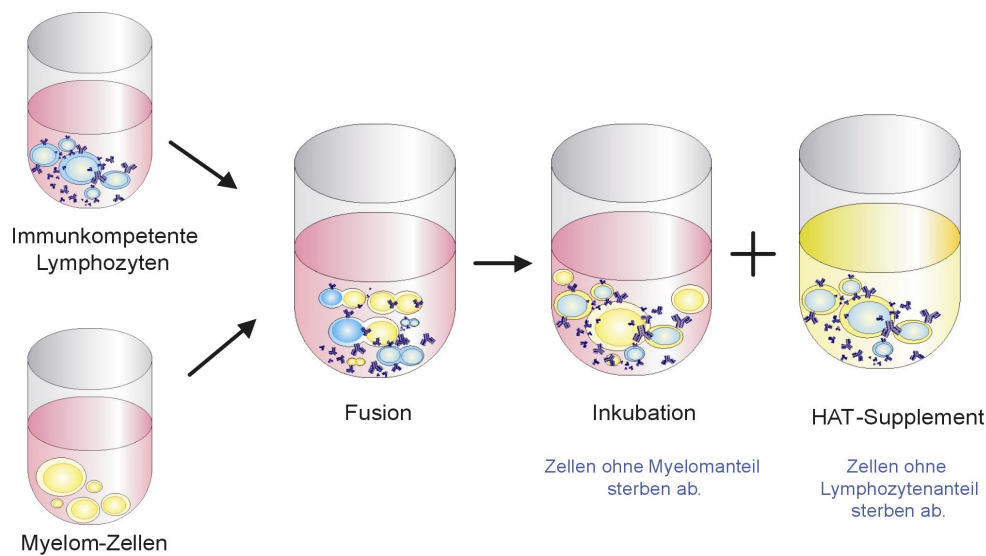


Abb. 3.17 Generierung und Selektion der Hybridom-Zellen. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Inkubation mit HAT-Supplement in die zwei ablaufenden Prozesse unterteilt.

Die selektierten Zellen wurden auf Mikrotiterplatten vereinzelt. Jede Linie erhielt ihren Namen durch eine Kombination aus der Mikrotiterplatte und der Bezeichnung der einzelnen Vertiefung. In jedem der 2 Ansätze wurden mehr als 1000 Hybridom-Linien etabliert. Die einzelnen Linien zeigten Wachstum und sekretierten Antikörper in den Kulturüberstand. Die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden mikroskopisch untersucht. Wurden in einer Vertiefung mehrere Zell-Kolonien gefunden, wurden diese auf eine weitere Mikrotiterplatte verteilt.

3.1.4.1 Direkter Nachweis der Antikörperbindung

Ein direkter Nachweis der Bindung des Antikörpers an ein Antigen ist möglich, wenn das Antigen spezifisch markiert ist. Eine solche Möglichkeit bietet die radioaktive Markierung eines Moleküls. Zum Nachweis der Bindung der monoklonalen Antikörper an das Zielmolekül Marrubiin wurde daher radioaktiv markiertes Marrubiin nach den Angaben von Knöss et al. (1997) hergestellt (s. Abschnitt 2.3.2). Es wurden 2,1 mg Marrubiin mit einer Gesamtaktivität von 5730 dpm gewonnen.

Je 30 µl einer Lösung des Marrubiins (63 µg; 172 dpm) wurden mit 300 µl eines Zellkultur-Überstandes (1, 2) mit Antikörpern, die potentiell gegen Marrubiin gerichtet waren, inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurde ein gegen ein fremdes Hapten gerichteter Antikörper im Zellkultur-Überstand in gleicher Art behandelt. Nach 7 Stunden Inkubationszeit wurden die Proteinteile der Lösung mit Hilfe eines Microcon-Röhrchens aufkonzentriert und die Lösung zweimal mit je 300 µl PBS gespült. Die aufkonzentrierte Proteinfraction wurde, wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, dünnschichtchromatographisch untersucht. Eine Detektion des proteingebundenen Marrubiins war aufgrund der ebenfalls mit Vanillin-Schwefelsäure reagierenden Bestandteile des Zellkultur-Mediums nicht möglich, visuell wurde kein freies Marrubiin detektiert. Die Startzonen der DC-Platte wurden daher mit einem Spatel abgehoben und die Radioaktivität per Szintillationszähler bestimmt (s. Abb. 3.18).

Die entsprechende Zone des Zellkultur-Überstandes 2 zeigte nach der Analyse eine etwas höhere Radioaktivität als die des Überstandes 1, der kaum von der unspezifischen Absorption des fremden Antikörpers zu unterscheiden war. Die Antikörper des Überstandes 2 zeigten demnach eine schwache, direkte Bindung des Marrubiins. Die gemessenen Werte sind jedoch insgesamt sehr niedrig und streuen relativ stark. Gegebenenfalls wurde durch den Methanolgehalt des Fließmittels, analog der Elution bei Immunoaffinitätssäulen (Shan et al., 2000) auch größere Anteil des gebundenen Marrubiins wieder vom Antikörper eluiert.

Da der Aufwand für die Herstellung von größeren Mengen radioaktiv markierten Marrubiins mit einer höheren spezifischen Radioaktivität zu hoch gewesen wäre, wurden die Untersuchungen mit einer indirekten Methode, dem ELISA (s. Abschnitt 3.1.5) fortgesetzt.

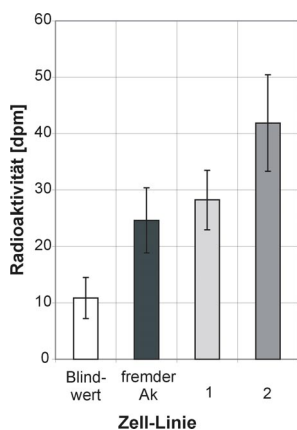


Abb. 3.18 Direkter Nachweis der Antikörperbindung an radioaktiv markiertes Marrubiin. Je 30 µl einer Marrubiin-Lösung (172 dpm) wurden mit je 300 µl eines Zellkultur-Überstandes (1, 2) oder eines fremden Antikörpers inkubiert. Nachdem die Antikörper aufkonzentriert, gewaschen und auf einer DC-Platte von unspezifisch gebundenem Marrubiin gereinigt worden waren, wurde die Radioaktivität der entsprechenden Fraktionen bestimmt.

3.1.4.2 Screening der etablierten Zell-Linien

Die Antikörper wurden in einem indirekten ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) auf eine Aktivität gegen Marrubiin untersucht. Dieses Standardsystem wird zur qualitativen und quantitativen Bestimmung verschiedenster Antigene eingesetzt (Crowther, 1995; Kemeny, 1994).

Dabei wird das Antigen (in diesem Fall Marrubenolsuccinat-Proteinkonjugat) an die Wände einer Polystyren-Mikrotiterplatte adsorbiert. Freie Valenzen der Mikrotiterplatte, die z.B. den Antikörper adsorbieren könnten, werden mit einem neutralen Protein, z.B. Milchpulver oder BSA blockiert. In einem zweiten immunologischen Schritt bindet der zu untersuchende (primäre) Antikörper an das auf diese Weise in immobilisierter Form präsentierte Antigen. Die Menge des gebundenen Antikörper wird mit Hilfe eines sekundären Antikörpers bestimmt, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. In diesem Falle handelte es sich um einen Anti-Maus-Antikörper, der im konstanten Fc-Teil des murinen IgG bindet.

Am C-terminalen Ende des zweiten Antikörpers ist in der Regel ein Enzym gebunden, über welches eine Farbreaktion katalysiert wird. Das System wird als indirekter ELISA bezeichnet, weil das Enzym nicht direkt an den ersten Antikörper gebunden ist, sondern über einen zweiten Antikörper „indirekt“ mit der Konzentration des ersten Antikörpers korreliert (Crowther, 1995). Als Chromogen wurde ABTS (2,2'-Azino-di-ethylbenzothiazolin-sulfonsäure) eingesetzt. Der Farbstoff reagiert unter Bildung eines grün gefärbten Radikalkations mit Wasserstoffperoxid unter der Katalyse von Peroxidase (Childs et al., 1975)

Da der sekundäre Antikörper über den primären Antikörper und das immobilisierte Antigen an der Wand der Mikrotiterplatte fixiert ist, steht die detektierte Menge des sekundären Antikörpers in direkter Korrelation zur Menge des Antigens bzw. zur Menge gebundenen primären Antikörpers (s. Abb. 3.19 und Abschnitt 2.6.4).

6. Coating

Das Proteinkonjugat wurde während der 12-stündigen Inkubationszeit an die Mikrotiterplatte adsorbiert. Das Proteinkonjugat ist hier als gelbe Proteinbasis dargestellt, aus der über den Succinat-“Spacer“ das Isoprenoid (blaue Kugel) gebunden wurde.

7. Blockieren

Freie Valenzen der Oberfläche der Vertiefung werden mit fettfreiem Milchpulver (Frema®) (blassgelbe Lösung) blockiert.

8. Inkubation mit dem murinen mAK

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper (primärer Antikörper, violett) banden im nächsten Inkubationsschritt an das immobilisierte Proteinkonjugat.

9. Inkubation mit Anti-Maus-Antikörper

Anti-Maus-Antikörper (als Konjugat mit Peroxidase, rot) wurden im nachfolgenden Inkubationsschritt an den konstanten Teil des primären Antikörpers gebunden.

10. Farbreaktion

Die Menge des gebundenen Antikörpers wurde indirekt über eine Farbreaktion (Chromogen: ABTS®) nachgewiesen. Je größer die Menge an in der Platte befindlichem primären Antikörper, desto größer die Menge an gebildetem grünen Farbstoff.

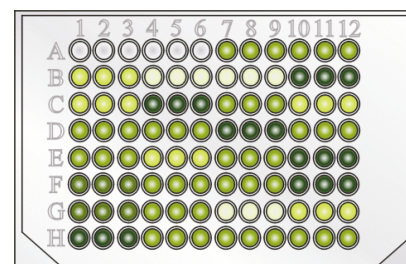
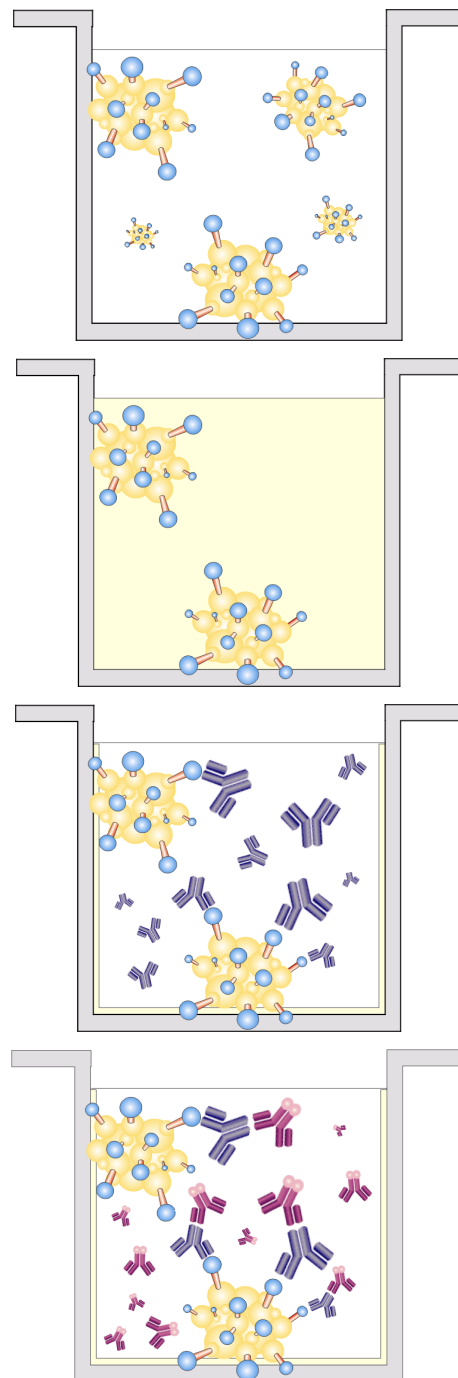


Abb. 3.19 Schema des indirekten ELISA.

Für dieses erste Screening wurde als Antigen das Konjugat aus Marrubenolsuccinat mit Thyroglobulin eingesetzt. In der Grafik 3.19 ist dieses Konjugat durch einen gelben Molekülteil dargestellt, aus dem rot die Succinatspacer herausragen, die das Furanolabdanditerpen (blaue Kugeln) tragen. Antikörper, die eine Bindung an dieses Konjugat zeigten, sind nicht gegen den Proteincarrier gerichtet, da dieser nicht das in der Immunisierung verwendete BSA als Trägerprotein enthält.

Die Zell-Linien, die eine Bindung an das Konjugat zeigten, wurden aus den Mikrotiterplatten-Vertiefungen in Anzuchtschalen übertragen und dort kultiviert. Die Hybridom-Zellen sekretierten Antikörper, die gegen den Marrubenolsuccinat-Teil des Moleküles gerichtet waren. Der Zellkultur-Überstand, der die monoklonalen Antkörper enthielt, wurde gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

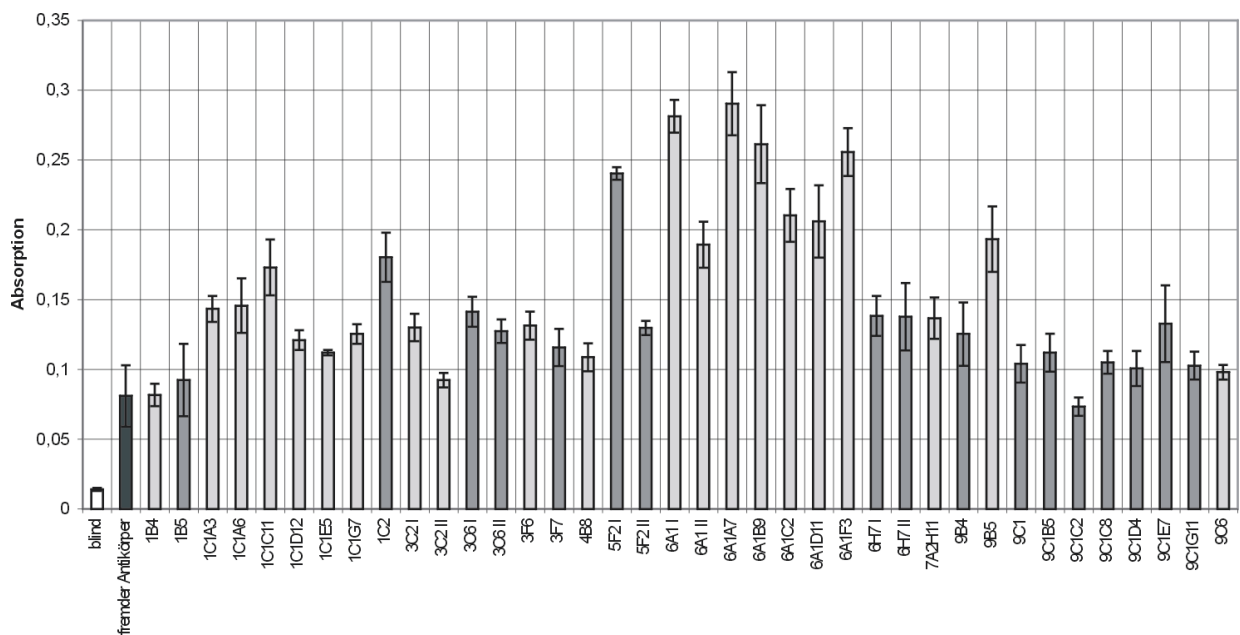


Abb. 3.20 Antikörper aus Zell-Linien der Immunisierung A. Je 10 µl des Kulturüberstandes der einzelnen Zell-Linien wurde entsprechend Abschnitt 2.7.4 im ELISA gegen 0,4 µg Marrubenolsuccinat-BSA-Konjugat eingesetzt. Die römischen Zahlen unterscheiden den ersten Überstand von einem 4 Wochen später gewonnenen. Die Werte geben jeweils Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen an.

3. Ergebnisse

Bei den Marrubenolsuccinat-Konjugaten wurden in der Immunisierung A 38 verschiedene Zell-Linien und Subklone etabliert, in der Immunisierung B acht Linien (s. Abb. 3.20 und 3.21).

Bei den Zell-Linien von A fielen die Überstände von 1C1, 1C2, 5F2, 6A1, 9B5 und 9C1 sowie deren Subklone im ELISA besonders hohe Absorptionen auf. Diese Absorptionen deuteten auf eine hohe Antikörperkonzentration bzw. hohe Affinität der Antikörper gegenüber dem Konjugat hin. Unter den Zell-Linien der Immunisierung B fiel nur Zell-Linie 6C5 durch sehr hohe Absorptionen auf. Fünf dieser sieben Zell-Linien wurden für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.

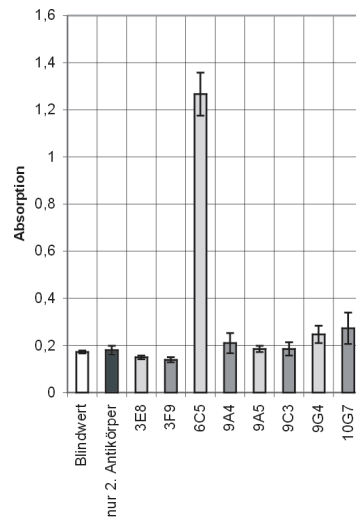


Abb. 3.21 Antikörper aus Zell-Linien der Immunisierung B. Je 10 μ l des Kulturüberstandes der einzelnen Zell-Linien wurde entsprechend 2.6.4 im ELISA gegen 0,4 μ g Marrubenolsuccinat-BSA-Konjugat eingesetzt. Die Werte geben jeweils Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen an.

3.1.5 Optimierung des Testsystemes ELISA

Im ELISA wurden als Antigen die Proteinkonjugate der Isoprenoide eingesetzt. In der ersten Voruntersuchung, in der Zell-Linien gegen BSA, das Protein der Immunisierung aussortiert werden sollten, wurde das Konjugat mit Thyroglobulin als Trägermolekül eingesetzt. Ebenso wie bei der Immunisierung selbst war eine möglichst hohe Belegungsrate mit dem entsprechenden Zielmolekül notwendig, um eine möglichst große Spanne zwischen starker, schwacher und fehlender Bindung zu schaffen. Die Problematik der Belegung wurde bereits in Abschnitt 3.1.3.5.2 diskutiert.

Auch unter der Verwendung des gleichen Proteinkonjugates gab es in einigen Fällen zunächst einmal nicht erklärbare Ergebnisse. In Abb. 3.22 sind Ansätze mit solchen Ergebnissen nebeneinander gestellt. Die Antikörper der Zell-Linie 6C5 wurden in steigender Konzentration im indirekten ELISA untersucht. Die Reihe eins gibt den erwarteten Verlauf wieder: Mit steigender Antikörper-Konzentration steigt auch die gefundene Absorption. In Reihe zwei ist die Grundabsorption bei 0,5 µl Zellkultur-Überstand schon sehr hoch, bei 4-8 µl ist bereits die maximale Bindung erreicht. Die Ergebnisse der Reihe 3 streuen sehr stark und sind nicht mehr aussagekräftig.

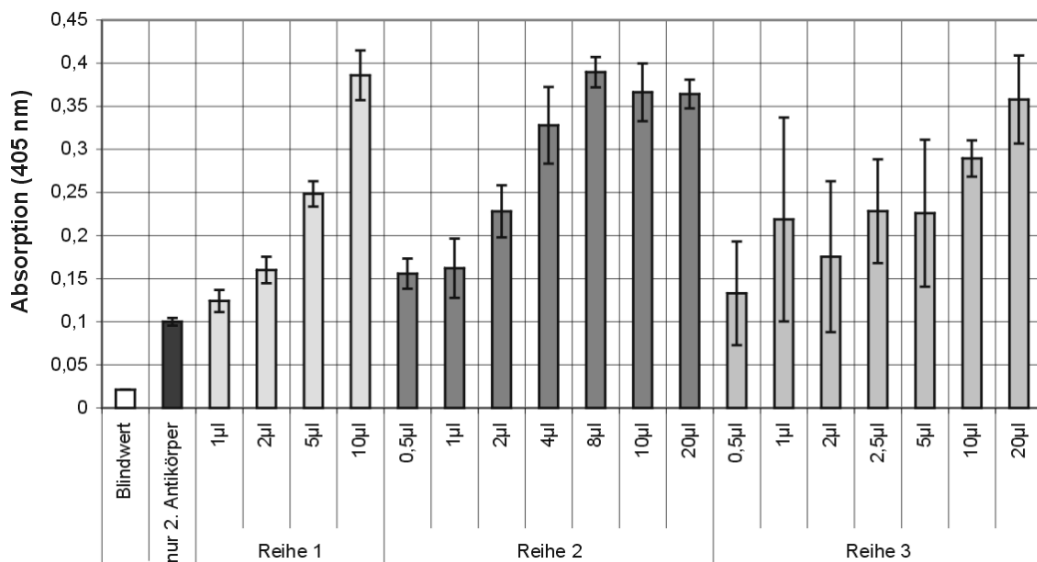


Abb. 3.22 Fehlerhafte ELISA. Steigende Mengen Zellkultur-Überstand der Zell-Linie 6C5 wurden im ELISA gegen 0,4 µg Marrubensuccinat-BSA-Konjugat eingesetzt. Jede Reihe gibt eine zu einem anderen Zeitpunkt bzw. auf einer anderen Mikrotiterplatte durchgeführten Versuch an. Die Werte sind jeweils Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen in nebeneinanderliegenden Vertiefungen.

3. Ergebnisse

Das für die Versuche verwendete Proteinkonjugat wurde bei -20°C in lyophilisierter Form gelagert. Bei genauerer Betrachtung erschien das Konjugat nach der Zugabe von PBS in manchen Fällen nicht mehr gelöst, sondern feinst suspendiert. Verlässliche Resultate erbrachte nur eine Charge gleichmäßig und nur einmal gefrorener konzentrierter Stammlösungen (1 mg / ml). Durch das Einfrieren und Auftauen wurde der hydrolytische Prozess, bei dem die Bindung des Furanolabdans an das Proteinkonjugat verloren geht, wahrscheinlich noch gesteigert. Gegebenenfalls unspezifisch adsorbiertes Marrubenolsuccinat ging aufgrund der Konformationsänderung des Proteins durch die Einfrier- und Auftauvorgänge zusätzlich verloren.

Zur Überprüfung der Überlegungen bezüglich dieser Fehlerquellen wurde ein frisch hergestelltes Marrubenolsuccinat-BSA-Konjugat wiederholt eingefroren und aufgetaut. Von jedem dieser Schritte wurden gleiche Mengen in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte gegeben und mit verschiedenen Konzentrationen an Zellkultur-Überstand 6C5 (Immunsierung B) versetzt. Nach dem ersten Zyklus war das Konjugat intakt. Steigende Mengen des Zellkultur-Überstandes korrelierten mit steigender Absorption im ELISA. Schon im zweiten Zyklus waren die Daten aufgrund stärkerer Streuung unkorreliert. Ab dem dritten Zyklus traten feinste Ausfällungen auf. Das Konjugat band insgesamt schlecht an die Mikrotiterplatte, wie die niedrigen Absorptionen zeigen (s. Abb. 3.23). Diese Phänomene sind nicht unbekannt. Nach Erlanger (1973) kommt es gelegentlich zu einer „Alterung“ und somit Unbrauchbarkeit von Proteinkonjugaten, die ihre Löslichkeit bzw. das Zielmolekül verlieren. Als Lösung bietet sich derzeit nur die konsequente Verwendung der aliquotierten Stammlösungen an.

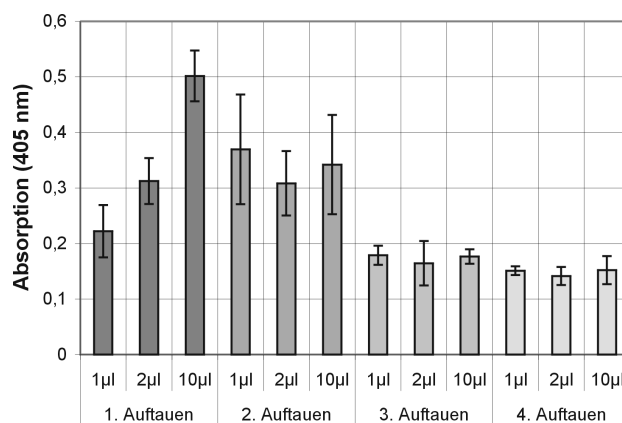


Abb. 3.23 Beispiel für den Einfluss wiederholter Auftauvorgänge auf die Qualität des Proteinkonjugates im ELISA. Eine Probe eines Proteinkonjugates mit Marrubenolsuccinat wurde wiederholt eingefroren. Nach jedem Auftauvorgang wurde ein Teil auf die gleiche Mikrotiterplatte pipettiert. Zu den vier auf diese Weise erhaltenen Ansätzen wurden steigende Mengen des Kulturüberstandes der Zell-Linie 6C5 (Immunsierung B) gegeben. Die Daten sind jeweils Mittelwerte aus drei Einzelmessungen.

Auch die zu untersuchenden Antikörper verloren bei der Lagerung der Zellkultur-Überstände in Falcon-Tubes bei 4°C zunehmend an Funktionalität (s. Abb. 3.24). Zusätzlich waren die mit fetalem Kälberserum angereicherten Lösungen bei dieser Art der Lagerung stärker durch Kontamination durch Mikroorganismen gefährdet.

Die monoklonalen Antikörper wurden deswegen ebenfalls in Aliquots bei -20°C gelagert. Die Auswertung der kompetitiven ELISA wurde in einem relativen Maßstab, im Vergleich zu Blindwerten, dargestellt, da die Reaktion des Antikörpers je nach Alter des verwendeten Zellkultur-Überstandes nicht vergleichbar war. Bei Lagerung bei 4°C verloren die Antikörper an Empfindlichkeit, was zu ungenauen und nichtreproduzierbaren Ergebnissen führte.

Die zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen Zellkultur-Überstände waren ebenfalls nicht immer vergleichbar. Direkt nach der Fusion enthalten die Hybridom-Zellen einen doppelten Chromosomensatz. Nur die Hälfte stammt jedoch von der immunkompetenten Milzzelle. Mit fortschreitender Kultivierung verlieren die Zellen nach und nach das überschüssige Erbmateriale, gegebenenfalls auch die Information, die den entsprechenden Antikörper betrifft. Da dieser Mechanismus in jeder einzelnen Zelle der Zellkultur unterschiedlich abläuft, kann nach Monaten die Antikörperproduktion der Zell-Linie abnehmen oder gar versiegen. Daher ist eine adäquate Lagerung der Zellkultur-Überstände bei -20°C wichtig.

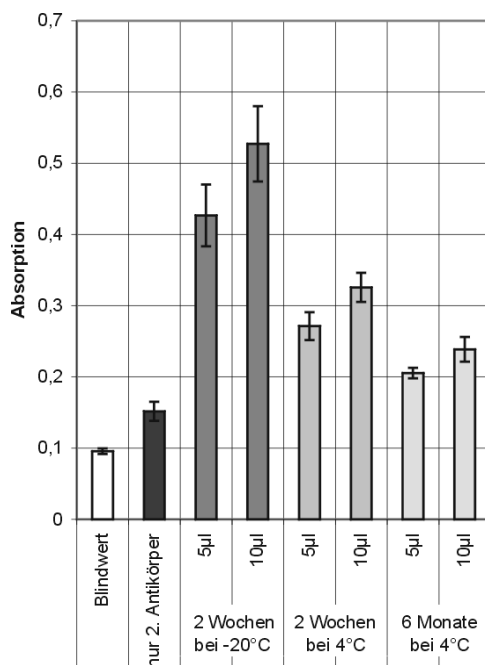


Abb. 3.24 Lagerung der Zellkultur-Überstände.

Der Kulturüberstand der Zell-Linie 6C5 wurde für 2 Wochen bei -20°C bzw. bei 4°C gelagert, ein weiterer Teil 6 Monate bei 4°C. Im ELISA wurden 0,4 µl Konjugat / Vertiefung (auf einer Mikrotiterplatte) mit 5 bzw. 10µl des jeweiligen Überstandes inkubiert. Weitere Details der Methode unter 2.7.4.

Peroxidase-Farbreaktion

Die Peroxidase-Farbreaktion basiert auf der Umsetzung von Wasserstoffperoxid durch die an den Anti-Maus-Antikörper gekoppelte Peroxidase. Als Chromogen wurde ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethyl)-benzthiazolin) eingesetzt. Eine intensivere Farbentwicklung korrelierte mit einer höheren gebundenen Menge des zu untersuchenden Antikörpers.

Die Farbstoffbildung war jedoch nicht linear, wie Abb. 3.25 zeigt. Die Farbstoffbildung schritt je nach Farbstoffmenge und Menge der vorhandenen Peroxidase unterschiedlich rasch voran. Der Farbstoff zersetzte sich nach Beendigung der Reaktion jedoch zunehmend, was eine quantitative Bestimmung erschwert. Der gebildete Farbstoff wurde daher nach jeweils genau 30 Minuten photometrisch bestimmt. Zusätzlich war entsprechend McCoy-Messer et al. (1993) darauf zu achten, dass der pH-Wert von 4,2 genau eingehalten wird.

Nach Kemeny (1994) ist auch die Konzentration des Wasserstoffperoxids von großer Bedeutung, da bei zu hoher Peroxid-Konzentration das Enzym an Aktivität verliert und bei zu geringer Konzentration die Reaktion weniger empfindlich ist. Portionen des einzusetzenden Wasserstoffperoxids wurden daher bei 4°C aufbewahrt.

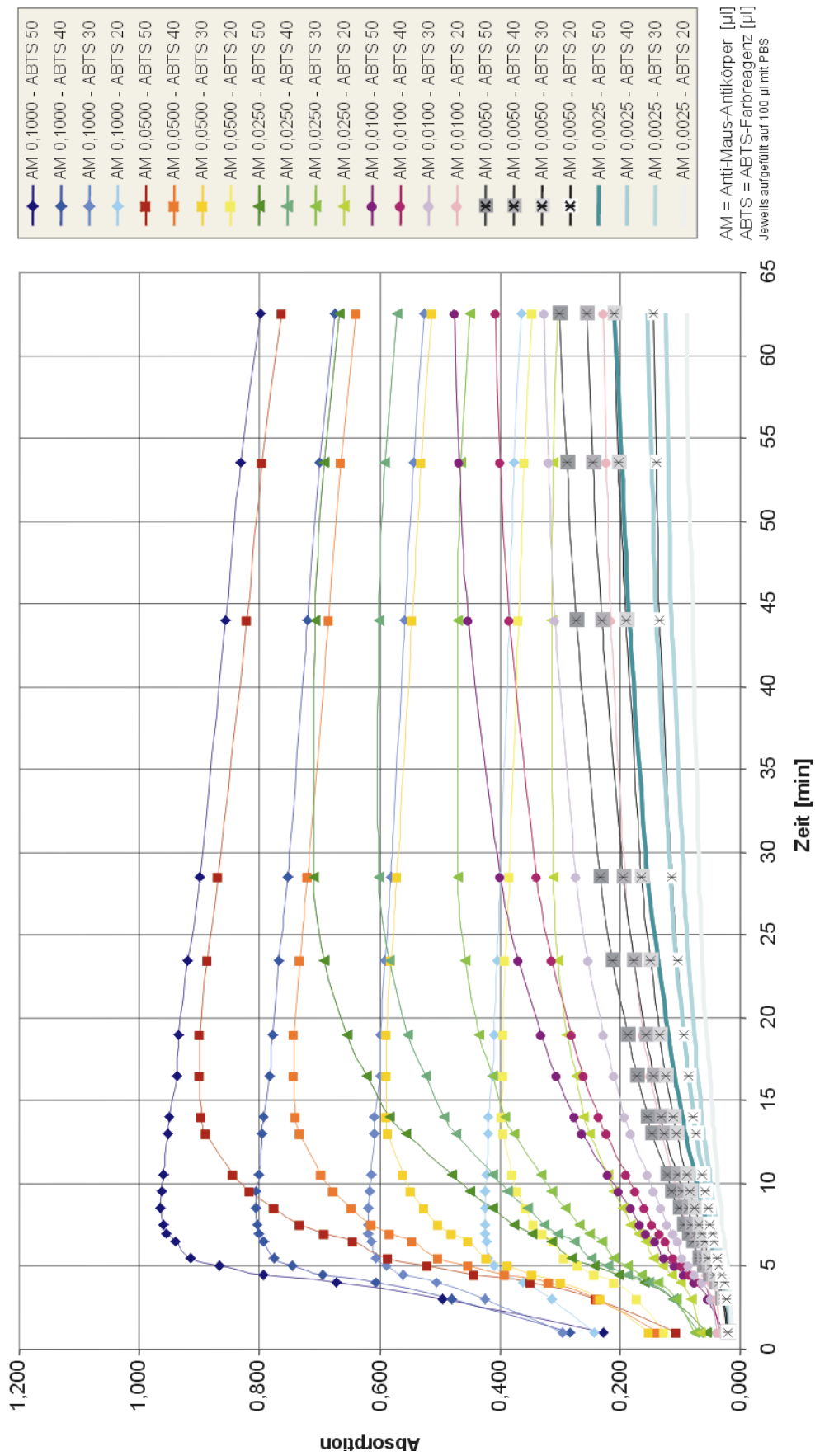


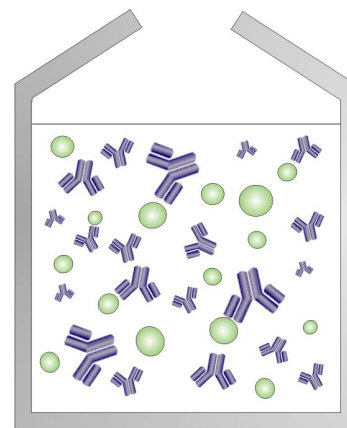
Abb. 3.25 Zeit-Abhängigkeit der Peroxidase-Reaktion. In einem ELISA-ähnlichen Modell wurden 0,0025 – 0,1 μl Anti-Maus-Antikörper mit wechselnden Mengen ABTS-Farbreakanz inkubiert. Die Lösungen wurden mit PBS auf jeweils 100 μl ergänzt. Der gebildete Farbstoff wurde photometrisch bestimmt. Der Farbstoff wurde je nach vorhandener Peroxidasekonzentration unterschiedlich schnell gebildet und wurde partiell wieder abgebaut. Nach ca. 30 Minuten Inkubation ist das Verhältnis zwischen Farbstoff-Bildung in schwächer konzentrierten Lösungen und -Abbau in den höher konzentrierten das günstigste.

3.1.6 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen Furanolabdanditerpene und erste Anwendung

Zur Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wurde eine andere Form des ELISA, der kompetitive ELISA eingesetzt. Hierbei kompetiert das Zielmolekül des immobilisierten Proteinkonjugates mit einem zweiten Molekül (= Kompetitor), das sich zusammen mit dem monoklonalen Antikörper in Lösung befindet. Je besser der Kompetitor an den monoklonalen Antikörper bindet, desto weniger Antikörper bleibt zur Bindung an das immobilisierte Proteinkonjugat. Die Menge des mit dem zweiten Antikörper und der gekoppelten enzymatischen Reaktion nachweisbaren Antikörpers nimmt also bei gleicher Bindungsstärke mit zunehmender Konkurrenz ab. Durch entsprechende Wahl verschiedener Kompetitoren wird das Epitop, das der Antikörper als Teil des Zielmoleküls bindet, bestimmbar (s. Abb. 3.26).

3a. Präinkubation der murinen Antikörper mit einem potentiellen Kompetitor

Die Antikörper wurden in einem Glas-Fläschchen mit dem möglichen Kompetitor (grüne Kugeln) vorinkubiert. Das Gemisch wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert.



3b. Inkubation der monoklonalen Antikörper mit dem Kompetitor und dem immobilisierten Proteinkonjugat

Band der Kompetitor an den monoklonalen Antikörper, stand für die Bindung an das immobilisierte Proteinkonjugat weniger Antikörper zur Verfügung.

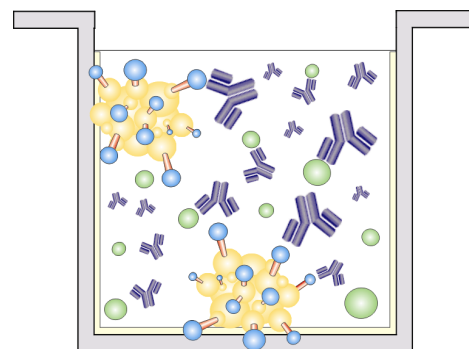


Abb. 3.26 Schema der zusätzlichen Schritte im kompetitiven ELISA. Mit Hilfe verschiedener strukturell nahe verwandter Kompetitorsubstanzen ist es möglich, diejenigen Teile des Zielmoleküls zu bestimmen, die als Hapten für den jeweiligen Antikörper fungierten. Beinhaltete der Kompetitor dieses Hapten ebenfalls und band an den Antikörper, stand für die Bindung an das immobilisierte Proteinkonjugat im ELISA weniger Antikörper zur Verfügung. Die Durchführung des indirekten ELISA ist in Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben.

Die Kompetitoren, die zur Charakterisierung verschiedener Zell-Linien im kompetitiven ELISA eingesetzt werden sollten, zeigten eine geringe Wasserlöslichkeit. Die Inkubation mit den Kompetitorsubstanzen musste daher zum Teil in Gegenwart organischer Lösungsmittel durchgeführt werden. Hierbei erwiesen sich Aceton, Dioxan und DMSO selbst in 5%iger Konzentration als inkompatibel mit den Antikörpern. Ethanol und besonders Methanol waren besser geeignet. Bei Konzentrationen von bis zu 20% (V/V) blieb eine Restaktivität der Antikörper erhalten. Mit zunehmendem Methanolanteil nahm die Absorption nur leicht zu (s. Abb. 3.27).

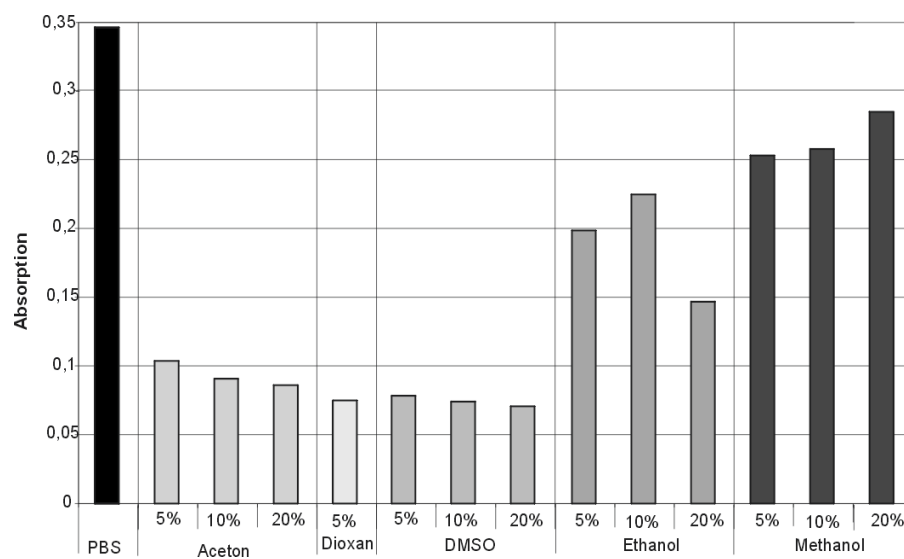


Abb. 3.27 Einfluss organischer Lösungsmittel auf den ELISA. 5µl des Kultur-Überstandes 6A1 wurde mit steigenden Konzentrationen organischer Lösungsmittel in PBS inkubiert. Für weitere methodische Details s. 2.6.4. Methanol zeigte die geringste Beeinträchtigung der Empfindlichkeit.

3.1.6.1 Checkpoint-Titration

In einem ersten Screening waren die Zell-Linien 1C1C11, 1C2, 5F2, 6A1, 6C5, 9B5 und 9C1C8 durch hohe Absorptionen im indirekten ELISA aufgefallen. Diese hohen Absorptionen deuten auf eine hohe Antikörpermenge oder hohe Bindungsaffinität hin. Die Zell-Linien wurden daher zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Die Überstände der Zell-Linien 1C2 und 9B5 zeigten mit zunehmender Kultivierungsdauer im ELISA immer geringere Absorptionen, was darauf hindeutet, dass die Hybridom-Zellen die Fähigkeit verloren, Antikörper zu binden. Die beiden Zell-Linien wurden daher nicht weiter untersucht.

Die sogenannte Checkpoint-Titration wurde eingesetzt, um für den kompetitiven ELISA eine optimale Korrelation zwischen der Menge des eingesetzten Proteinkonjugates, des Zellkultur-Überstandes und möglicher Kompetitoren zu finden. Hierfür wurden steigende Konzentrationen des entsprechenden Zellkultur-Überstandes oder gereinigten Antikörpers mit einer gleichbleibenden Konzentration Proteinkonjugat inkubiert (s. Abb. 3.28).

In halblogarithmischer Darstellung ergab sich für die einzelnen Überstände bzw. aufgereinigten Antikörper eine Kurve, anhand derer das optimale Verhältnis von Proteinkonjugat und Antikörper bestimmt werden konnte (s. Abb. 3.29). Geeignet für ELISA-Systeme ist nur der Bereich mit möglichst großer Steigung. Für den kompetitiven ELISA sollte eine Konzentration aus dem oberen Drittel des linearen Kurvenanteils gewählt werden. Die Konkurrenz und damit die verminderte Bindung des Antikörpers an das Proteinkonjugat zeigt so den deutlichsten Effekt. Die Antikörper der Zell-Linie 1C1C11 zeigten ein lineares Intervall zwischen 5 und 20 μ l, ebenso 5F2. 6A1 konnte mit 2 - 10 μ l bereits in geringeren eingesetzt werden, genau wie 9C1C8. 6C5 hat mit 2- ca. 7 μ l das engste Intervall (s. Tab. 3.3).

Name der Zellkultur	Immunisierung	Checkpoint-Titration
1C1C11	MIN A	05 – 20 μ l
5F2	MIN A	05 – 20 μ l
6A1	MIN A	02 – 20 μ l
6C5	MIN B	02 – 07 μ l
9C1C8	MIN A	02 – 20 μ l

Tab. 3.3 Charakterisierte Zell-Linien aus Immunisierungen mit Marrubenolsuccinat-Konjugat. Die Abkürzung MIN steht für Marrubiin, die Zielstruktur, gegen die die monoklonalen Antikörper gerichtet sein sollten.

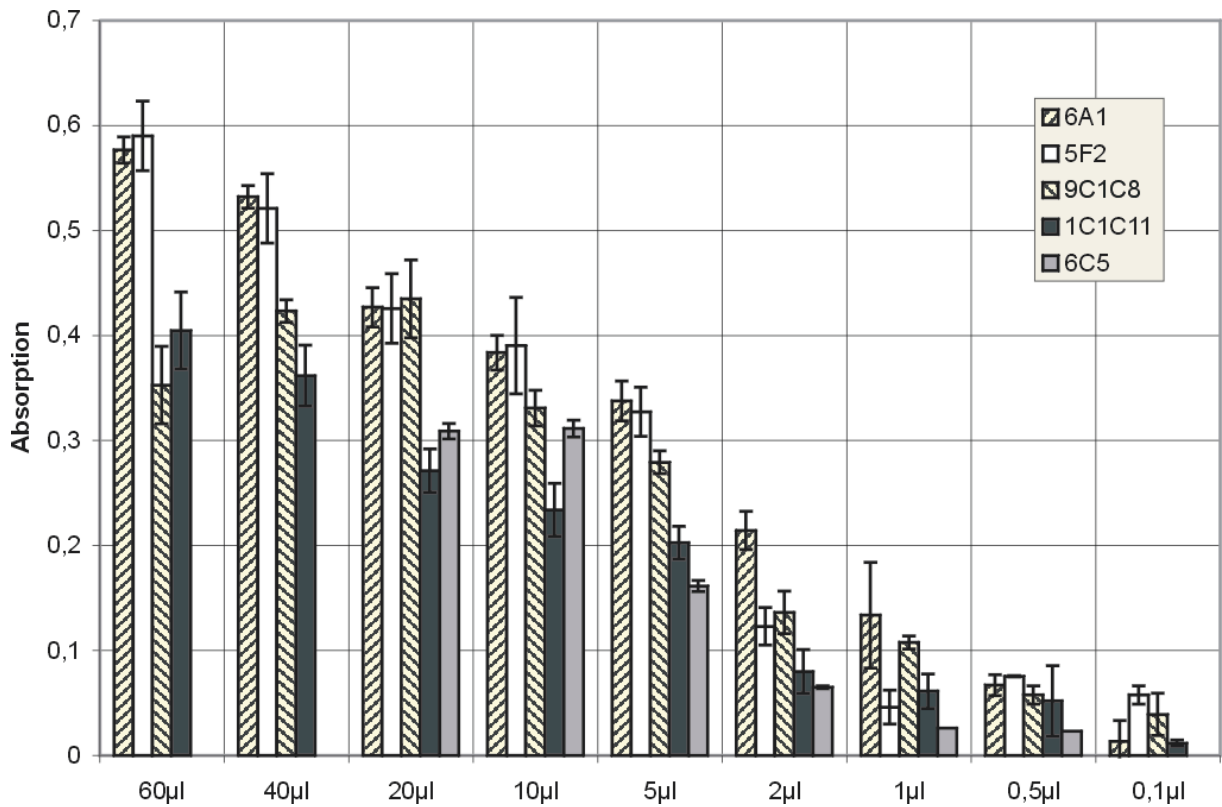
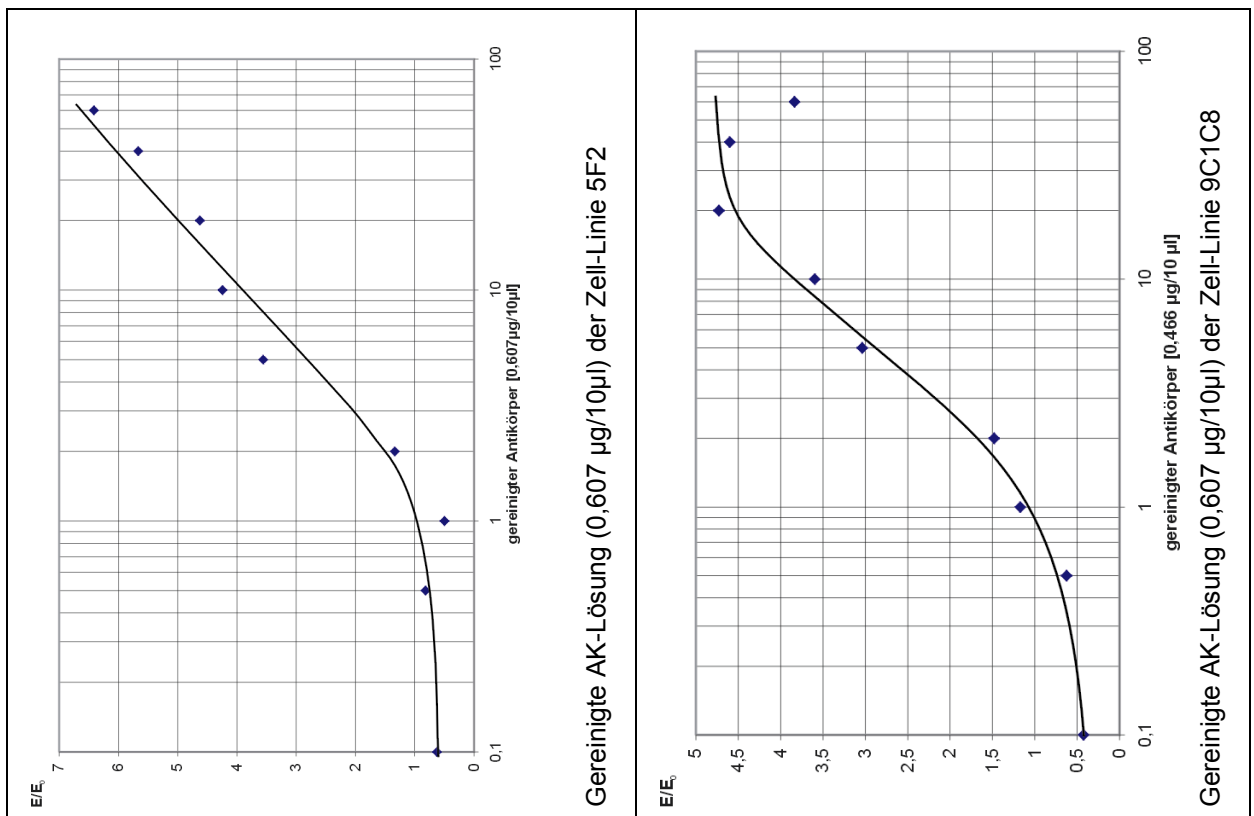


Abb. 3.28 Checkpoint-Titration verschiedener Zell-Linien und gereinigter Antikörper aus den Immunisierungen mit Marrubensuccinat-Proteinkonjugat. 0,1 – 60µl verschiedener Antikörper-Lösungen wurden mit 0,4 µg/ Vertiefung Marrubensuccinat-Proteinkonjugat inkubiert. Die Antikörper 6A1, 1C1C11 und 6C5 wurden als Zellkultur-Überstand eingesetzt. 5F2 und 9C1C8 wurden in Form ihrer gereinigten Lösungen mit einer Konzentration von 0,607 µg / 10µl bzw. 0,466 µg / 10µl verwendet.



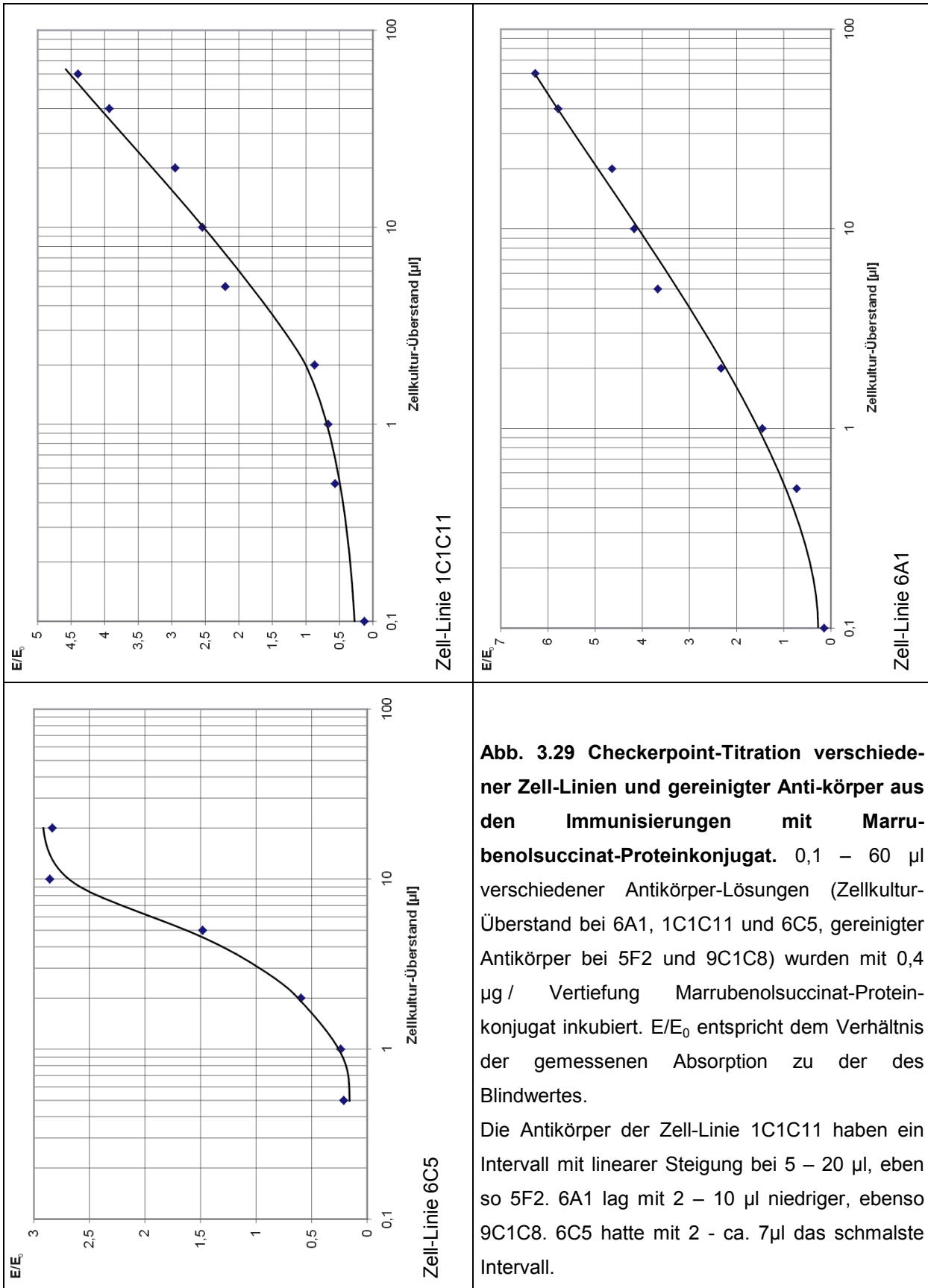


Abb. 3.29 Checkpoint-Titration verschiedener Zell-Linien und gereinigter Anti-körper aus den Immunisierungen mit Marrubensuccinat-Proteinkonjugat. 0,1 – 60 µl verschiedener Antikörper-Lösungen (Zellkultur-Überstand bei 6A1, 1C1C11 und 6C5, gereinigter Antikörper bei 5F2 und 9C1C8) wurden mit 0,4 µg / Vertiefung Marrubensuccinat-Proteinkonjugat inkubiert. E/E₀ entspricht dem Verhältnis der gemessenen Absorption zu der des Blindwertes.

Die Antikörper der Zell-Linie 1C1C11 haben ein Intervall mit linearer Steigung bei 5 – 20 µl, ebenso 5F2. 6A1 lag mit 2 – 10 µl niedriger, ebenso 9C1C8. 6C5 hatte mit 2 - ca. 7µl das schmalste Intervall.

3.1.6.2 Kompetitionen

Mit Hilfe der Daten aus der Checkpoint-Titration wurden die Antikörper der Zell-Linien 1C1C11, 5F2, 6A1, 6C5 und 9C1C8 im kompetitiven ELISA getestet. In allen Fällen wurde eine Konzentration von 5 μ l Zellkultur-Überstand pro 100 μ l PBS eingesetzt. Für die Charakterisierung standen als Kompetitoren Marrubiin, Marrubenol, Sclareol, Galeopsin, Leosibiricin, Bernsteinsäure und Furan-3-carbonsäure zur Verfügung (s. Abb. 3.30). Steigende Mengen der verschiedenen Kompetitoren wurden zu einer konstanten Menge an Zellkultur-Überstand und konstanter Menge an Proteinkonjugat pipettiert.

Um die Bindung des Antikörpers an einen möglichen Kompetitor zu erhöhen, wurden diese beiden Komponenten vorinkubiert. Hierfür wurde der Kulturüberstand der zu untersuchenden Zell-Linie und der Kompetitor für eine Stunde vorinkubiert. Das Gemisch, in dem die Bindung des Kompetitors an den Antikörper bereits stattgefunden hat, wurde dann in die Mikrotiterplatte und zu dem immobilisierten Proteinkonjugat gegeben (s. Abschnitt 2.6.5).

Die untersuchten Diterpene sind nur begrenzt wasserlöslich. Sie wurden daher in organischen Lösungsmitteln (Methanol, Dichlormethan, Aceton) in Glasvials eingefüllt. Das Lösungsmittel wurde durch Druckluft entfernt.

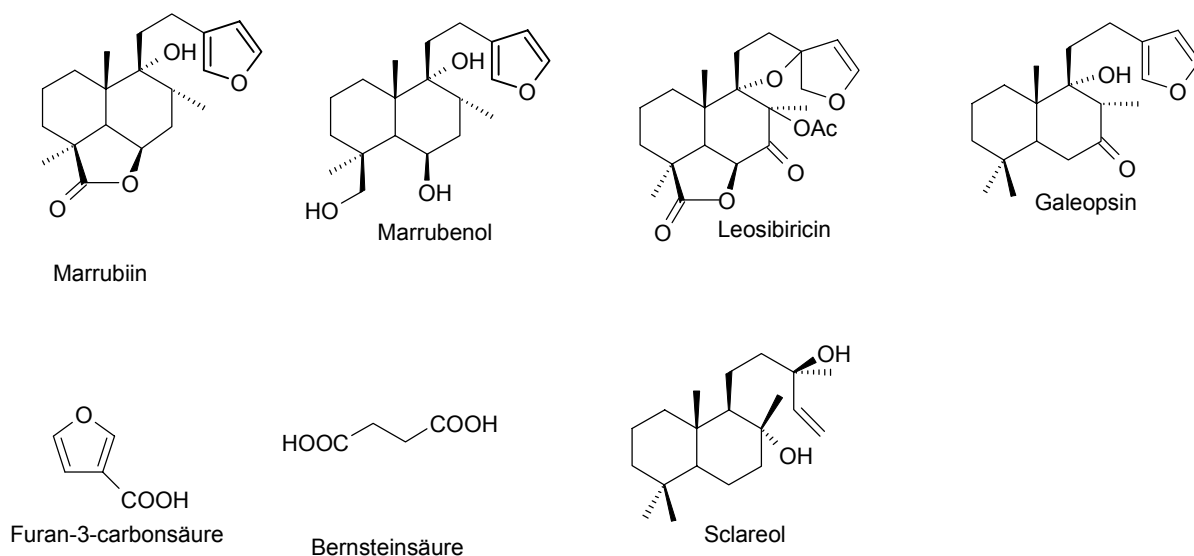


Abb. 3.30 Kompetitorsubstanzen zur Charakterisierung der Antikörper gegen Marrubenolsuccinat.

Mit den Antikörpern der Zell-Linie 6A1 konnte Marrubiin als Kompetitor in einer Konzentration von 0,75 nmol /100 µl nachgewiesen werden. Die Grafik 3.31 zeigt die Abnahme der gebildeten Farbstoffmenge im Vergleich zur Inkubation ohne Kompetitor. Konkurrenz zeigten auch Marrubenol und das Furanolabdanditerpen Galeopsin, nicht aber das Labdanditerpen Sclareol und auch nicht Leosibiricin, ein Labdanditerpen mit Präfuranstruktur. Ascorbinsäure als Antioxidans hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Peroxidasereaktion.

Konkurrenz wurde auch mit Furan-3-carbonsäure beobachtet. Besonders letztere Konkurrenz zeigt, dass Antikörper der Zell-Linie 6A1 allgemein gegen 3-substituierte Furanstrukturen gerichtet sind (s. Abb. 3.31 und 3.32).

Die Zell-Linien 1C1C11, 5F2, 9C1C8 und 6C5 wurden ebenfalls mit Hilfe des kompetitiven ELISA charakterisiert. Die Antikörper der Zell-Linie 1C1C11 scheinen ein Epitop zu erkennen, das dem der Linie 6A1 ähnelt. Auch hier wurde eine schwache Konkurrenz mit Marrubenol und Furan-3-carbonsäure nachgewiesen. Die Antikörper der Zell-Linie 5F2 zeigten nur Konkurrenz mit Marrubenolsuccinat und mit Bernsteinsäure. Die Antikörper dieser Zell-Linie sind gegen den Succinat-„Spacer“ gerichtet. Vor der Immunisierung und im Organismus der Maus fand wahrscheinlich eine Hydrolyse des Konjugates statt, die zu unsubstituiertem Succinat am Proteinkonjugat führte.

9C1C8 und 6C5 sind Zell-Linien, deren Antikörper auch eine Bindung an Sclareol, ein Labdanditerpen ohne Furansubstituenten, zeigten. Eine Konkurrenz mit Furan-3-carbonsäure wurde bei beiden Zell-Linien nicht beobachtet. 6C5 zeigte zusätzlich eine Konkurrenz mit Galeopsin. Die einzelnen Zell-Linien und die Daten der Konkurrenzen sind in Abb. 3.33 zusammengefasst.

Für die weitere Charakterisierung sind zunächst neue Konkurrentensubstanzen notwendig, um die Antikörper und das Ziel, gegen das sie gerichtet sind, genau definieren zu können. Insgesamt führten zwei Immunisierungen zu monoklonalen Antikörpern, die gegen mindestens drei verschiedenen Epitopen gerichtet sind. Zwei sind auf den Furanring gerichtet, eine bindet an den verwendeten Succinat-Spacer und zwei sind auf das Labdangrundgerüst zurückzuführen.

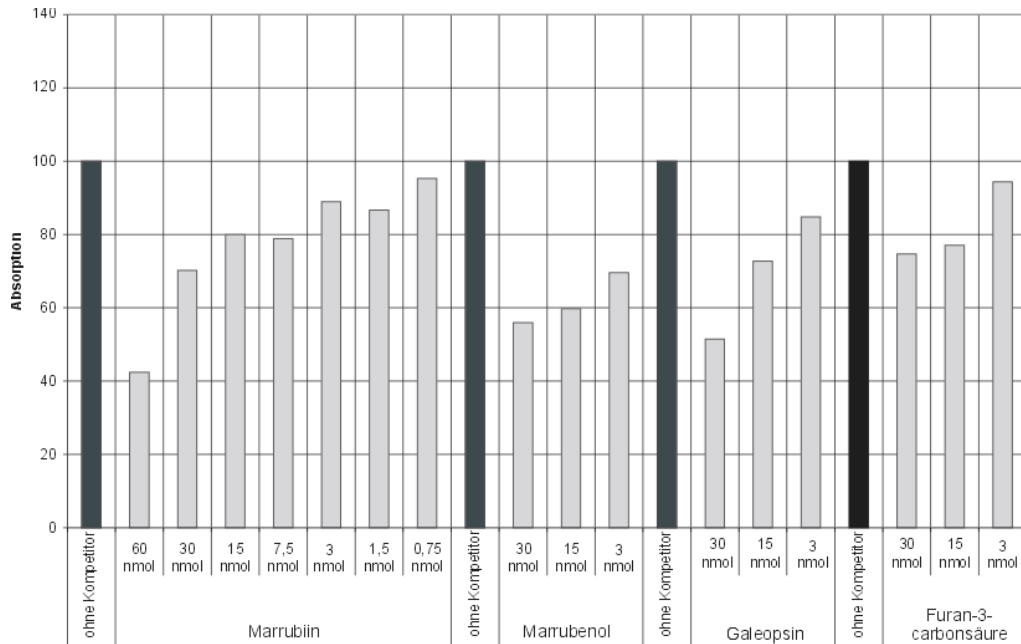


Abb. 3.31 **Kompetition verschiedener Substanzen mit Antikörpern der Zell-Linie 6A1** Antikörper der Zell-Linie 6A1 wurden mit verschiedenen Konzentrationen einer Kompetitor-Lösung in PBS inkubiert, bevor das Gemisch in die ELISA-Vertiefungen übertragen wurde. Kompetition wurde durch Abnahme der Farbstoffbildung bei zunehmender Kompetitorkonzentration nachgewiesen.

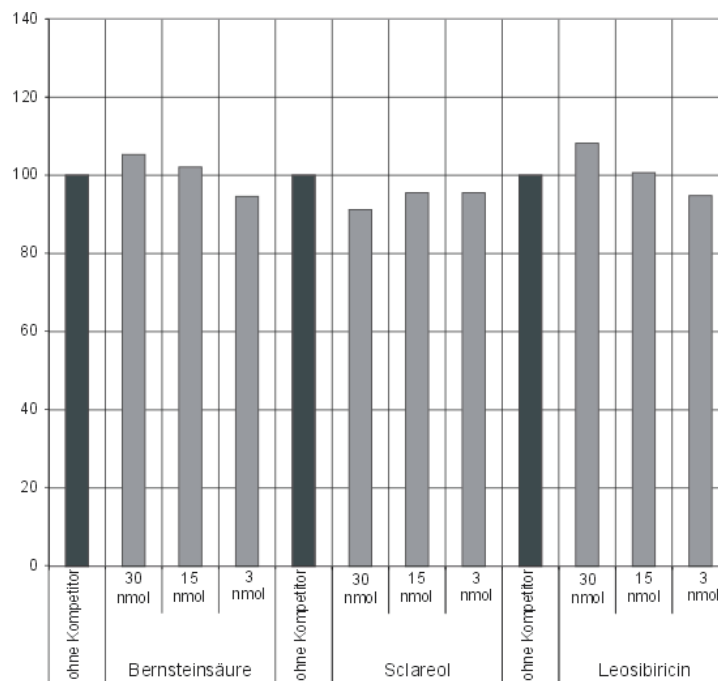


Abb. 3.32 **Kompetition verschiedener Substanzen mit Antikörpern der Zell-Linie 6A1 fehlt** Antikörper der Zell-Linie 6A1 wurden mit verschiedenen Konzentrationen einer Kompetitor-Lösung in PBS inkubiert, bevor das Gemisch in die Mikrotiterplatten-Vertiefungen übertragen wurde. Im Gegensatz zu den Kompetitoren der Abb. 3.5.3.2. fehlt die Abnahme der Farbstoffentwicklung.

Zell-Linie	Kompetition							
		(+)	+			-	(+)	
1C1C11		(+)	+			-	(+)	
5F2	-	+	-	+	-	-	-	-
6A1	+	+	+	-	+	-	+	-
6C5	+	+	+	-	+	+	-	
9C1C8	+	+	+	-		(+)	-	

Chemical structures shown below the table, with arrows indicating their corresponding competition results:

- Marrubiin
- Marrubenosuccinat
- Marrubenol
- Bernsteinsäure
- Galeopsin
- Sclareol
- Furan-3-carbonsäure
- Leosibiricin

Tab. 3.33 Zusammenfassung der Ergebnisse der Wettbewerbs-Assays. Die verschiedenen Zell-Linien wurden mit steigenden Mengen (3 bis 30 nmol) der verschiedenen Wettbewerbern inkubiert. „+“ symbolisiert eine Wettbewerbs, „(+“ eine schwache bzw. unsichere Wettbewerbs und „-“ fehlende Wettbewerbs. Leere Felder bedeuten noch nicht durchgeführte Wettbewerbsversuche.

3.1.6.3 Anwendungsmöglichkeiten

Die monoklonalen Antikörper sollen unter anderem für Reihenuntersuchungen von Pflanzen und deren Zubereitungen auf das Vorkommen von Furanolabdanditerpenen eingesetzt werden. Die Antikörper wurden daher in einem kompetitiven ELISA mit wässrigen Tee-Extrakten (Dekokten) verschiedener Furanolabdanditerpenhaltiger Arzneipflanzen inkubiert. Wenn die Antikörper auch die Furanolabdanditerpene innerhalb der Matrix eines Pflanzenextraktes binden, kann das System auf vielfältige Weise in der Naturstoffanalyse eingesetzt werden. Für eine derartige Untersuchung eignen sich besonders die mAk der Zell-Linie 6A1, da das Epitop, an das die Antikörper binden, genau bekannt ist. Die mAK fokussieren 3-substituierte Furanringe.

Wässrige Extrakte von *Marrubium vulgare*, *Leonurus cardiaca* und *Galeopsis segetum* zeigten jeweils Konkurrenz in diesem System (s. Abb. 3.34), *Melissa officinalis* dagegen nicht. Die Versuche zeigen, dass der Nachweis von Furanolabdanditerpenen mit Hilfe der monoklonalen Antikörper der Zell-Linie 6A1 auch in komplexen Vielstoffgemischen möglich ist. Furanolabdanditerpene in Arzneipflanzen wurden bereits von Knöss (1996) mit Hilfe eines photometrischen Tests nachgewiesen. Es wurden dabei deutliche Unterschiede in der Menge an Furanolabdanditerpenen in Mustern der verschiedenen Arzneipflanzen gefunden. Solche Differenzen konnten im kompetitiven ELISA nicht beobachtet werden. Eine Quantifizierung der FLD scheint daher mit Hilfe der Antikörper der Zell-Linie 6A1 nicht möglich, wohl jedoch eine qualitative Einschätzung.

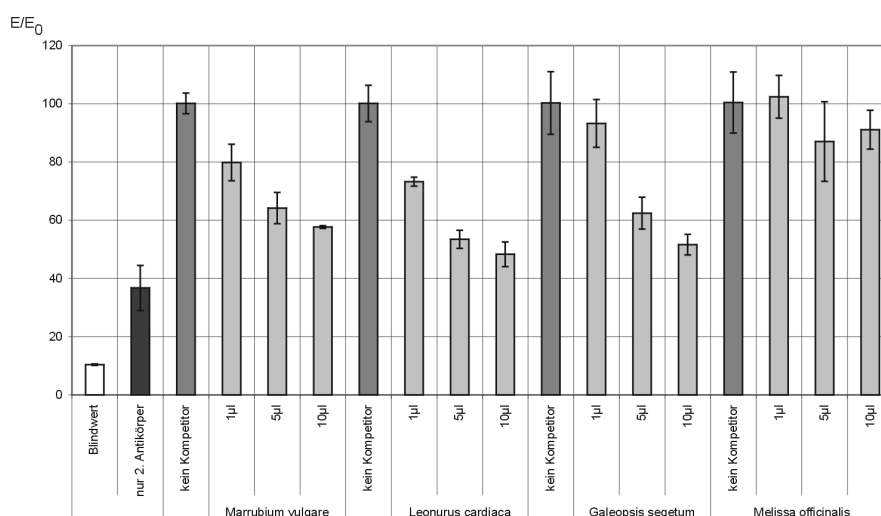


Abb. 3.34 Konkurrenz verschiedener Tee-Extrakte mit Antikörpern der Zell-Linie 6A1. Analog den in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Konditionen wurden Dekokte verschiedener Arzneipflanzen mit je 5µl Zellkultur-Überstand der Linie 6A1 inkubiert.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projektes wurden monoklonale Antikörper gegen drei verschiedene Epitope des Hapten Marrubenolsuccinat etabliert und charakterisiert. Die Antikörper der Zell-Linie 5F2 fokussieren den Succinat-Spacer. Die mAk aus 6A1 binden an 3-substituierte Furanringe, die mAk aus 1C1C11 wahrscheinlich an ein ähnliches Epitop. Besonders für die weitere Charakterisierung der Antikörper der Zell-Linien 6C5 und 1C1C11 fehlen Kompetitoren, die als Labdanditerpene Kreuzreaktionen mit dem unterschiedlich substituierten Labdan-Bicyclus erkennbar machen.

3.2 Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen pentazyklische Triterpene

3.2.1 Strategie

Die Erkenntnisse, die im Rahmen der Versuche mit Furanolabdanditerpenen gewonnen worden waren, sollten nun an einer zweiten Zielstruktur erweitert werden. Hierfür wurde das pentazyklische Triterpen Oleanolsäure ausgewählt. Oleanolsäure ist genuin in verschiedenen Pflanzen vorhanden (Liu, 1995), sie bildet auch die Basis vieler ähnlich gestalteter Sapogenine der Triterpensaponine (Mahato et al., 1988; Price et al., 1987). Oleanolsäure ist kommerziell erhältlich (Sigma), so dass für dieses System die aufwändige Extraktion und Reinigung dieses Ausgangsstoffes entfiel.

Aufgrund der Schwierigkeiten, die die Verwendung eines Bersteinsäure-Spacers bei der Synthese des Proteinkonjugates mit Marrubenolsuccinat bereitet hatte, wurden für Oleanolsäure zwei verschiedene Proteinkonjugate synthetisiert. Das erste wurde mit Oleanylsuccinat, also unter Verwendung eines Spacers und unter Bindung an den Ring A, hergestellt. In einem zweiten Konjugat wurde Oleanolsäure ohne weitere Veränderungen eingesetzt, die Bindung also über die Carboxylfunktion zwischen den Ringen D und E geknüpft (s. Abb.3.35). Dadurch konnte zum einen untersucht werden, ob die Verwendung eines solchen „Spacers“ wirklich notwendig ist. Zum anderen bieten die beiden verschiedenen Anknüpfungspunkte ggf. die Möglichkeit, zwei verschiedene Antikörper zu erzeugen, deren Epitope sich nicht überlappen. Zwei derartige Antikörper erlauben, z.B. in einem Sandwich-ELISA (Crowther, 1995) eine noch spezifischere Erfassung eines definierten Zielmoleküls.

Die Generierung und Charakterisierung der Antikörper wurde analog der für die Furanolabdanditerpene beschriebenen Schritte durchgeführt.

3.2.2 Synthese geeigneter Zielstrukturen für die Immunisierung und Antikörper-Charakterisierung

Oleanolsäure wurde entsprechend den Reaktionen für Furanolabdanditerpene mit LiAlH_4 mit einer Ausbeute von über 90% zum Oleanylalkohol reduziert. Die Veresterungen mit Essigsäureanhydrid bzw. Bernsteinsäureanhydrid verliefen ebenfalls mit hohen Ausbeuten von über 80%. Die Derivatisierungsreaktionen sind in Abbildung 3.35 zusammengefasst. Die Untersuchung der Produkte mittels DC führte zu den folgenden R_f -Werten: Unter Verwendung von Kieselgel 60 F_{254} -Platten und dem Fließmittel Chloroform/Methanol (95:5) ergab sich für Oleanolsäure $R_f = 0,59$, Oleanylalkohol $R_f = 0,71$, Oleanylacetat $R_f = 0,39$ und Oleanylsuccinat $R_f = 0,92$ (s. Abb. 3.36). Zum Nachweis der Identität der Produkte wurden $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und DEPT 135-Experimente herangezogen. Die gefundenen Daten entsprechen den Angaben in der Literatur. Die Spektren sowie eine Zusammenfassung sind im Spektrenanhang dargestellt (s. Abschnitt 8).

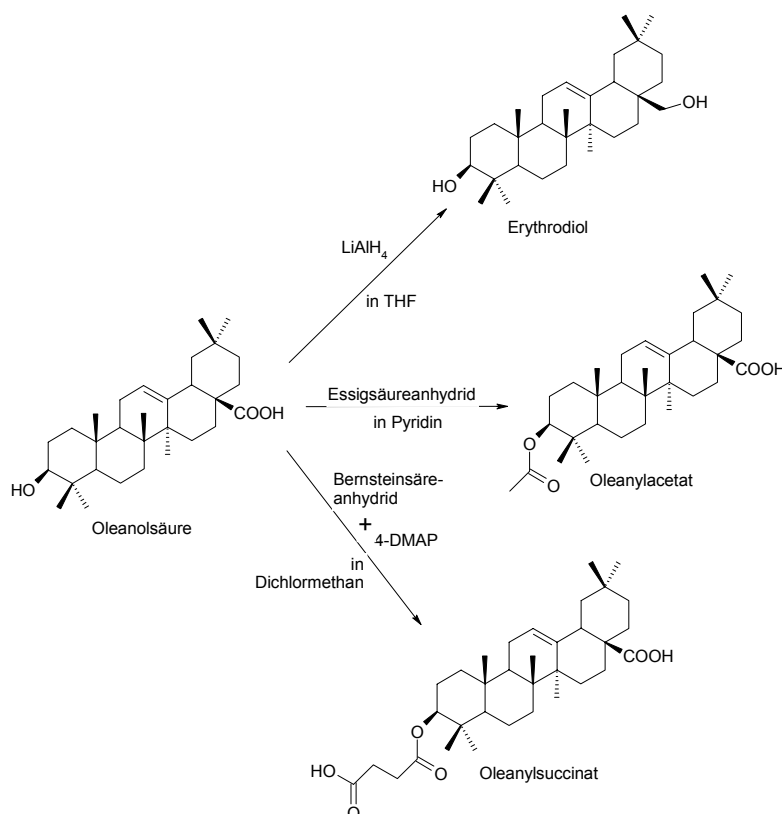


Abb. 3.35 Derivatisierungsreaktionen von Oleanolsäure (3β -Hydroxy-olean-12-en-28-olsäure). Die Produkte Oleanylsuccinat (Bernsteinsäure-mono-(Olean-28-carboxyl-12-en- 3β -yl)-ester), Oleanylacetat (3β -Acetoxy-olean-12-en-28-olsäure) und Erythrodiol (Olean-12-en- $3\beta,28$ -diol) wurden mittels DC, NMR und MS identifiziert.

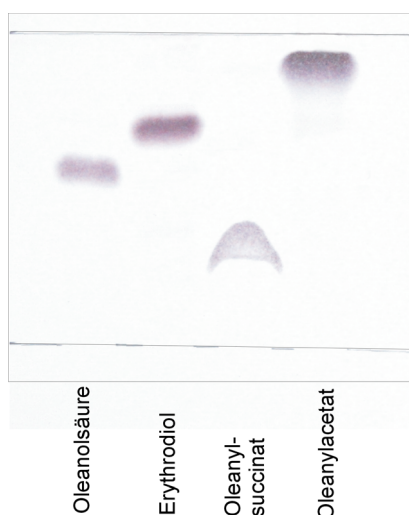


Abb. 3.36 DC der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Derivate der Oleanolsäure. Die Substanzen wurden auf einer DC-Fertigplatte Kieselgel 60 F₂₅₄ mit dem Fließmittel Chloroform:Methanol (95 : 5), Laufhöhe 6 cm getrennt und mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-reagenz detektiert.

Die Identität der Oleanolsäurederivate wurde weiterhin durch MS-Experimente belegt. Alle gefundenen Massen stimmten mit den für die jeweiligen Produkte in der Literatur angegebenen Werten überein (s. Tab. 3.5). Die jeweiligen Spektren befinden sich ebenfalls im Anhang.

Substanz	Gefundene Masse	Masse lt. Literatur	Quelle
Oleanolsäure	456,4	456	Ulubelen et al., 1999
Erythrodiol	442,4	442	Lee et al., 2000
Oleanylacetat	498,3	498	Kim et al., 1999
Oleanylsuccinat	556,3	556,77	Yang et al, 1997

Tab. 3.5 MS-Untersuchung der Derivate der Oleanolsäure. Alle Produkte wurden mit Hilfe des EI-Verfahrens untersucht und die gefundenen Massen mit den Literaturwerten verglichen.

Um monoklonale Antikörper generieren zu können, mussten zunächst die Proteinkonjugate der Zielstrukturen hergestellt werden. Hierfür wurden sowohl Oleanylsuccinat als auch Oleanolsäure nach der „Methode des gemischten Anhydrids“ an bovines Serumalbumin (BSA) bzw. Thyroglobulin (THY) gekoppelt.

Oleanolsäure ist nicht wasserlöslich und wurde dementsprechend bei der Reinigung des Produktes mit Hilfe der Dialyse nicht entfernt. Nach der Lyophilisation der entsprechenden Lösungen wurde der Rückstand in PBS-Puffer aufgenommen und nicht gelöste Oleanolsäure abzentrifugiert. Problematisch war dabei jedoch die teilweise schlechte Löslichkeit der Proteinkonjugate.

Alternativ wurden die Proteinkonjugate mit Hilfe der Größenaustauschchromatographie an einer Sephadex A25-Säule gereinigt. Die Konjugate wurden vollständig von nicht konjugiertem Triterpen und den anderen Begleitsubstanzen getrennt (s. Abb. 3.37)

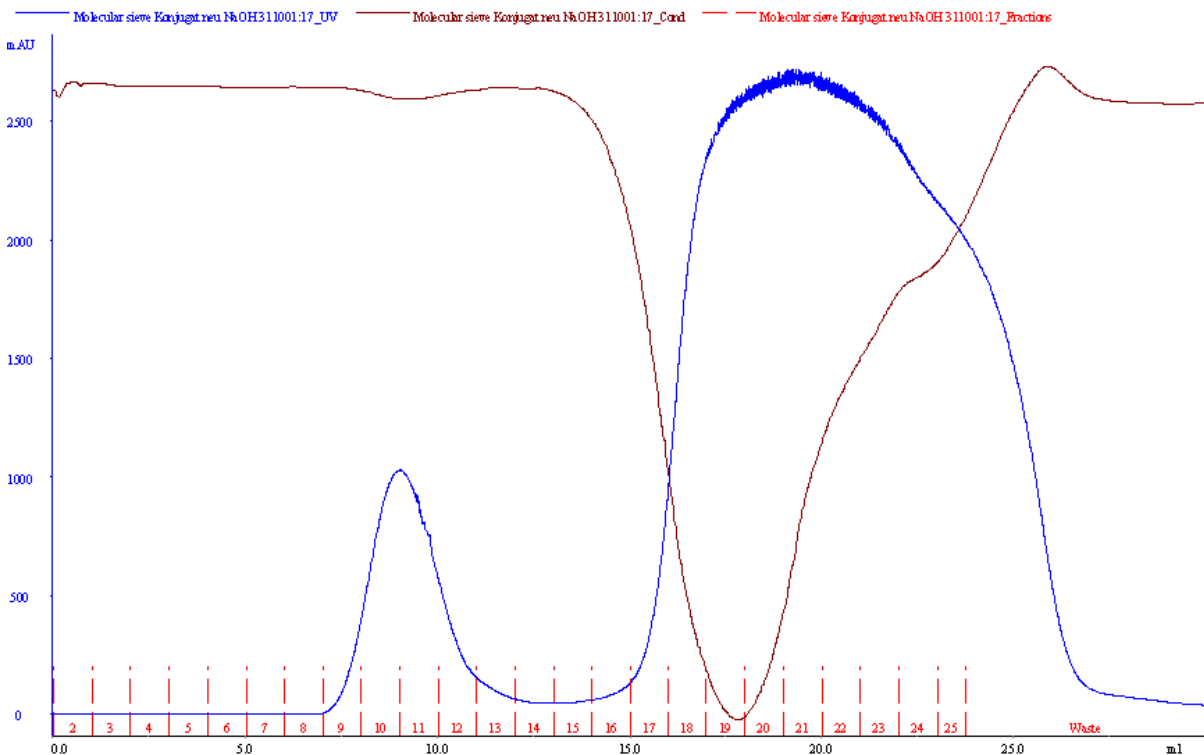


Abb. 3.37 Reinigung von 3 mg Oleanolsäure-BSA-Konjugat mit Hilfe einer Sephadex A-25-Säule. Es wurden Fraktionen zu je 1ml gesammelt. Die blaue Kurve zeigt die UV-Absorption bei 215 nm innerhalb der Durchflusszelle. Die laufenden Nummern (rot) bezeichnen die einzelnen Fraktionen. Bei Fraktion 9-12 eluiert das Proteinkonjugat von der Säule, ab Fraktion 17 die Begleitsubstanzen der Reaktion, wie auch die braune Kurve (Leitfähigkeit) zeigt.

Wie bereits oben beschrieben, waren die Konjugate von Oleanolsäure nur begrenzt in Wasser bzw. PBS löslich, die Konjugate mit Oleanylsuccinat kaum. Eine Immunisierung ist mit unlöslichen Proteinkonjugaten durchaus möglich (Erlanger, 1980). Zumindest für die Untersuchungen im ELISA muss jedoch ein lösliches Konjugat zur Verfügung stehen, das adsorptiv an die Polystyren-Wände der Mikrotiterplatte gebunden werden kann. Nach verschiedenen Löslichkeitsversuchen konnte ein Teil der in PBS unlöslichen Reste in 50% Isopropanol in Lösung gebracht werden. (s. Abb. 3.38). Die Ausbeute betrug für das Oleanolsäure-BSA-Konjugat 77%, für das entsprechende THY-Konjugat 36%, für das Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat 10% und für das Oleanylsuccinat-THY-Konjugat 32%.

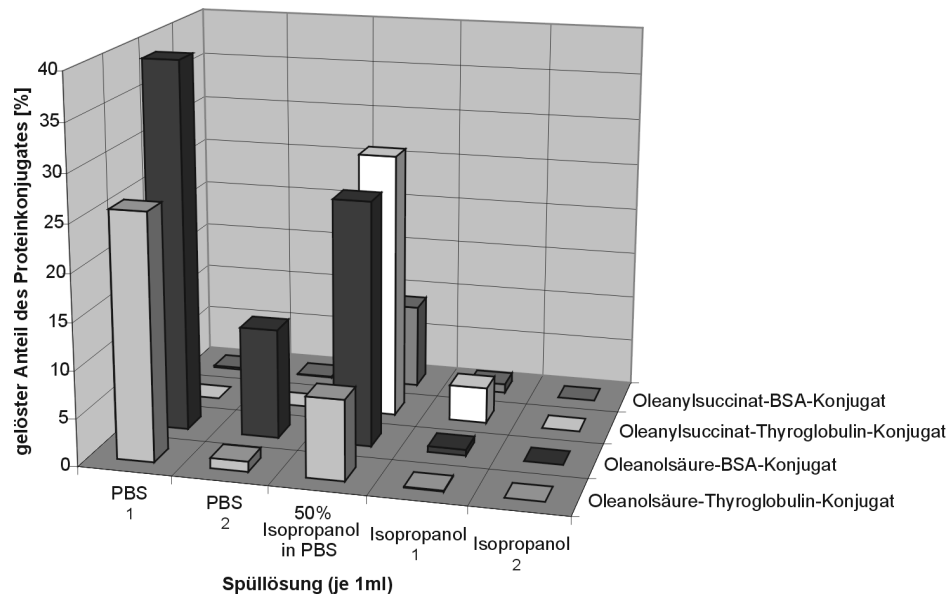


Abb. 3.38 Löslichkeit der Proteinkonjugate mit Oleanolsäure bzw. Oleanylsuccinat in Wasser und Isopropanol. Je 5 mg des entsprechenden Konjugates wurden in der entsprechenden Spüllösung suspendiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde die überstehende klare Lösung abgenommen und der Proteingehalt mit Hilfe des Bradford-Testes bestimmt. Das Pellet wurde in der nachfolgenden Spüllösung resuspendiert.

Die Belegungsrate der Proteinkonjugate konnte bisher nur für die entsprechenden BSA-Konjugate bestimmt werden. Die Belegung der Thyroglobulin-Konjugate konnte nur qualitativ nachgewiesen werden. Im DC wurden die Konjugate mit Anisaldehyd-Schwefelsäurereagenz angefärbt, die reinen Proteine dagegen nicht.

Die Größenzunahme der BSA-Konjugate mit Oleanolsäure (Ol) und Oleanylsuccinat (Olsuc) war schon im SDS-PAGE deutlich zu erkennen. Die Bindung über die primäre Carboxylfunktion des Oleanylsuccinats führte dabei zu höheren Bindungsraten als die des tertiären Carboxyls der Oleanolsäure. In beiden Fällen zeigte das Produkt eine Molekülgröße um oder über 70.000 Da (s. Abbildung 3.11).

Die apparative Ausstattung des MALDI-TOF reichte noch nicht aus, die Molekülgröße der Thyroglobulin-Konjugate zu bestimmen. Für das Oleanolsäure-Konjugat wurde eine mittlere Masse von 67.271 Da (zweites Maximum bei 67.799 Da) ermittelt (s. Abb. 3.39). Bei einem Molekulargewicht von $MW_{\text{Oleanolsäure}} = 456 \text{ g/mol}$ entspricht das einer durchschnittlichen Menge von 2,3 (3,5) Molekülen Oleanolsäure. Reines BSA zeigte erwartungsgemäß eine Masse von 66.222 Da (s. Abb. 3.12). Für das Konjugat mit Oleanylsuccinat wurde eine mittlere Masse von 70.429 Da ermittelt (s. Abb. 3.40). Bei einem Molekulargewicht von $MW_{\text{Oleanylsuccinat}} = 556 \text{ g/mol}$ entspricht die Massendifferenz von 4207 Da einer durchschnittlichen Menge von 7,6 Molekülen Oleanylsuccinat.

3. Ergebnisse

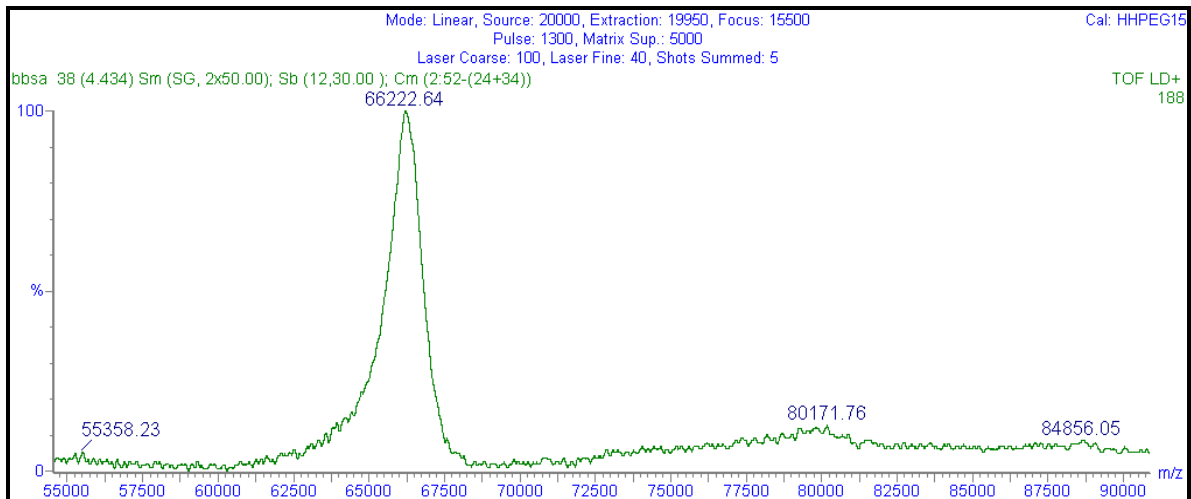


Abb. 3.11 MALDI-TOF-Experiment zur Bestimmung der Masse des zur Konjugation eingesetzten BSA. Die durchschnittliche Masse entspricht dem erwarteten Wert von 66.222 Da.

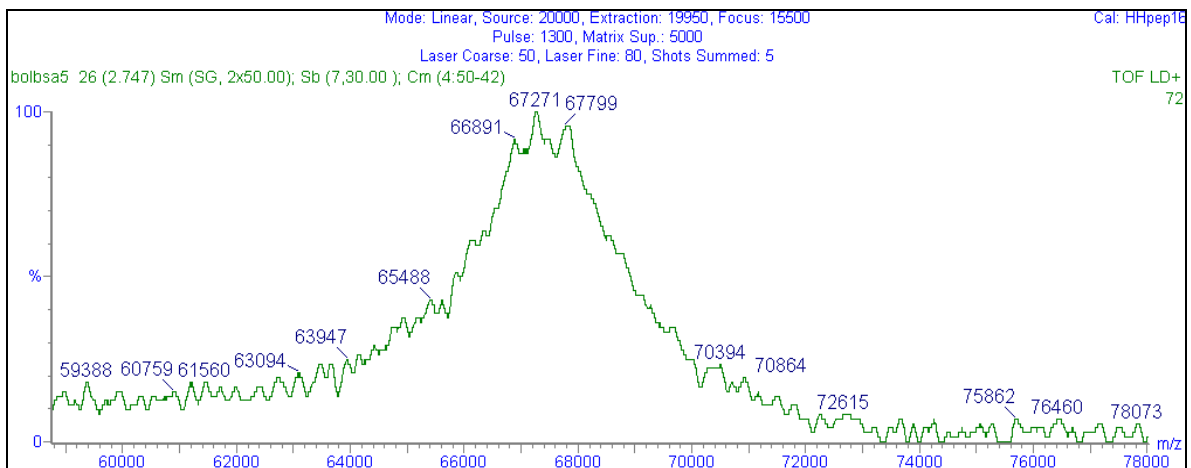


Abb. 3.39 MALDI-TOF-Experiment zur Bestimmung der Masse des Proteinkonjugates von Oleanolsäure mit BSA. Die durchschnittliche Masse des Konjugates beträgt 67.271 Da, weitere Maxima liegen bei 66.891Da und 67.799 Da.

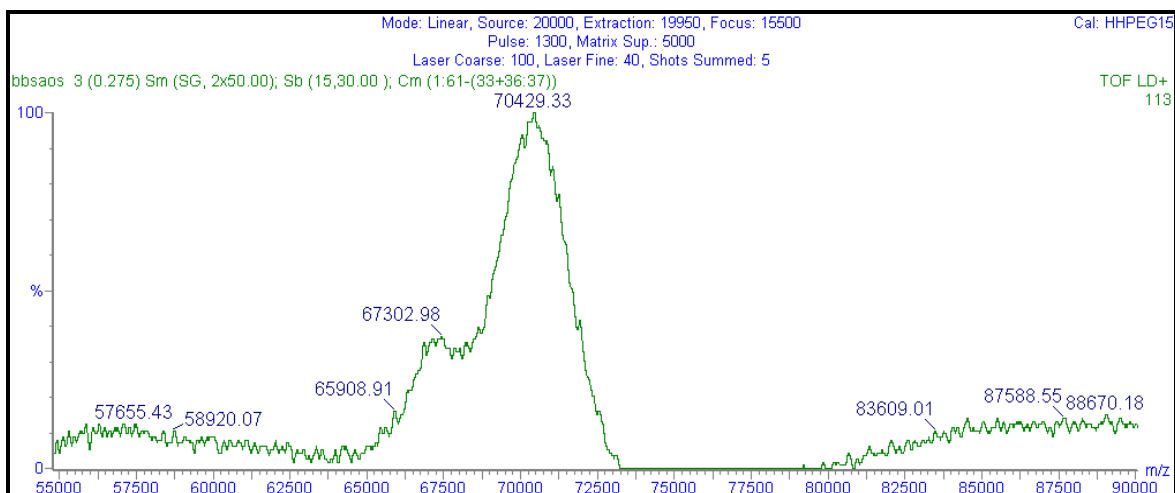


Abb. 3.40 MALDI-TOF-Experiment zur Bestimmung der Masse des Proteinkonjugates von Oleanylsuccinat mit BSA. Die durchschnittliche Masse des Konjugates beträgt 70.429 Da.

3.2.3 Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Oleanolsäure

Für die Immunisierung standen je ein Konjugat mit Oleanolsäure und Oleanylsuccinat zur Verfügung. Da die genaue Belegungsrate nur für die Konjugate mit BSA als Trägerprotein bekannt waren und die Belegung des Thyroglobulin-Proteinkonjugates bei den Marrubenolsuccinat-Konjugaten höher war, wurden die THY-Konjugate für die Immunisierung eingesetzt. Zusätzlich war die Ausbeute an löslichem Konjugat höher. Die BSA-Konjugate standen somit zur Charakterisierung zur Verfügung.

Um den Unterschied zwischen der Immunisierung mit einem löslichen und einem unlöslichen Konjugat untersuchen zu können, wurde von dem Konjugat mit Oleanolsäure und dem mit Oleanylsuccinat als Zielmolekül je eine unlösliche und eine lösliche Fraktion eingesetzt. Die vier unterschiedlichen Konjugate für die Immunisierung sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Name	Zielmolekül	Trägerprotein	Fraktion
OL A	Oleanolsäure	Thyroglobulin	gelöst in PBS
OL B	Oleanolsäure	Thyroglobulin	unlöslich, suspendiert in PBS
OLSUC A	Oleanylsuccinat	Thyroglobulin	gelöst in 50% Isopropanol
OLSUC B	Oleanylsuccinat	Thyroglobulin	unlöslich, suspendiert in PBS

Tab. 3.6 Konjugate für die Generierung monoklonaler Antikörper gegen Oleanolsäure.

Die Immunisierung wurde analog der Vorgehensweise bei den Furanolabdanditerpenen durchgeführt (s. 3.1.4). Die Mäuse, die mit OL-Konjugaten immunisiert wurden, erreichten einen stabilen Antikörpertiter nach 4 Monaten, bei den OLSUC-Konjugaten dauerte die Immunisierung einen Monat länger. Danach zeigten die Seren der immunisierten Mäuse einen hohen Antikörper-Titer. Die Seren wurden in einem indirekten ELISA auf eine Bindung an das Oleanolsäure- bzw. Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat untersucht. Bereits in 10.000facher Verdünnung zeigten alle vier Seren eine starke Bindung an das immobilisierte Proteinkonjugat (s. Abb. 3.41).

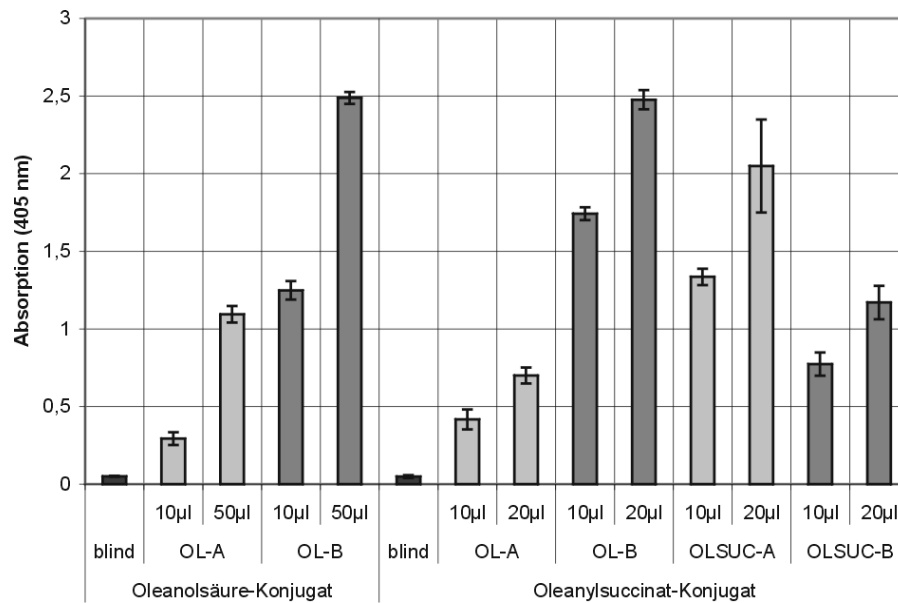


Abb. 3.41 Indirekter ELISA des gewonnenen polyklonalen Serums. Je 10 µl bzw. 20 µl einer 1:10.000 Verdünnung des aus der Maus gewonnenen Serums der vier verschiedenen Immunisierungen wurden entsprechend Abschnitt 2.6.4 im ELISA gegen 0,8 µg des angegebenen Proteinkonjugates eingesetzt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Einzelmessungen.

Die immunkompetenten B-Lymphozyten wurden nach der gleichen Methode gewonnen und mit Myelomzellen fusioniert. Bislang wurden nur die Milzzellen der Immunisierungen OL A, OL B und OLSUC B aufgearbeitet. In allen drei Fällen wurden jeweils mehr als 1000 Klone etabliert und auf eine Bindung an das Oleanolsäure- bzw. Oleanylsuccinat-Konjugat untersucht.

3.2.3.1 Immunisierung mit Oleanolsäure-Konjugaten

Ausgehend von der Immunisierung mit unlöslichem Oleanolsäure-THY-Konjugat (OL B) konnten acht verschiedene Zell-Linien etabliert werden, deren Antikörper eine Affinität zum Oleanolsäureteil des Konjugates zeigten. In allen Fällen war die Reaktion sehr schwach (s. Abb. 3.42). Mit Hilfe des löslichen Oleanolsäure-Konjugats (OL A) wurden 27 verschiedene Zell-Linien generiert (s. Abb. 3.43). Unter diesen zeigte nur 10F10 eine besonders hohe Bindung an den Oleanolsäureteil des Konjugates, wie sie für eine hohe Antikörpermenge bzw. eine spezifische Bindung typisch ist.

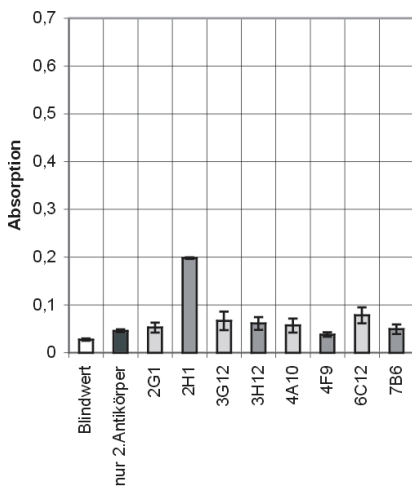


Abb. 3.42 Zell-Linien der Immunisierung OL B
Je 10 µl des Kulturüberstandes der einzelnen Zell-Linien wurde entsprechend 2.6.4 im ELISA gegen 0,8 µg Oleanolsäure-BSA-Konjugat eingesetzt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Einzelmessungen.

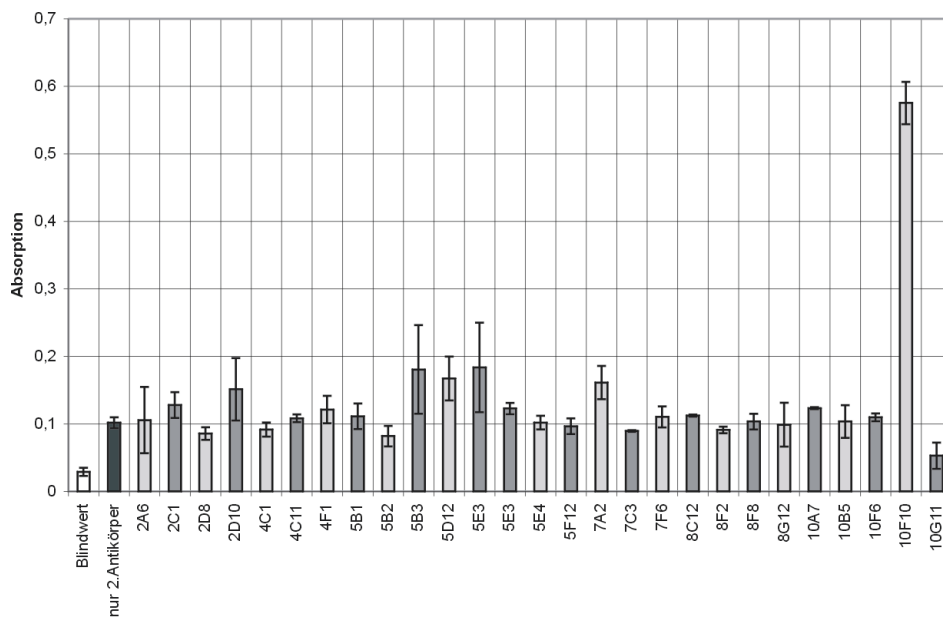


Abb. 3.43 Zell-Linien der Immunisierung OL A. Je 10 µl des Kulturüberstandes der einzelnen Zell-Linien wurde entsprechend 2.6.4 im ELISA gegen 0,8 µg Oleanolsäure-BSA-Konjugat eingesetzt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Einzelmessungen.

3.2.3.2 Immunisierung mit Oleanylsuccinat-Konjugaten

Oleanolsäure wurde zur Konjugation zum einen direkt, zum anderen aber auch unter Verwendung von Succinat als „Spacer“ eingesetzt. Zwei Mäuse wurden mit einem löslichen (OLSUC A) und einem unlöslichen Proteinkonjugat (OLSUC B) immunisiert. Bislang wurde nur die Milz der mit dem unlöslichen Konjugat immunisierten Maus (OLSUC B) aufgearbeitet und die Lymphozyten mit Myelom-Zellen fusioniert. Die immunkompetenten Lymphozyten der Maus, die mit dem löslichen Anteil des Proteinkonjugates behandelt wurden (OLSUC A), werden unter Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Aus dem Ansatz OLSUC B stammen sieben verschiedene Zell-Linien, die eine Affinität zu einem Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat zeigten (s. Abb. 3.44). Die fünf Linien 3H10, 4D11, 5F9, 6C2 und 7A6 fielen im ersten ELISA durch hohe Absorption auf. Diese Linien wurden zur weiteren Charakterisierung ausgewählt.

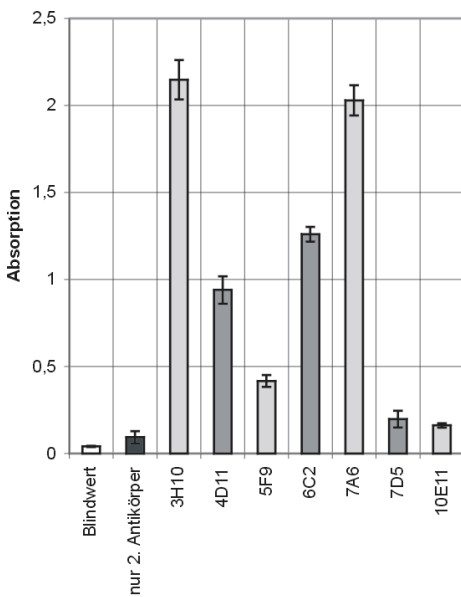


Abb. 3.44 Zell-Linien der Immunisierung OLSUC B. Je 10 µl des Kulturüberstandes der einzelnen Zell-Linien wurde entsprechend 2.6.4 im ELISA gegen 0,8 µg Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat eingesetzt. Die unterschiedlichen Schattierungen grenzen einzelne Zell-Linien ab. Die dargestellten Absorptionen sind Mittelwerte aus drei Einzelmessungen.

3.2.4 Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen Triterpene

3.2.4.1 Checkpoint-Titration

Die Zellkultur-Überstände aus sechs verschiedener Zell-Linien aus den Immunisierungen OL A (10F10) und OLSUC B (3H10, 4D11, 5F9, 6C2, 7A6) wurden in der Checkpoint-Titration auf eine Reaktion mit dem Oleanolsäure- bzw. dem Oleanylsuccinat-Konjugat untersucht. Die Antikörper der Zell-Linien 5F9 und 4D11 zeigten gegenüber beiden Konjugaten nur eine relativ schwache Reaktion. Sie wurden in die weiteren Charakterisierungsschritte nicht einbezogen.

Die vier verbleibenden Zell-Linien enthielten Antikörper, die sowohl an das Oleanolsäure- als auch an das Oleanylsuccinat-Konjugat banden. Die Checkpoint-Kurven der Zell-Linien 10F10 und 3H10 verliefen dabei bei der Inkubation mit beiden Konjugaten auf ähnliche Weise. Die Antikörper der Zell-Linien 6C2 und 7A6 banden stärker an das Oleanylsuccinat-Konjugat als an das Oleanolsäure-Konjugat (s. Abb. 3.45 und 3.46). Eine Begründung für die höheren Werte könnte die höhere Belegungsrate des Oleanylsuccinats mit Triterpen-Molekülen sein.

Die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper wurde für alle vier Zell-Linien auf der Basis des Oleanolsäure-Konjugats durchgeführt, da dieses Konjugat in höherer Ausbeute und besserer Löslichkeit herstellbar war. Die mit Hilfe der Checkpoint-Titration ermittelten Konzentrationsintervalle für die einzelnen Zell-Linien und die verwendete Konzentration im kompetitiven ELISA sind in der Tabelle 3.6 zusammengestellt.

Name der Zell-Linie	Immunisierung	Checkpoint-Titration	Konzentration im kompetitiven ELISA
3H10	OLSUC B	2 – 20 µl	2 µl
6C2	OLSUC B	0,2 – 2 µl	1 µl
7A6	OLSUC B	0,5 – 10 µl	1 µl
10F10	OL A	0,5 – 5 µl	5 µl

Tab. 3.6 Charakterisierte Zell-Linien aus Immunisierungen mit Oleanolsäure-Derivaten

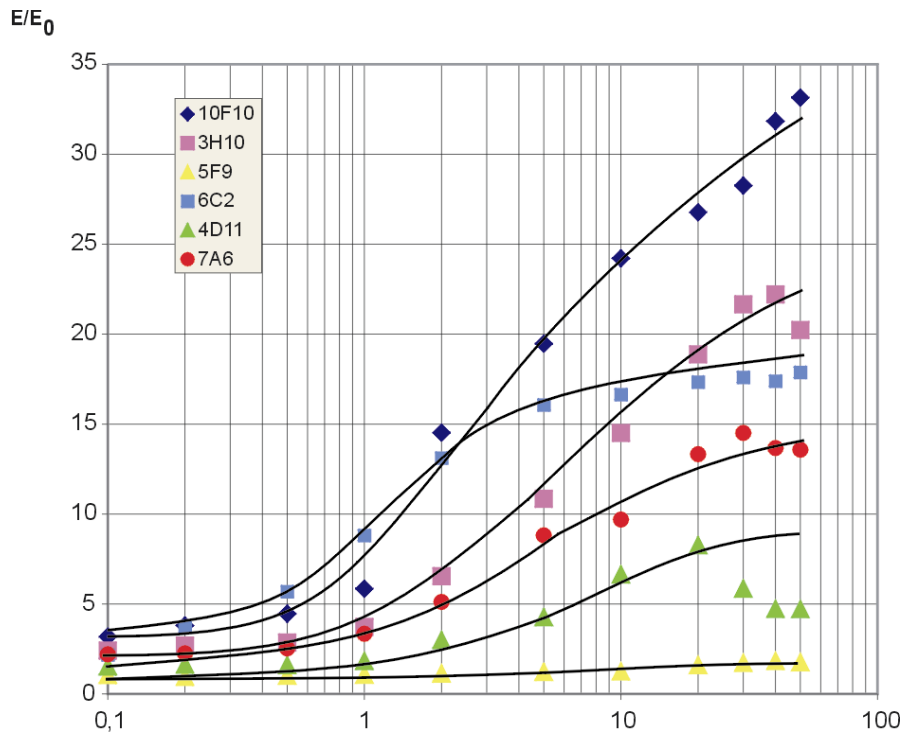


Abb. 3.45 Checkpoint-Titration. Steigende Mengen Kulturüberstand der einzelnen Zell-Linien wurde entsprechend 2.6.4 im ELISA gegen 0,8 µg Oleanolsäure-BSA-Konjugat eingesetzt.

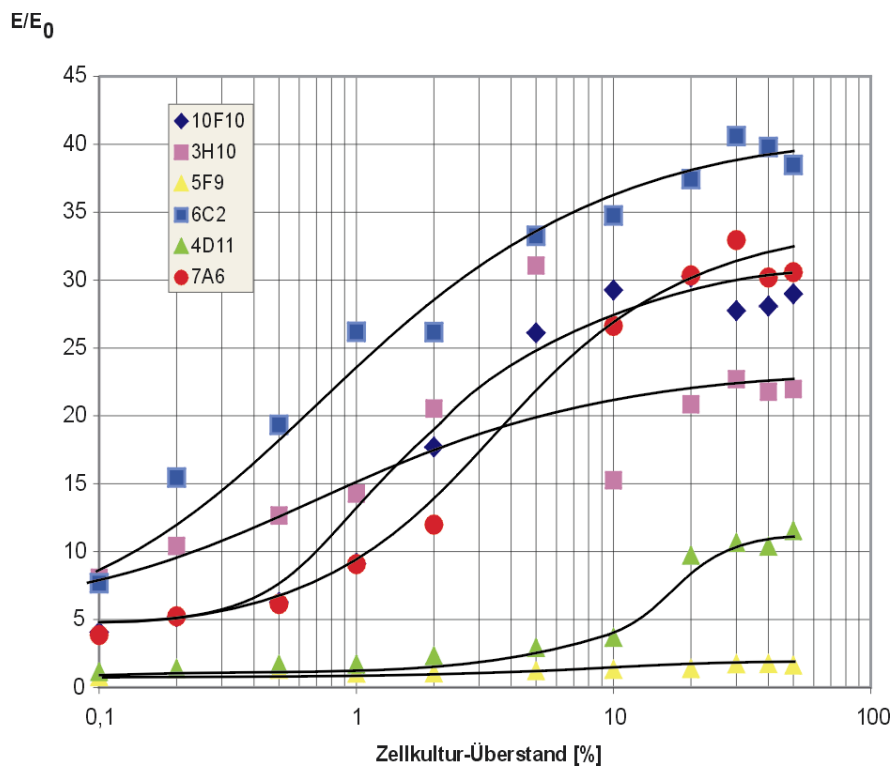


Abb. 3.46 Checkpoint-Titration. Steigende Mengen Kulturüberstand der einzelnen Zell-Linien wurde entsprechend 2.6.4 im ELISA gegen 0,8 µg Oleanylsuccinat-BSA-Konjugat eingesetzt.

3.2.4.2 Kompetitiver ELISA

In den Voruntersuchungen der Zell-Linien mit monoklonalen Antikörpern gegen Oleanolsäure und Oleanylsuccinat fielen besonders die vier Linien 10F10 (OL A), 3H10, 6C2 und 7A6 (alle OLSUC B) auf. Jede der vier Linien zeigte Aktivität im ELISA gegen das Oleanolsäure-BSA-Konjugat. Im kompetitiven ELISA (s. Abschnitt 2.6.5) mit diesem Proteinkonjugat als Basis wurden die Zell-Kulturüberstände mit steigenden Konzentrationen an Oleanolsäure inkubiert. Nur die Antikörper der Zell-Linien 6C2, 7A6 und 10F10 ließen eine konzentrationsabhängige Hemmung durch den Kompetitor Oleanolsäure erkennen. Die Antikörper der Zell-Linie 3H10 reagierten unspezifisch und die gemessenen Absorptionen unterlagen großen Schwankungen (s. Abb. 3.47). Eine weitere Bestimmung des erkannten Epitopes war bei den Antikörpern dieser Zell-Linie daher nicht möglich.

Mit Hilfe der Antikörper des Zellkultur-Überstandes der Linien 10F10 war es möglich, 100 pmol / 100 µl PBS Oleanolsäure nachzuweisen. Bei den Antikörpern der Zell-Linie 7A6 und 6C2 lag die Grenze mit 200 pmol / 100 µl PBS höher.

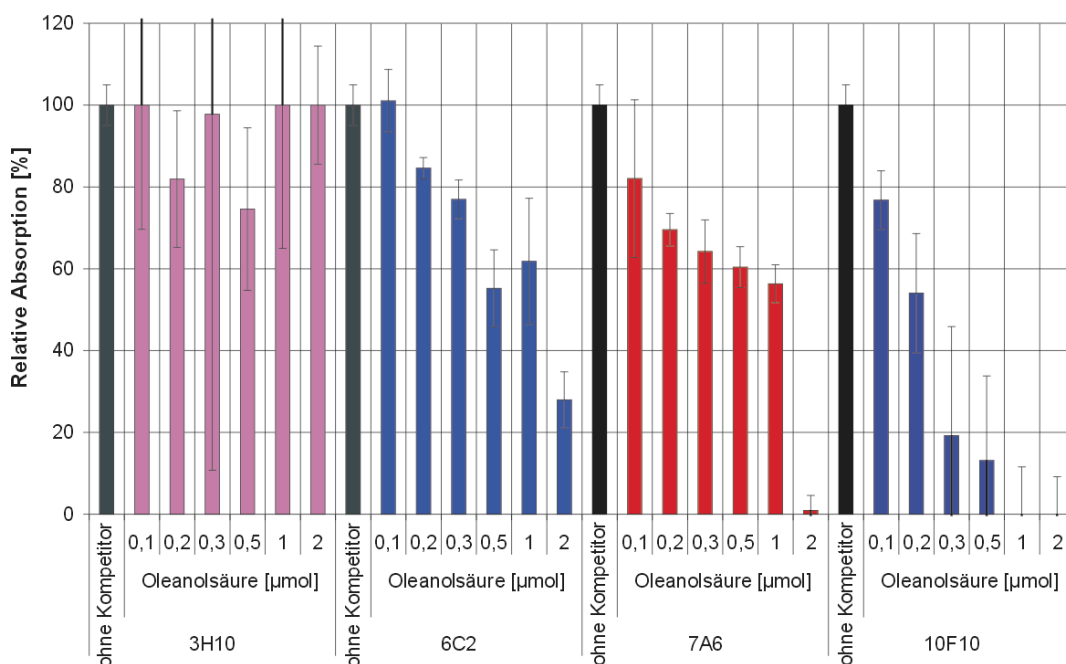


Abb. 3.47 Konkurrenz der Antikörper der Zell-Linien 10F10, 3H10, 6C2 und 7A6 mit Oleanolsäure. Der jeweilige Zellkultur-Überstand (5 µl / 100 µl bei 10F10, 2 µl / 100 µl bei 3H10, 1 µl / 100 µl bei 6C2 und 7A6) wurde mit steigenden Konzentrationen Oleanolsäure präinkubiert. Die im ELISA gemessene Absorption wurde in Relation zu derjenigen ohne Kompetitor gesetzt, jeweils vermindert um den Blindwert (jeweils Mittelwerte aus 3 Einzelmessungen).

3. Ergebnisse

Die Antikörper der Zell-Linie 10F10 wurden mit verschiedenen Kompetitoren analog dem Verfahren in Abschnitt 3.1.6.2 auf eine Kreuzreaktion untersucht. Durch Variation in verschiedenen Molekülbereichen der Oleanolsäure wurde eine Charakterisierung des erkannten Epitops möglich. Als Kompetitoren wurden insgesamt 22 verschiedene Triterpene eingesetzt, die zum überwiegenden Teil von Prof. Wollenweber, Darmstadt (Institut für Botanik) und Prof. Hamburger, Jena (Institut für Pharm. Biologie) zur Verfügung gestellt wurden. Die Ergebnisse des ELISA sind in Abb. 3.48 zusammengestellt, die dazu gehörenden Strukturen in Abb. 3.49.

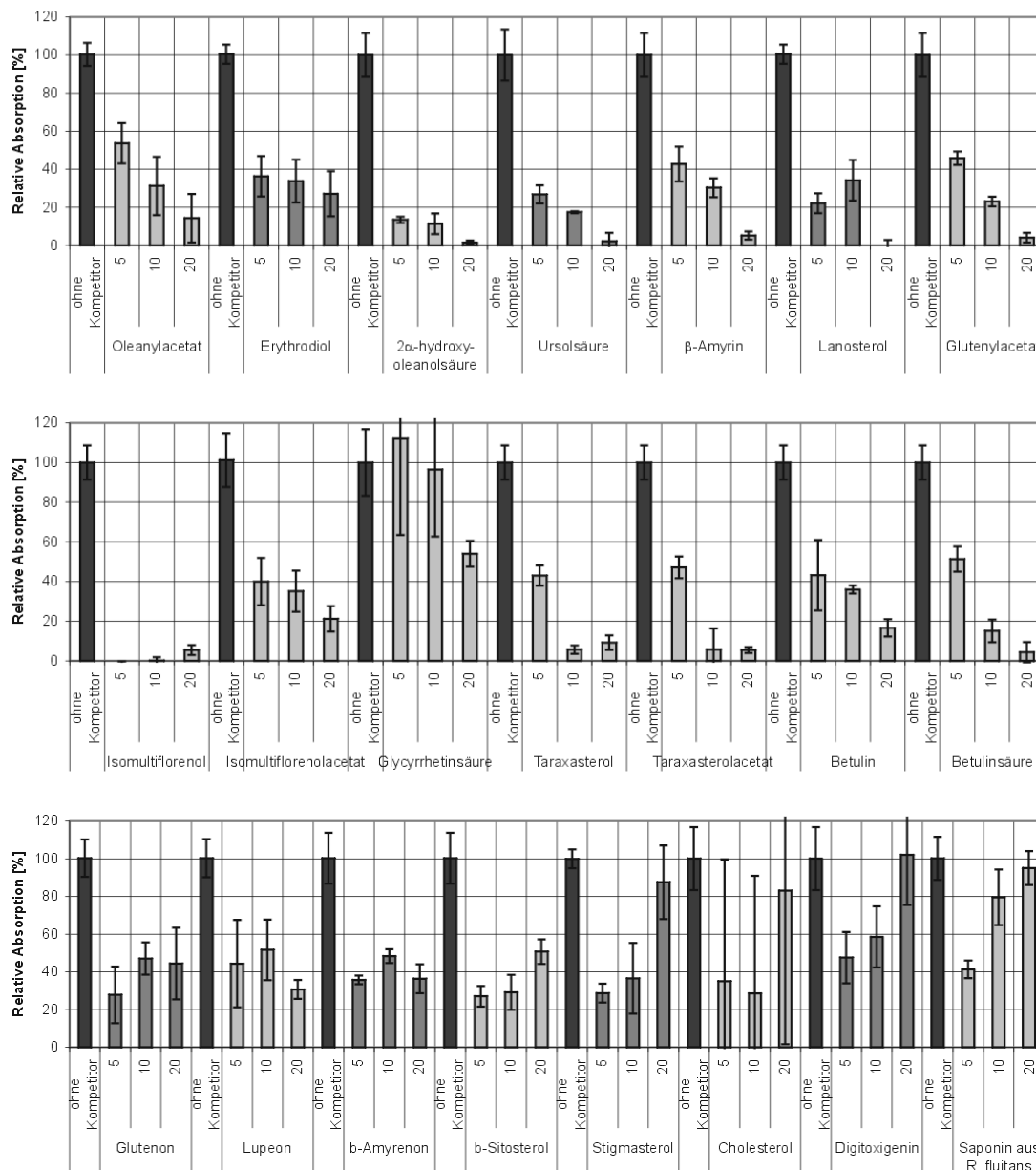


Abb. 3.48 Charakterisierung der Antikörper der Zell-Linie 10F10 - Konkurrenz. Die dargestellten Triterpene wurden in einer Menge von 5 – 20 µMol mit je 5 µl des Kulturüberstandes der Zell-Linie 10F10 in 100 µl PBS präinkubiert. Der entsprechende ELISA zeigte eine konzentrationsabhängige Konkurrenz (Oben und Mitte) bzw. fehlende konzentrationsabhängige Konkurrenz (Unten).

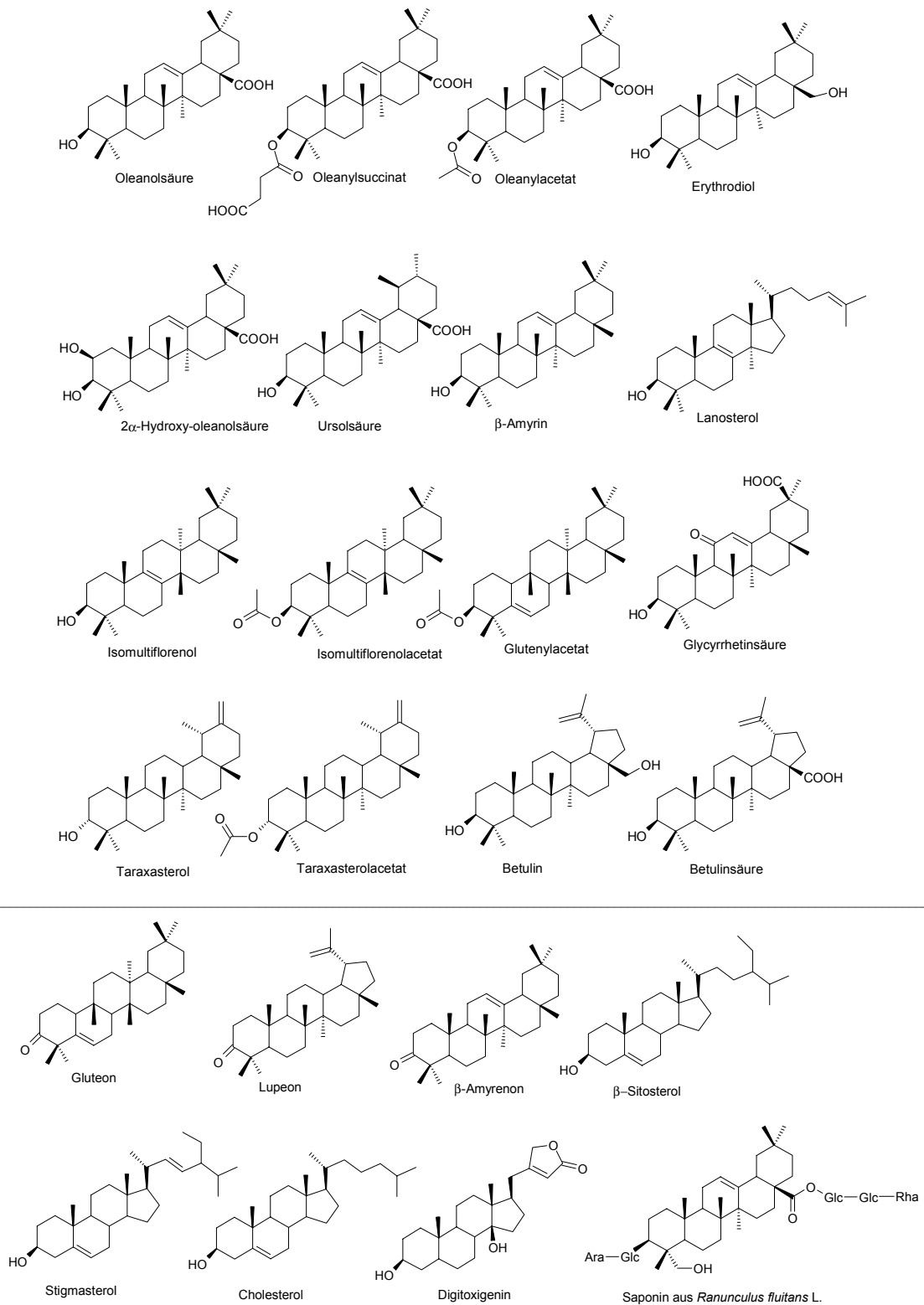


Abb. 3.49 Charakterisierung der Antikörper der Zell-Linie 10F10. - Konkurrenz. Die dargestellten Triterpene wurden in einer Menge von 5 – 20 μmol mit je 5 μl des Kulturüberstandes der Zell-Linie 10F10 in 100 μl PBS präinkubiert. Der entsprechende ELISA zeigte eine bei den Substanzen im oberen Bereich konzentrationsabhängige Konkurrenz (s. Abb. 3.48.), bei denen im unteren Bereich dagegen nicht. Das Saponin aus *Ranunculus fluitans* ist 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1-3)- α -L-arabinopyranosyl] -28-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-4) - β -D-glucopyranosyl-(1-6) - β -D-glucopyranosyl]hederagenin (Wegner et al., 2000).

Die Antikörper der Zell-Linie 10F10 erkennen ein Epitop, das im unteren Molekülbereich angesiedelt ist. Die Ringe A und B müssen *trans* verknüpft sein, was die fehlende Konkurrenz mit Digitoxigenin zeigt. Die Hydroxygruppe an C3 ist obligatorisch, sie darf nicht zum Keton oxidiert sein, da eine Konkurrenz mit Lupeon, Gluteon und β -Amyrenon fehlt. Die Hydroxygruppe kann mit einfachen Substituenten wie Acetat verestert sein (Konkurrenz mit Isomultiflorenolacetat, Oleanylacetat und Taraxasterolacetat). Auch eine weitere Hydroxygruppe in Position 2 (2 α -Hydroxy-oleanolsäure) beeinträchtigt die Bindung nicht. Dagegen behindert die 11-Ketofunktion der Glycyrrhetinsäure deutlich. Die Konkurrenz ist schwach.

Durch andere Positionierung von Doppelbindungen wird das Kohlenstoffskelett des Triterpens verformt, jedoch nicht so stark, dass die Bindung an den Konkurrenten verloren ginge. Die Doppelbindung in Position 12 der Oleanolsäure darf fehlen (Taraxasterol, Taraxasterolacetat, Betulin, Betulinsäure) oder in Position 8 (Isomultiflorenol, Isomultiflorenolacetat, Lanosterol) oder 5 (Glutenylacetat) liegen. Alle Konkurrenten benötigen zwei Methylsubstituenten in Position 4 (β -Sitosterol, Cholesterol, β -Sitosterol). Die Größe und Substitution des E-Ringes sind nicht relevant.

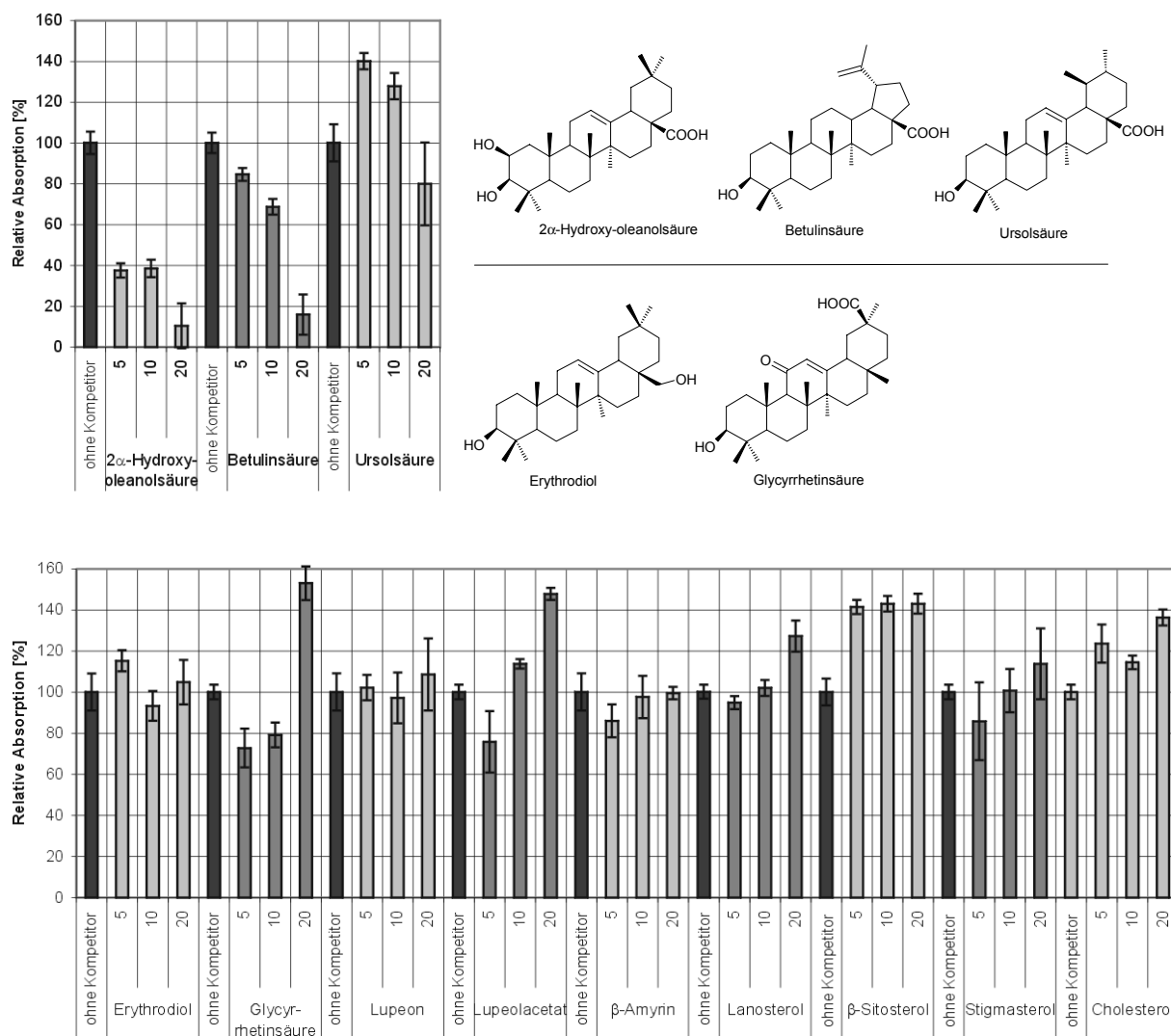


Abb. 3.50 Charakterisierung der Antikörper der Zell-Linie 6C2. Verschiedene Triterpene wurden in einer Menge von 5 – 20 μmol mit je 5 μl des Kulturüberstandes der Zell-Linie 6C2 in 100 μl PBS präinkubiert. Der entsprechende ELISA zeigte eine konzentrationsabhängige Competition (obere Reihe) bzw. fehlende Competition (untere Reihe).

Wie die Abb. 3.50 zeigt, wurde für die Antikörper der Zell-Linie 6C2 bisher Competition mit Oleanolsäure, Ursolsäure, und Betulinsäure, nicht jedoch mit Erythrodiol und Glycyrrhetinsäure nachgewiesen. Auch verschiedene andere Kompetitoren wie Sterole werden nicht erkannt. An dem Epitop, das dieser Antikörper erkennt, muss daher die Carboxy-Funktion an C28 des Oleanolsäuremoleküls beteiligt sein. Auch die Verschiebung einer Methylgruppe der Oleanolsäure von C20 nach C19, was zu Ursolsäure führt, schwächt die Bindung bereits. Für die vollständige Charakterisierung der Antikörper dieser Zell-Linie sollten noch weitere Kompetitoren gefunden werden, die unterschiedliche Substitutionsmuster in den Ringen C, D und E tragen.

3. Ergebnisse

Die Antikörper der Zell-Linie 7A6 zeigen Konkurrenz Betulinsäure und Ursolsäure. Weiterhin binden sie an Cholesterol und β -Sitosterol, nicht jedoch an Lanosterol und Stigmasterol. Auch Erythrodiol zeigte in den Wettbewerbsversuchen keinen Effekt (Ergebnisse der Untersuchungen s. Abbildung 3.51, Die Strukturen sind in Abbildung 3.49 zusammengefasst). Die Antikörper dieser Zell-Linie können bislang noch nicht auf ein Epitop festgelegt werden. Eine Möglichkeit zur Charakterisierung wären die Kombination aus weiteren Wettbewerben mit Methoden des molecular modelling.

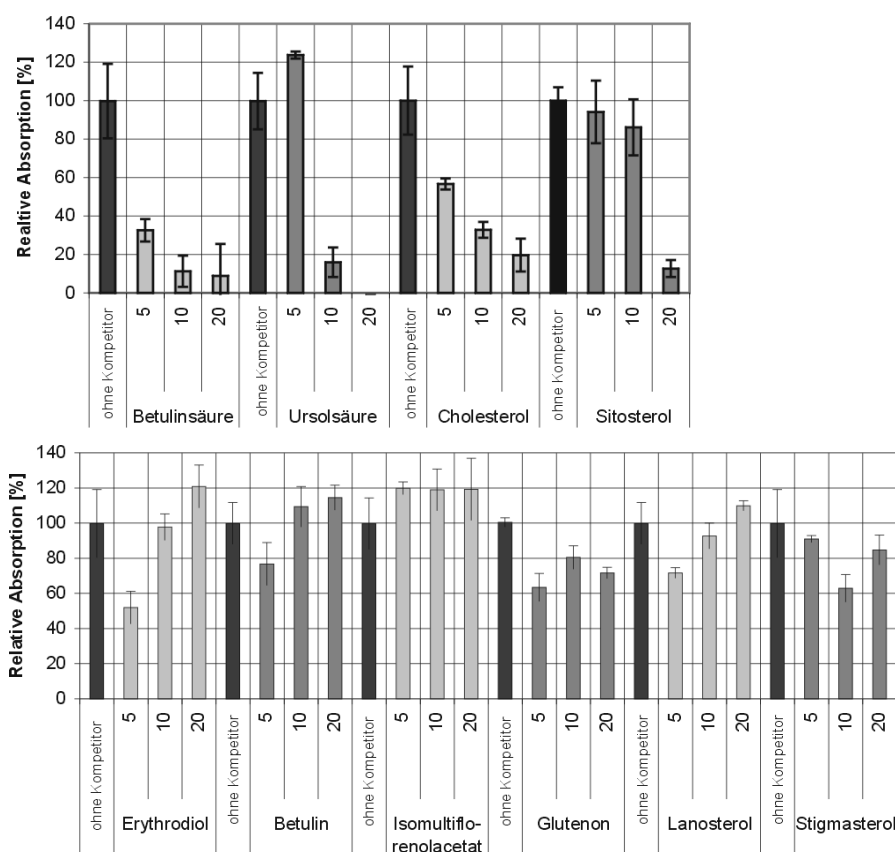


Abb. 3.51 Charakterisierung der Antikörper der Zell-Linie 7A6. Verschiedene Triterpene wurden in einer Menge von 5 – 20 μ mol mit je 5 μ l des Kulturüberstandes der Zell-Linie 7A6 in 100 μ l PBS präinkubiert. Der entsprechende ELISA zeigte eine konzentrationsabhängige Konkurrenz (obere Reihe) bzw. fehlende Konkurrenz (untere Reihe).

3.2.4.3 Anwendungsmöglichkeiten

Nach den bisherigen Untersuchungen ist der Zellkultur-Überstand der Zell-Linie 10F10 aufgrund der Empfindlichkeit des Nachweises für weitergehende Untersuchungen gut geeignet. Daher wurden mit dieser Zell-Linie erste Versuche durchgeführt, Oleanolsäure und ähnliche Substanzen in Tee-Zubereitungen nachzuweisen. Hierfür wurden Zubereitungen (Dekokte) nach den Angaben in Abschnitt 2.3.3 hergestellt. Die untersuchten Pflanzen bzw. Pflanzenteile gehören größtenteils zu den „Saponindrogen“ des DAB bzw. EuAB (s. Abb. 3.52 und 3.53).

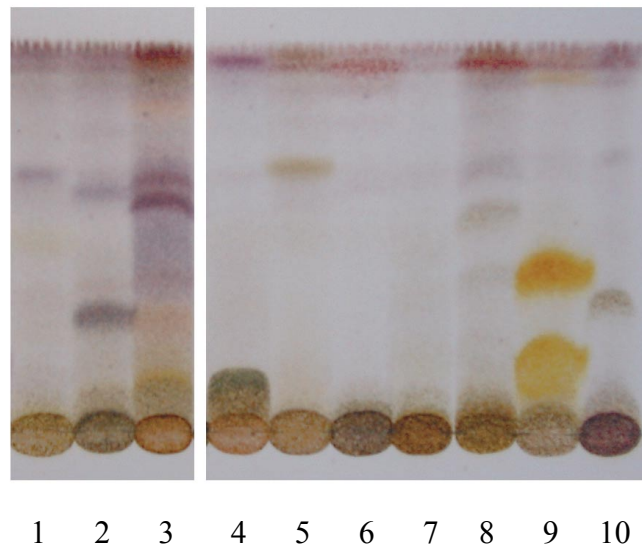


Abb. 3.52 Tee-Präparationen für die Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Triterpene. Die Tee-Präparationen (Dekokte) wurden entsprechend Abschnitt 2.3.3 hergestellt. Verwendet wurden hierbei die Früchte von *Aesculus hippocastanum* (6) und *Crataegus monogyna* (4), die Blätter von *Betula pendula* (3) und *Hedera helix* (1), die Wurzeln von *Glycyrrhiza glabra* (9), *Gypsophila paniculata* (2), *Polygala senega* (8), *Primula veris* (10) und *Smilax spec.*(5) sowie die Rinde von *Quillaia saponaria* (7).

3. Ergebnisse

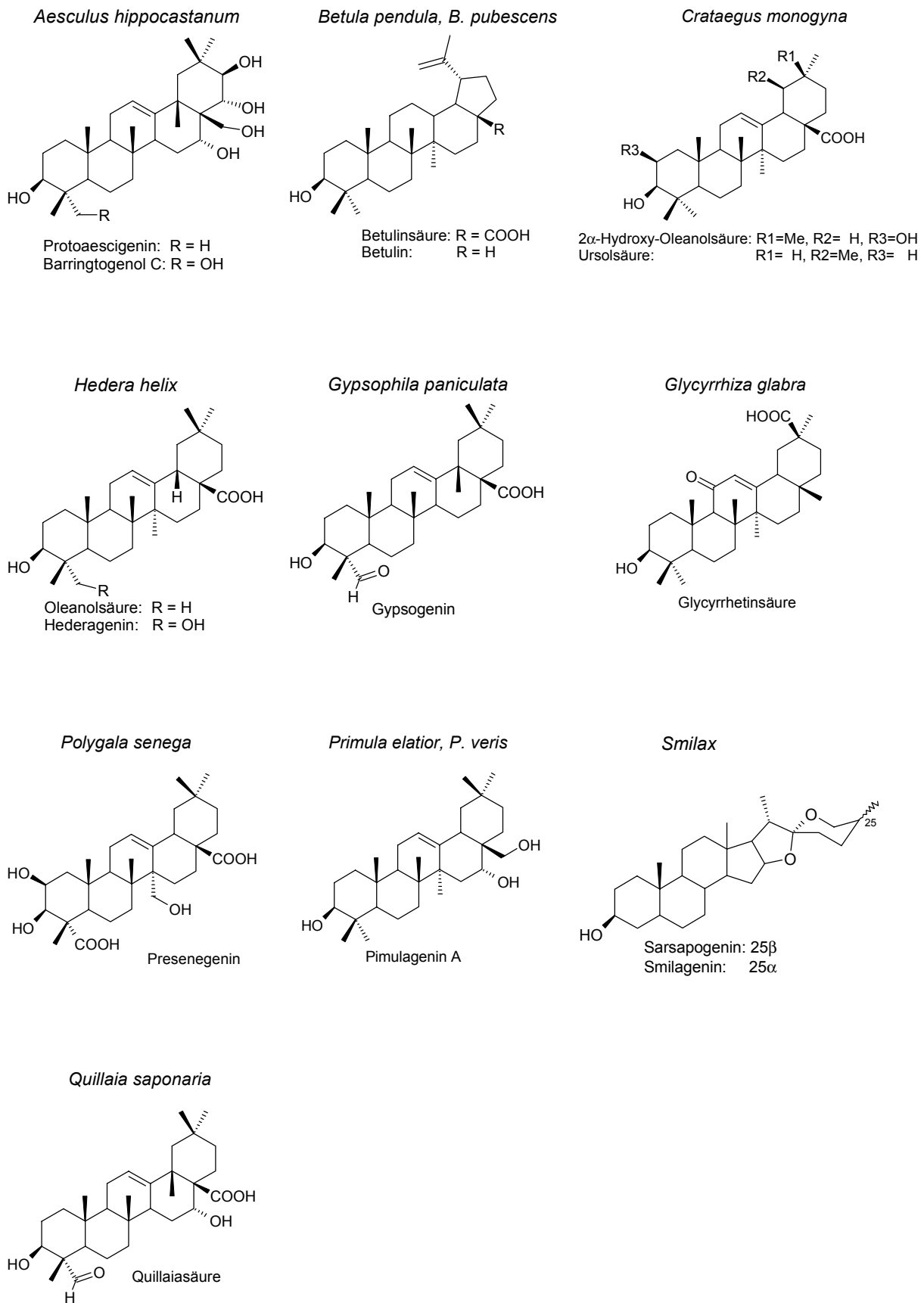


Abb. 3.53 Hauptsapogenine der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Saponindrogen.

Aesculus hippocastanum, die Rosskastanie, enthält in den verwendeten Samen mindestens 3% des Estersaponingemisches Aescin, das sich von den Sapogeninen Protoaescigenin bzw. Barringtogenol C ableitet. Zusätzlich besteht die Δ^7 -Sterolfraction zu 65% aus Δ^7 -Stigmastenol, das als Reinsubstanz Konkurrenz mit den Antikörpern der Zell-Linie 10F10 zeigte. (Stankovic et al., 1984 und 1985).

Crataegus monogyna, der eingriffelige Weißdorn enthält 0,42 – 0,45% Triterpensäuren, darunter Ursol- und 2α -Hydroxy-oleanolsäure (Schindler, 1955; Hagers Handbuch). Die arzneilich verwendete Droge „Birkenblätter“ setzt sich aus den Blättern von *Betula pendula*, die Hänge-Birke, und *Betula pubescens*, der Moorbirke zusammen. Das Blattmaterial enthält ca. 3% Saponine, die auf Betulinsäure basieren (Fischer et al., 1961; Wichtl, 1989). Betulinsäure und Betulin zeigten als Reinsubstanzen Konkurrenz mit den Antikörpern der Zell-Linie 10F10.

Hedera helix ist eine der meistverwendeten Saponindrogen. Efeublätter enthalten ca. 5% eines Saponingemisches, das hauptsächlich aus dem bidesmosidischen Hederacosid B, in kleineren Anteilen aus den Monodesmosiden β -Hederin, α -Hederin und Hederacosid C besteht. Sapogenine dieser Substanzen sind Oleanolsäure und Hederagenin (Elias et al., 1991; Pasich et al., 1983; Tschesche et al., 1965). Die weiße Seifenwurzel *Gypsophila paniculata* enthält bis zu 20% eines Saponingemisches, dessen Hauptbestandteil das Gypsosid A auf der Basis von Gypsogenin ist (Wulff, 1968; Wagner, 1983).

Glycyrrhiza glabra, die Süßholzwurzel, enthält 8-12% Glycyrrhizin, deren Basis die Glycyrrhetinsäure ist (Sticher et al., 1978; Wulff, 1968). Glycyrrhetinsäure zeigte mit den Antikörpern der Zell-Linie 10F10 eine schwache Konkurrenz. Die Basis der Saponine in Senegawurzel (*Polygala senega*) ist Presenegenin (Estrada et al., 2000; Wagner, 1983).

Primula elatior und *P. veris*, die Stammpflanzen der Primelwurzel, enthalten 5 – 10 % eines Saponingemisches mit Primulagenin A als Hauptsapogenin (Wagner et al., 1986; Wulff, 1968). Die Arzneidroge Sarsapillwurzel wird aus verschiedenen *Smilax*-Arten gewonnen. Es sind 8 – 10% eines Saponingemisches auf der Basis von Presenegenin enthalten (Tschesche et al., 1966; Wulff, 1968). Seifenrinde aus *Quillaia saponaria* enthält 8,5 – 16% eines Saponingemisches, das als Aglykon die Quillaiasäure hat (Higuchi et al., 1987 und 1988). Die Strukturen der einzelnen Sapogenine sind in der Abbildung 3.53 zusammengefasst, die Ergebnisse in der Abbildung 3.54.

Im ELISA fallen besonders die Extrakte von *Betulae pendula* und *Quillaia saponaria* durch eine hohe Konkurrenz auf. Betulin und Betulinsäure wurden als Reinsubstanzen positiv im kompetitiven ELISA getestet. Auch Quilliasäure passt zu dem im kompetitiven ELISA ermittelten Epitop und ist zudem in hoher Konzentration im Material enthalten. Die durch den Extrakt von *Gypsophila paniculata* hervorgerufene Konkurrenz ist fast ebenso stark und reflektiert eine vergleichbar hohe Konzentration des entsprechenden Sapogenins Gypsogenin, das sich von Quilliasäure nur durch eine Hydroxygruppe unterscheidet.

Extrakte aus *Hedera helix* und *Aesculus hippocastanum* zeigen eine etwas schwächere Konkurrenz. Beide Drogen enthalten Sapogenine, die zu dem postulierten Hapten der Zell-Linie 10F10 passen.

Die Extrakte von Primelwurzel, Polygalawurzel und Süßholzwurzel hemmen die Bindung der Antikörper nur schwach. Dies ist bei letzteren beiden leicht zu erklären, denn durch Modifikationen in dem Molekülteil, auf den vermutlich der Antikörper fokussiert, wird die Bindung erschwert.

Die Steroidsaponine aus dem *Smilax*-Extrakt haben keinen Einfluss auf die Bindung der Antikörper. Es fehlen z.B. die Methylgruppen in Ring A und B.

Crataegus monogyna enthält keine Saponine, wohl aber geringe Mengen an den freien Triterpensäuren Ursolsäure und 2 α -Hydroxy-oleanolsäure. Die gemessene Konkurrenz verdeutlicht in Korrelation mit den Konkurrenzen der stark saponinhaltenen Drogen noch einmal, dass Saponine selbst aufgrund der voluminösen Zucker-Seitenketten keine Konkurrenz bewirken können und mit Hilfe dieses Assays nur freie Aglyka erfasst werden.

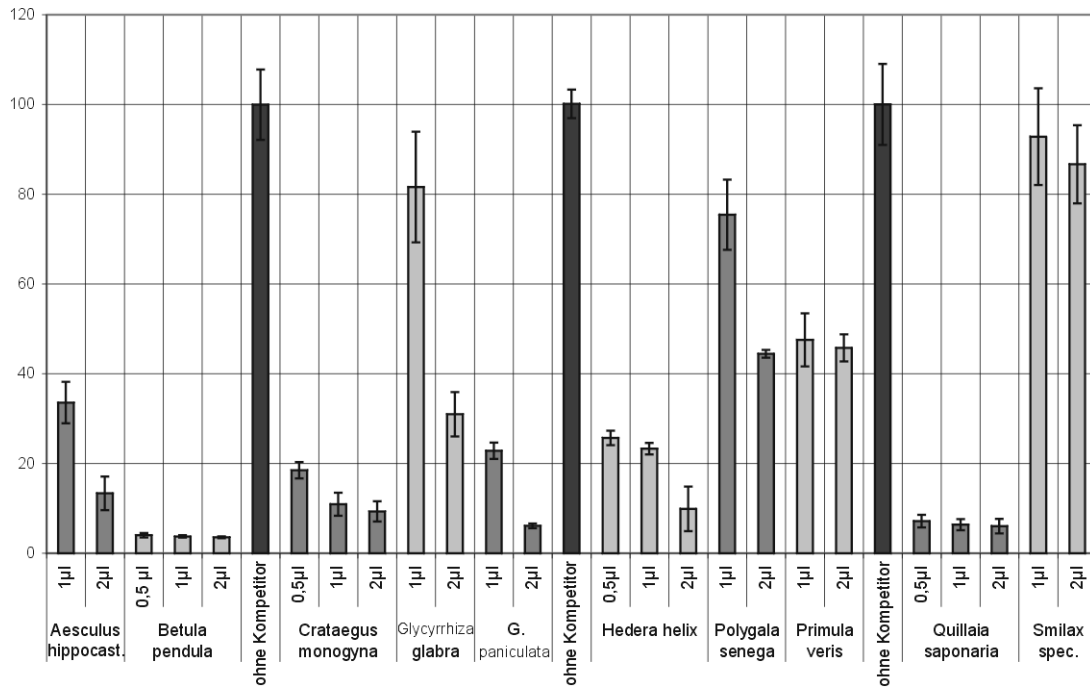


Abb. 3.54 Kompetitiver ELISA der Antikörper der Zell-Linie 10F10 mit verschiedenen Tee-Präparationen. Die Tee-Präparationen (Dekokte) wurden entsprechend den Angaben in Abschnitt 2.3.3 hergestellt. Verwendet wurden hierbei die Früchte von *Aesculus hippocastanum* und *Crataegus monogyna*, die Blätter von *Betula pendula* und *Hedera helix*, die Wurzeln von *Glycyrrhiza glabra* (ungeschält), *Gypsophila paniculata*, *Polygala senega*, *Primula veris* und *Smilax spec.* sowie die Rinde von *Quillaia saponaria*. Unterschiedliche Konzentrationen dieser Dekokte (0,5 – 2 µl / 100 µl PBS) wurden mit je 5 µl Kulturüberstand der Zell-Linie 10F10 präinkubiert.

4 Diskussion

4.1 Monoklonale Antikörper gegen Furanolabdanditerpene

4.1.1 Monoklonale Antikörper gegen Marrubiin

Die Arbeitsgruppe Knöss beschäftigt sich unter anderem mit der Biosynthese der Diterpene aus *Marrubium vulgare* L.. Im Rahmen dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen Marrubiin, das Hauptditerpen dieser Pflanze, generiert. Die untere Grenze für die Größe eines Antigens, die für eine Induktion einer Immunreaktion im tierischen Organismus ausreicht, beträgt ca. 1 kDa (Erlanger, 1980). Kleinere Moleküle werden daher kovalent an ein Trägerprotein kovalent gebunden (Landsteiner, 1945). Marrubiin wurde hierfür zu Marrubenol reduziert und über einen Bernsteinsäure-„Spacer“ an BSA und Thyroglobulin gekoppelt.

Diese Form der Konjugatbildung unter Verwendung von Bernsteinsäure wurde bereits für die Darstellung anderer Konjugate für die Immunisierung mit niedermolekularen Haptenen eingesetzt, wie z.B. Digitoxigenin (Oliver et al., 1968), β -Ecdyson (Lauer et al., 1974), Clonazepam (Dixon et al., 1977), Crocin (Xuan et al., 1999), Retrorsin (Zündorf et al., 1998) und Forskolin (Shoyama et al., 1998). Die Verwendung eines „Spacers“ verbessert nach Literaturangaben sowohl die Spezifität (Lindner et al., 1972), als auch die Erkennbarkeit des Zielmoleküls (Mould et al., 1977).

Mit Marrubiin als Kopplungspartner erwies sich die Bindung über Bernsteinsäure jedoch als labil. In wässriger Lösung verloren die Proteinkonjugate zunehmend die Belegung mit Furanolabdanditerpen, wobei der Spacer im Konjugat verblieb. Eine mögliche Begründung für die Labilität der Esterbindung kann der störende Einfluss der γ -Hydroxygruppe des Marrubenols sein. Mit densitometrischen Untersuchungen des Konjugates nach einer Farbreaktion mit Vanillin-Schwefelsäure wurde die Belegung mit Marrubenol bestimmt (Knöss, 1997). Die Verwendung von 1,4-¹⁴C-Bernsteinsäure gestattete die Quantifizierung des gebundenen Succinats (Pflüger, 1989). Die Diskrepanz zwischen dem Anteil an gebundenem Furanolabdanditerpen und gebundenem Spacermolekül wurde im Vergleich dieser Untersuchungen deutlich.

Die Belegungsrate betrug 5 : 1 (Marrubenolsuccinat : BSA) bzw. 13 : 1 (Gesamt-Succinat : BSA). Eine solche Belegungsrate führte bei Klause et al. (1974) in der Immunisierung ebenfalls zu guten Resultaten.

Der Verlust des Proteinkonjugates an Furanolabdanditerpen unter der Dialyse wurde mit MALDI-TOF nachgewiesen. Diese Methode stellt die zur Charakterisierung von Proteinkonjugaten derzeit gängigste Methode dar (Shoyama et al., 1998, Gourlaouën et al., 1998). Die Ergebnisse wurden im weiteren Verlauf der Arbeit durch einen indirekten ELISA bestätigt.

Die Untersuchungen machen deutlich, dass eine einfache Ermittlung der Molekülmasse des Proteinkonjugates per MALDI-TOF zur Charakterisierung des entsprechenden Konjugates gegebenenfalls nicht ausreicht. Die Bestimmung kann zu falsch hohen Werten bei der Bestimmung der Belegungsrate von Proteinkonjugaten führen.

Die Proteinkonjugate wurden zur Immunisierung von zwei Balb/C-Mäusen eingesetzt. Nach Erreichen eines stabilen Antikörpertiters wurden die Milz-Zellen gewonnen und mit Myelom-Zellen fusioniert. Die resultierenden Hybridom-Zellen wurden unter Zugabe von HAT-Supplement kultiviert. Alle Arbeiten, die Immunisierung, Fusion, Kultivierung und das erste Screening der Zell-Linien umfassten, wurden in Kooperation mit Frau I. Zündorf, Universität Frankfurt, durchgeführt.

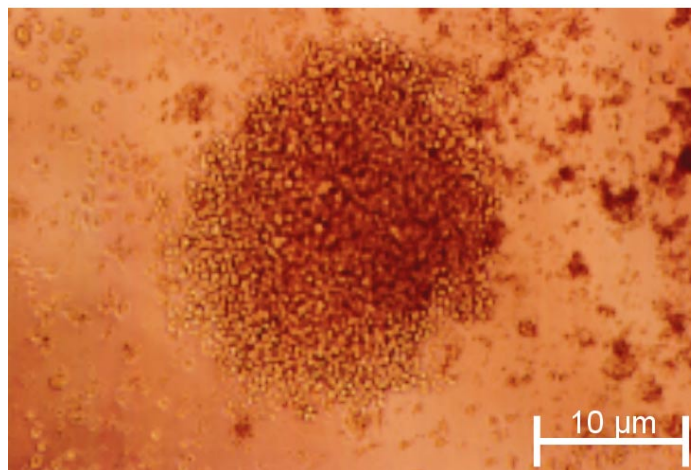


Abb. 4.1 Mikroskopisches Bild einer Hybridom-Zell-Linie. Die Hybridom-Zell-Linien wurden in flachen Anzuchtschalen kultiviert. Die einzelnen Zellen sekretierten die gebildeten Antikörper in das umgebende Nährmedium. Die Aufnahme stammt von I. Zündorf.

In der ersten Immunisierung wurden insgesamt 38 verschiedene Zell-Linien und Subklone etabliert, die ein stabiles Wachstum zeigten und Antikörper gegen Marrubenolsuccinat sekretierten. In der zweiten Immunisierung wurden acht weitere derartige Linien gewonnen. Von den 46 Zell-Linien fielen besonders die Antikörper von 1C1, 5F2, 6A1, 6C5, 9B5 und 9C1 durch hohe Absorptionen im ELISA auf. Die Absorptionen können in einer hohen Antikörperkonzentration im Zellkultur-Überstand oder in einer hohen Affinität der Antikörper zu dem entsprechenden Antigen begründet liegen.

In einem kompetitiven ELISA (Kemeny, 1994, Durchführung s. Abschnitt 2.6.4) sollte mit Hilfe verschiedener ähnlicher Strukturen das Epitop untersucht werden, an das die Antikörper der einzelnen Zell-Linien binden. Der kompetitive ELISA lieferte jedoch nur reproduzierbare Ergebnisse, wenn folgende Parameter eingehalten wurden:

1. Proteinkonjugat

Im Rahmen des ELISA wurden zur Immobilisierung des Antigens in der Mikrotiterplatte wiederum die Proteinkonjugate von Marrubenolsuccinat mit Thyroglobulin bzw. BSA eingesetzt, da sie das Antigen gerichtet präsentieren. Die Hydrolyseempfindlichkeit der Konjugate wurde bereits diskutiert. Auch die Empfindlichkeit des ELISA wurde durch die abnehmende, relativ geringe Belegung der Proteinkonjugate beeinträchtigt.

Eine Alternative zu den bisher verwendeten Marrubenolsuccinat-Konjugaten kann gegebenenfalls ein Konjugat auf der Basis von Marrubiinsäure bieten. Marrubiin kann alkalisch zu Marrubiinsäure (Hardy et al., 1957) reduziert und die entstehende Carboxylgruppe der Marrubiinsäure zur Bindung des Isoprenoids nach der Methode des gemischten Anhydrids genutzt werden. Im resultierenden Konjugat wird das Isoprenoid durch den fehlenden Spacer nicht sehr weit aus dem Protein herausgehoben, was zu sterischen Problemen bei der Anheftung der Antikörper führen kann. Auch eine direkte, gerichtete Bindung des Diterpens an die Oberfläche der Mikrotiterplatte ist eine alternative Strategie, um die problematische Verwendung des Marrubenolsuccinat- Proteinkonjugates im ELISA zu vermeiden.

2. Zellkultur-Überstand

Der verwendete Zellkultur-Überstand mit den darin enthaltenen monoklonalen Antikörpern musste möglichst frisch sein, zumindest jedoch bei -20°C gelagert werden. Selbst mit diesen Vorsichtsmaßnahmen nahm die Aktivität der Antikörper langsam ab.

Im optimierten kompetitiven ELISA konnte Marrubiin als Kompetitor mit den Antikörpern der Zell-Linie 6A1 bis zu einer Konzentration von 0,75 nmol / 100µl nachgewiesen werden. Weitere Kompetitoren waren die Furanolabdanditerpene Marrubenol und Galeopsin sowie Furan-3-carbonsäure. Sclareol oder Leosibiricin, welche Labdanditerpene ohne Furan- bzw. mit Präfuransystem sind, zeigten keine konzentrationsabhängige Competition. Die Antikörper der Zell-Linie 6A1 sind daher gegen 3-substituierte Furanringe gerichtet.

Antikörper gegen ein derart gestaltetes Epitop waren aus theoretischen Überlegungen heraus zu erwarten: Die Abb. 4.2 gibt die Struktur des Marrubensuccinates in ungefährer räumlicher Darstellung wieder. Durch die Verknüpfung der freien Carboxylgruppe (s. Pfeil) des Bernsteinsäure-„Spacers“ mit dem Proteinträger wird besonders der am entgegengesetzten Ende des Moleküls befindliche Furanring an der Oberfläche des Konjugates dem Immunsystem der Maus präsentiert.

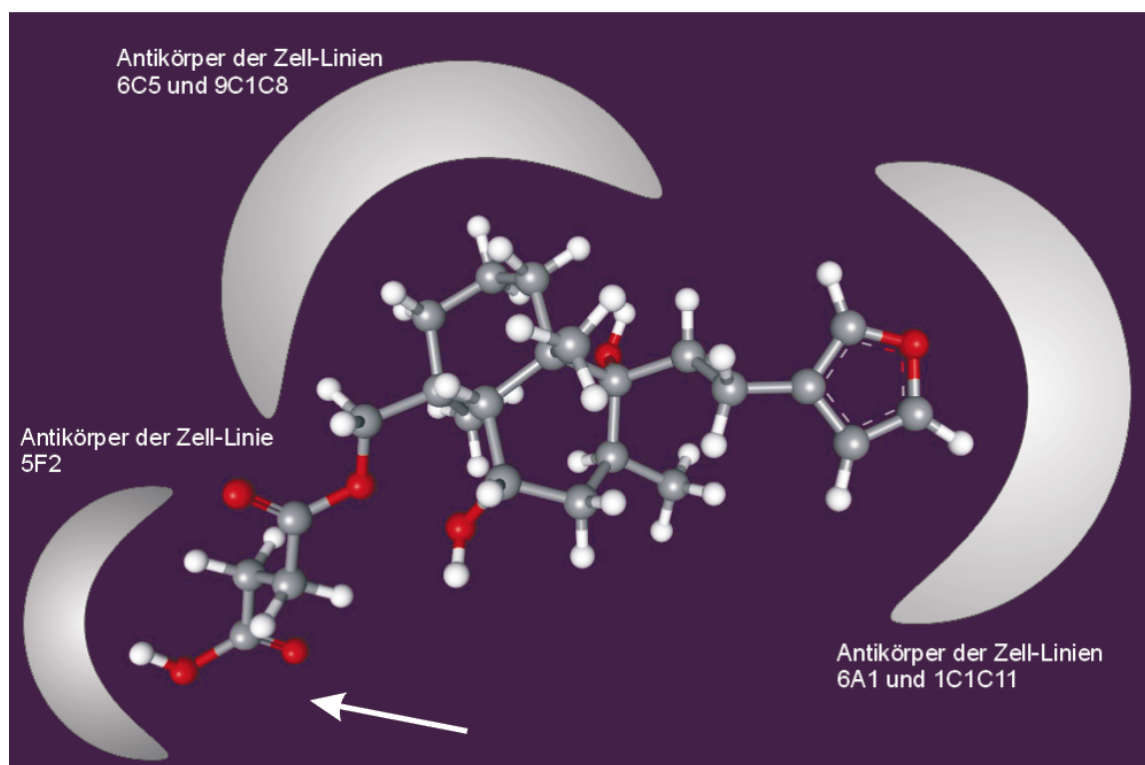


Abb. 4.2 Dreidimensionale Darstellung von Marrubensuccinat. Die Struktur von Marrubensuccinat wurde mit Hilfe des Programms Cerius II auf ein energetisches Minimum gerechnet. Die wiedergegebene Struktur ist nicht von kristallographischen Messungen gestützt, sie gibt nur eine grobe Näherung wieder. Die freie Carboxylgruppe des Bernsteinsäuresubstituenten wurde mit einem Pfeil markiert. Der graue Bereich markiert den wahrscheinlichsten Angriffspunkt der mAK verschiedener Zell-Linien an das Furanolabdanditerpen entsprechend dem kompetitiven ELISA.

Die Zell-Linien 1C1C11, 5F2, 9C1C8 und 6C5 wurden ebenfalls mit Hilfe des kompetitiven ELISA charakterisiert: Die Antikörper der Zell-Linie 1C1C11 scheinen ein Epitop zu erkennen, das dem der Linie 6A1 ähnelt. Auch hier wurde Konkurrenz mit Furan-3-carbonsäure nachgewiesen. Die Antikörper der Zell-Linie 5F2 zeigten nur Konkurrenz mit Marrubensuccinat und mit Bernsteinsäure. Die Existenz solcher Antikörper bestätigte indirekt die Esterhydrolyse des Marrubensuccinats vom Konjugat. Die mAK sind gegen den Succinat-„Spacer“ gerichtet.

9C1C8 und 6C5 bilden Antikörper, die keine Konkurrenz mit Furan-3-carbonsäure zeigten. Andererseits konkurrierten sie mit Sclareol, einem Labdan-Diterpen ohne Furan-Substituent. Das Epitop umfasst daher vermutlich Teile des Labdangrundgerüsts. 6C5 konkurrierte auch mit Galeopsin, einem weiteren Labdan-Diterpen. Es sind zusätzliche Untersuchungen und auch weitere Konkurrenten-Substanzen notwendig, um die Antikörper dieser Zell-Linien zu charakterisieren.

Die generierten und z.T. vollständig charakterisierten monoklonalen Antikörper sind die ersten Antikörper überhaupt, die gegen ein Furanolabdanditerpen als Zielstruktur gerichtet sind. Gegen das Labdan-Diterpen Forskolin entwickelten Sakata et al. (1994) monoklonale Antikörper. Forskolin aus *Coleus forskohlii* ist ein Aktivator der Adenylatzyklase (Metzger et al., 1981). Die Autoren erhielten zwei verschiedene Zell-Linien, die IgG gegen das Labdan produzierten. Eine der Linien wurde mit sechs verschiedenen Konkurrenten untersucht, von denen nur eine Substanz (7-Deacetylforskolin) eine 5%-Inhibition der Bindung zeigte. Eine genauere Charakterisierung des erkannten Epitops wurde nicht durchgeführt.

4.1.2 Anwendung der monoklonalen Antikörper gegen Furanolabdanditerpene

Die Arbeiten zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Marrubiin wurden ursprünglich begonnen, um ein empfindliches System für die Erforschung der Diterpenbiosynthese zu gewinnen, z.B. zur Analyse der Lokalisation der Furanolabdanditerpene in Pflanzen oder Zellkulturen von *Marrubium vulgare* verfolgen zu können. Einblicke in das Innere der Pflanze, bis in subzelluläre Bereiche, erlauben Immuno-cytochemische Methoden, bei denen die Zielstruktur mit monoklonalen Antikörpern im Pflanzengewebe nachgewiesen wird. Antikörper wurden in diesem Zusammenhang schon beispielsweise zur Differenzierung veresterter und unveresterter Pektine in *Petunia hybrida* (Lenartowska et al., 2001), zur Detektion von Glucosylceramid in der Zellwand verschiedener Pilze (Toledo et al., 2001) oder verschiedenster Zellwandproteine in Pflanzen und Algen (Zusammenfassung bei Knox, 1997) eingesetzt. Ein Beispiel für einen immunologischen Nachweis eines Proteins gibt die Abb. 4.3. Der Blattschnitt von *Zea mays* wurde mit Anti-(Ribulosebiphosphat-carboxylase (rubisco))-Antikörpern inkubiert, welche dann mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper detektiert werden konnten. Auf diese Weise konnte rubisco in den Scheidenzellen der Leitbündelscheiden nachgewiesen werden, dort wiederum in den Chloroplasten, wie die gelbe Färbung zeigt.

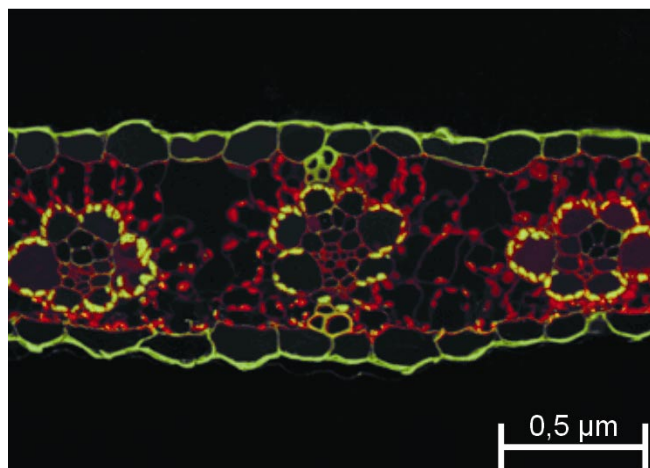


Abb. 4.3 Immunologischer Nachweis von rubisco in Mais (*Zea mays* L.). Ein Schnitt durch ein Maisblatt wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen Ribulosebiphosphat-carboxylase (rubisco) inkubiert. Das Enzym wurde in den Chloroplasten der Scheidenzellen um das Leitbündel als gelbe Fluoreszenz mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen. Die rote Fluoreszenz stammt von Chlorophyll, die grünen Schattierungen von Lignin und Cutin (Foto von T. Jones, mit freundl. Genehmigung von DuPont).

Die überwiegende Mehrheit an Veröffentlichungen in diesem Bereich bezieht sich auf den Nachweis von Zellwand-Bestandteilen bzw. membrangebundenen Proteinen. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung muss das Pflanzenmaterial auf einem Träger fixiert werden. Zusätzlich müssen die Zellen geöffnet werden, damit die Antikörper zum Nachweis ins Innere gelangen können. Die verschiedenen hierzu eingesetzten Methoden wie Cryofixierung (Vitha et al., 2000) oder Einbettung in Wachs (von Witsch et al., 1998) eignen sich schlecht dazu, die Proben derart zu fixieren, dass auch kleine, lösliche Antigene lokalisiert werden können und nicht unter den verschiedenen Inkubationsschritten ausgewaschen werden (Vitha et al., 2000). Sobald Matrices gefunden sind, die den Nachweis kleiner und löslicher Antigene im Pflanzengewebe gestatten, wird es auch möglich sein, *Marrubium vulgare* mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörpern zu untersuchen. Der Ort der Biosynthese der Diterpene ist fraglich. Besonders die Zell-Linien, die einen Teil des Labdangrundgerüsts binden, können gegebenenfalls auch schon Vorstufen von Marrubiin im Gewebe nachweisen. Der Speicherort von Marrubiin kann dann mit Hilfe der Antikörper der Zell-Linien 6A1 nachgewiesen werden.

Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Shoyama untersuchten die Lokalisation verschiedener sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe mit einer indirekten Methode. Sie übertrugen die löslichen Bestandteile eines frischen Pflanzenschnittes analog dem Verfahren des „Western Blottings“ (Hames et al., 1990) auf eine Membran. Tanaka et al. (1998) verwendeten monoklonale Antikörper auf diese Weise zum Nachweis von Ginsenosid Rb1 in Ginsengwurzeln. Die Autoren bedeckten die frische Schnittfläche einer Ginsengwurzel mit einer PVDF-Membran und fixierten die übertragenen Ginsenoside danach mit Natriumperiodat. Die monoklonalen Antikörper banden an die immobilisierten Ginsenoside und konnten mit Hilfe eines sekundären Antikörpers detektiert werden. Shan et al. (2000) zeigten vergleichbare Daten für Glycyrrhizin in *Glycyrrhiza glabra* (s. Abb. 4.4). Die Untersuchungen liefern im Vergleich zu den mikroskopischen immunocytochemischen Untersuchungen Anhaltspunkte zur makroskopischen Lokalisation der Zielstrukturen.

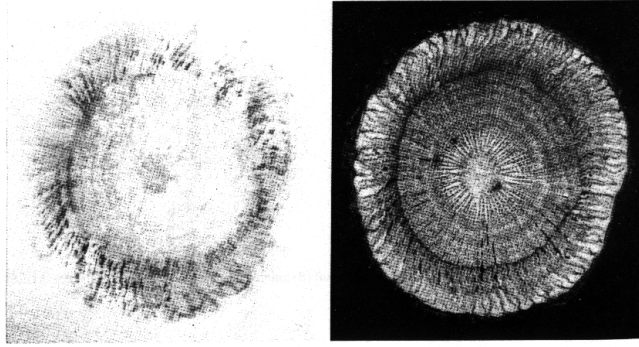


Abb. 4.4 Immuncytolokalisation von Glycyrrizin in *Glycyrriza glabra*. Shan et al. (2000) blotteten die löslichen Bestandteile eines frischen Pflanzenschnittes auf eine Membran und wiesen die Zielstrukturen mit Hilfe monoklonaler Antikörper nach.

Interessanter ist dagegen eine Abwandlung der Methode, bei der die zu untersuchenden Proben, z.B. Extrakte, nach dünnschichtchromatographischer Trennung auf eine PVDF-Membran übertragen („geblottet“) und fixiert werden. Die Membran wird mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert und mit einem sekundären, farbig markierten Antikörper analog dem indirekten ELISA nachgewiesen. Zusätzlich zur Kompetition können parallel Informationen zum dünnschichtchromatographischen Verhalten der erkannten Substanzen gesammelt werden (Putalun et al., 2000; Shan et al., 2000; Tanaka et al., 1998).

Aniagolu et al. (1995) entwickelten ebenfalls eine Western-Blotting-Methode auf PVDF-Membranen zum Nachweis von Cholesterol mit Anti-Cholesterol-Antikörpern. Die Autoren bescheinigten dieser Methode eine vierfach größere Sensitivität, verglichen mit dem konventionellen ELISA in Polystyren-Platten.

Die monoklonalen Antikörper gegen Forskolin werden in weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe Shoyama auch zur quantitativen Bestimmung von Labdanditerpenen in verschiedenen Teilen von *C. forskohlii* eingesetzt (Yanagihara et al., 1996). Die Autoren setzten dazu einen kompetitiven ELISA ein.

Erste Versuche mit wässrigen Drogenextrakten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass auch die Antikörper der Zell-Linie 6A1 geeignet sind, Furanolabdanditerpene aus Pflanzenextrakten in einem kompetitiven ELISA qualitativ zu detektieren. Eine quantitative Bestimmung erscheint zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Auch ist die Sensitivität des ELISA mit 0,75 nmol Marrubiin / 100 μ l gegenüber 0,014 nmol Forskolin / 100 μ l in den Untersuchungen von Sakata et al. (1994) noch nicht sehr hoch.

Problematisch ist hierbei wahrscheinlich das Proteinkonjugat, das mit einer Belegungsrate von 5 : 1 (Marrubenolsuccinat : BSA) im Vergleich zu dem Forskolin-Konjugat mit 10 : 1 (7-Deacetylforskolin-7-hemisuccinat : BSA) deutlich schwächer belegt ist.

Eine Sensitivierung des Nachweises bieten solche Techniken, bei denen der Antikörper immobilisiert wird. Als Bindungspartner eignen sich wiederum die Polystyren-Wände einer Mikrotiterplatte. Im direkten ELISA (Crowther, 1995) wird der Antikörper mit einem radioaktiv oder enzymatisch markierten Antigen inkubiert. Auch ein kompetitiver Aufbau dieses Assays ist denkbar. Aus Marrubiin muss hierfür jedoch wiederum partialsynthetisch ein Konjugat, z.B. mit Biotin oder Peroxidase, dargestellt werden.

Eine hohe Kapazität bieten auch verschiedene Festphasen-Matrices, die mit Antikörper beladen werden können (Liddell et al., 1995). In Form von feinen Kugeln, sogenannten „beads“ aus verschiedensten Materialien wie Polystyren (Liddell et al., 1995) oder Alginat-Chitosan-Gel (Albarghouthi et al., 2000) machen sie einen noch mobileren Einsatz monoklonaler Antikörper möglich. Die Kugeln dienen vorwiegend der Reinigung von unerwünschten Antigenen. Eine interessante Möglichkeit der Detektion bieten in diesem Zusammenhang z.B. paramagnetische „beads“. An Antikörper gebundene Micron-Partikel ermöglichen durch ihren störenden Einfluss auf ein Magnetfeld eine physikalische Detektion in der Probe ohne Störung durch die Matrix (Richardson et al., 2001).

Antikörper-beladene Partikel ermöglichen weiterhin auch die Sammlung von Zielstrukturen aus einer wässrigen Lösung heraus. Immunoaffinitäts-Säulen, die mit diesen Partikeln gefüllt sind, können der Ausfilterung unerwünschter Antigene ebenso dienen wie einer Aufkonzentrierung der Zielstruktur aus der Matrix. Die gebundenen Moleküle können in einem zweiten Schritt von der Matrix gelöst und anderen analytischen Verfahren zugänglich gemacht werden. Neueste Veröffentlichungen kombinieren Immunoaffinitäts-Säulen z.B. mit massenspektrometischen Untersuchungen (Sauda et al., 2002).

Diese Art der Konzentrierung wurde z.B. auch für das Labdanditerpen Forskolin (Yanagihara et al., 1996, s. Abb. 4.5) und Ginsenoside (Putalun et al., 1999) durchgeführt. Die Antikörper auf der Immunoaffinitätssäule zeigten erst nach mehr als zehn aufeinander folgenden Adsorptions- und Desorptionszyklen einen Kapazitätsverlust (Tanaka et al., 1998).

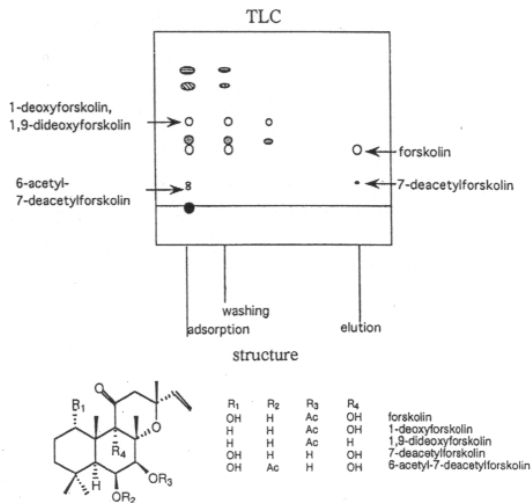


Abb. 4.5 Konzentrierung Forskolin-ähnlicher Substanzen aus einem Extrakt von *Coleus forskohlii* an einer Immunoaffinitäts-Säule. Die erste Bande zeigt die nicht adsorbierten Anteile des Extraktes, die mittleren Banden die verschiedenen Wasch-Schritte. Die gebundenen Zielstrukturen wurden durch Elution wieder freigegeben (Grafik aus Tanaka et al., 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper gegen Furanolabdanditerpene sollen in einem anderen zukünftigen Projekt für Reihenuntersuchungen von Arzneipflanzen auf die entsprechenden Zielstrukturen eingesetzt werden. Hierfür werden die Antikörper an einem porösen Körper (Kartusche) immobilisiert, der in eine Säulenhülse eingepasst werden kann. Die mit Antikörpern beladenen Immunoaffinitätssäulen können mobil eingesetzt werden. Für die Beladung mit Zielstrukturen sind keinerlei Vorarbeiten notwendig. Auf diese Weise können, z.B. im Atlantischen Bergregenwald Brasiliens (Kooperation mit V. Cechinel, Itajai, Brasilien), sogar Pflanzenpresssäfte durch die Kartusche gegeben werden. Durch die Bindung an den immobilisierten Antikörper werden die Zielstrukturen aus der Lösung filtriert und ggf. stabilisiert. Die Möglichkeit einer Artefaktbildung, wie sie bei längerer Aufarbeitung oder Lagerung von Extrakten häufig auftritt, wird auf diese Weise verringert. Ein qualitativer Nachweis der Belegung kann dann mit einer Farbreaktion direkt im Feld erfolgen. Die gebundenen Zielstrukturen können jedoch auch bis zur Analyse gelagert und erst dann von den Antikörpern eluiert werden.

4.2 Monoklonale Antikörper gegen pentacyclische Triterpene

4.2.1 Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Oleanolsäure

Die im Rahmen der Arbeiten mit den monoklonalen Antikörpern gegen Furanolabdanditerpene gewonnenen Erkenntnisse sollten nun auf eine zweite isoprenoide Struktur, ein Sapogenin, übertragen werden. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern soll dann ein einfaches Testsystem zur Gesamtbestimmung von Saponinen etabliert werden. Die bisher hierfür eingesetzten Methoden beruhen entweder auf relativ unspezifischen biologischen Effekten oder auf der Bestimmung von Einzelkomponenten. Als Zielstruktur wurde Oleanolsäure als „Muttersubstanz“ vieler Sapogenine vom Triterpen-Saponintyp eingesetzt. Für die Kopplung der Oleanolsäure an die Trägerproteine BSA und Thyroglobulin wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, wiederum ausgehend von der Tatsache, dass gegen diejenigen Teile des Zielmoleküls, die nicht in die Bindung an das Protein involviert sind, spezifische Antikörper resultieren (Ezan et al., 1987).

Zum einen wurde Oleanolsäure in Analogie zur Verfahrensweise mit Marrubiin über eine Hydroxygruppe (Kohlenstoffatom 3) mit Bernsteinsäure verestert. Über die zweite Carboxylgruppe der Bernsteinsäure wurde wiederum die Peptidbindung nach der „Methode des gemischten Anhydrids“ geknüpft (Erlanger, 1980). Bei der Durchführung dieser Reaktion wurde keine Schutzgruppe verwendet. Eine Bindung an das Protein ist daher grundsätzlich sowohl mit der Carboxylgruppe der Bernsteinsäure als auch mit Carboxyl-17 der Oleanolsäure selbst möglich. Aus sterischen Gesichtspunkten (s. Abb. 4.6) erscheint eine Bindung über die Carboxylgruppe des Succinat-„Spacers“ jedoch wahrscheinlicher. In einem zweiten Ansatz wurde Oleanolsäure direkt, ohne Verwendung von Bernsteinsäure, an das Protein gebunden.

Auf diese Weise wurden theoretisch zwei verschiedene Teile des Oleanolsäuremoleküls bei der Immunisierung an der Oberfläche des Konjugates präsentiert. Bei der Verknüpfung unter Zuhilfenahme des Succinat-„Spacers“ wurden besonders die eher Oleanolsäure-spezifischen Ringe D und E des pentazyklischen Systems erfasst. Wurde die Oleanolsäure unsubstituiert für die Kopplung eingesetzt, ragte eher der unspezifische Molekülteil mit den Ringen A und B aus dem Konjugat. Die Proteinkonjugate wurden so angelegt, dass die generierten Antikörper mit verschiedenen monodesmosidisch verknüpften Oleanolsäure-Derivaten der Triterpensaponine interagieren konnten.

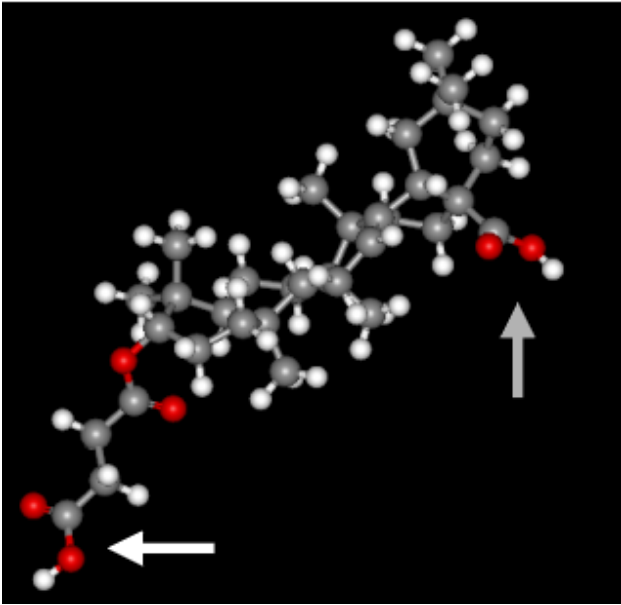


Abb. 4.6 Dreidimensionale Darstellung von Oleanylsuccinat. Die Struktur von Marrubenolsuccinat wurde mit Hilfe der Software Cerius II auf ein energetisches Minimum gerechnet. Die wiedergegebene Struktur gibt nur eine grobe Näherung wieder. Sie ist jedoch mit der von Yang et al. (1997) veröffentlichten Kristallstruktur vergleichbar. Beide Carboxylgruppen des Moleküls (weiß die Carboxylgruppe des Succinat-„Spacers“, grau die Carboxylgruppe der Oleanolsäure) wurden mit Pfeilen markiert.

Die synthetisierten Proteinkonjugate wurden mit Hilfe der Gel-Elektrophorese und MALDI-TOF charakterisiert. Die Bindungsrate betrug für das eingesetzte Oleanolsäure-BSA-Konjugat 2,3 bzw. 3,5 : 1 (Oleanolsäure : BSA) und für das Oleanylsuccinat-Konjugat 7,3 : 1 (Oleanylsuccinat : BSA). Diese Daten stimmen mit den Abschätzungen aus der Proteintrennung mittels SDS-PAGE überein. Für die Immunisierung wurden die jeweiligen Thyroglobulin-Konjugate eingesetzt, deren Belegungsraten aus den Erfahrungen mit der Charakterisierung der Konjugate zur Basis von Marrubenolsuccinat heraus höher belegt waren als die entsprechenden BSA-Konjugate.

Landsteiner et al. (1945) ermittelten, damals bezogen auf die Gewinnung polyklonaler Seren, eine optimale Belegungsrate von 10 Zielmolekülen für BSA, Klaus et al. (1974) erzielten bereits mit 5 Zielmolekülen gute Ergebnisse. Nach Erlanger (1973) ist eine Immunreaktion schon gegen ein Proteinkonjugat mit nur einem einzigen Zielmolekül pro Trägermolekül möglich. Die passende Immunreaktion ist jedoch seltener. Ebenso ist eine maximale Belegungsrate des Proteins denkbar, oberhalb derer sich die Epitope der gegengerichteten Antikörper unter Umständen über Teilbereiche zweier Zielmoleküle erstrecken. In einer späteren Publikation nennt Erlanger (1980) ein Intervall von 8 bis 25 Zielmolekülen pro Trägermolekül, innerhalb dessen ein guter Antikörpertiter und somit eine optimale Ausgangsbasis für die Generierung monoklonaler Antikörper gewährleistet ist. Obwohl die Belegungsrate besonders bei dem Konjugat auf der Basis von Oleanolsäure in dieser Arbeit mit 2,3 : 1 deutlich niedriger lag als in den meisten oben genannten Veröffentlichungen gefordert, gelang die Immunisierung.

Die Konjugate sind in PBS schlecht löslich. Nach Erlanger (1980) ist auch eine Immunisierung mit unlöslichen Konjugaten möglich. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde je eine Maus mit dem löslichen und dem unlöslichen Oleanolsäure- bzw. Oleanylsuccinat immunisiert. Die Aktivität des polyklonalen Serums war bei Verwendung von löslichem wie unlöslichem Konjugat etwa gleich hoch. Mit den Zellen von drei der vier immunisierten Tiere wurden bislang monoklonale Antikörper nach den Methoden von Köhler und Milstein (1975) hergestellt. Die Immunisierung mit Oleanolsäure-THY-Konjugat führte zu insgesamt 35 verschiedenen Zell-Linien mit einer Aktivität gegen Oleanolsäure-BSA-Konjugat. Nur acht dieser Linien stammten aus der Immunisierung mit dem unlöslichen Konjugat-Teil. Unter diesen Linien fiel allerdings 10F10 durch eine besonders hohe Bindung an das Oleanolsäure-BSA-Konjugat auf.

Im Rahmen der Immunisierung mit Oleanylsuccinat konnten sieben Zell-Linien etabliert werden, die eine Aktivität gegen das Oleanylsuccinat-Konjugat zeigten, darunter drei (3H10, 6C2 und 7A6) mit einer hohen Aktivität im ELISA.

Alle vier Zell-Linien wurden mit Hilfe der Checkerpoint-Titration und einem kompetitiven ELISA mit Oleanolsäure untersucht. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Antikörper ein Epitop erkennen, das in beiden Konjugaten vorhanden ist. Möglicherweise ist ein Teil des Oleanylsuccinats im Proteinkonjugat über C-28 gebunden und der Bernsteinsäuresubstituent wird unter den Bedingungen des ELISA abgespalten. Möglicherweise sind die Antikörper jedoch auch gegen ein Hapten gerichtet, das in beiden Konjugaten präsentiert wird. Oleanolsäure konnte im kompetitiven ELISA mit den Antikörpern der Zell-Linien 10F10 und 7A6 bis zu einer Konzentration von 100 pmol / 100 µl nachgewiesen werden. Ab 200 pmol / 100 µl zeigten die Antikörper der Zell-Linie 6C2 Konkurrenz.

Die für die weitere Untersuchung verwendeten Kompetitoren besitzen eine z.T. sehr schlechte Wasserlöslichkeit. Daher war die Gegenwart eines organischen Lösungsmittels im Inkubationsansatz unumgänglich. Methanol erwies sich in den Untersuchungen als das Lösungsmittel, das der Reaktionsfähigkeit der Antikörper am wenigsten schadete. Tanaka et al. (1996) verwendeten ebenfalls Methanol bis zu einer Konzentration von 10%.

Die Antikörper der Zell-Linie 10F10 wurden im kompetitiven ELISA auf eine Konkurrenz mit 22 verschiedenen Triterpenen untersucht. Wie erwartet fokussieren die Antikörper der Zell-Linie aus der Immunisierung mit Oleanolsäure die Ringe A und B des pentazyklischen Moleküls. Nach den vorliegenden Daten müssen die Ringe A und B *trans* verknüpft vorliegen, weiter sind die Hydroxygruppe in Position 3 des Moleküls sowie die zwei Methylgruppen an Position 4 für eine Bindung notwendig. Steroide, denen diese Methylgruppen fehlen, zeigten keine Konkurrenz. Die Hydroxygruppe kann mit Essigsäure verestert sein, glykosidische Substituenten verhindern jedoch anscheinend eine Bindung. Eine weitere Hydroxygruppe in Position 2 störte die Konkurrenz dagegen nicht. Die 11-Ketofunktion der Glycyrrhetinsäure beeinträchtigte die Bindung (s. Abb. 4.7).

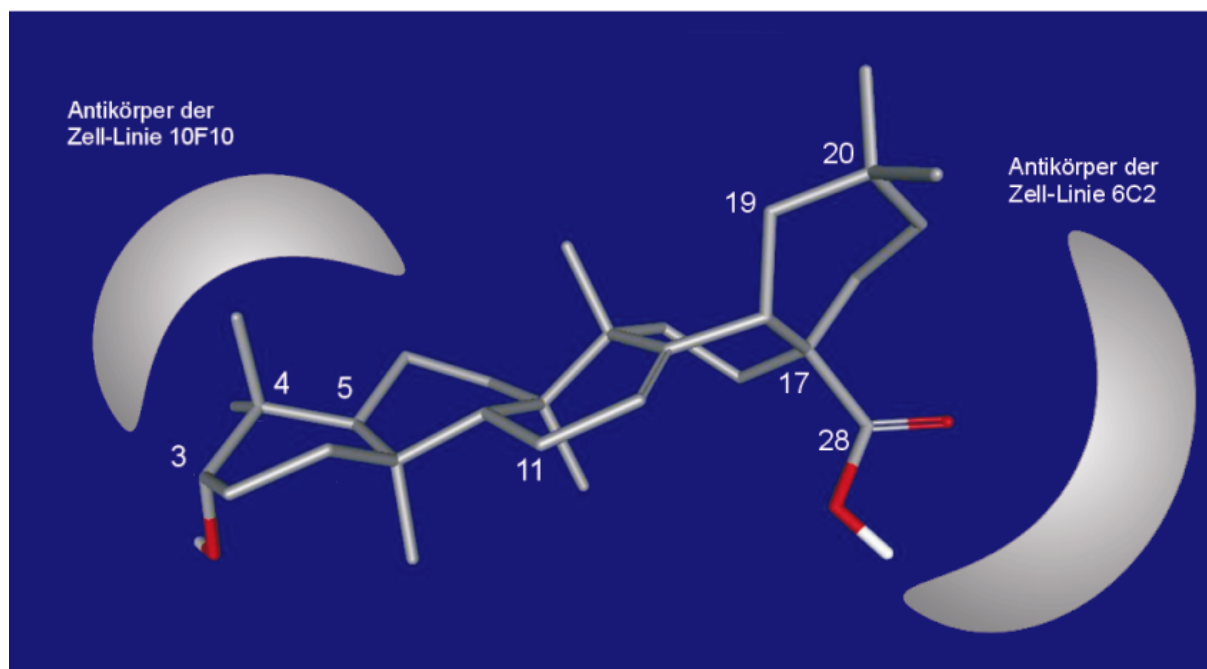


Abb. 4.7 Konkurrenz der monoklonalen Antikörper der Zell-Linien 10F10 und 6C2 am Beispiel der Oleanolsäure. Die Struktur von Oleanolsäure wurde mit Hilfe des Programms Cerius II auf ein energetisches Minimum gerechnet. Dargestellt ist nur das Kohlenstoffskelett des Moleküls mit den funktionellen Gruppen.

Die Antikörper der Zell-Linie 6C2 erkennen ein Epitop, das (s. Abb. 4.2.1.2, rechts) hauptsächlich den Ring E umfasst. Die Carboxyposition (28 an 17) ist für die Bindung essentiell, der korrespondierende Alkohol Erythrodiol wird bereits nicht mehr erkannt. Auch eine Verschiebung einer der Methylgruppen von Position 20 nach 19 wie bei Ursolsäure führt bereits zu einer Beeinträchtigung der Bindung.

Die Charakterisierung der Antikörper der Zell-Linie 7A6 ist noch nicht abgeschlossen. Die Immunglobuline binden an so unterschiedliche Kompetitoren wie Oleanolsäure, Cholesterol und β -Sitosterol, nicht aber an Erythrodiol. Diese Kompetitoren unterscheiden sich grundlegend, hauptsächlich in den Ringen D und E, so dass die Bindung wahrscheinlich den mittleren bis unteren Molekülteil mit den Ringen A und B umfasst. Eine Möglichkeit der Charakterisierung der Antikörper dieser Zell-Linie wäre die Kombination von weiteren Antikörpern, die sich in den Ringen A bis D geringfügiger unterscheiden, mit den Möglichkeiten des molecular modelling, wie sie bereits von Got et al. (1997) zur Aufklärung von Epitopen eingesetzt wurden.

Die Antikörper der Zell-Linie 6C2 entsprechen damit den theoretischen Überlegungen, die bei der Synthese des Proteinkonjugates getroffen worden waren. Durch die Verwendung des Succinat-„Spacers“ wurde der obere Molekülteil mit den Ringen D und E an der Oberfläche des Konjugates dem Immunsystem präsentiert. Die Antikörper aus 6C2 binden in genau diesem Bereich; anders bei der direkten Kopplung der Oleanolsäure, bei der besonders die Ringe A und B aus dem Konjugat herausragten. Folgerichtig wurden mit der Zell-Linie 10F10 Antikörper gegen ein Epitop in diesem Bereich etabliert.

4.2.2 Monoklonale Antikörper gegen Triterpene

Die Zahl der Triterpene, die als Zielstrukturen zur Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gewählt wurden, ist im Vergleich zu den Diterpenen, bei denen Forskolin das einzige Beispiel bietet, groß (s. Abb. 4.8):

Gegen Glycyrrhetinsäure, die sich von Oleanolsäure nur durch die Stellung des Carboxyls (C-30 anstelle C-28) und eine zusätzliche Keto-Funktion an C-11 unterscheidet, wurden bereits von Tanaka et al. (1998) mehrere Zell-Linien monoklonaler Antikörper etabliert. Die Autoren verwendeten zur Darstellung des Proteinkonjugates Glycyrrhizin, das 2- β -Glucuronido- α -Glucuronid der Glycyrrhetinsäure. Die Triterpene wurden über die Glucuronsäure-Anteile gebunden, die dadurch ähnlich wie Bernsteinsäure als „Spacer“ fungierten. Die Antikörper der dargestellten Zell-Linien zeigten nur in sehr geringem Maße Konkurrenz mit anderen Triterpenen und deren Derivaten, so z.B. mit Glycyrrhetinsäure, 11-Deoxo-18 β -glycyrrhetinsäure und Deoxycholsäure. Es wurde gezeigt, dass Oleanolsäure, Ursolsäure und verschiedene weitere Saponine und Sterole nicht kompetieren.

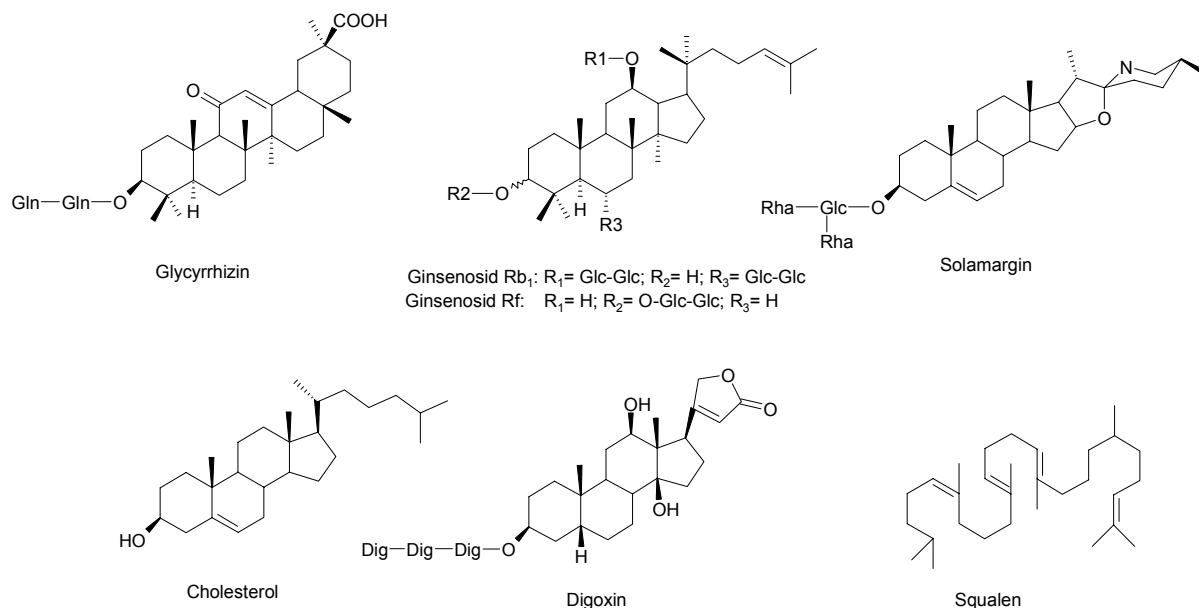


Abb. 4.8 Zielstrukturen für die Generierung monoklonaler Antikörper gegen Triterpene. Die Saponine wurden jeweils über die Glykoside an Proteinträger konjugiert. „Dig“ entspricht Digitoxose, „Glc“ Glucose, „Gln“ Glucuronsäure und „Rha“ Rhamnose.

Aus der Arbeitsgruppe um Shoyama, die sich mit der Generierung monoklonaler Antikörper gegen Naturstoffe beschäftigt, stammen auch monoklonale Antikörper gegen Ginsenosid Rb₁ (ein Bidesmosid des Protopanaxadiols) (Tanaka et al., 1999) und Solamargin (3-O- β -Chacotriosylsolasodin, ein Steroidsaponin aus *Solanum*) (Ishiyama et al., 1996). Auch bei diesen beiden Saponinen wurde der Glykosid-Anteil als Kopplungspartner für die Bildung des Proteinkonjugates genutzt. Die Bindung kann bei den Antikörpern gegen Ginsenosid Rb₁ auf diese Weise über beide Zuckeranteile erfolgen; sie wird jedoch nicht genauer bestimmt (Fukuda et al., 1999). Eine Charakterisierung des vom Antikörper fokussierten Epitopes findet in diesen Arbeiten nur in Form eines „Negativbeweises“ statt. Eine Kreuzreaktion der Antikörper mit anderen Ginsenosiden sowie Oleanolsäure, Ursolsäure, β -Sitosterol, Glycyrrhizin, Cholesterol etc. (insgesamt 18 Kompetitoren) wird ausgeschlossen (Tanaka et al., 1999).

Nah et al. (2000) wählten Ginsenosid Rf als Zielmolekül. Dieses Glycosid des Betulafolientriols ist ein Monodesmosid. Die Bindung wurde daher über die einzige verfügbare Seitenkette geknüpft. Die Autoren verglichen die Bindungsaffinität der Antikörper gegen Ginsenosid Rf nur mit der an sechs andere Ginsenoside.

Monoklonale Antikörper gegen Digoxin wurden von Kehayov et al. (1990) ebenfalls durch ein BSA-Konjugat dargestellt, bei dem die Bindung des Zielmoleküls an den Proteinträger über die Digitoxose-Komponenten des Herzglykosids geknüpft wurde. Die resultierenden 21 Zell-Linien wurden mit 25 Kompetitoren untersucht. Auch Zalcborg et al. (1983) verwendeten die Zuckerkomponente zur Bindung an HSA. Die Spezifität der Antikörper wurde von den Autoren jedoch nur mit Spironolacton, Testosteron und Cortison untersucht. Auch Antikörper gegen das acyklische Triterpen Squalen wurden bereits etabliert (Matyas et al., 2000).

IgG gegen Cholesterol konnten genuin in verschiedenen Säugetieren nachgewiesen werden. In einer Studie mit 742 freiwilligen Probanden wiesen sämtliche Serumproben Antikörper gegen Cholesterol auf (Alving et al., 1999). Entsprechend einfach sind monoklonale Antikörper nach der Injektion von mit Cholesterol beladenen Liposomen darstellbar (Alving et al., 1991).

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten monoklonalen Antikörper bilden eine gute Ergänzung zu den bislang verwendeten Zielstrukturen. Mit Hilfe der Antikörper der Zell-Linie 10F10, die gegen den basalen Teil des Moleküls gerichtet ist, können erstmals Triterpen-Sapogenine vom Oleanol-Typ verschiedener Genese nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion zu Sterolen besteht nicht. Die Zell-Linie 6C2 liefert zusätzlich Antikörper, die relativ spezifisch auf das Oleanolsäure-Molekül gerichtet erscheinen.

4.2.3 Anwendung der monoklonalen Antikörper gegen Triterpene

Ziel der Darstellung monoklonaler Antikörper war es, ein Werkzeug zu gewinnen, mit dessen Hilfe eine quantitative Bestimmung von Saponingemischen möglich wird. Hierfür wurden zunächst, wie bereits mit den Antikörpern gegen Furanolabdanditerpene, Untersuchungen mit Extrakten verschiedener saponinhaltiger Arzneipflanzen durchgeführt. Die Antikörper der derzeit empfindlichsten Zell-Linie 10F10 wurden mit verschiedenen Saponin- bzw. triterpenhaltigen Dekokten (= unter Kochen mit Ethanol hergestellte Extrakte, s. Abschnitt 2.3.3) vorinkubiert. Die Oleanolsäureanaloga in *Betulae herba*, *Quillaia radix*, *Saponariae radix*, *Hederae herba*, *Hippocastani fructus*, *Primulae radix*, *Polygala radix*, *Liquiritiae radix* und *Crataegi fructus* konnten konzentrationsabhängig detektiert werden. Den Steroidsaponinen aus *Sarsapilli radix* fehlen funktionelle Gruppen, die für die Bindung der Antikörper an das Hapten notwendig sind. Sie werden dementsprechend nicht gebunden und zeigen keine Kompetition (s. Abschnitt 3.2.4.3).

Die Sensitivität des Assays ist mit einer Nachweisgrenze von 100 pmol Oleanolsäure bei 5 µl Zellkultur-Überstand im Vergleich zu anderen Autoren nicht sehr hoch. Sakata et al. (1994) wiesen Forskolin bis zu einer Konzentration von 2,4 pmol nach. Nah et al. (2000) zeigten eine noch höhere Empfindlichkeit (0,25 pmol) für Ginsenosid Rb₁.

Die Empfindlichkeit des kompetitiven ELISA gegen Oleanolsäurederivate kann aber durchaus noch gesteigert werden:

Das im ELISA verwendete immobilisierte Proteinkonjugat war mit einer Belegungsrate von 2,3 : 1 (Oleanolsäure : BSA) nur wenig mit Oleanolsäure belegt. Das von Sakata et al. (1994) verwendete 7-Deacetyl-Forskolin-7-hemisuccinyl-BSA-Konjugat lag dagegen mit einer Rate von 10 : 1 (Forskolinderivat : BSA) deutlich höher, ebenso wie die Rate im Ginsenosid Rf-Assay (60 : 1, Ginsenosid Rf : BSA).

Im Assay wurden zwar mit 0,8 µg Proteinkonjugat pro Vertiefung deutlich höhere Konzentrationen als in den beiden Vergleichsassays (je 0,01 µg) eingesetzt, die tatsächlich immobilisierte Menge an Proteinkonjugat ist jedoch deutlich geringer. Dadurch wird die tatsächliche Sensitivität der Antikörper nur bedingt vergleichbar. Die Synthese eines Proteinkonjugates mit einer höheren Belegungsrate an Oleanolsäure würde die Sensitivität des ELISA deutlich erhöhen. In Analogie der Proteinkonjugate gegen die Saponine Ginsenosid Rf und Rb₁ sowie Solamargin könnte ein Monodesmosid der Oleanolsäure als Ausgangsprodukt für die Synthese dienen.

Der kompetitive ELISA gestattet die Untersuchung von wässrigen Lösungen ohne aufwändige Probenvorbereitung. Er wird routinemäßig zur Bestimmung zahlloser Antigene eingesetzt. Eines der zukünftigen Anwendungsgebiete der monoklonalen Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurden, ist ein „medium“- bis „high-throughput“-Screening von Pflanzenextrakten auf die entsprechenden Zielstrukturen. Da die Proteinkonjugate auf der Basis von Oleanolsäure im Gegensatz zu denen gegen Marrubiin stabil sind, ist eine quantitative Bestimmung, wenn auch noch nicht im optimalen Konzentrationsbereich, bereits mit diesem kompetitiven ELISA-System schnell und kostengünstig möglich.

Die Antikörper, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurden, sind besonders zur Bestimmung von Sapogeninen, nicht immer aber zur Bestimmung von Saponinen geeignet. Die gegebenenfalls vorhandenen Zuckerketten stören den Nachweis, wie für die Antikörper der Zell-Linie 10F10 mit Triterpenen aus *R. fluitans* gezeigt wurde. Gegebenenfalls ist daher eine Hydrolyse vor der Bestimmung der Triterpene notwendig. Monodesmoside der Oleanolsäure werden jedoch von einem der beiden Antikörper gebunden, die an räumlich entgegengesetzten Teilen des Moleküls angreifen.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit bieten die im Rahmen der Anwendung monoklonaler Antikörper gegen Furanolabdanditerpene vorgestellten Immunoaffinitäts-Säulen (s. Abschnitt 4.1.2). Sie können ein System zur Konzentrierung und Konservierung von Zielstrukturen ebenso wie zur raschen Detektion und apparativ wenig aufwändiger Bestimmung bieten.

Die Arbeiten anderer Autoren zur Generierung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Triterpene sind, ebenso wie die gegen fast alle Naturstoffe (s. Tab. 1.1) unter einer ähnlichen Prämisse zu sehen. Ziel all dieser Arbeiten war es, eine Zell-Linie zu etablieren, mit deren Antikörpern eine präzise Charakterisierung der eingesetzten Zielstruktur möglich war. So bleibt auch die Anwendung der mit großem Aufwand hergestellten Antikörper auf wenige Möglichkeiten beschränkt. Dabei vernachlässigen die meisten Autoren die Möglichkeit, Antikörper zu nutzen, die zwar nicht ausschließlich an eine Zielstruktur binden, aber gerade dadurch einen viel universelleren Nutzen haben können. So können beispielsweise die im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörper der Zell-Linie 10F10 für die Detektion verschiedenster Sapogenine eingesetzt werden. Die etwas geringere Spezifität macht sie zu einem wertvollen analytischen Werkzeug, mit dem im Rahmen eines Saponin-Tests Untersuchungen mit einer großen Zahl saponinhaltigen Arzneipflanzen und deren Zubereitungen durchgeführt werden können.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation umfasst die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen zwei Isoprenoide: Marrubiin aus *Marrubium vulgare* L. und Oleanolsäure. Beide Moleküle wurden zum ersten Mal als Zielstrukturen verwendet.

A) Marrubiin

1. Marrubiin wurde aus *Marrubium vulgare* L. in präparativem Maßstab extrahiert und gereinigt. Das Terpen wurde zu Marrubenolsuccinat derivatisiert.
2. Marrubenolsuccinat wurde an verschiedene Proteinträger gekoppelt. Die resultierenden Proteinkonjugate wurden nach verschiedenen Methoden (DC, Radiolabelling, SDS-PAGE und MALDI-TOF) charakterisiert. Die verschiedenen Methoden wurden miteinander kombiniert und eine Belegungsrate von 5:1 bzw. 25:1 (Marrubenolsuccinat : BSA bzw. Thyroglobulin) ermittelt.
3. In zwei Immunisierungen mit dem Marrubenol-BSA-Konjugat wurden insgesamt 46 Hybridoma-Zell-Linien und Subklone erzeugt, die eine Bindung an Marrubenolsuccinat-Thyroglobulin-Konjugat zeigten. Fünf dieser Zell-Linien wurden in Checkerpoint-Titration und kompetitivem ELISA untersucht. Mit Hilfe der Antikörper der Zell-Linie 6A1 konnte Marrubiin bis zu einer Konzentration von 0,75 nmol / 100 µl nachgewiesen werden.
4. Die Antikörper der Zell-Linien 6A1 sind gegen 3-substituierte Furanringe gerichtet. Die Immunglobuline der Zell-Linie 1C1C11 erkennen ein ähnliches Epitop. Antikörper von 5F2 zeigten Konkurrenz mit der zur Derivatisierung verwendeten Bernsteinsäure. 9C1C8 und 6C5 enthalten Antikörper, die vermutlich gegen einen Teil des Labdan-Bicyclus gerichtet sind.

B) Oleanolsäure

1. Oleanolsäure wurde zur Präsentation unterschiedlicher Teile des Moleküls zum einen direkt über die 28-Carboxy-Funktion, zum anderen nach Succinylierung der 3-Hydroxygruppe an Trägerproteine gekoppelt. Die resultierenden BSA-Konjugate wurden mit Hilfe von MALDI-TOF charakterisiert und wiesen eine Bindungsrate von 2,3 bzw. 7,3 : 1 (Oleanolsäure bzw. Oleanylsuccinat : BSA) auf.
2. In insgesamt 4 Immunisierungen wurden bislang 35 Zell-Linien in zwei Immunisierungen mit dem Oleanolsäure-Thyroglobulin-Konjugat und sieben Zell-Linien in einer Immunisierung mit Oleanylsuccinat-Konjugat etabliert. Aus diesen wurden sechs Zell-Linien zur Checkerpoint-Titration, davon drei zur Bestimmung des erkannten Epitopes im kompetitiven ELISA ausgewählt.
3. Antikörper der Zell-Linie 10F10 wurden mit 22 verschiedenen Kompetitoren untersucht. Die Antikörper aus der Immunisierung mit Oleanolsäure-Konjugat erkennen ein definiertes Epitop im Bereich der Ringe A und B. Oleanolsäure wurde mit 5 µl Zell-Kulturüberstand bis zu einer Konzentration von 100 pmol / 100 µl nachgewiesen. Die Antikörper der Zell-Linie 6C2 fokussieren die Ringe D und E des Moleküls zusammen mit der Carboxyfunktion (C-28 an C-17). Die Zeilstruktur der Antikörper der Zell-Linie 7A6 ist noch nicht enau bekannt, liegt aber wahrscheinlich im Bereich der Ringe A und B.
4. In einem kompetitiven ELISA wurde die Anwendung der monoklonalen Antikörper der Zell-Linie 10F10 mit verschiedenen Tee-Zubereitungen Saponin- bzw. Oleanolsäure-haltiger Pflanzen untersucht. Die Antikörper kompetierten konzentrationsabhängig mit den in den Extrakten enthaltenen Zielstrukturen.

6 Literatur

1. Adam, K.P., Becker, H.
Analytik biogener Arzneistoffe, Pharmazeutische Biologie, Band 4
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2000
2. Ainsworth, N.
Potential for Integrated Control of Horehound *Marrubium vulgare* L. by the Plume Moth *Wheeleria spilodactylus* (Curtis) and 2,4-D
Biocon. Sci. Tech. 1999, **9**, 355-364
3. Albarghouthi, M., Fara, D.A., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalka, K., Badwan, A.
Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads.
Int J. Pharm. 2000, **206**, 23-34
4. Altincicek, B., Kollas, A.-K., Eberl, M., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Hintz, M., Beck, E., Jomaa, H.
LytB, a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*.
FEBS Letters 2001, **499**, 37-40
5. Altincicek, B., Kollas, A.-K., Sanderbrand, S., Wiesner, J., Hintz, M., Beck, E., Jomaa, H.
GcpE Is Involved in the 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in *Escherichia coli*.
J. Bact. 2001, **183**, 2411-2416
6. Alving, C.R., Swartz, G.M.
Antibodies to Cholesterol Conjugates, and Liposomes: Implications for Atherosclerosis and Autoimmunity.
Crit. Rev. Immunol. 1991, **10**, 441-453
7. Alving, C.R., Wassef, N.M.
Naturally occurring antibodies to cholesterol: a new theory of LDL cholesterol metabolism.
Immunology today 1999, **20**, 362-366
8. Anigolou, J., Swartz, G.M., Dijkstra, J., Madsen, J.W., Raney, J.J., Green, S.J.
Analysis of anticholesterol antibodies using hydrophobic membranes.
J. of Immunol. Meth. 1995, **182**, 85-92
9. Appleton, J.W., Fulke, J.W.B., Henderson, M.S., McCrindle, R.
The stereochemistry of Marrubiin.
J. Chem. Soc. (C) 1967, 1943-1947
10. Aragay, A.M., Ruiz-Gomez, A., Penela, P., Sarnago, S., Elorza, A., Jimenez-Sainz, M.C., Mayor, F.
G Protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions.
FEBS Letters 1998, **430**, 37-40
11. Bader, G.
Pharmakologische und biopharmazeutische Bewertung von Triterpensaponinen
Pharmazie 1994, **49**, 391-400

12. Ballero, M., Sotgiu, A.M., Piu, G.
Empirical administration of preparations of *Marrubium vulgare* in the asthmatic syndrome
Biomed. Lett. 1998, **57**, 31-36
13. Bartos, F., Olsen, G.D., Leger, R.N., Bartos, D.
Stereospecific antibodies to methadone. I. Radioimmunoassay of d,l-methadone in human serum.
Res. Commun.Chem.Pathol.Pharmacol. 1977, **16**, 131-43
14. Benedum, J., Loew, D., Schilcher, H.
Arzneipflanzen in der Traditionellen Medizin
Kooperation Phytopharmaka Bonn 1994
15. Besson, J.-M., Chaouch, A.
Peripheral and Spinal Mechanisms of Nociception
Phys. Rev. 1987, **67**, 67-186
16. Boissonnas, R.A., Preitner, G.
Etude comparative des la scission de divers groupes de blocage de la fonction α -amino des acides aminés.
Helv. Chim. Acta 1951, **34**, 874-885
17. Bradford, M.M.
A Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding
Anal. Biochem. 1976, **72**, 248-254
18. Brand, K., Schlüter, W., Schlemper, V., Cechinel-Filho, V., Knöss, W.
Furanic labdane diterpenes from *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) - investigation of analgesic effects
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 1999, **331 S1**, 54
19. Brand, K., Zampirolo, J., Schlemper, V., Cechinel-Vilho, V. , Knöss, W.
Antinociceptive effect of furanic labdane diterpenes
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 1999, **331 S2** , 6
20. Brand, K., Zündorf, I., Dinger mann, T., Knöss, W.
Monoclonal Antibodies: Tools in Isoprenoid research
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 2001, **334 S2**, 30
21. Buckingham, J
Dictionary of Natural Products on CD-ROM Vers. 6.1
Chapman & Hall London 1998
22. Burn, D., Rigby, W.
Marrubiin. Part 2. Correlation with Ambreinolide
J. chem soc. 1957, 2964-2974
23. Cambrosio, A., Keating, P.
Exquisite Specificity – the monoclonal antibody revolution
University press Oxford 1995

-
24. Carvalho, L.M., Seita, J.
A New Oleanolic Acid Derivative from *Securinega tinctoria*
Planta Med. **1993**, *59*, 369-372
 25. Cechinel Filho, V., Corrêa, R., Vaz, Z., Calixto, J. B., Nunes, R.J., Pinheiro, T.R., Andricopulo, A.D., Yunes, R.,A.
Further studies on analgesic activity of cyclic imides.
Il Pharmaco 1998, **53**, 55-57
 26. Childs, R.E., Bardsley, W.G.
The steady-state of peroxidase with 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen
Biochem. J. 1975, **145**, 93-103
 27. Collier, H. D. J., Dinnin, L. C., Johnson, C. A., Schneider, C.
The abdominal response and its supression by analgesic drugs in the mouse.
Br. J. Pharmacol. 1968, **32**, 295-310
 28. Crowther, J.R.
Methods in Molecular Biology 42: ELISA – Therory and Practice
Humana Press Totowa, New Jersey 1995
 29. Diener, U., Knoll, E., Wisser, H.
Preparation of Antibodies to Catecholamines and Metabolites – Syntheses of Various Immunogenes and Charaterization of the resulting Antibodies.
Clin. Chim.. Acta 1981, **109**, 1-11
 30. Dingermann, T.
Gentechnik Biotechnik
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 1999
 31. Dixon, W.R., Young, R.L., Ning, R., Liebman, A.
Radioimmunoassay of the Anticonvulsant Agent Clonazepam
J. Pharm. Sci. 1977, **66**, 235-237
 32. Edmond Rouan, S.K., Otterness, I.G., Cunningham, A.C., Rhodes, C.T.
Specific, High Affinity Colchicine Binding Monoclonal Antibodies: Development and Characterization of the Antibodies.
Hybridoma 1989, **8**, 435-448
 33. Ehrlich, P.
Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung.
Hirschwald Verlag Berlin 1904
 34. Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A.
Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids.
Trends Plant Sci. 2001, **6**, 78-84
 35. Elias, R., Diaz Lanza, A.M., Vidal-Ollivier, E., Balansard, G.
Triterpenoid saponins from the leaves of *Hedera helix*
J. nat. Prod. 1991, *54*, 98-103

36. Engvall, E., Perlmann, P.
Enzyme-Linked immunosorbent Assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G
Immunochemistry 1971, **8**, 871-874
37. Erlanger, B.F.
Principles and Methods for the Preparation of Drug Protein Conjugates for Immunological Studies
Pharmacol. rev. 1973, **25**, 271-291
38. Erlanger, B.F.
The Preparation of Antigenic Hapten-Carrier Conjugates: A Survey
Methods in Enzymology 1980, **70**, 85-104
39. Estrada, A., Katselis, G.S., Laarveld, B., Barl, B.
Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of *Polygala senega* L.
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 2000, **23**, 15-26
40. Ey, P.L., Prowse, S.J., Jenkin, C.R.
Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b Immunoglobulins from Mouse Serum using Protein A-Sepharose
Immunochemistry 1978, **15**, 429-436
41. Ezan, E., Mamas, C., Rougeot, C., Ray, D.
Strategies for developing specific and sensitive hapten radioimmunoassays.
In: Handbook of Experimental Pharmacology
Springer Verlag Berlin 1987
42. Farina, C., Pinza, M., Pifferi, G.
Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids
Il Farmaco 1998, **53**, 22-32
43. Fischer, F.G., Seiler, N.
Die Triterpenalkohole der Birkenblätter
Liebigs Ann. Chem. 1961, **644**, 146-162
44. Fukuda, N., Tanaka, H., Shoyama, Y.
Western Blotting for Ginseng Saponins, Ginsenoides Using Anti-ginsenoide Rb1 Monoclonal Antibody
Biol. Pharm. Bull. 1999, **22**, 219-220
45. Fulke, J.W.B., Henderson, M.S., McCrindle, R.
Some Reactions of the Diterpene Marrubiin and its Congeners
J. Chem. Soc. 1968, 807-810
46. Gabor, F., Hamilton, G., Pittner, F.
Drug-Protein Conjugates: Haptenation of 1-Methyl-10 α -methoxydihydrosergol and 5-Bromonicotinic Acid to Albumin for the Production of Epitope-Specific Monoclonal Antibodies against Nicergoline.
J. Pharm. Sci. 1995, **84**, 1120-1125
47. Gendloff, E.H., Casale, W.L., Ram, B.P., Tai, J.H., Pestka, J.J., Hart, L.P.
Hapten-Protein conjugates prepared by the mixed anhydride method
J.f Immuno. Meth. 1986, **92**, 15-20

-
48. Glasel, J.A., Bradbury, W.M., Venn, R.F.
Properties of Anti-Morphine Antibodies
Mol. Immunol. 1983, **20**, 1419-1422
 49. Gordin, H.M.
Marrubiin
J. Am. Chem. Soc. 1908, **30**, 265-268
 50. Got, P.A., Scherrmann, J.-M.
Stereoselectivity of Antibodies for the Bioanalysis of Chiral Drugs.
Pharm.l Res. 1997, **14**, 1516-1523
 51. Gourlaouën, N., Bolbach, G., Florentin, D., Gonnet, F., Marquet, A.
Characterization of protein-hapten conjugates by mass spectrometry
Bioorg. Med.. Chem. 1998, **1 (II)**, 35-40
 52. Grothaus, P.G., Bignami, G.S., O'Malley, S., Harada, K.E., Byrnes, J.B., Waller, D.F., Raybould, T.J., McGuire, M.T., Alvarado, B.
Taxane-specific monoclonal antibodies: measurement of taxol, baccatin III, and "total taxanes" in *Taxus brevifolia* extracts by enzyme immunoassay.
J. Nat. Prod. 1995, **58**, 1003-14.
 53. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis
Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G.
Springer Verlag Berlin 1993
 54. Hames, B.D., Rickwood, D.
Gel Electrophoresis of Proteins: a Practical approach
IRL Press Oxford 1990
 55. Hardy, D.G., Rigby, W., Moody, D.P.
Marrubiin. Part 1. Oxidation Products
J. chem soc. 1957, 2955-2964
 56. Higuchi, R., Komori, T.
Structures of Compounds derived from the Acy Moieties of Quillajasaponin
Phytochemistry 1987, **26**, 2357-2360
 57. Higuchi, R., Tokimitsu, Y., Komori, T.
An acylated triterpenoid saponin from *Quillaia saponaria*
Phytochemistry 1988, **27**, 1165-1168
 58. Holtzapple, C.K., Carlin, R.J., Rose, B.G., Kubena, L.F., Stankler, L.H.
Characterization of monoclonal antibodies to aflatoxin M1 and molecular modeling studies of related Aflatoxins.
Mol. Immunol. 1996, **33**, 939-946
 59. Ishiyama, M., Shoyama, Y., Murakami, H., Shinohara, H.
Production of monoclonal antibodies development of an ELISA for solamargine
Cytotechnology 1996, **18**, 153-158

60. Jaffe, B.M., Newton, W.T., McGiugan, J.E.
The effect of carriers on the production of antibodies to the gastrin tetrapeptide.
Immunochemistry 1970, **7**, 715-25
61. Kashiwada, Y., Wang, H.-K., Nagao, T., Kitanaka, S., Yasuda, I., Fujioka, T., Yamagisi, T., Cosentino, L.M., Kozuka, M., Okabe, H., Ikeshiro, Y., Hu, C.-Q., Lee, K.-H.
Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV Activity of Oleanolic acid, Pomolic acid and Structurally Related Triterpenoids.
J. nat. prod. 1998, **61**, 1090-1095
62. Kehayov, I.R., Tyutyulkova, S.N., Lolov, S., Kyurkchiev, S.D.
Generation of Monoclonal Anti-Digoxin Antibodies
Hybridoma 1990, **9**, 493-509
63. Kemeny, D.M.
ELISA – Anwendung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor
Gustav Fischer Stuttgart 1994
64. Kim, N.-C., Desjardins, A.E., Wu, C.D., Kinghorn, A.D.
Activity of Triterpenoid Glycosides from the Root Bark of *Mussadena macrophylla* against Two Oral Pathogens
J. Nat. Prod. 1999, **62**, 1379-1384
65. Klause, G.G.B., Cross, A.M.
The Influence of Epitope Density on the Immunological Properties of Hapten-Protein Conjugates
1. Characteristics of the Immune response to Hapten-Coupled Albumen with Varying Epitope Density
Cell. Immunol. 1974, **14**, 226-241
66. Knöss, W.
Bildung der Furanolabdanditerpene in *L. cardiaca* L. und *M. vulgare* L.
Habilitationsschrift Bonn 1996
67. Knöss, W.
Terpenbiosynthese in Bakterien und Pflanzen – neue Perspektiven
Pharmazie in unserer Zeit 1999, **28**, 247-254
68. Knöss, W., Reuter, B., Zapp, J.
Biosynthesisis of the labdane diterpene marrubiin in *Marrubium vulgare* via a non-mevalonate pathway.
Biochem. J. 1997, **326**, 449-454
69. Knöss, W., Zapp, J.
Accumulation of Furanic Labdane Diterpenes in *Marrubium vulgare* and *Leonurus cardiaca*
Planta med. 1998, **64**, 357-361
70. Knox, J.P.
The Use of Antibodies to Study the Architecture and Developmental regulation of Plant Cell Walls.
Int. Rev. of Cytotechnology 1997, **171**, 79-121

-
71. Köhler, G., Milstein, C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature 1975, **256**, 495-497
72. Krejci, I., Zadina, R.
Die gallentreibende Wirkung von Marrubiin und Marrubiinsäure
Planta med. 1959, **7**, 1-7
73. Kuzuyama, T., Takahashi, S., Watanabe, H., Seto, H.
Direct Formation of 2-C-Methyl-D-Erythrol-4-Phosphate from 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate by 1-Deoxy-D-Xylulose 5 Phosphate Reductoisomerase, a New Enzyme in the Non-Mevalonate Pathway to Isopentenyl Diphosphate
Tetrahedron Letters 1998, **39**, 4509-4512
74. Lacalle-Dubois, M.A., Wagner, H.
A review of the biological and pharmaceutical activities of saponins
Phytomedicine 1996, **2**, 363-386
75. Lämmler, U.K.
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4
Nature 1970, **227**, 680-685
76. Landsteiner, K.
The specificity of serological reactions
Harvard Univ. Press Cambridge, Mass., 1945
77. Lau, H.P., Gaur, P.K., Chu, F.S.
Preparation and Characterization of Aflatoxin B_{2a}-hemiglutarate and its use for the production of antibody against Aflatoxin B₁
J. food safety 1981, **3**, 1-13
78. Lauer, R.C., Solomon, P.H., Nakanishi, K., Erlanger, B.F.
Antibodies to the Insect Moulting Hormone β -Ecdysone
Experientia 1974, **30**, 560-562
79. Lechat, P., Mudgett-Hunter, M., Margolies, M.N., Haber, E., Smith, T.W.
Reversal of Lethal Digoxin Toxicity in Guinea Pigs using Monoclonal Antibodies and Fab Fragments.
J. of Pharmacol. Experiment. Ther. 1984, **229**, 210-213
80. Lee, C.-K., Chang, M.-H.
The Chemical Constituents from the Heartwood of *Eucalyptus citriodora*
J. of the Chinese Chemical Society 2000, **47**, 555-560
81. Lee, S.T., Schoch, T.K., Stegelmeyer, B.L., Gardner, D.R., Than, K.A., Molyneux, R.J.
Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Hepatotoxic Alkaloids Riddelliine and Riddelliine N-Oxide.
J. Agric. Food. Chem. 2001, **49**, 4144-4151

82. Lenartowska, M., Rodriguez-Garcia, M.I., Bednarska, E.
Immunocytochemical localization of esterified and unesterified pectins in unpollinated and pollinated styles of *Petunia hybrida* Hort.
Planta 2001, **213**, 182-91
83. Lichtenthaler, H.K.
Der 1-Desoxy-D-xylulose-Biosyntheseweg
Biospektrum 1998, 4, 49-52
84. Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., Schwender, J.
Two independent biochemical pathways for isopentenylidiphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants.
Physiol. Plant 1997, **101**, 643-652
85. Liddell, E., Weeks, I.
Antibody technology
Bios scientific publishers Oxford 1995
86. Lindner, H.R., Perel E, Friedlander A, Zeitlin A.
Specificity of antibodies to ovarian hormones in relation to the site of attachment steroid hapten to the peptide carrier.
Steroids 1972, **19**, 357-361
87. Liu, J.
Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid
J. of Ethnopharmacology 1995, **49**, 57-68
88. Liu, J., Liu, Y.P., Parkinson, A., Klaassen, C.D.
Effect of oleanolic acid on chemical induced liver injury in mice.
Act. Pharmacol. Sin. 1995, **15**, 16-23
89. Lopez, K.M., LaFever, R.E.
Marrubiin production in the White Horehound: Localization of diterpenoid production in *Marrubium vulgare*.
Abs. Pap. Am. Chem. Soc. 1999, **217**, 479
90. Ma, B.L.
Hypolipidemic effects of oleanolic acid.
Trad. Med. Pharmacol. 1986, **2**, 28-29
91. Ma, C., Nakamura, N., Miyashiro, H., Hattori, M., Shimotohno, K.
Inhibitory effects of Constituents from *Cynomorium songaricum* and Related Triterpene Derivatives on HIV-1 Protease
Chem. Pharm. Bull. 1999, **47**, 141-145
92. Mahato, S.B., Sarkar, S.K., Poddar, G.
Triterpenoid saponins
Phytochemistry 1988, **27**, 3037-3067

-
93. Maillard, M., Adenwunmi, C.O., Hostettmann, K.
A Triterpene Glycoside from the Fruits of *Tetrapleura tetraptera*
Pytochemistry 1992, **31**, 1321-1323
94. Mangoni, L., Adinolfi, M.
The Stereochemistry of Marrubiin
Tetrahedron Letters 1968, **3**, 269-273
95. Mangoni, L., Adinolfi, M., Laonigro, G., Caputo, R.
Synthesis of Marrubiin
Tetrahedron 1972, **28**, 611-621
96. Maytas, G.R., Wassef, N.M., Rao, M., Alving, C.R.
Induction and detection of antibodies to Squalene.
J. of Immun. Meth. 2000, **245**, 1-14
97. McCoy-Messer, J., Bateman, R.C.
Instability of the ABTS/Peroxidase Reaction Product in Biological Buffers
BioTechniques 1993, **15**, 271-273
98. Mendez, J., Bilia, A.R., Morelli, I.
Phytochemical investigations of *Lina* genus. Flavonoids and tirterpenoids from *Licania pittieri*.
Pharm. Acta Helv. 1995, **70**, 223-226
99. Metzger, H., Lindner, E.
The positive inotropic-acting forskolin, a potent adenylatcyclase activator.
Drug Research 1981, **15**, 473-497
100. Morinaga, O., Tanaka, H., Shoyama, Y.
Production of monoclonal antibody against a major purgative component, sennoside A, its
characterization and ELISA
Analyst 2000, **125**, 1109-1113
101. Mould, G.P., Aherne, G.W., Morris, B.A., Taelle, J.D., Marks, V.
Radioimmunoassay of Drugs and Ist Clinical Application
Eur. J. Metab. Pharmacol. 1977, **2**, 171-176
102. Nah, J.-J., Song, J.Y., Choi, S., Kim, S.-C., Rhim, H.W., Oh, T.H., Lee, S.-M., Nah, S.-Y.
Preparation of Monoclonal Antibody against Ginsenoide Rf and Ist Enzyme Immunoassay.
Biol. Pharm. Bull. 2001, **23**, 523-526
103. Newton, G.D
Monoclonal antibody-based self-testing products.
Am. Pharm. 1993, **NS 33**, 22-23
104. Novaes, A.P., Rossi, C., Poffo, C., Pretti Júnior, E., Oliveira, A.E., Schlemper, V., Niero, R., Cechinel-Filho, V., Bürger, C.
Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants
Thérapie 2001, **56**, 427-430

105. Oliver, G.C., Parker, B.M., Bransfield, D.L., Parker, C.W.
The Measurement of Digitoxin in Human Serum by Radioimmunoassay
J. Clin. Invest. 1968, **47**, 1035-1042
106. Park, J.W., Smolen, J.
Monoclonal Antibody Therapy
Adv. Prot. Chem. 2001, **56**, 369-421
107. Pasich, B.A., Terminska, K., Demczuk, K.
Heterosides from the leaves of ivy – *Hedera helix* L.
Farm. Pol. 1983, **39**, 657-659
108. Paulus, K. Bauer, R.
An improved 5-Lipoxygenase Assay in Microtiter Scale for the Screening of Herbal Drugs
Abstract 497 of the Joint Meeting “2000 years of Natural Product Research”, Amsterdam 1999
109. Pena Eversberg, C.
Untersuchungen zu frühen Schritten der Terpenbiogenese in *Marrubium vulgare* L.
Diplomarbeit Bonn 1998
110. Pflüger, T.
Zur Entwicklung eines Enzym-Immuno-Assays zum Nachweis makrozyklischer Pyrrolizidinalkaloide vom Senecionan-Typ
Dissertation, Bonn 1989
111. Pontarotti, P.A., Rahmani, R., Martin, M., Barbet, J.
Monoclonal Antibodies to Antitumor Vinca Alkaloids: Thermodynamics and Kinetics.
Molecular Immunology 1985, **22**, 277-284
112. Popa, D. P., Pasechnik, G. S., Anh. P. T.
Marrubiol – a new diterpenoid from *Marrubium vulgare*
Khimiya Prirodnykh Soedinenii 1968, **4**, 345-348
113. Price, K.R., Johnson, I.T., Fenwick, G.R.
The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs.
Crit. Rev. Food Sci. Nut. 1987, **26**, 27-135
114. Putalun, W., Tanaka, H., Yahara, S., Lhieochaiphon, S., Shoyama, Y.
Survey of Solasodine-Type Glycoalkaloids by Western Blotting and ELISA Using Anti-solamargine Monoclonal Antibody
Biol. Pharm. Bull. 2000, **23**, 72-75
115. Rahbarizadeh, F., Rasaee, M.J., Madani, R., Rahbarizadeh, M.H., Omidfar, K.
Preparation and Characterization of Specific and High-Affinity Monoclonal Antibodies Against Morphine.
Hybridoma 2000, **19**, 413-417
116. Ramos, R.R., Alarcon-Aguilar, F., Lara-Lemus, A., Flores-Saenz, J.L.
Hypoglycemic Effect of Plants Used in Mexico as Atidiabetics
Arch. Med. Res. 1992, **23**, 59-64

-
- 117.Reuter, B.
Gibberella fujikuroi – Untersuchungen zur Biogenese von Prenyldiphosphaten in zellfreien Systemen und zu frühen Schritten der Terpenbiogenese “in vivo”
Dissertation Bonn 1999
- 118.Reuter, K., Sanderbrand, S., Jomaa, H., Wiesner, J., Steinbrecher, I., Beck, E., Hintz, M., Klebe, G., Stubbs, M.T.
Crystal Structure of 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate Reductoisomerase, a crucial Enzyme in the Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis
J.Biol. Chem. 2002, **277**, 5378-5384
- 119.Richardson J, Hawkins P, Luxton R.
The use of coated paramagnetic particles as a physical label in a magneto-immunoassay.
Biosens. Bioelectron. 2001, **16**, 989-93
- 120.Rohmer, M.
A Mevalonate-independent Route to Isopentenyl Diphosphate
In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*
Elsevier 1998
- 121.Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., Sahm, H.
Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to IPP.
Biochem. J. 1993, **295**, 517-524
- 122.Römpp Lexikon Naturstoffe
Georg Thieme Verlag, Stuttgart & New York 1997
- 123.Rubenstein, K.E., Schneider, R.S., Ullman, E.F.
„Homogenous“ enzyme immunoassay. A new immunochemical technique
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1972, **47**, 846-851
- 124.Ruzicka, L.
The isoprene rule and the biogenesis of terpenoid compounds.
Experientia 1953, **9**, 357-367
- 125.Sakata, R., Shoyama, Y., Murakami, H.
Production of monoclonal antibodies and enzyme immunoassay for typical adenylate cyclase activator, Forskolin
Cytotechnology 1994, **16**, 101-108
- 126.Saouda, M., Romer, T., Boyle, M.D.
Application of immuno-mass spectrometry to analysis of a bacterial virulence factor.
Biotechniques 2002, **32**, 916-923
- 127.Schindler, H.
Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden homöopathisch verwendeter Heilpflanzen
Editio Cantor 1955

128. Schlemper, V., Ribas, A., Nicolau, M., Cechinel-Filho, V.
Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues
Phytomedicine 1996, **3**, 211-216
129. Schwarz, M.
Terpen-Biogenese in Ginkgo biloba: Eine überraschende Geschichte.
Dissertation Nr. 10951, ETH Zürich 1994
130. Shan, S., Tanaka, H., Hayashi, J., Shoyama, Y.
Western blotting of Glycyrrhetic acid Glucuronides using Anti-Glycyrrhizin Monoclonal Antibody.
J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 2001, **24**, 1491-1499
131. Shan, S.J., Putalun, W., Fukuda, N., Morinaga, O., Tanaka, H., Shoyama, Y.
ELISA, Western Blotting, Immunocytolocalization and Immunoaffinity Column for Naturally Occuring Bioactive Compounds Using Monoclonal Antibodies.
J. Food Drug Anal. 2000, **8**, 258-269
132. Shoyama, Y., Fukuda, T., Murakami, H.
Production of monoclonal antibodies and ELISA for thebaine and codeine
Cytotechnology 1996, **19**, 55-61
133. Shoyama, Y., Tanaka, H., Fukuda, N.
Monoclonal Antibodies against naturally occurring bioactive compounds
Cytotechnology 1998, **31**, 9-27
134. de Souza, M. M., de Jesus, R. A. P., Cedchinel-Vilho, V., Schlemper, V.
Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*
Phytomedicine 1998, **5**, 103-107
135. Stancovic, S.K., Bastic, M.B., Jovanovic, J.A.
Composition of the sterol fraction in Horse chestnut.
Phytochemistry 1984, **23**, 2677-2679
136. Stancovic, S.K., Bastic, M.B., Jovanovic, J.A.
Composition of the Triterpene Alcohol fraction of Horse Chestnut seed.
Phytochemistry 1985, **24**, 119-121
137. Stephens, L.J., Wheeler, M.S.
Synthesis of Diterpenoid Acids – X. Stereochemistry of Marrubiin, the C₈ and C₉-Positions
Tetrahedron 1970, **26**, 1561-1567
138. Sticher, O., Soldati, F.
Glycyrrhizinsäurebestimmung in Radix Liquiritiae mit Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)
Pharm. Acta Helv. 1978, **53**, 46-52
139. Szafran, H., Beiser, S.M., Erlanger, B.F.
The Use of Egg Albumin Conjugates for the Purification of Antibody
J. Immunol. 1969, **103**, 1157-1158

140. Tanaka, H., Fukuda, N., Shoyama, Y.
Formation of monoclonal antibody against a major ginseng compound, ginsenoide Rb1 and its characterization.
Cytotechnology 1999, **29**, 115-120
141. Tanaka, H., Goto, Y., Shoyama, Y.
Monoclonal Antibody based Enzyme Immunoassay for Marihuana (Cannabinoid) Compounds
J. Immunoassay 1996, **17**, 321-342
142. Tanaka, H., Shoyama, Y.
Formation of a Monoclonal Antibody against Glycyrrhizin and Development of an ELISA
Biol. Pharm. Bull. 1998, **21**, 1391-1393
143. Teuscher, E.
Pharmazeutische Biologie
Vieweg Verlag Braunschweig 1990
144. Tkachev, A.V., Denisov, A.Y.
Oxidative Decarboxylation by Hydrogen Peroxide and a Mercury (II) Salt: a Simple Route to nor-Derivatives of Acetyloleanolic, Acetylursolic and Dehydroabietic Acids.
Tetrahedron 1994, **50**, 2591-2598
145. Toledo, M.S., Suzuki, E., Levery, S.B., Straus, A.H., Takahashi, H.K.
Charaterization of monoclonal antibody MEST-2 specific to glucosylceramide of fungi and plants.
Glycobiology 2001, **11**, 105-112
146. Tonevitsky, A.G., Marx, U., Agapov, I., Moisenovich, M.
Detection of isolated mistletoe lectin chains in plant extracts.
Arzneimittelforschung 2002, **52**, 67-71
147. Tschesche, R., Schmidt, W., Wulff, G.
Reindarstellung und Strukturermittlung der Saponine des Efeus (*Hedera helix* L.)
Z. Naturforschg. 1965, **20b**, 708-709
148. Ulubelen, A., Tan, N.
Terpenoids from *Salvia recognita* and *Salvia aethiopsis*
Sci. pharm. 1999, **67**, 83-88
149. Vaughan, Jr., Osato, Jr. und R.
The Preparation of Peptides Using Mixes Carbonic-Carboxylic Acid Anhydrides
J. Am. Chem. Soc. 1952, **74**, 676
150. Vitha, S., Baluska, F., Braun, M., Samaj, J., Volkmann, D., Barlow, P.W.
Coparison of cryofixation and aldehyde fixation for plant actin immunochemistry: Aldehydes do not destroy F-actin.
Hist. J. 2000, **32**, 457-466
151. Walker, C.S., Clark, S.J., Wotiz, H.H.
Steroids 1973, **21**, 259

152. van Weemen, B.K., Schuurs, A.H.W.M.
Immunoassay using Antigen Enzyme Conjugates
FEBS Letters 1971, **15**, 232-237
153. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M.
Drogenanalyse
Springer-Verlag New York 1983
154. Wagner, H., Reger, H.
Radix Primulae-Extrakte
Deutsche Apotheker-Zeitung 1986, **126**, 1489-1493
155. Wegner, C., Hamburger, M.
Tensioactive Compounds from the Aquatic Plant *Ranunculus fluitans* L. (Ranunculaceae)
Helv. Chim. Act. 2000, **83**, 1454-1464
156. Weiler, E.W.
Chemistry of Plant Protection
Springer Verlag, Berlin 1990
157. Wheeler, D.M.S., Wheeler, M.M., Fetizon, M., Castine, W.H.
Synthesis of Diterpenid Acids – VII. The Stereochemistry of Marrubiin.
Tetrahedron 1967, **23**, 3909-3921
158. Wichtl, M.
Teedrogen – Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1989
159. Wieland, T., Bernhard, H.
Über Peptid-Synthesen. 3. Mitteilung: Die Verwendung von Anhydriden aus N-acylierten Aminosäuren
und Derivaten anorganischer Säuren
Ann Chem. 1951, **572**, 190-198
160. Winzler, S., Rosenstein, B.D.
Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs
AAOHN Journal 1998, **46**, 253-260
161. von Witsch, M., Baluska, F., Staiger, C.J., Volkmann, D.
Profillin is associated with the plasma membrane in microspores and pollen.
J Cell. Biol. 1999, **77**, 303-312
162. Wulff, G.
Neuere Entwicklungen auf dem Saponingebiet
Deutsche Apothekerzeitung 1968, **23**, 797-808
163. Wulff, G., Tschesche, R.
Über Triterpene – XXVI: Über die Struktur der Rosskastaniensaponine (Aescin) und die Aglykone
verwandter Glykoside.
Tetrahedron 1969, **25**, 415-436

-
164. Xuan, L., Tanaka, H., Xu, Y., Shoyama, Y.
Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization
Cytotechnology 1999, **29**, 65-70
165. Xuan, L.-J., Tanaka, H., Morimoto, S., Shoyama, Y., Akanuma, H., Muraoka, K.
Determination of 1,5-anhydro-glucitol-carrier protein conjugates by matrix-assisted laser
desorption/ionization tof mass spektrometry and antibody formation
Spectroscopy 2000, **14**, 85-92
166. Yalow
Nature 1959, **184**, 1648
167. Yanagihara, H., Sakata, R., Minami, H., Tanaka, H., Shoyama, Y., Murakami, H.
Immunoaffinity column chromatography against forskolin using an anti-forskolin monoclonal antibody
and its application.
Anal. Chim. Acta 1996, **335**, 63-70
168. Yanagihara, H., Sakata, R., Shoyama, Y., Murakami, H.
Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies.
Planta med. 1996, **62**, 169-172
169. Yang, J., Quail, W., Jia, Z.
Succinyl oleanolic acid
Acta Cryst. 1997, **C53**, 349-351
170. Young, Y.-F.
Production of Monoclonal Antibody against Dinitroacetanilid via in vitro immunization
Dissertation Brigham Young University (USA) 1984
171. Zalberg, J.R., Healey, K., Hurrell, J.G.R., McKenzie, I.F.G
Monoclonal Antibodies to drugs – Digoxin
Int. J. Immunopharmac. 1983, **5**, 397-402
172. Zamponi, A.
Identifizierung, Klonierung und heterologe Expression eines Terpensynthasegens aus *Marrubium
vulgare*.
Dissertation Bonn 2002
173. Zündorf, I., Dinger mann, T.
Gentechnologie und Arzneimittel
Pharmazie in unserer Zeit 1998, **27**, 223-232
174. Zündorf, I., Wiedenfeld, H., Röder, E., Dinger mann, T.
Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies against the Pyrrolizidine Alkaloid Retrorsin.
Planta medica 1998, **64**, 259-263

7 Pharmakologische Untersuchungen der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Furanolabdanditerpene und deren Derivatisierungsprodukten *in vivo* / *in vitro*

7.1 Einleitung	150
7.2 Material und Methoden	151
7.2.1 Writhing-Test.....	151
7.2.2 COX 1- und 2-Assay	152
7.2.3 LOX-Assay	152
7.2.4 GRK ₂ -Assay	153
7.3 Ergebnisse	154
7.3.1 Nachweis antinoczeptiver Wirkung im Writhing-Test.....	155
7.3.2 <i>In vitro</i> -Untersuchung: Hemmung der GRK ₂	156
7.3.3 <i>In vitro</i> -Untersuchung: Hemmung der COX-1 bzw. -COX-2	157
7.3.4 <i>In vitro</i> -Untersuchung: Hemmung der 5-LOX	158
7.4 Diskussion.....	159

7.1 Einleitung

Die Arbeitsgruppe von V. Cechinel (Itajai, Brasilien) untersuchte traditionelle Arzneipflanzen Brasiliens in verschiedenen *in vivo*-Modellen. Der ethanolsche Extrakt von *Marrubium vulgare* fiel im Writhing-Test an der Maus durch eine dosisabhängige antinociceptive Wirkung auf (de Souza et al., 1998), die auf Marrubiin zurückgeführt werden konnte (Cechinel-Filho et al., 1998). Über die gemeinsame Forschung an Marrubiin kam ein Kontakt zustande, in dessen Rahmen die pharmakologischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe erweitert werden konnten. Verschiedene im Rahmen dieser Arbeit isolierte oder synthetisierte Diterpene und andere Vergleichssubstanzen aus der Arbeitsgruppe Knöss wurden im Rahmen einer Kooperation in der Arbeitsgruppe von V. Cechinel in vorhandenen Modellen getestet.

Aufgrund der interessanten Ergebnisse wurden Kontakte zu den Arbeitsgruppen von R. Bauer (Düsseldorf) und M. Kassack (Bonn) geknüpft, die in verschiedenen *in vitro*-Modellen Naturstoffe auf eine antinociceptive Wirkung hin untersuchen. Die Substanzen, die im *in vivo*-Test in Brasilien untersucht wurden und werden, wurden parallel auf eine Hemmwirkung gegen Cyclooxygenase, Lipoxxygenase und G-Protein-Rezeptorkinase 2 untersucht. Besonders die ersten zwei Enzyme spielen eine zentrale Rolle in der Schmerzentwicklung und Schmerzweiterleitung (Besson et al., 1987). Die Möglichkeiten, über die eine Substanz Einfluss auf das nociceptive System nehmen kann, sind jedoch sehr zahlreich. Daher war die Wahrscheinlichkeit eher gering, den Mechanismus der schmerzstillenden Wirkung mit diesen drei *in vitro*-Assays klären zu können.

De Souza et al. (1998) machten bereits verschiedene Angaben zur Wirkungsweise des ethanolschen Extraktes aus *M. vulgare* und zu Marrubiin:

Bei einer Konzentration von 90 μmol / kg Körpergewicht wurde der Ausdruck des durch Essigsäureinjektion hervorgerufenen Schmerzes in Mäusen praktisch vollständig unterdrückt. Die ID_{50} betrug 2,2 μg / kg Körpergewicht. Der Effekt war langanhaltend und bis zu 5 Stunden nach Essigsäureinjektion nachweisbar.

In verschiedenen weiteren *in vivo*-Assays wie dem Formalin-induzierten Schmerz- und Ödemtest und dem Capsaicin-Schmerztest wurde die antinociceptive Wirkung an Ratten von den Autoren bestätigt. Das Labdan wirkte dosisabhängig bei intraperitonealer und peroraler Applikation. Die im Ödemtest beobachtete Wirkung ließ zusätzlich auf eine

antiinflammatorische Wirkkomponente schließen. Cechinel-Filho und Mitarbeiter vermuteten daher eine direkte sensorische Wirkkomponente im Zusammenhang mit Bradykinin bzw. Glutamat sowie eine antiinflammatorische Einflussnahme des Furanolabdanditerpens über die Arachidonsäurekaskade.

In einer weiteren Versuchsreihe des Writhing-Tests wurde den Tieren 20 Minuten nach der Gabe von Marrubiin und 10 Minuten vor der Injektion der Essigsäure 5 mg / kg Körpergewicht Naloxon, ein unspezifischer Morphinrezeptor-Antagonist, intraperitoneal verabreicht. Die Gabe hatte keinen Effekt auf die Wirkung des Marrubiins. Im hot-plate-Test war Marrubiin bis zu einer Konzentration von 180 µmol/kg Körpergewicht ebenfalls wirkungslos. Auch dieser Test ist für eine Wirkung auf das Opioidsystem angelegt. Der antinociceptive Wirkmechanismus des Furanolabdanditerpens scheint daher nicht über Morphin-Rezeptoren zu verlaufen.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Writhing-Test

Der Writhing-Test an der Maus wurden von V. Cechinel (Itajai, Brasilien) durchgeführt (de Souza et al., 1998; Cechinel-Filho et al., 1998). Die Autoren folgten den Vorgaben von Collier et al. (1968) mit kleinen Modifikationen:

Männliche „Swiss mice“ mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25 – 30 g wurden in einer kontrollierten Umgebung gehalten. Wasser und Futter standen ad libitum zur Verfügung.

Den Tieren (N=10) wurde die zu untersuchende Substanz (10 mg/kg Körpergewicht), gelöst in Ethanol bzw. Ethanol/Wasser, intraperitoneal verabreicht; die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine entsprechende Menge isotonischer Kochsalzlösung. Die Tiere der Positivgruppe erhielten Aspirin oder Paracetamol (ebenfalls 10 mg/kg Körpergewicht) subcutan. Nach 30 Minuten wurde den Tieren 0,6%ige Essigsäure intraperitoneal in eine Hinterpfote gespritzt. Danach wurden die Tiere in separate Boxen gesetzt. Die Zahl der durch diese Injektion ausgelösten Kontraktionen des Abdomens bzw. der Hinterpfote wurde kumulativ über einen Zeitraum von 30 Minuten bestimmt.

Die antinociceptive Aktivität der zu untersuchenden Substanzen wurde als Reduktion der Anzahl der abdominalen Kontraktionen im Vergleich zu den Kontrolltieren ausgedrückt.

7.2.2 COX 1- und 2-Assay

Die Untersuchung auf eine Aktivität gegen Cyclooxygenase 1 (COX-1) und Cyclooxygenase 2 (COX-2) wurden von R. Bauer (Düsseldorf) und Mitarbeitern nach der Methode von Redl et al. (1994) bzw. Reininger et al. (1998) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 10 µl der zu untersuchenden Lösung zu 190 µl 0,1M TRIS/HCl, 18 µM L-Adrenalin-D-hydrogentartrat und 10µM Hematin pipettiert. Nach der Zugabe von 0,2 Einheiten COX-1 COX-2 (Cayman) wurde das Gemisch 5 Minuten lang präinkubiert, bevor das Gemisch auf eine Konzentration von 5 µM Arachidonsäure eingestellt wurde.

Die Inkubation mit COX-1 bei 37°C wurde nach 10 Minuten, die mit COX-2 nach 20 Minuten durch die Zugabe von 10 µl einer 10%igen Ameisensäurelösung gestoppt. Die Konzentration des jeweils gebildeten PGE₂ wurde mit Hilfe eines PGE₂-Enzym-Immunoassay (R&D Systems) bestimmt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden jeweils als Mittelwert aus drei Einzelbestimmungen dargestellt.

7.2.3 LOX-Assay

Auch die Untersuchungen auf eine Wirkung auf die Lipoxygenase wurden von R. Bauer (Düsseldorf) nach den Angaben in Paulus et al. (1999) durchgeführt. Hierzu wurden intakte Schweine-Leukozyten verwendet, welche mit 0,2 mM CaCl₂, 1 µM Eicosatetraensäure, 1 µM Ca-Ionophor 23187 und 0,12 mM Arachidonsäure inkubiert wurden. Die Menge an gebildetem Leukotrien B₄ (LTB₄) wurde mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays (Cayman Chemicals) bestimmt.

7.2.4 G-Proteinrezeptorkinase 2-Assay

Die Untersuchungen wurden von M. Kassack, Bonn, durchgeführt.

Die Aktivität der G-Proteinrezeptorkinase 2 (GRK₂) wurde über die Phosphorylierung des Photorezeptors Rhodopsin bestimmt. Hierfür wurden dunkel-adaptierte „Rod outer segments (ROS)“ bei schwachem Rotlicht präpariert: Die Rinderretina wurde hierfür mit einem Polytron-Homogenisator homogenisiert und sukzessive einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation unterworfen. Die Rhodopsin-Bande wurde abgetrennt und mit 2,5 M Harnstoff behandelt. Die so präparierten ROS zeigten keine endogene Kinase-Aktivität und bestanden hauptsächlich aus Rhodopsin, wie ein 10% SDS-PAGE zeigte.

Ca. 150 pmol Rhodopsin wurden in Gegenwart weißen Lichtes (bzw. in Dunkelheit) in einem Puffer mit 20 mM Tris-HCl (pH= 7,5), 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 100 µM γ-[³³P]-ATP (4440 cpm/fmol) zusammen mit 0,5 µl 2µM GRK₂ inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten durch die Zugabe von eisgekühlten 800 µl 100 mM Natriumphosphat/5 mM EDTA-Puffer (pH= 7,5) gestoppt. Die zu untersuchenden Substanzen wurden der Phosphorylierungsmischung in einer Konzentration von 100 µM zugefügt.

Nach Zentrifugation bei 20.000 x g wurde das Rhodopsin-Pellet in 30µl SDS Puffer (2% SDS, 10% Glycerol, 0,001% Bromphenolblau in 0,08 M Tris-HCl, pH=6,8) resuspendiert. Ein Aliquot wurde auf einem 10% SDS-PAGE getrennt.

Die Rhodopsin-Banden bei 30 – 35 kD wurden mit Hilfe eines GelScan 3D v.2.1 autoradiographisch vermessen.

7.3 Ergebnisse

Die Arbeitsgruppe um V. Cechinel (Itajai, Brasilien) konnte eine antinociceptive Wirkung des ethanolischen Extraktes von *Marrubium vulgare* sowie von Marrubiin nachweisen.

In Fortsetzung der pharmakologischen Untersuchungen wurden dieser Arbeitsgruppe labdanhaltige Pflanzenextrakte und einige der als Targetstrukturen hergestellten Reinsubstanzen zur Verfügung gestellt. In Kooperation mit zwei weiteren Arbeitsgruppen wurden verschiedene *in vitro*-Modelle in die Untersuchungen mit einbezogen, die im Zusammenhang mit einer antinociceptiven Wirkung stehen können:

- 1) Writhing-Test Untersuchung weiterer Furanolabdanditerpene und
-Fraktionen
durchgeführt von V. Cechinel-Filho und Mitarbeitern

- 2) GRK₂-Assay Mögliche Hemmung der Signaltransduktion
z.B. am Opioid-Rezeptor
durchgeführt von M. Kassack und Mitarbeitern

- 3) COX-1 und -2-Assay Mögliche Hemmung der Arachidonsäure-Kaskade
durchgeführt von R. Bauer und Mitarbeitern

- 4) 5-LOX-Assay Mögliche Hemmung der Leukotrien-Biosynthese
durchgeführt von R. Bauer und Mitarbeitern

7.3.1 Nachweis antinoczeptiver Wirkung im Writhing-Test

Im Writhing-Test wurden von V. Cechinel neben dem ethanolischen Extrakt aus *Marrubium vulgare* (Herkunft: Bonn) auch die gereinigte Furanolabdanditerpenfraktion (s. Abschnitt 2.3.3) von *M. vulgare* und *Leonurus cardiaca* untersucht. Beide Pflanzen sind Arten der Lamiaceae und enthalten Furanolabdanditerpene. Als Reinsubstanzen wurden bisher Marrubiin, Marrubenol und Hispanolon eingesetzt.

Die Furanolabdanditerpenfraktion aus *M. vulgare* zeigte mit $84,04\% \pm 3,4\%$ Hemmung der Konstriktion eine stärkere Wirkung als der ethanolische Rohextrakt dieser Pflanze (65%). Die Labdanfraktion aus *L. cardiaca* erwies sich mit $94,00\% \pm 1,5\%$ Inhibition als noch potenter. Die Wirkung der Einzelsubstanzen nahm von Marrubiin 76% über Marrubenol ($92,6\% \pm 2,1\%$) zu Hispanolon ($92,20 \pm 1,5\%$) hin zu. Die Wirkung aller untersuchten Fraktionen war mehr als doppelt so groß wie die der Standardanalgetika Aspirin und Paracetamol (35%) (s. Abb. 7.1). Weitere Labdane und –Fraktionen befinden sich in der Untersuchung.

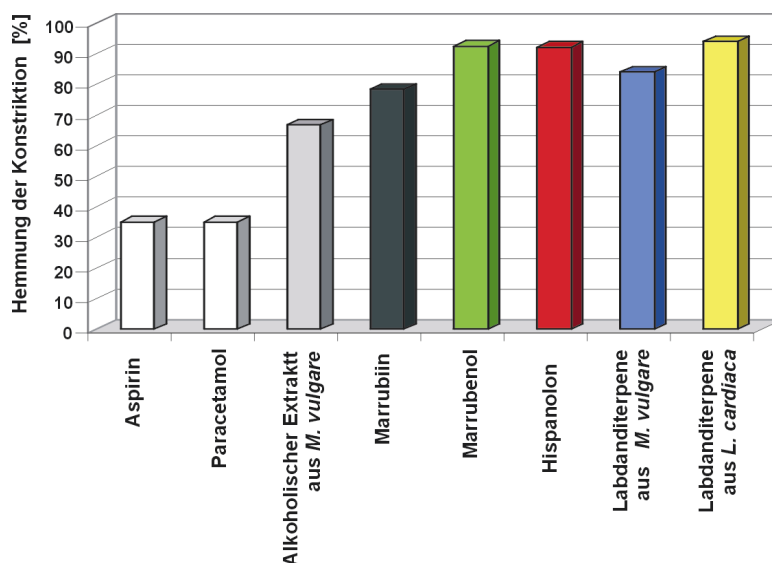


Abb. 7.1 Untersuchung von Furanolabdanditerpenen und FLD-reichen Fraktionen im Writhing-Test an der Ratte. Den zu untersuchenden Tieren wurden je 10 mg / kg Körpergewicht der zu untersuchenden Substanz bzw. der Extrakte i.p. appliziert, Kontrolltieren ein gleiches Volumen isotoner Kochsalzlösung. Nach 30 Minuten wurde verdünnte Essigsäure in eine Hinterpfote gespritzt und die Zahl der Konstriktionen des Hinterleibes und der Pfote kumulativ über 30 Minuten bestimmt. Die prozentuale Hemmung der Konstriktion entspricht dem Verhältnis an Konstriktionen von Tieren der Versuchs- und der Kontrollgruppe.

7.3.2 *In vitro*-Untersuchung: Hemmung der GRK₂

In einer ersten Testreihe wurde von M. Kassack, Bonn, die Wirkung auf die G-Proteinrezeptorkinase 2 (GRK₂) untersucht, ein Protein, das unter anderem an der Signaltransduktion der Opioidrezeptoren beteiligt ist.

Die verwendete Reaktion arbeitet mit Hilfe des isolierten Photorezeptors Rhodopsin, der aus Rinderretina gewonnen wurde. Unter der Katalyse von GRK₂ wird Rhodopsin in der Gegenwart von weißem Licht phosphoryliert. Durch den Einsatz von γ -[³³P]-ATP wurde der Grad der Phosphorylierung und damit die Aktivität der GRK₂ bestimmbar.

In diesem Testsystem wurden Marrubiin und Marrubenol, dessen Derivatisierungsprodukte Marrubenolacetat und -succinat, die Furanolabdanditerpene Hispanolon und Leosibiricin sowie die Labdanditerpene Sclareol und Manool eingesetzt. Selbst in der relativ hohen Konzentration von 100 mM zeigte keines der untersuchten Furanolabdanditerpene eine Hemmwirkung von über 20% auf die G-Poteinrezeptorkinase 2 (s. Abbildung 7.2).

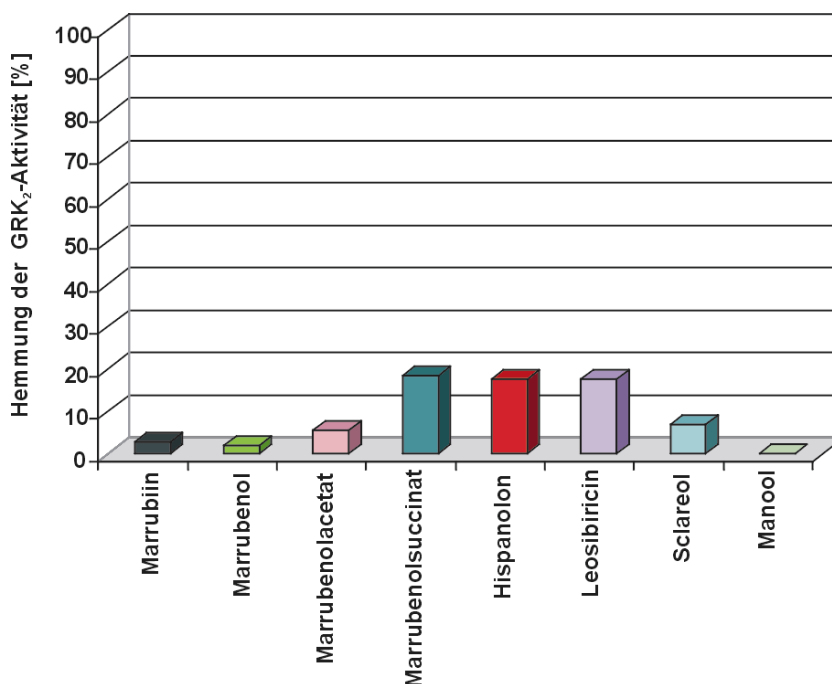


Abb. 7.2 Untersuchung von Furanolabdanditerpenen im GRK₂-Assay. Rhodopsin wurde in Gegenwart von GRK₂ und γ -[³³P]-ATP mit weißem Licht bestrahlt, was die Phosphorylierung des Photorezeptors auslöste. Die Reaktion wurde durch die Verwendung radioaktiv markierten ATPs quantifizierbar. Die Labdanditerpene wurden dem Reaktionsansatz in einer Menge von 100 mM zugefügt. Die Ergebnisse wurden in Relation zu Blindwert-Experimenten gestellt.

7.3.3 *In vitro*-Untersuchung: Hemmung der COX-1 bzw. -COX-2

Cyclooxygenase ist ein zentrales Enzym des Arachidonsäurestoffwechsels. Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs), die Hemmstoffe der Cyclooxygenase, wirken in therapeutischer Konzentration analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch. Es werden zwei Isoformen, COX-1 und COX-2 unterschieden, von denen ersteres hauptsächlich konstitutiv exprimiert wird und das letztere hauptsächlich induzierbar ist.

Die von R. Bauer (Düsseldorf) eingesetzte Methode basierte auf der quantitativen Bestimmung von PG E₂, einem Produkt der Umsetzung von Arachidonsäure unter Katalyse der jeweiligen COX-Isoform.

Die in diesem Testsystem eingesetzten Substanzen entsprachen denen im GRK₂-Assay: Die Furanolabdanditerpene Marrubiin und Marrubenol, Marrubenolacetat und -succinat, Hispanolon und Leosibiricin sowie die Labdanditerpene Sclareol und Manool.

Alle eingesetzten Diterpene waren selbst bei hoher Konzentration von 320 – 160 µM nur schwach wirksam (s. Abb. 7.3).

Ein Einfluss auf die Nociception über die Hemmung der COX war somit nicht nachweisbar.

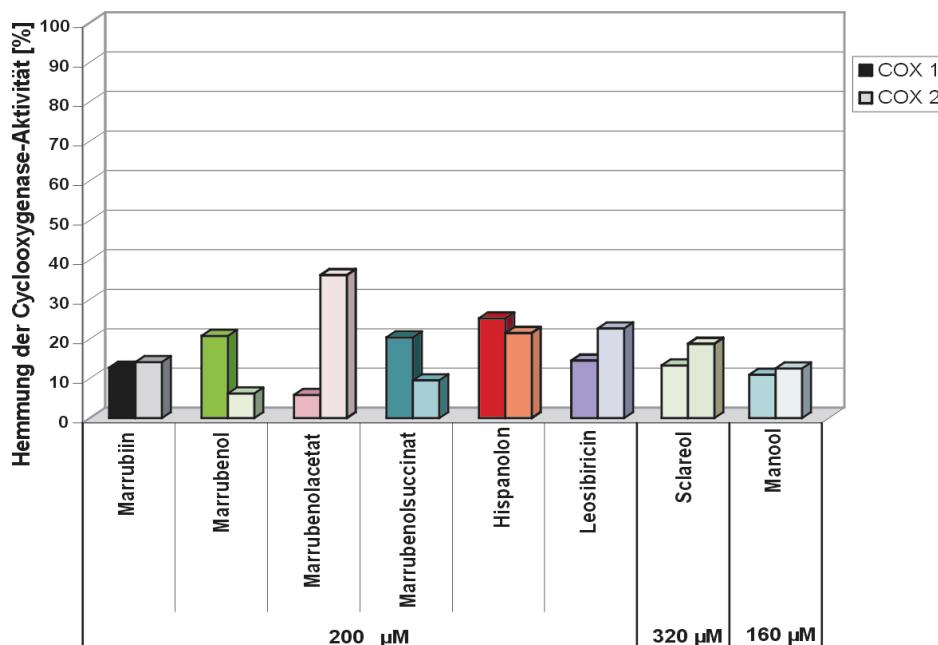


Abb. 3.7.3 Untersuchung von Labdanditerpenen im COX-Assay. Die Umsetzungsrate von Arachidonsäure durch Cyclooxygenase zu PG E₂ wurde mit Hilfe eines enzymatischen Immunoassays bestimmt. Die prozentuale Hemmung der Labdanditerpene wurde gegen beide Isoformen des Enzyms ermittelt. Die eingesetzte Konzentration lag mit 200 µM bzw. 320 µM für Sclareol und 160 µM für Manool sehr hoch.

7.3.4 *In vitro*-Untersuchung: Hemmung der 5-LOX

Ein weiterer Assay untersuchte einen möglichen Einfluss der Labdanditerpene auf die Leukotrienbiosynthese. Ein zentrales Enzym dieser Synthese ist die 5-Lipoxygenase. Leukotriene sind an der Wundheilung beteiligt, besonders aber am chronischen wie akuten Entzündungsgeschehen.

Die in Kooperation von R. Bauer (Düsseldorf) durchgeführte Reaktion beruht wiederum auf der quantitativen Bestimmung eines Umsetzungsproduktes der Lipoxygenase, der LTB₄ mit Hilfe eines Immunoassays.

Von den in diesem Testsystem eingesetzten Furanolabdanditerpenen Marrubiin, Marrubenol, Marrubenolacetat und -succinat, Hispanolon und Leosibiricin zeigte in der hohen Konzentration von 200 µM Hispanolon mit 54,7% (Mittelwert aus drei Messungen) eine leichte Hemmwirkung. Die Labdanditerpene Sclareol und Manool waren mit 87,5% und 84,7% etwas stärker wirksam. Bei der eingesetzten Konzentration von 200 µM bzw. 160 µM ist diese Inhibition jedoch insgesamt als schwach zu bewerten (s. Abb. 7.4). Die gefundenen Werte können aufgrund ihrer Größenordnung auch keine Erklärung für die Wirkung im Writhing-Test liefern.

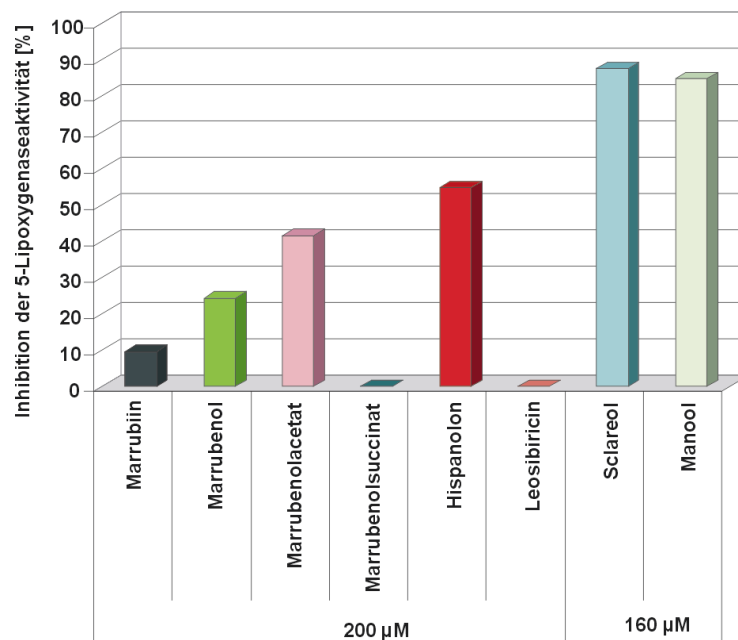


Abb. 3 Untersuchung von Labdanditerpenen im 5-LOX-Assay. Die Umsetzungsrate von Arachidonsäure durch 5-Lipoxygenase zu PG E₂ wurde mit Hilfe eines enzymatischen Immunoassays bestimmt. Die eingesetzte Konzentration lag mit 200µM bzw. 160µM für Sclareol und Manool sehr hoch. Die ermittelten Werte wurden in Relation zu Blindwerten gesetzt.

7.4 Diskussion

Die *in vivo*-Untersuchungen von V. Cechinel und Mitarbeitern zur antinociceptiven Wirkung von Marrubiin wurden mit den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Zielstrukturen und einigen aufkonzentrierten Furanolabdanfraktionen fortgesetzt. Marrubiin erreichte bei einer eingesetzten Konzentration von 10 mg / kg Körpergewicht Maus eine deutliche antinociceptive Wirkung. Durch Marrubiin wurden im Rahmen des Writhing-Testes 76% der säureinduzierten Konstriktionen unterdrückt. Eine gleiche Menge Aspirin bzw. Paracetamol zeigte nur 35% Hemmung.

Die Furanolabdanditerpen-Fraktionen aus *Marrubium vulgare* und *Leonurus cardiaca* beinhalten mit 84% bzw. 92% ebenfalls ein hohes antinociceptives Potential. Die bereits untersuchten Furanolabdane Hispanolon (92%) und Marrubenol (93%) sind noch einmal deutlich stärker wirksam als Marrubiin selbst (Brand et al., 1998 a und 1998 b). Die Untersuchungen werden von V. Cechinel mit der Bestimmung der IC₅₀ der verschiedenen Furanolabdanditerpene fortgesetzt.

Eine erste Testung in drei verschiedenen *in vitro*-Modellen sollte helfen, den Reaktionsmechanismus, über den die Furanolabdanditerpene in die Schmerzbildung, -leitung oder Schmerzverarbeitung eingreifen, zu bestimmen. Aus den Untersuchungen von de Souza et al. (1998) war bereits bekannt, dass der Wirkmechanismus nicht mit dem des Morphins vergleichbar ist. Naloxon als Morphinrezeptor-Antagonist zeigte keine Wirkung. Weiterhin hatten die Labdanditerpene keine antinociceptive Wirkung in dem auf das Opioidsystem ausgerichteten hot-plate-Test. Die Autoren vermuteten einen an die Arachidonsäurekaskade gekoppelten Wirkmechanismus.

Keine der eingesetzten Zielstrukturen einschließlich Marrubiin hatte eine hemmende Wirkung auf die Cyclooxygenasen 1 und 2 oder die 5-Lipoxygenase (s. Abschnitt 7.2.2 und 7.2.3), welche Schlüsselenzyme der Arachidonsäurekaskade bilden (Winzeler et al., 1997). Auch das nur indirekt an der Schmerzweiterleitung beteiligte Enzym G-Protein-Rezeptorkinase 2 (Aragay et al., 1998) wurde von den eingesetzten Substanzen in seiner Funktion nicht beeinflusst. Der Mechanismus der schmerzstillenden Wirkung der Furanolabdanditerpene *in vivo* bleibt daher vorerst ungeklärt.

Bei der Suche nach dem Mechanismus kann radioaktiv markiertes Marrubiin ebenso helfen wie die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten Antikörper gegen Furanolabdanditerpene. Besonders letztere ermöglichen auch die Suche nach Pflanzen mit neuen und gegebenenfalls noch weit potenteren Antinociceptiva aus dieser Naturstoffklasse.

8 Spektrenanhang

Marrubiin und Derivate:

8.1 Marrubiin.....	162
8.2 Marrubenol	169
8.3 Marrubenolsuccinat	174
8.4 Marrubiinsäure	179

Oleanolsäure und Derivate

8.5 Oleanolsäure	184
8.6 Erythrodiol.....	189
8.7 Oleanylsuccinat.....	194
8.8 Oleanylacetat	199

8.1 Marrubiin

Masse (EI): 332,2

Literatur: 332 (Knöss, 1996)

¹H-NMR in CDCl₃:

0,97 (d, J = 5 Hz, H-17); 1,05 (s, H-20); 1,28 (s, H-18); 1,69 und 1,32 (m und m, H-1); 1,70 und 1,53 (m und m, H-1); 1,87 und 1,77 (m und m, H-11); 2,08 und 1,46 (m und m, H-3); 2,13 (m, H-8); 2,14 und 1,68 (m und m, H-7); 2,23 (d, J = 5 Hz, H-5); 2,52 (m, H-12); 4,74 (t, J = 5 Hz, H-5); 2,52 (m, H-12); 4,74 (t, J = 5 Hz, H-6); 6,26 (br. s, H-14); 7,22 (br.s, H-16); 7,35 (br. s, H-15)

Knöss et al., 1997 :

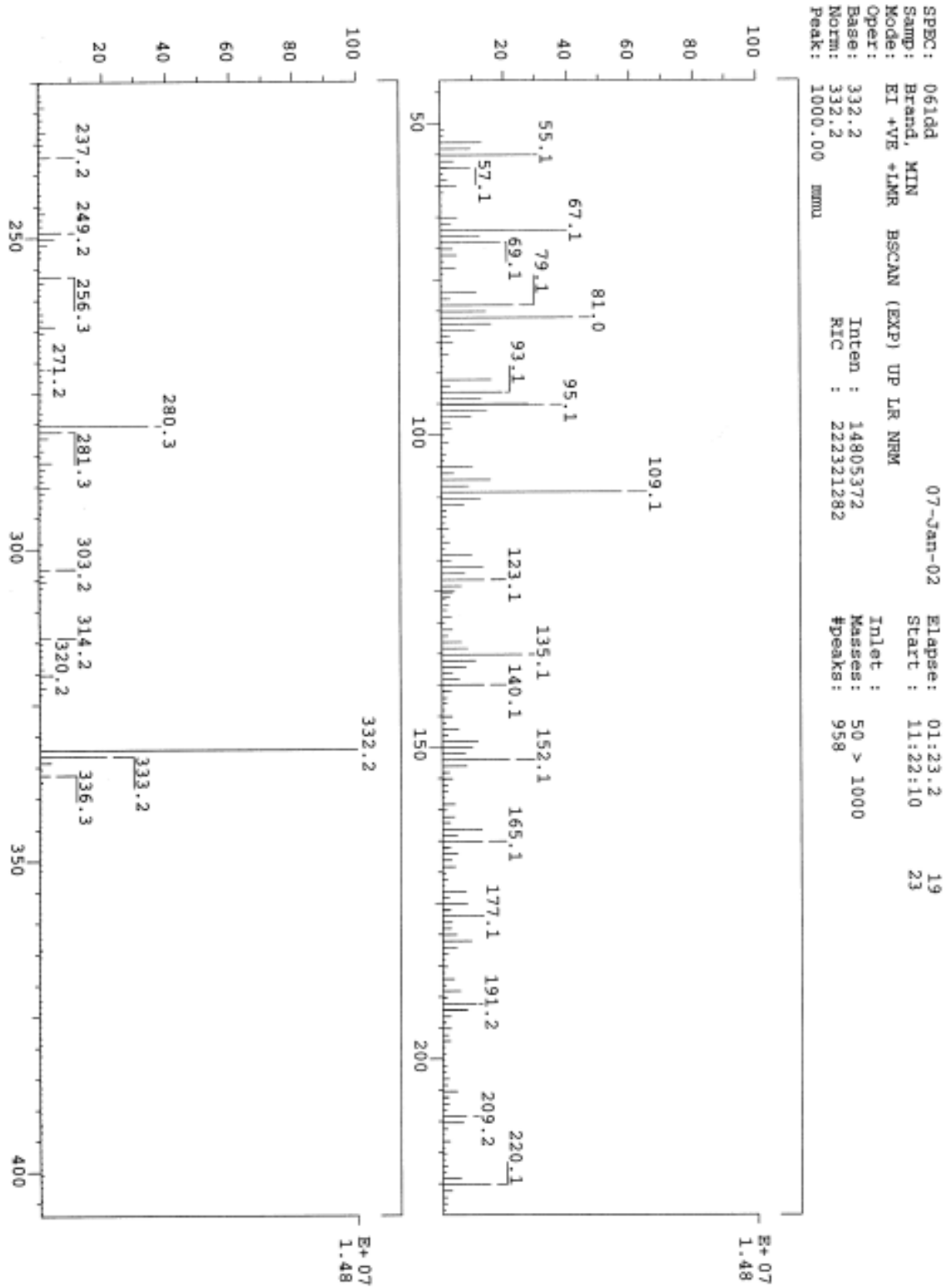
0,95 (d, J = 6,5 Hz, H-17); 1,04 (s, H-20); 1,27 (s, H-18); 1,68 und 1,29 (m und m, H-1); 1,72 und 1,50 (m und m, H-1); 1,88 und 1,74 (m und m, H-11); 2,11 und 1,43 (m und m, H-3); 2,12 (m, H-8); 2,13 und 1,68 (m und m, H-7); 2,21 (d, J = 5 Hz, H-5); 2,51 (m, H-12); 4,72 (t, J = 5 Hz, H-5); 2,51 (m, H-12); 4,72 (t, J = 5 Hz, H-6); 6,25 (br. s, H-14); 7,21 (br.s, H-16); 7,34 (br. s, H-15)

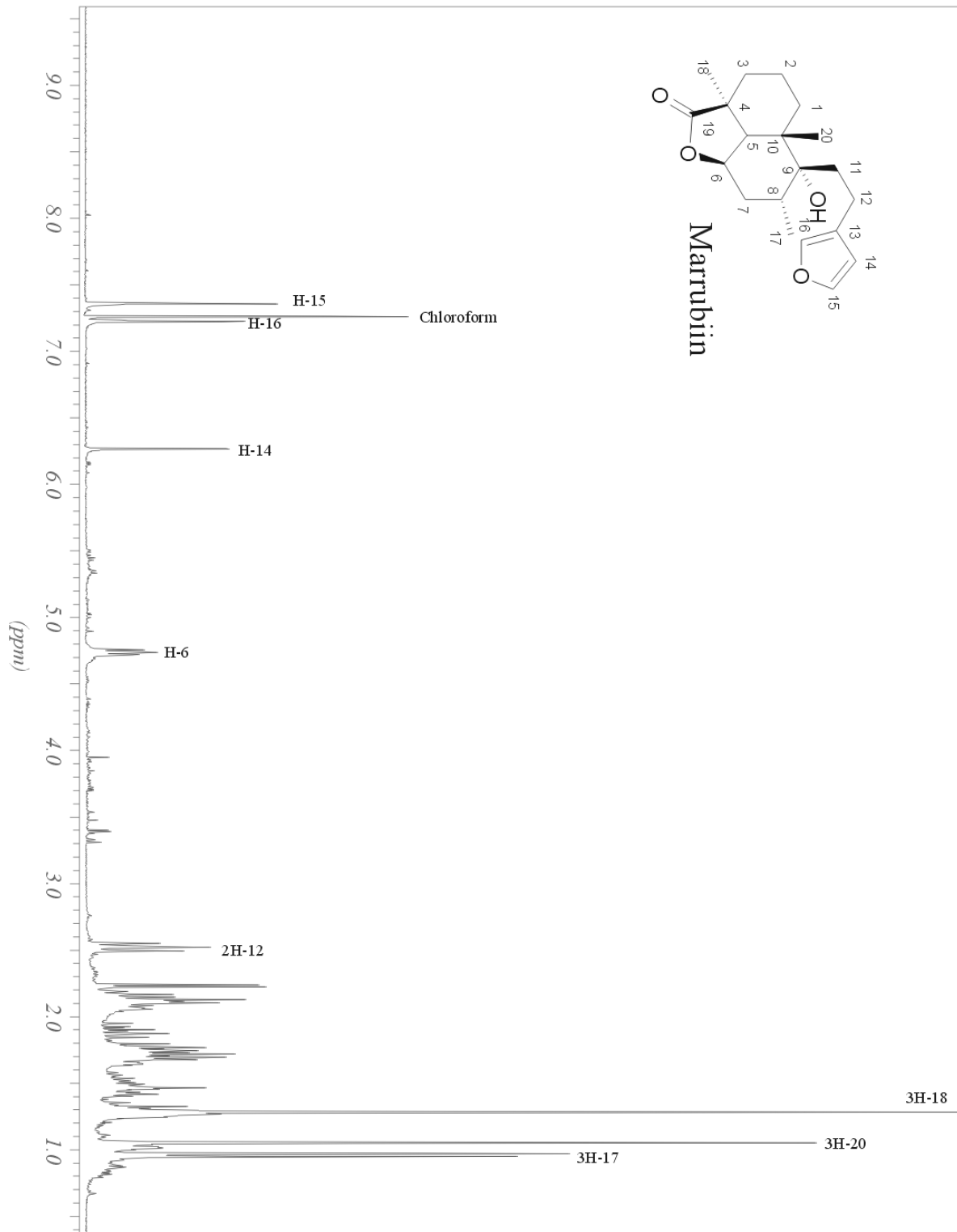
¹³C-NMR in CDCl₃:

16,6 (q, C-17) ; 18,2 (t, C-2) ; 21,0 (t, C-12) ; 22,3 (s, C-20); 23,0 (q, C-18) ; 28,4 (t, C-3); 28,7 (t, C-1) ; 31,6 (t, C-7); 32,4 (d, C-8); 35,2 (t, C-11); 39,8 (s, C-10); 43,8 (s, C-4); 44,9 (d, C-5); 75,8 (s, C-9); 76,2 (d, C-6); 110,7 (d, C-14); 125,0 (s, C-13); 138,6 (d, C-16); 143,1 (d, C-15); 183,8 (s, C-19)

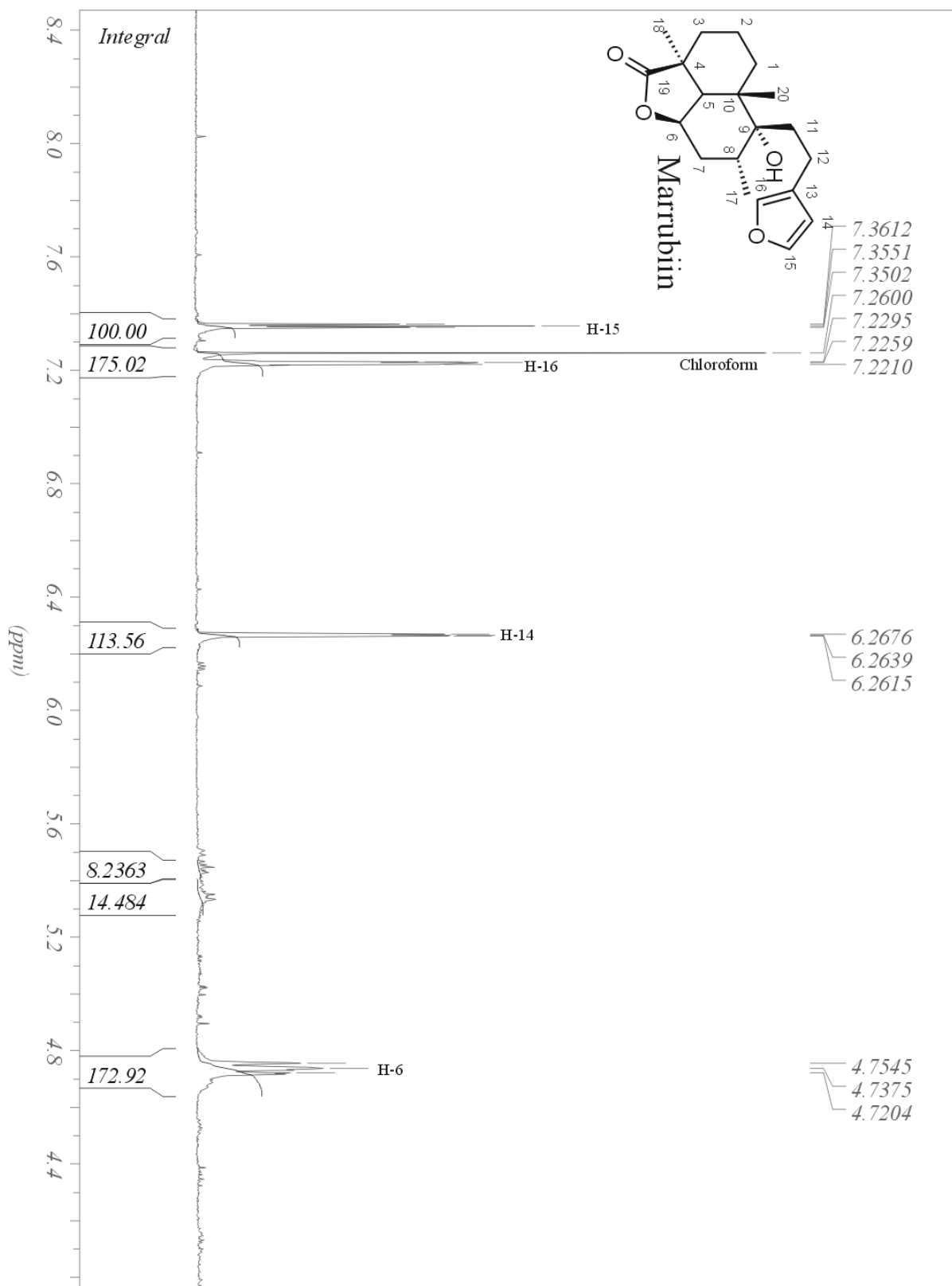
Knöss et al., 1997 :

16,6 (q, C-17) ; 18,1 (t, C-2) ; 21,0 (t, C-12) ; 22,3 (s, C-20); 23,0 (q, C-18) ; 28,3 (t, C-3); 28,6 (t, C-1) ; 31,5 (t, C-7); 32,3 (d, C-8); 35,1 (t, C-11); 39,7 (s, C-10); 43,7 (s, C-4); 44,8 (d, C-5); 75,8 (s, C-9); 76,2 (d, C-6); 110,7 (d, C-14); 125,0 (s, C-13); 138,6 (d, C-16); 143,1 (d, C-15); 183,9 (s, C-19)

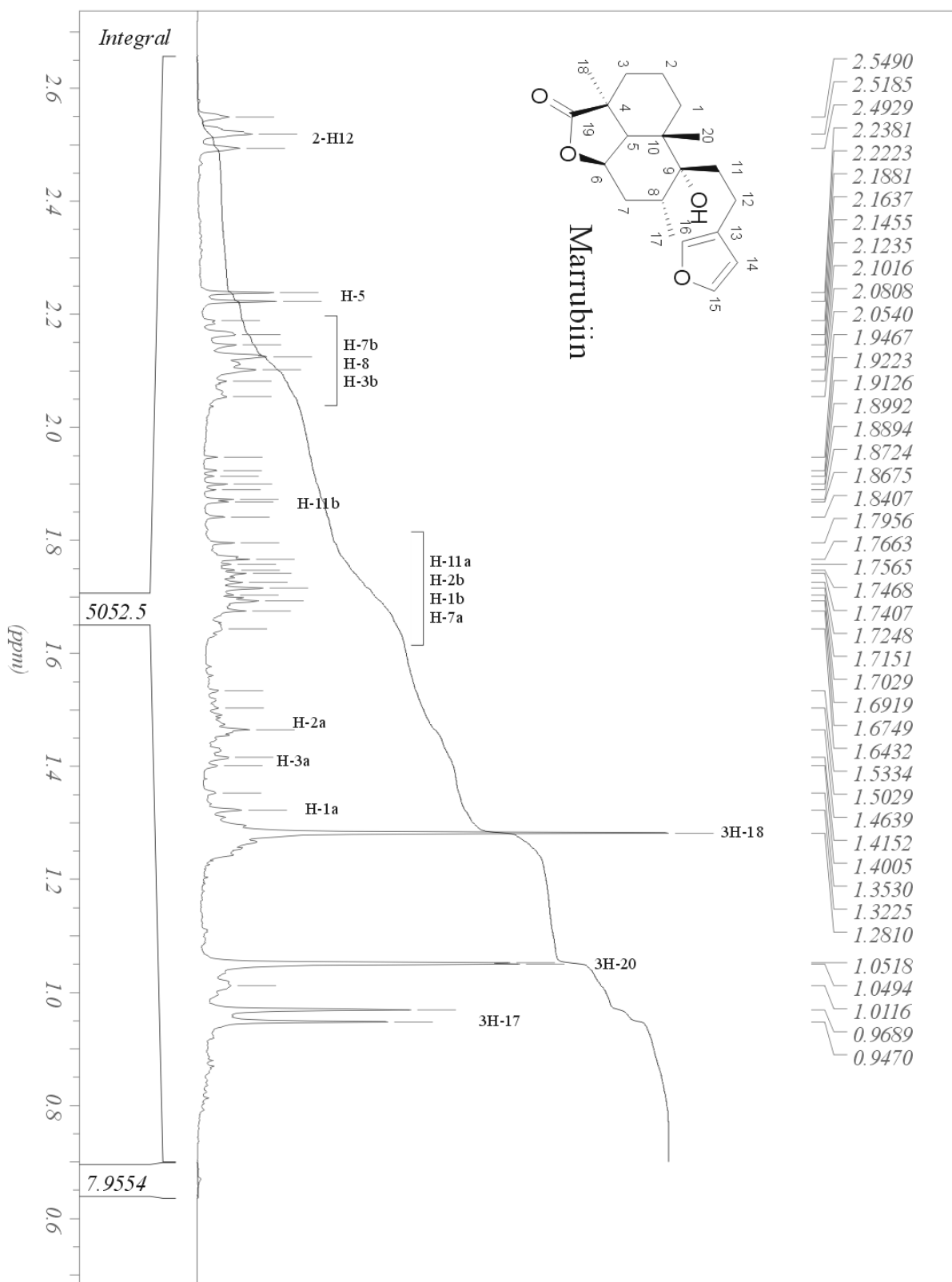


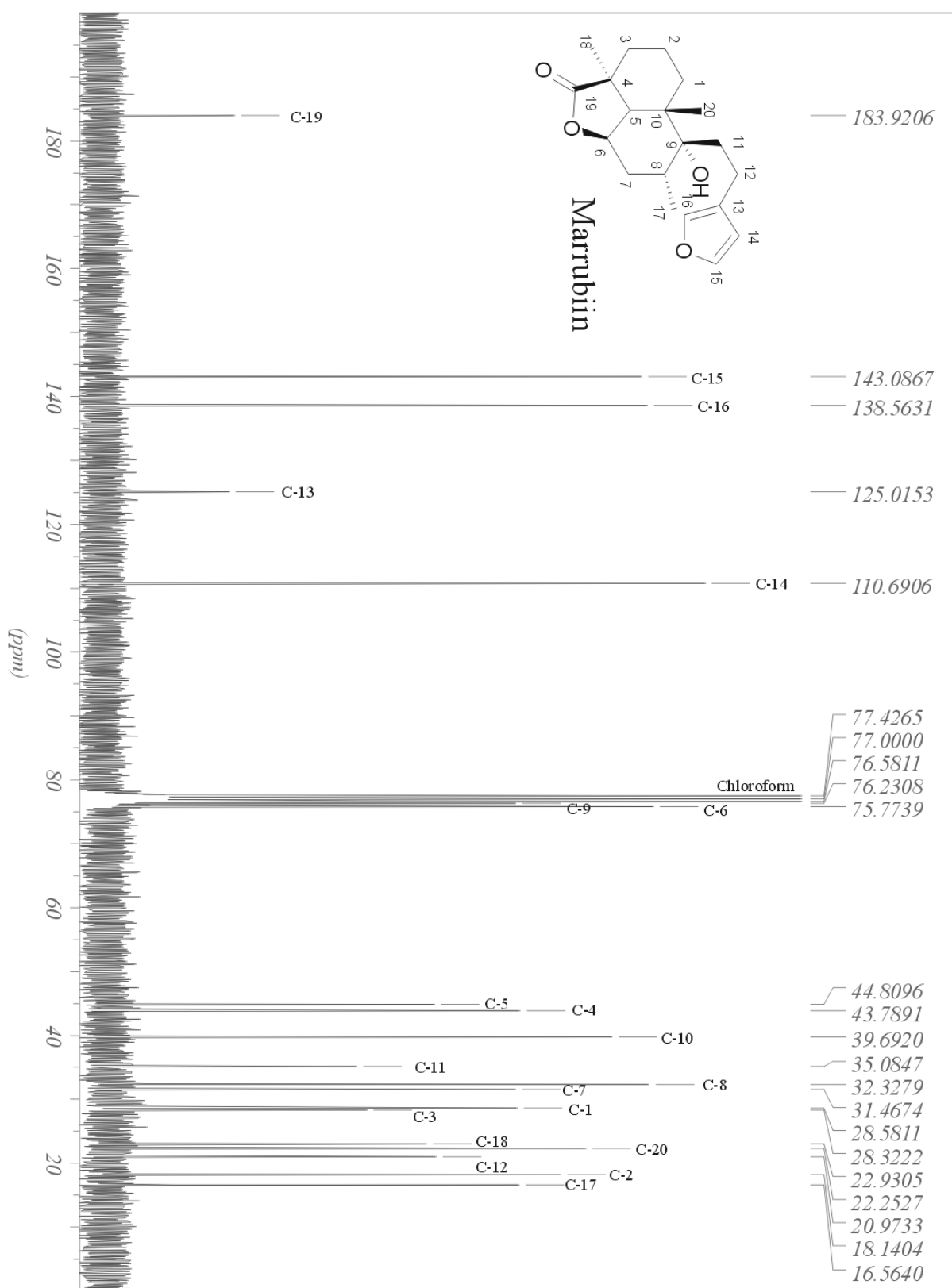


$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Marrubiin (300 MHz, CDCl_3)

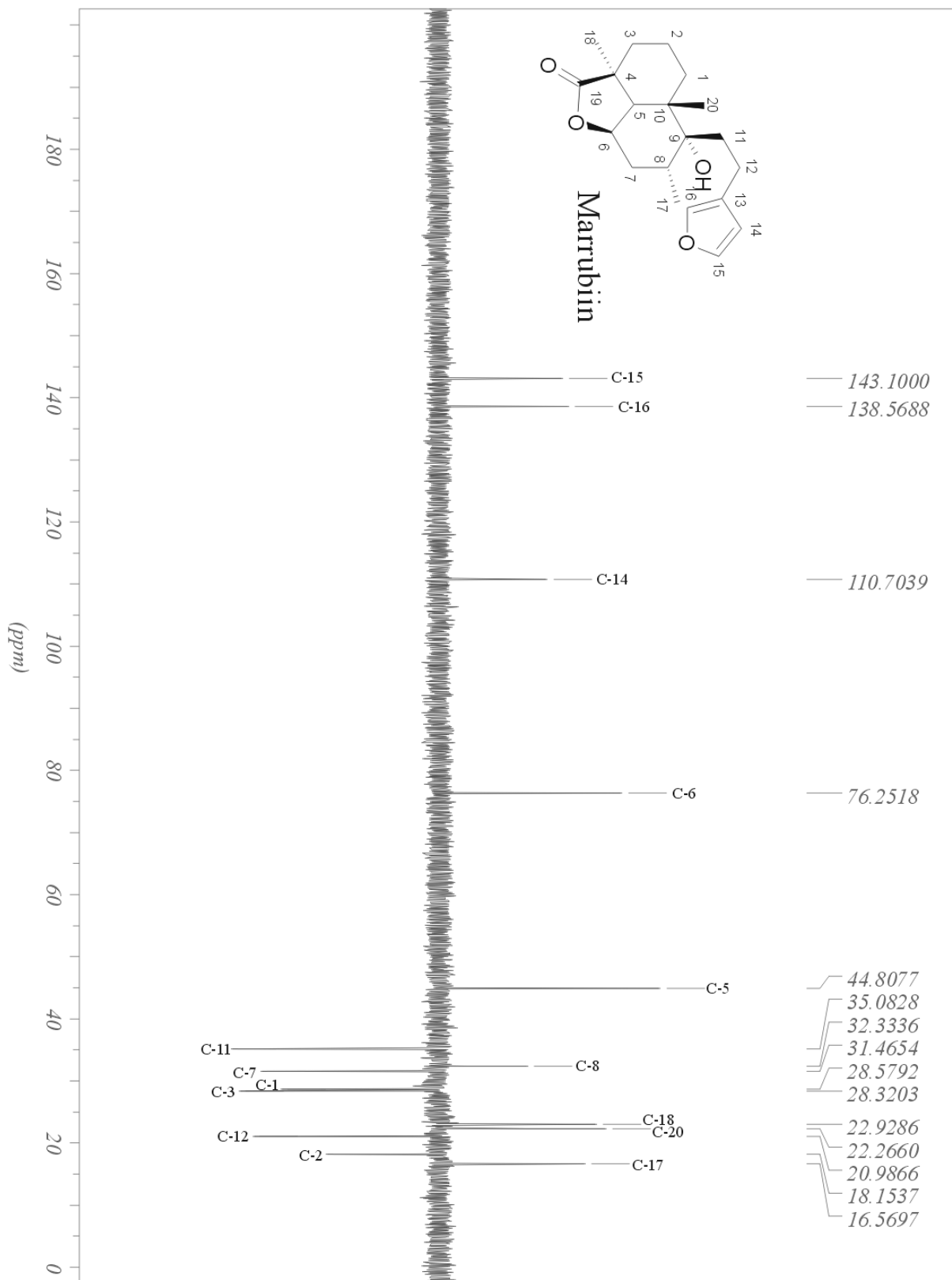


¹H-NMR-Spektrum Marrubiin (300 MHz, CDCl₃) – Auszug 1

 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Marrubiin (300 MHz, CDCl_3) – Auszug 2



^{13}C -NMR-Spektrum Marrubiin (300 MHz, CDCl_3)



DEPT 135-Spektrum Marrubiin (300 MHz, CDCl₃)

8.2 Marrubenol

Masse: 336,3

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

δ 0,96 (d, $J = 6,5$ Hz, H-17); 1,05 (s, H-20); 1,28 (s, H-18); 2,49 (m, H-12); 4,12 (m, H-6); 4,26 und 3,18 ($J = 11$ Hz, H-19); 6,27 (br. s, H-14); 7,22 (H-16); 7,35 (dd, H-15)

Knöss, 1996 (Marrubenol):

δ 0,77 (d, $J = 6,5$ Hz, H-17); 1,05 (s, H-20); 1,35 (s, H-18); 2,51 (m, H-12); 4,12 (m, H-6); 4,20 und 3,21 ($J = 11$ Hz, H-19); 6,25 (br. s, H-14); 7,25 (H-16); 7,35 (dd, H-15)

Knöss et al., 1997 (Marrubiin):

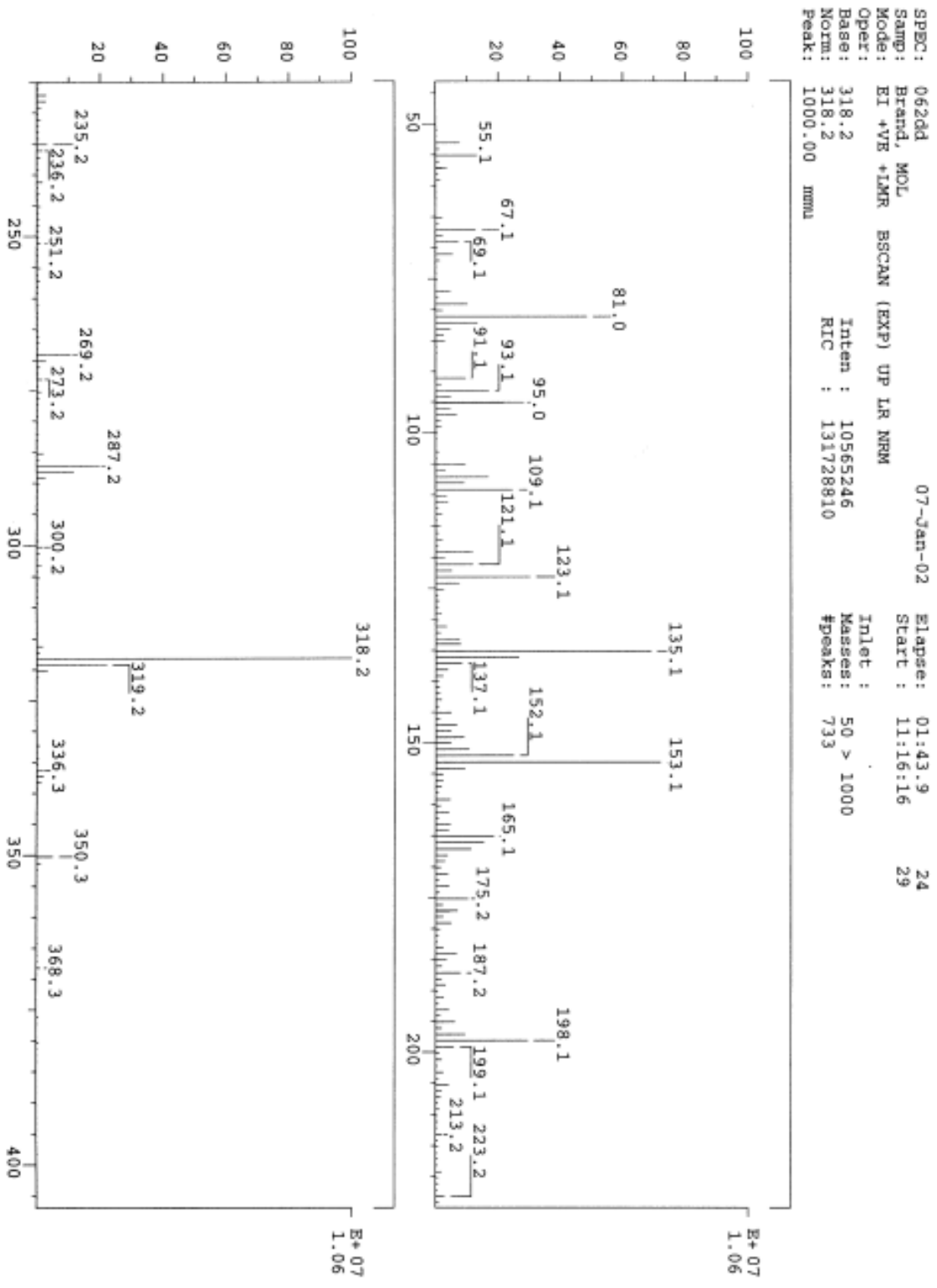
δ 0,95 (d, $J = 6,5$ Hz, H-17); 1,04 (s, H-20); 1,27 (s, H-18); 1,68 und 1,29 (m und m, H-1); 1,72 und 1,50 (m und m, H-1); 1,88 und 1,74 (m und m, H-11); 2,11 und 1,43 (m und m, H-3); 2,12 (m, H-8); 2,13 und 1,68 (m und m, H-7); 2,21 (d, $J = 5$ Hz, H-5); 2,51 (m, H-12); 4,72 (t, $J = 5$ Hz, H-5); 2,51 (m, H-12); 4,72 (t, $J = 5$ Hz, H-6); 6,25 (br. s, H-14); 7,21 (br.s, H-16); 7,34 (br. s, H-15)

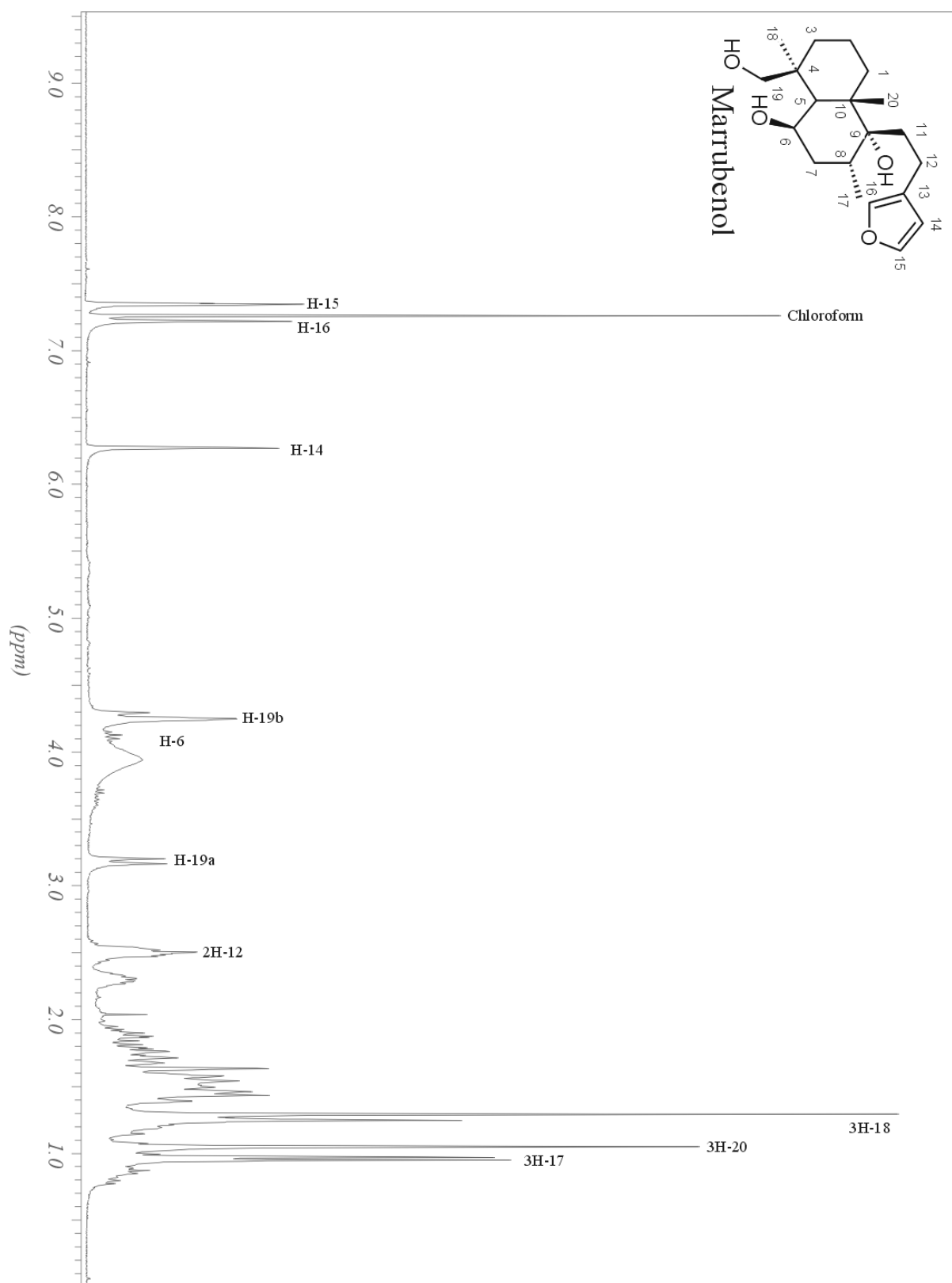
$^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 :

δ 16,2 (q, C-17) ; 18,2 (t, C-2) ; 18,5 (t, C-20) ; 19,4 (s, C-12); 28,0 (q, C-18) ; 29,6 (t, C-7); 31,1 (d, C-8); 33,7 (t, C-1) ; 34,9 (t, C-3); 38,8 (s, C-10); 40,4 (s, C-4); 43,3 (t, C-11); 49,4 (d, C-5); 69,5 (d, C-6); 68,8 (s, C-19) ; 76,6 (s, C-9); 110,8 (d, C-14); 125,4 (s, C-13); 138,5 (d, C-16); 142,9 (d, C-15)

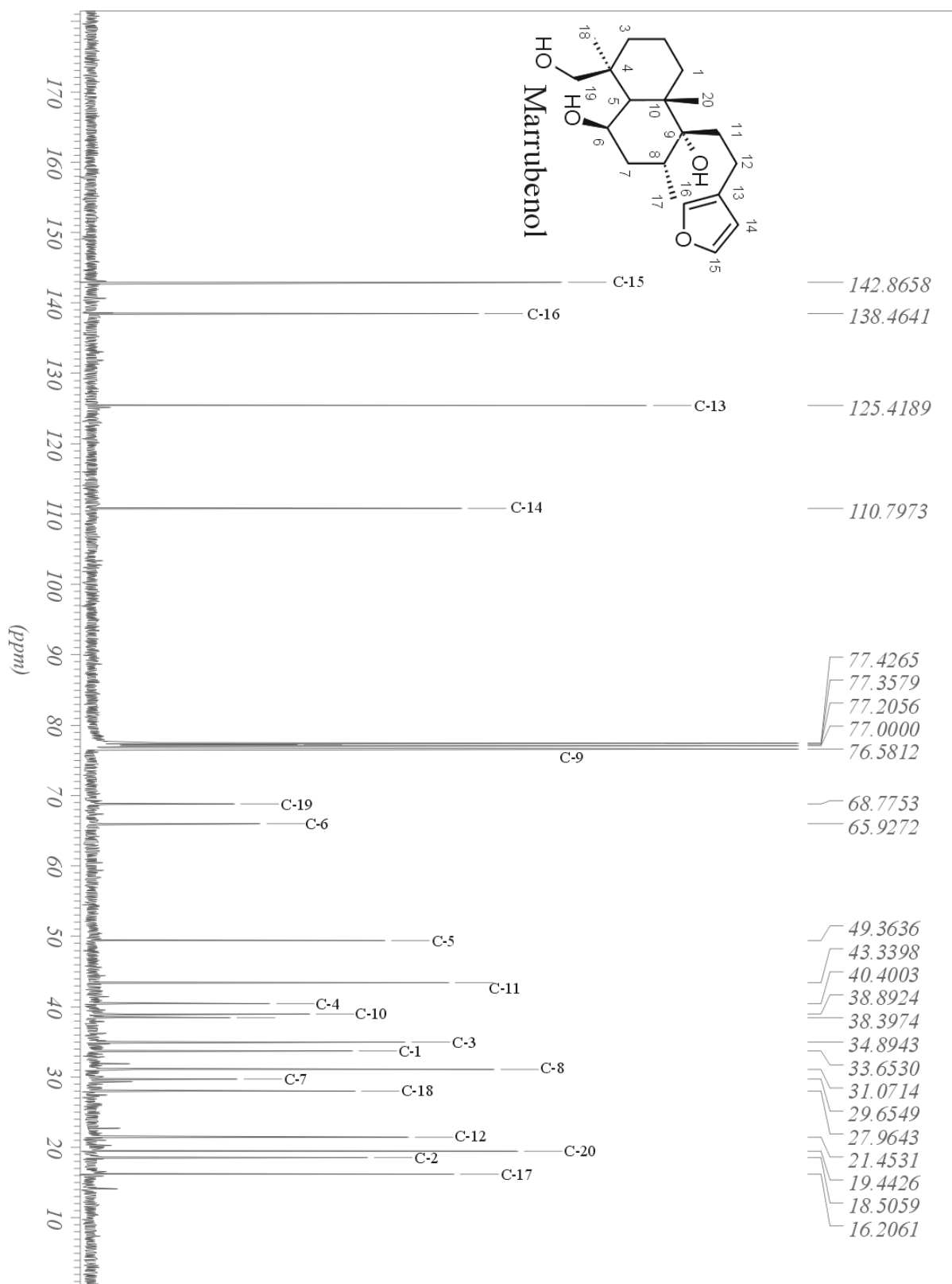
Knöss et al., 1997 (Marrubiin):

δ 16,6 (q, C-17) ; 18,1 (t, C-2) ; 21,0 (t, C-12) ; 22,3 (s, C-20); 23,0 (q, C-18) ; 28,3 (t, C-3); 28,6 (t, C-1) ; 31,5 (t, C-7); 32,3 (d, C-8); 35,1 (t, C-11); 39,7 (s, C-10); 43,7 (s, C-4); 44,8 (d, C-5); 75,8 (s, C-9); 76,2 (d, C-6); 110,7 (d, C-14); 125,0 (s, C-13); 138,6 (d, C-16); 143,1 (d, C-15); 183,9 (s, C-19)

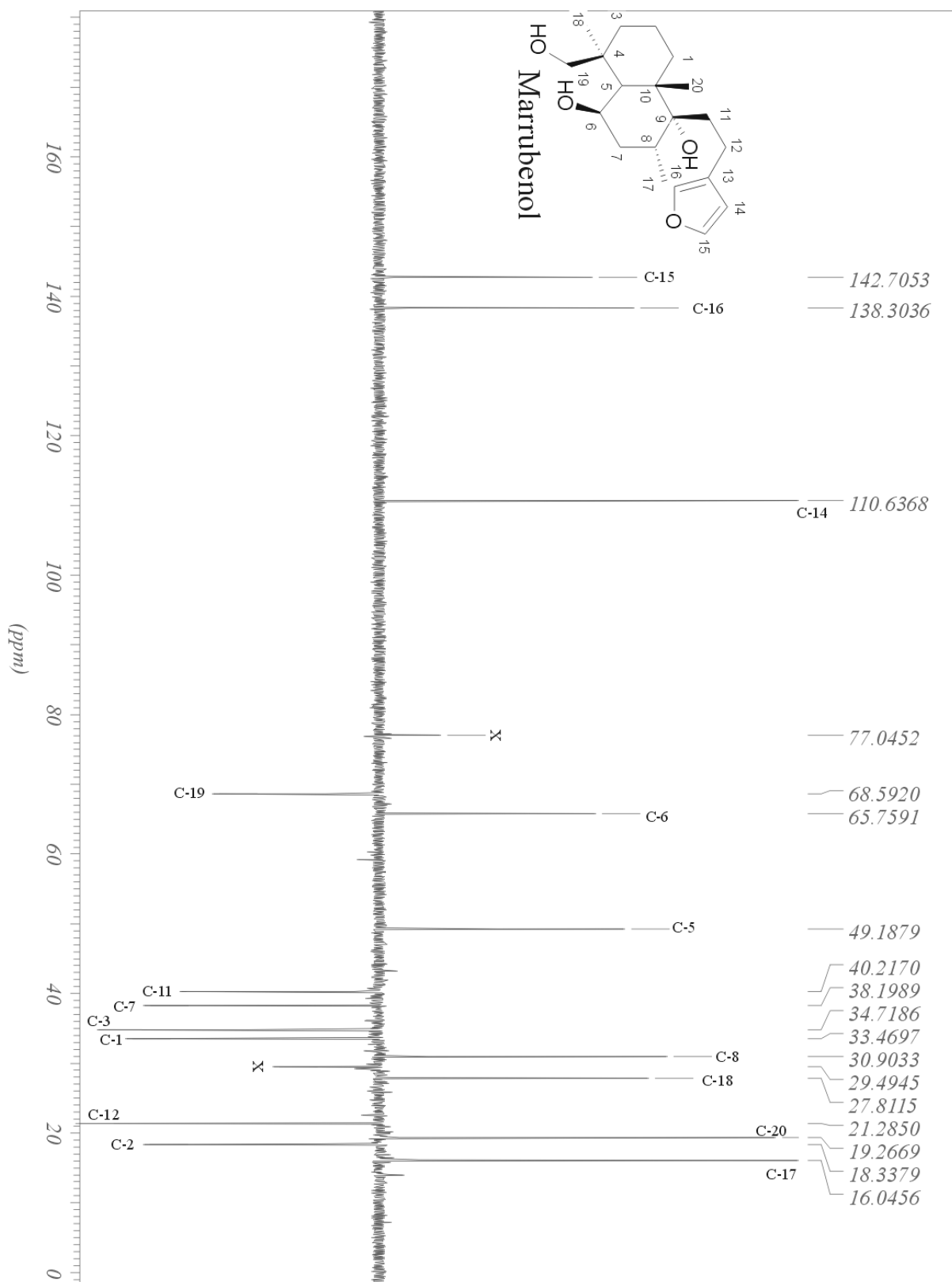


 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Marrubenol (300 MHz, CDCl_3)

8. Spektrenanhang



¹³C-NMR-Spektrum Marrubienol (300 MHz, CDCl₃)

DEPT 135-Spektrum Marrubienol (300 MHz, CDCl₃)

8.3 Marrubenolsuccinat

Masse: 446,2

¹H-NMR in CDCl₃:

δ 0,94 (d, J = 6 Hz, H-17); 1,00 (s, H-20); 1,21 (s, H-18); 2,62 (br. m, H-32 und H-33); 4,12 (m, H-19); 4,54 (q, H-6); 6,26 (br. s, H-14); 7,21 (H-16); 7,34 (dd, H-15)

Knöss, 1996 (Marrubenol):

δ 0,77 (d, J = 6,5 Hz, H-17); 1,05 (s, H-20); 1,35 (s, H-18); 2,51 (m, H-12); 4,12 (m, H-6); 4,20 und 3,21 (J = 11 Hz, H-19); 6,25 (br. s, H-14); 7,25 (H-16); 7,35 (dd, H-15)

Knöss et al., 1997 (Marrubiin):

δ 0,95 (d, J = 6,5 Hz, H-17); 1,04 (s, H-20); 1,27 (s, H-18); 1,68 und 1,29 (m und m, H-1); 1,72 und 1,50 (m und m, H-1); 1,88 und 1,74 (m und m, H-11); 2,11 und 1,43 (m und m, H-3); 2,12 (m, H-8); 2,13 und 1,68 (m und m, H-7); 2,21 (d, J = 5 Hz, H-5); 2,51 (m, H-12); 4,72 (t, J = 5 Hz, H-5); 2,51 (m, H-12); 4,72 (t, J = 5 Hz, H-6); 6,25 (br. s, H-14); 7,21 (br.s, H-16); 7,34 (br. s, H-15)

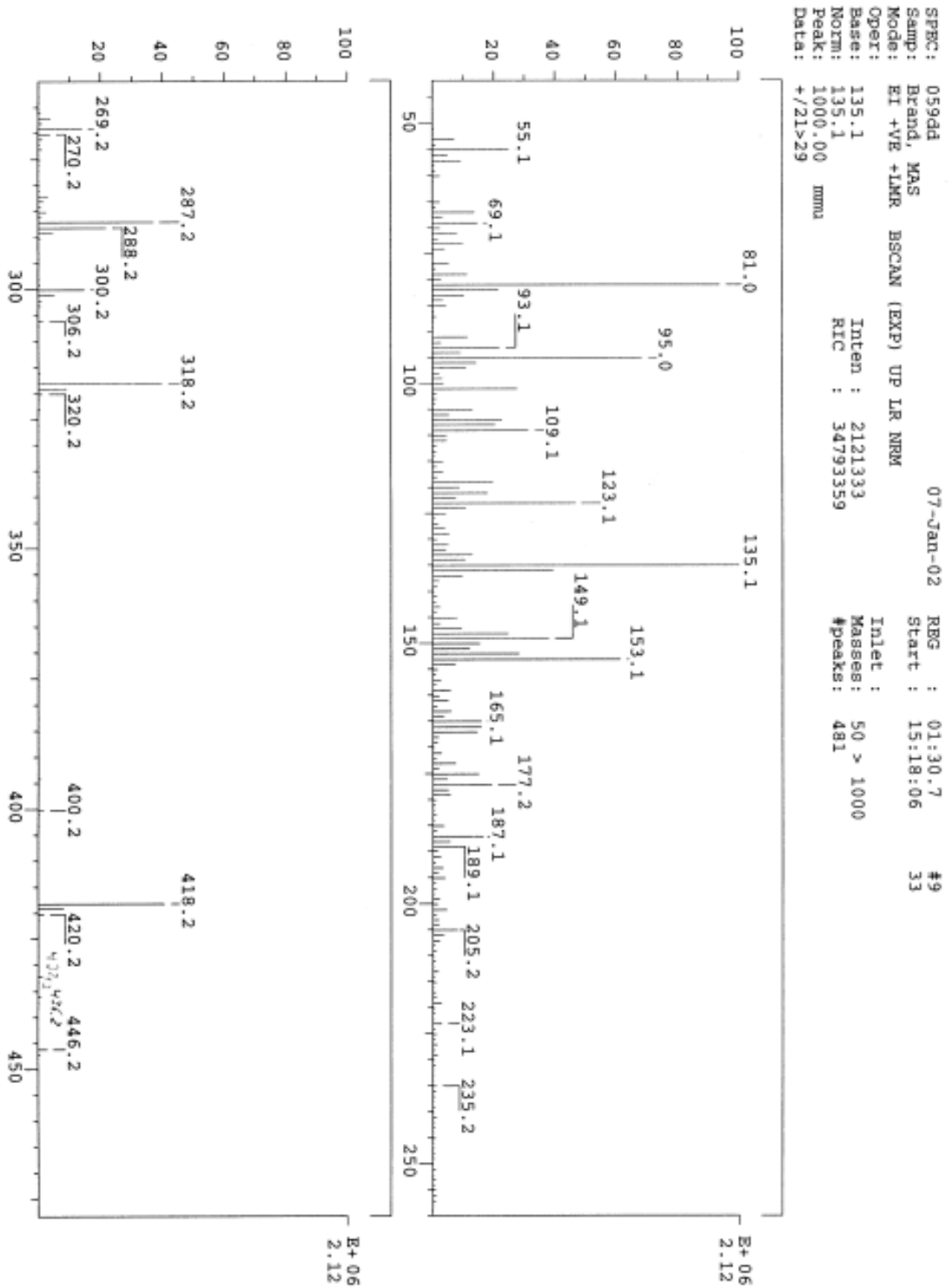
¹³C-NMR in CDCl₃:

δ 16,2 (q, C-17) ; 18,3 (t, C-2) ; 20,0 (t, C-12) ; 21,4 (s, C-20); 27,3 (q, C-18) ; 29,8 (d, C-8); 33,3 (t, C-1) ; 34,8 (t, C-3); 38,0 (s, C-10); 39,5 (s, C-4); 43,3 (t, C-11); 49,8 (d, C-5); 66,5 (d, C-6); 69,0 (s, C-19) ; 110,7 (d, C-14); 125,3 (s, C-13); 138,5 (d, C-16); 142,9 (d, C-15)

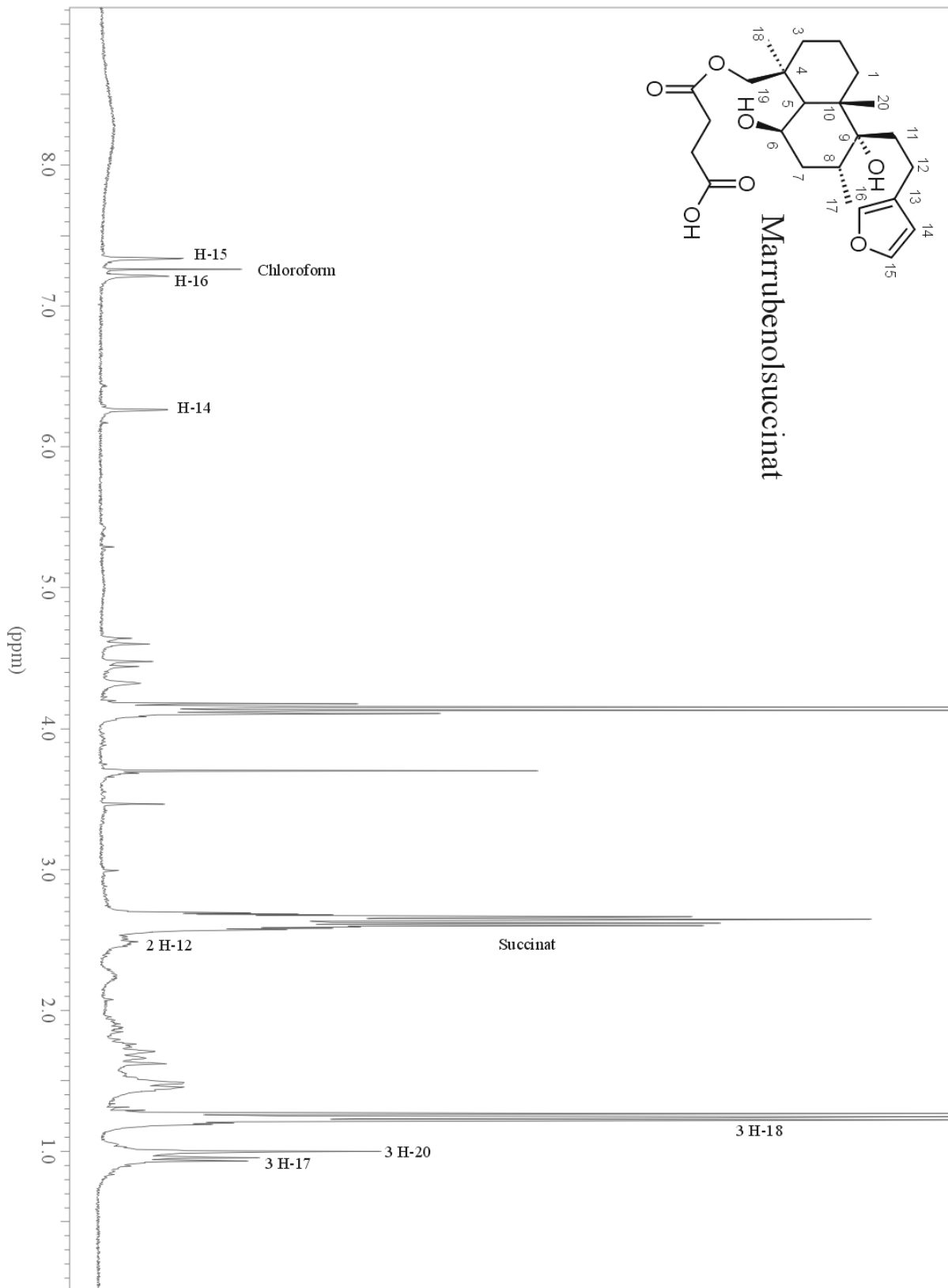
Succinat: 28,9 (C-22 und 23); 171,1 und 177,8 (C-21 und C-24).

Knöss et al., 1997 (Marrubiin):

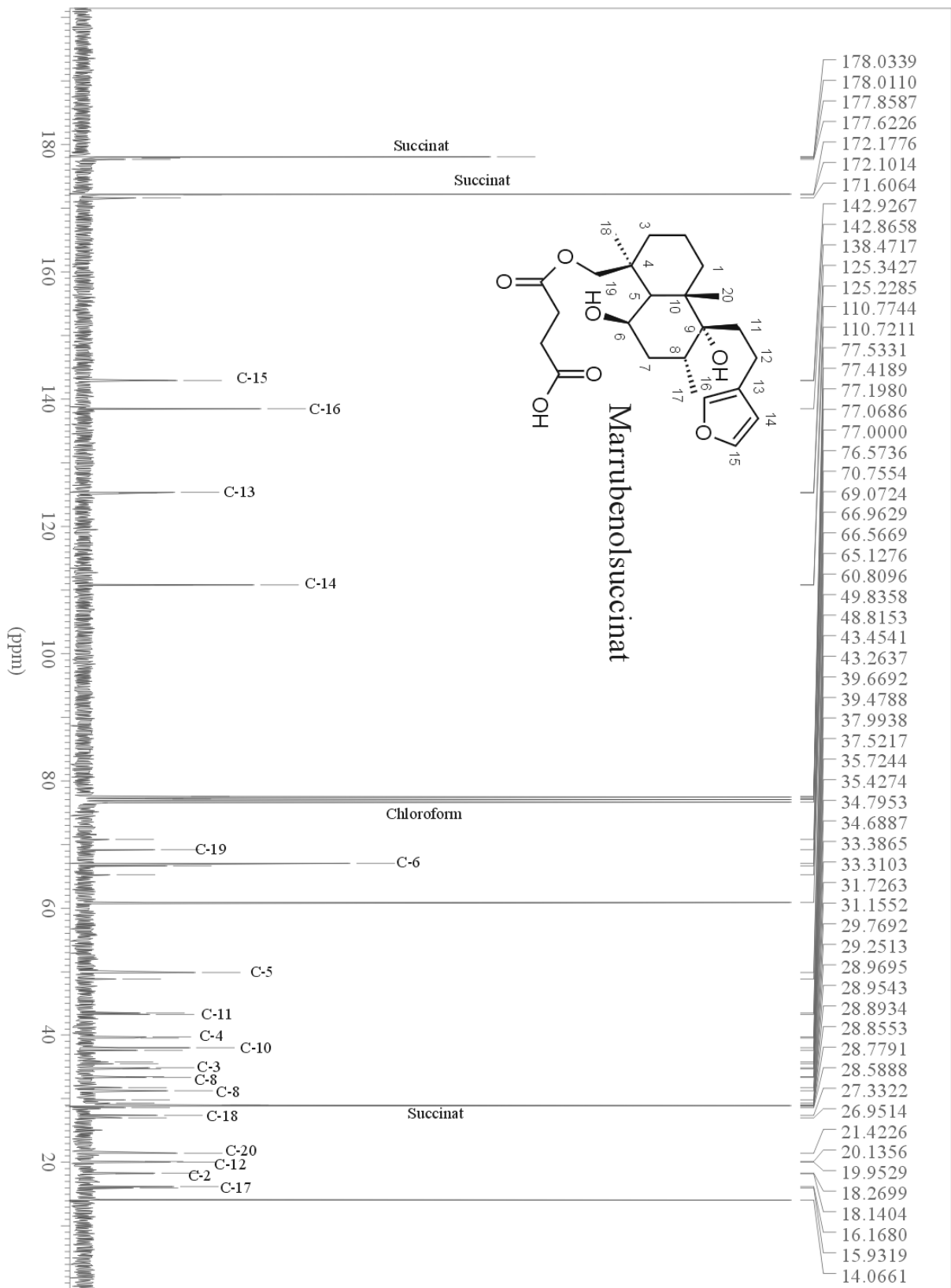
δ 16,6 (q, C-17) ; 18,1 (t, C-2) ; 21,0 (t, C-12) ; 22,3 (s, C-20); 23,0 (q, C-18) ; 28,3 (t, C-3); 28,6 (t, C-1) ; 31,5 (t, C-7); 32,3 (d, C-8); 35,1 (t, C-11); 39,7 (s, C-10); 43,7 (s, C-4); 44,8 (d, C-5); 75,8 (s, C-9); 76,2 (d, C-6); 110,7 (d, C-14); 125,0 (s, C-13); 138,6 (d, C-16); 143,1 (d, C-15); 183,9 (s, C-19)



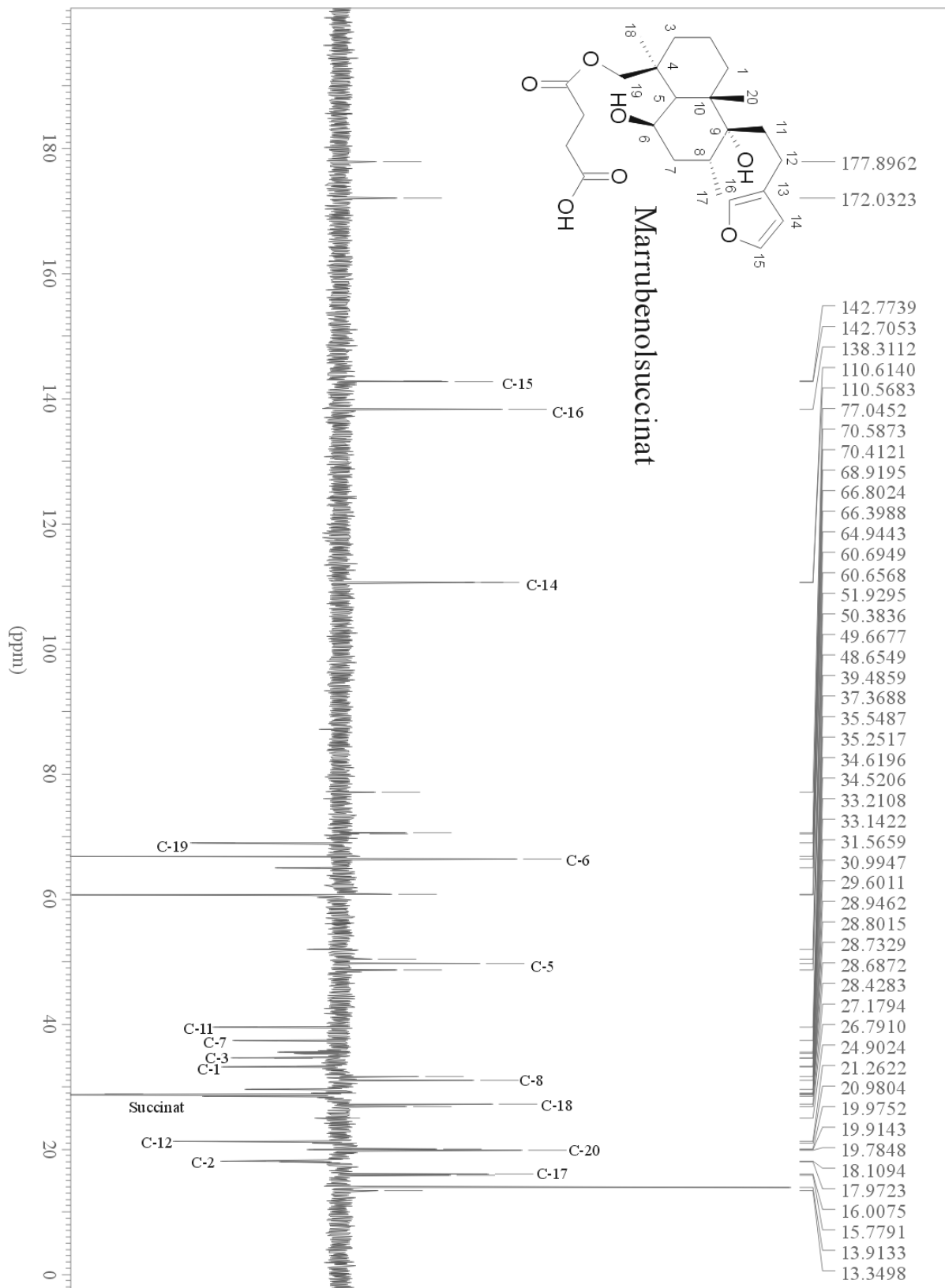
EI-MS Marrubenolsuccinat



$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Marrubenosuccinat (300 MHz, CDCl_3)



¹³C-NMR-Spektrum Marrubensuccinat (300 MHz, CDCl₃)



DEPT 135-Spektrum Marrubenolsuccinat (300 MHz, CDCl₃)

8.4 Marrubiinsäure

Masse: 350,2

Verunreinigt mit Marrubiin (332,2)

¹H-NMR in CDCl₃ (s. Spektrenanhang):

δ 1,01 (d, J = 7,5 Hz, H-17); 1,12 (s, H-20); 1,30 (s, H-18); 2,3 (m, H-5); 2,52 (m, H-12); 4,38 (m, H-6); 6,30 (br.s, H-14); 7,26 (br.s, H-16); 7,37 (br.s, H-15)

Knöss et al., 1997 (Marrubiin):

δ 0,95 (d, J = 6,5 Hz, H-17); 1,04 (s, H-20); 1,27 (s, H-18); 1,68 und 1,29 (m und m, H-1); 1,72 und 1,50 (m und m, H-1); 1,88 und 1,74 (m und m, H-11); 2,11 und 1,43 (m und m, H-3); 2,12 (m, H-8); 2,13 und 1,68 (m und m, H-7); 2,21 (d, J = 5 Hz, H-5); 2,51 (m, H-12); 4,72 (t, J = 5 Hz, H-5); 2,51 (m, H-12); 4,72 (t, J = 5 Hz, H-6); 6,25 (br. s, H-14); 7,21 (br.s, H-16); 7,34 (br. s, H-15)

¹³C-NMR in CDCl₃ (s. Spektrenanhang):

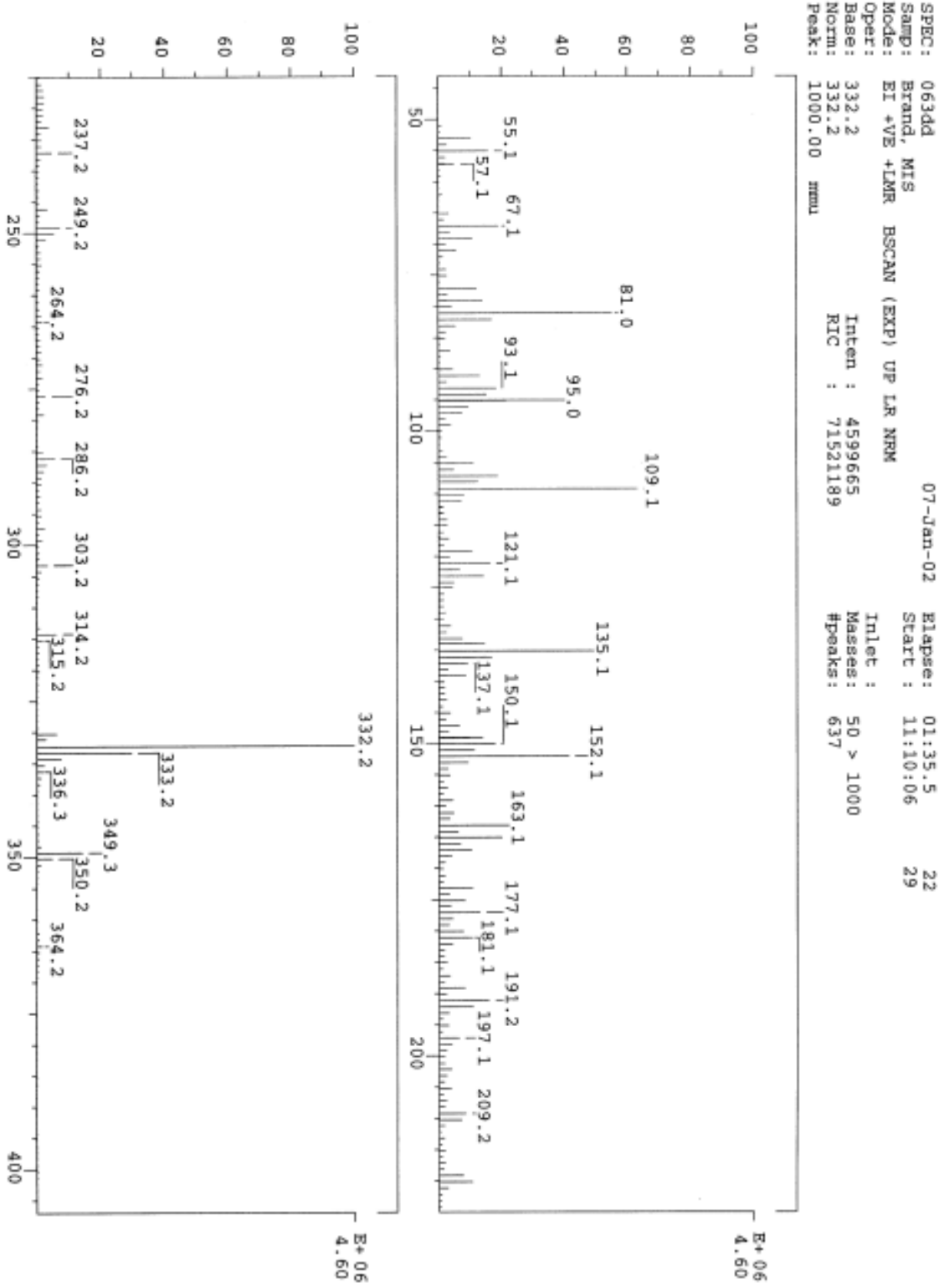
Knöss et al., 1997 (Marrubiin):

δ 52,0 (d, C-5); 67,0 (s, C-9); 76,2 (d, C-6); 111,7 (d, C-14); 127,1 (s, C-13); 139,6 (d, C-16); 144,0 (d, C-15); 183,6 (s, C-19)

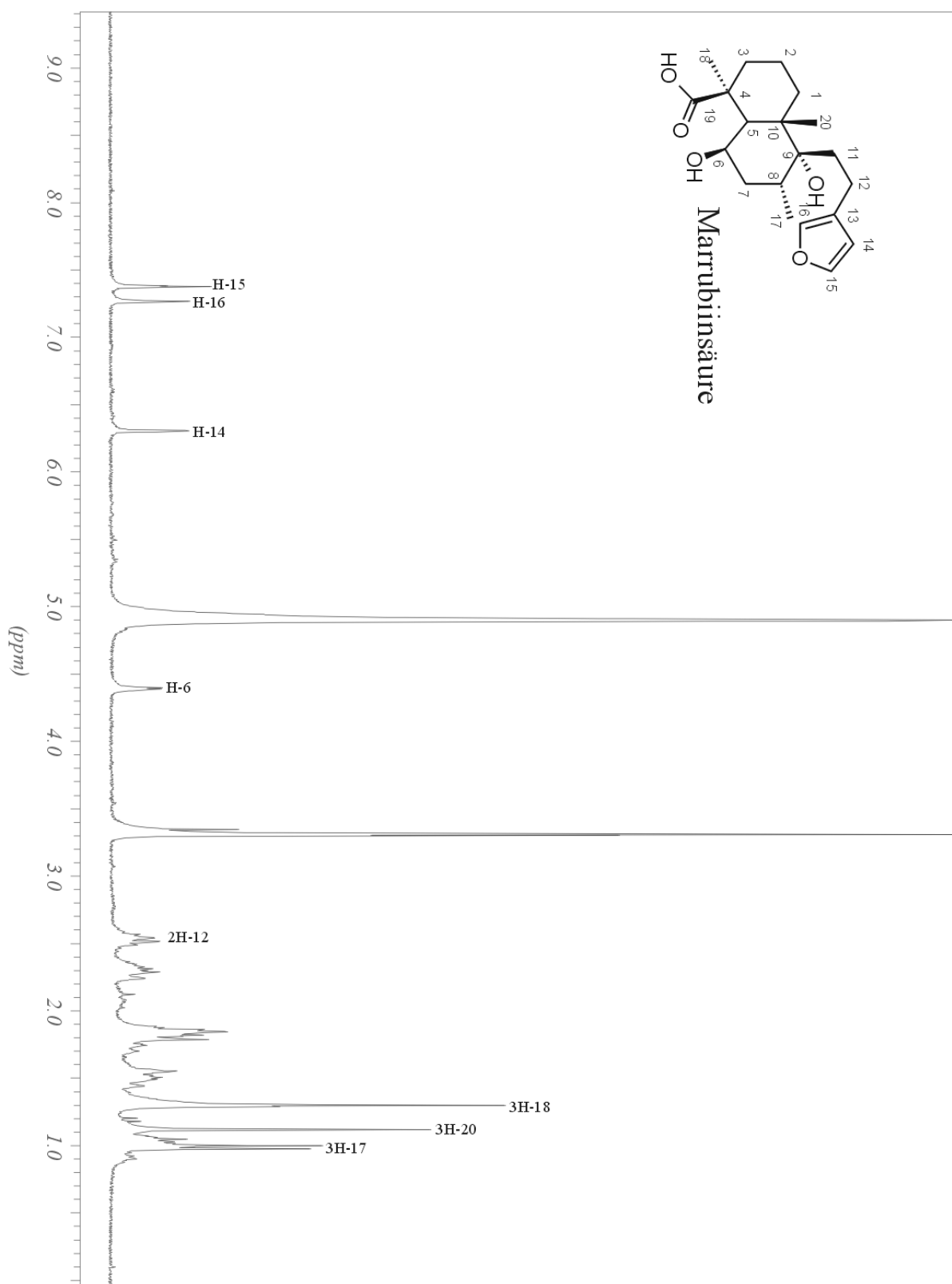
(Verunreinigt mit Marrubiin)

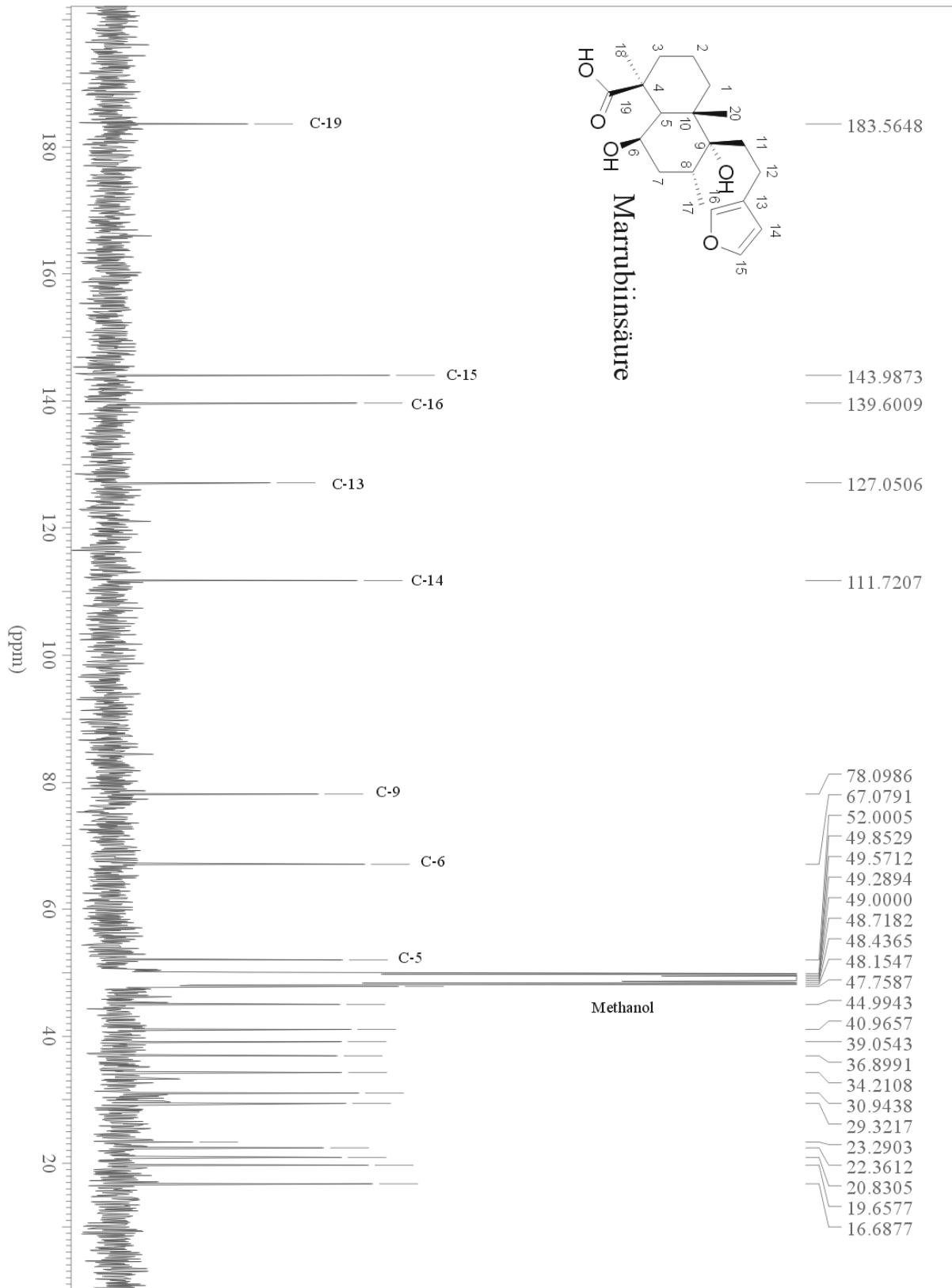
Knöss et al., 1997 (Marrubiin):

δ 16,6 (q, C-17) ; 18,1 (t, C-2) ; 21,0 (t, C-12) ; 22,3 (s, C-20); 23,0 (q, C-18) ; 28,3 (t, C-3); 28,6 (t, C-1) ; 31,5 (t, C-7); 32,3 (d, C-8); 35,1 (t, C-11); 39,7 (s, C-10); 43,7 (s, C-4); 44,8 (d, C-5); 75,8 (s, C-9); 76,2 (d, C-6); 110,7 (d, C-14); 125,0 (s, C-13); 138,6 (d, C-16); 143,1 (d, C-15); 183,9 (s, C-19)

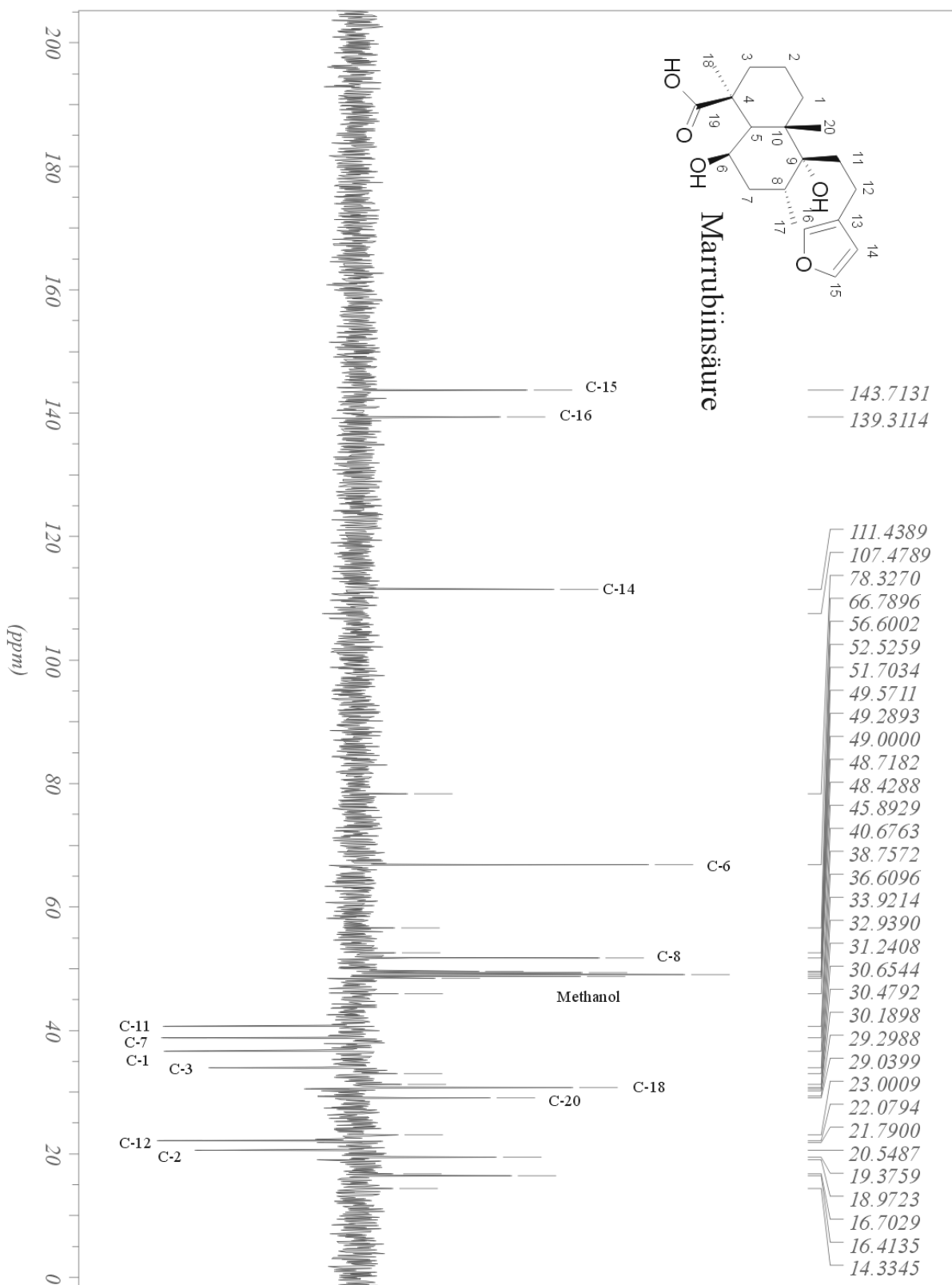


EI-MS Marrubiinsäure

 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Marrubiinsäure (300 MHz, D_3COD)



¹³C-NMR-Spektrum Marrubiinsäure (300 MHz, D₃COD)



DEPT 135-NMR-Spektrum Marrubiinsäure (300 MHz, D₃COD)

8.5 Oleanolsäure

Masse: 456,4

Literatur : 456 (Ulubelen et al., 1999)

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 (s. Spektrenanhang):

δ 0,67 (3H, s, H-25); 0,71 (3H, s, H-24); 0,85 (3H, s, H-29); 0,87 (3H, s, H-23); 0,89 (3H, s, H-26); 1,09 (3H, s, H-30); 3,29 (1H, m, H-18); 4,30 (1H, d, $J = 6$, H-3); 5,16 (1H, m, H-12)

Mendez et al., 1995:

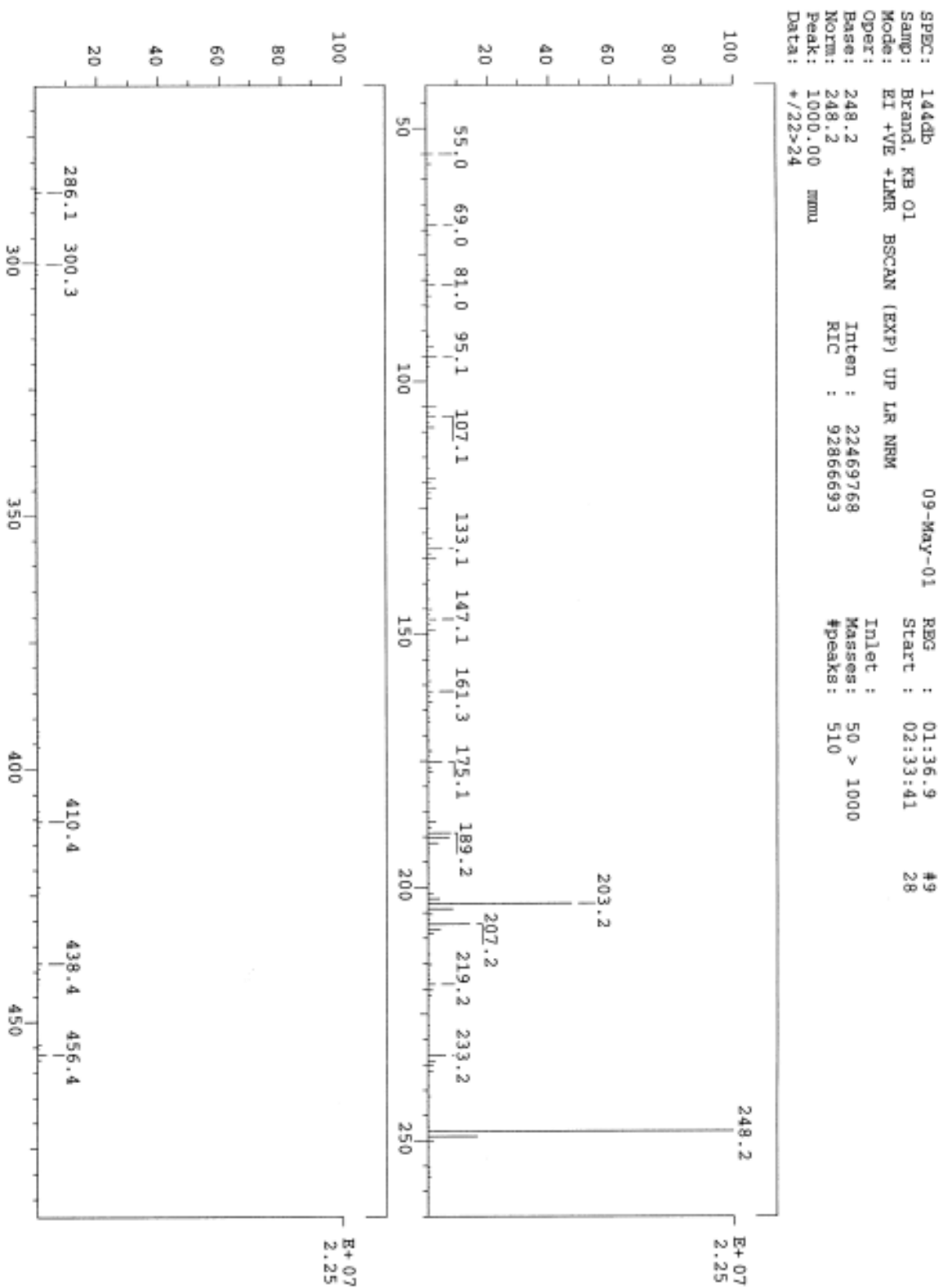
δ 0,70 (s, H-30); 0,86 (s, H-24); 0,86 (s, H-26); 0,99 ($J = 6,5$ Hz, H-23); 1,08 (s, H-27); 3,20 ($J = 11,4$ und $5,5$ Hz, H-3); 5,14 (t, $J = 3,5$ Hz, H-12);

$^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 (s. Spektrenanhang):

δ 17,9 (C-25); 18,8 (C-24); 19,6 (C-26); 20,8 (C-6); 25,4 (C-11); 25,7 (C-16); 26,2 (C-30); 28,4 (C-27); 29,8 (C-2); 30,0 (C-15); 31,0 (C-20); 33,2 (C-22); 34,9 (C-7); 35,2 (C-29); 35,6 (C-21); 36,1 (C-10); 43,6 (C-18); 44,1 (C-14); 48,2 (C-19); 48,5 (C-17); 49,9 (C-9); 57,6 (C-5); 79,6 (C-3); 124,3 (C-12); 146,6 (C-13); 181,3 (C-28)

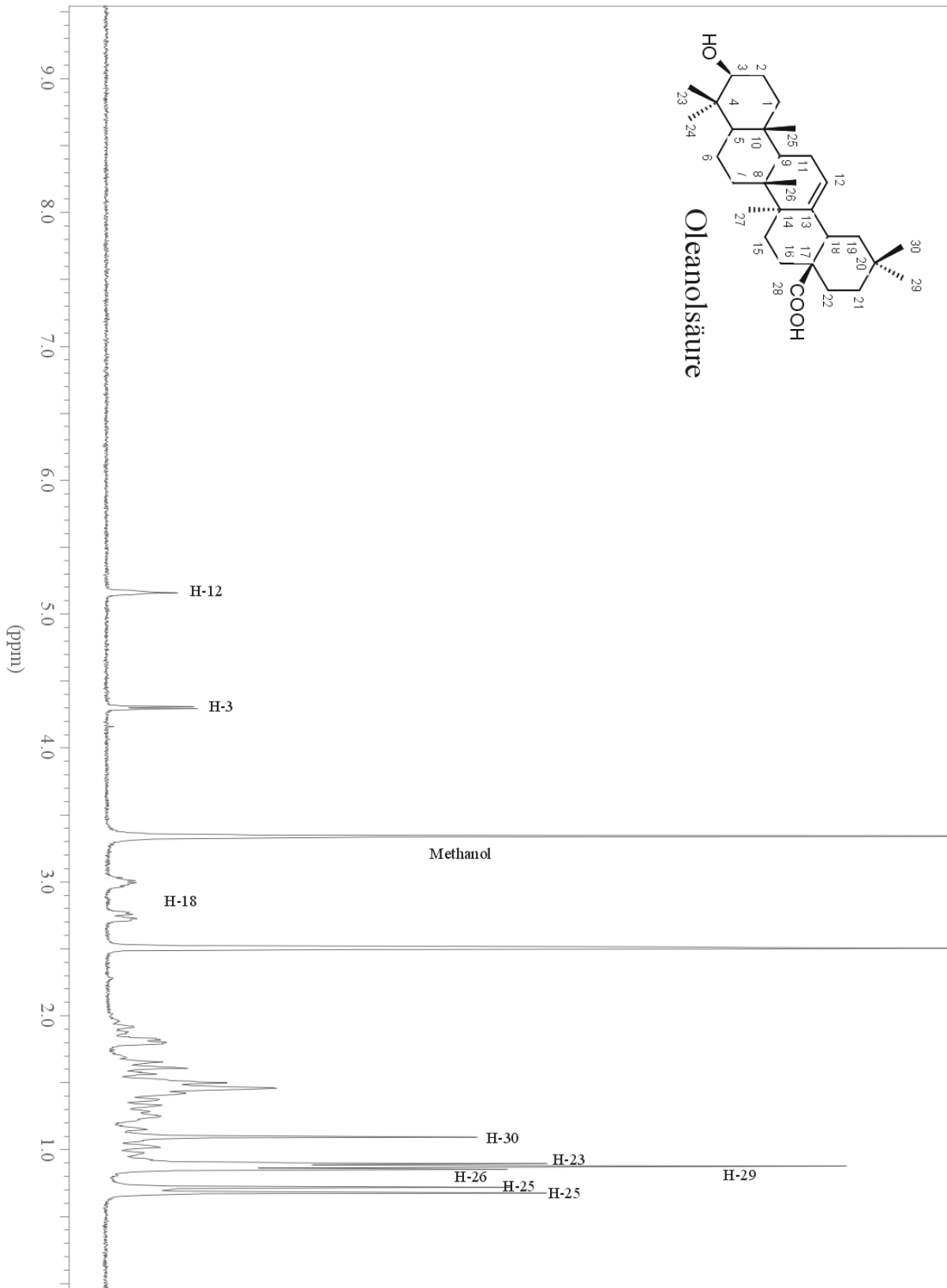
Maillard et al., 1992:

δ 15,3 (C-25); 15,6 (C-24); 16,8 (C-26); 18,3 (C-6); 23,1 (C-11); 23,4 (C-16); 23,6 (C-30); 26,0 (C-27); 27,4 (C-2); 27,7 (C-15); 28,1 (C-23); 30,6 (C-20); 32,3 (C-22); 32,6 (C-7); 33,1 (C-29); 33,8 (C-21); 37,0 (C-10); 38,5 (C-1); 38,7 (C-4); 39,3 (C-8); 41,3 (C-18); 41,6 (C-14); 45,8 (C-19); 46,6 (C-17); 47,6 (C-9); 55,2 (C-5); 78,7 (C-3); 122,1 (C-12); 143,4 (C-13); 181,0 (C-28)

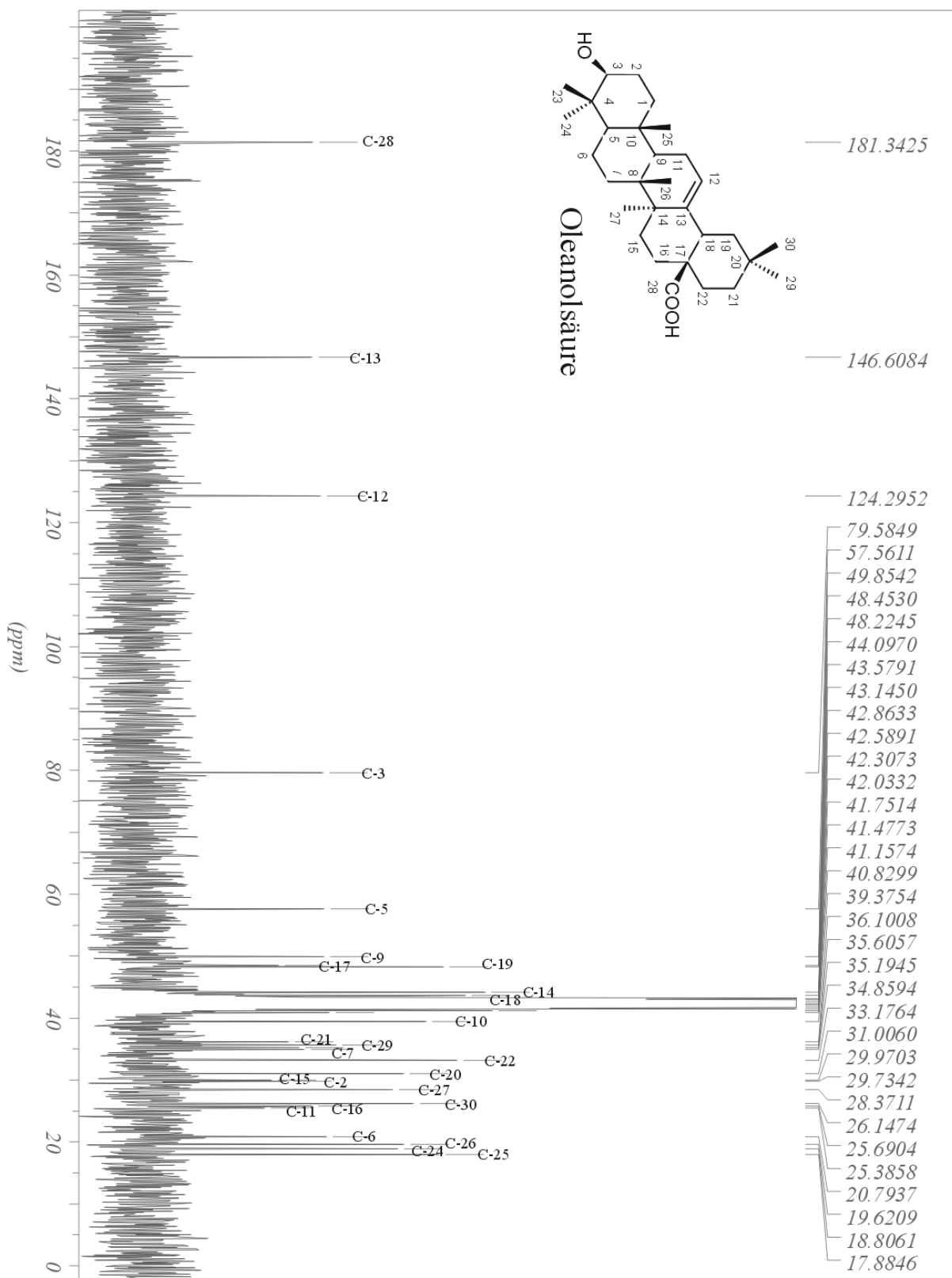


EI-MS Oleanolsäure

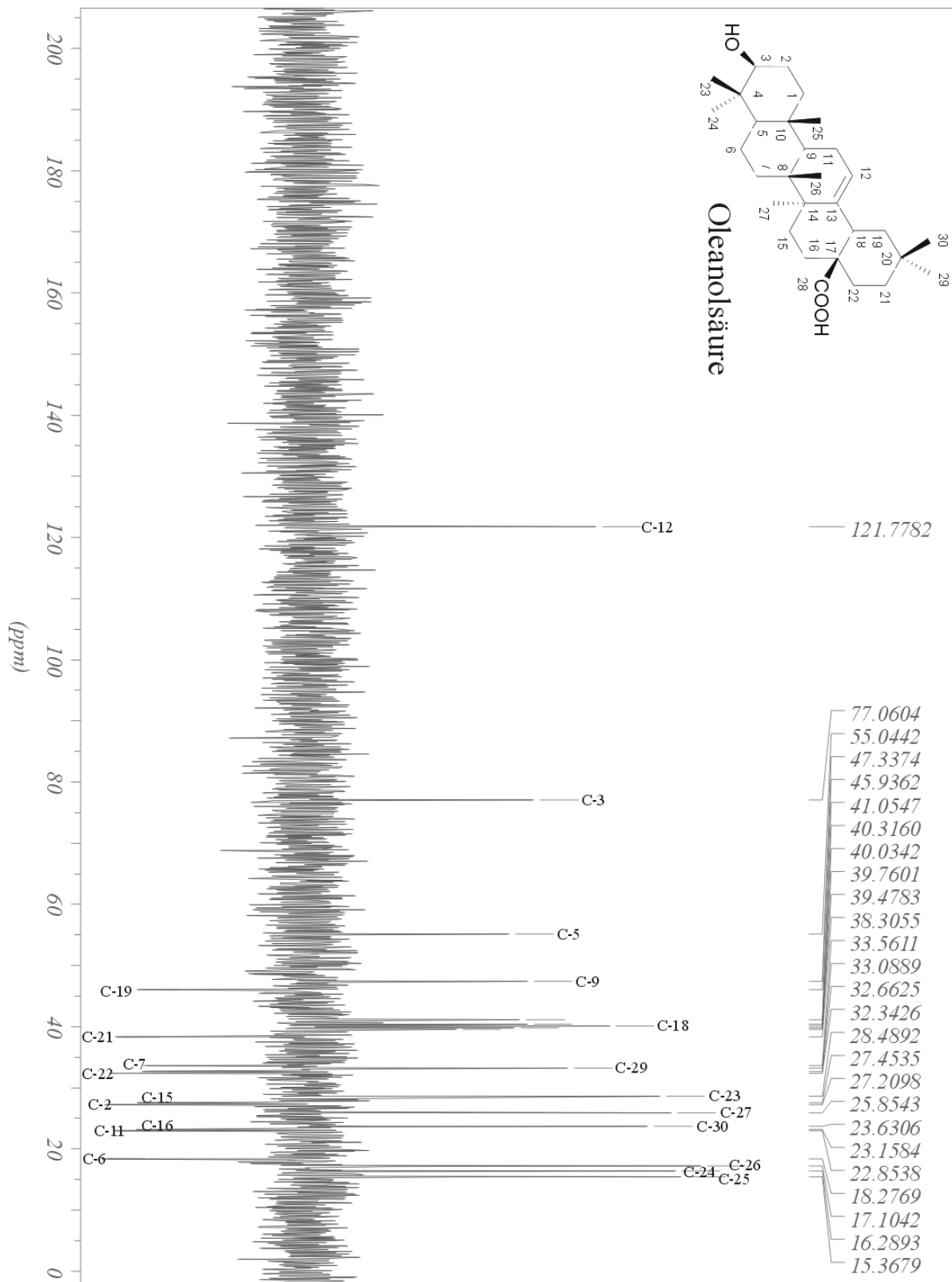
8. Spektrenanhang



$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Oleanolsäure (300 MHz, D_3COD)



¹³C-NMR-Spektrum Oleanolsäure (300 MHz, D₃COD)



DEPT 135-Spektrum Oleanolsäure (300 MHz, D₃COD)

8.6 Erythrodiol

Masse : 442,4

Literatur : 442 (Lee et al., 2000)

$^1\text{H-NMR}$ in D_3COH :

δ 0,66 (3H,s); 0,81 (3H, s, H-25); 0,83(3H, s, H-24); 0,85 (3H, s, H-29); 0,87 (3H, s, H-23); 0,88 (3H, s, H-26); 1,09 (3H, s, H-30); 3,34 (H-18); 4,30(1H, m, H-3); 5,09 (1H, m, H-12)

Lee et al.,2000 in CDCl_3 :

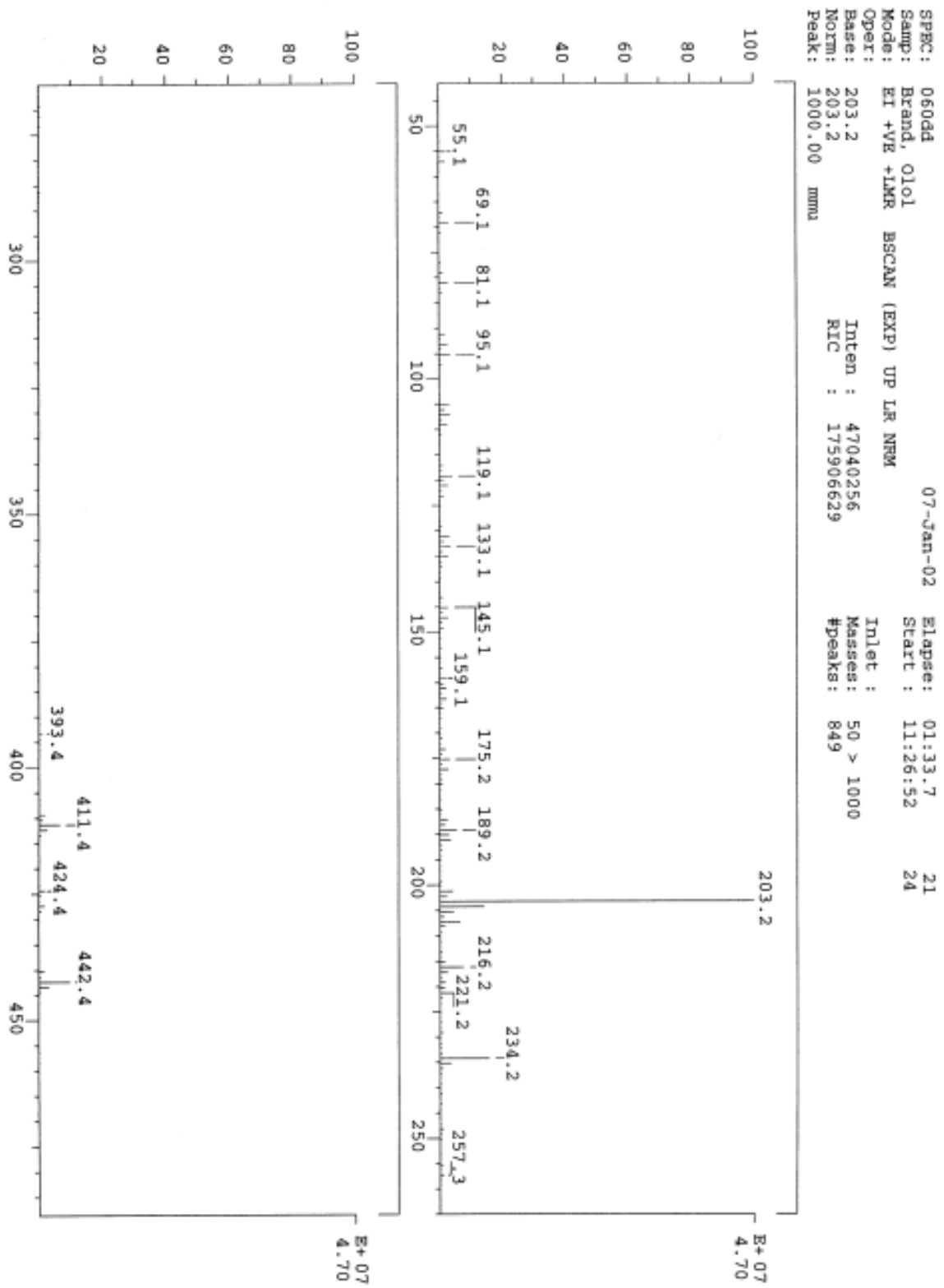
δ 0,77 (3H,s) ; 0,85 (3H, s) ; 0,86 (3H, s) ; 0,91 (3H, s) ; 0,92 (3H, s) ; 0,97 (3H, s) ; 1,14 (3H, s) ; 3,18 (1H, d, J = 10,9 Hz); 3,19 (1H, m); 3,53 (1H, d, J = 10,9 Hz); 5,17 (1H, t, J = 3,5 Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ in D_3COH (s. Spektrenanhang):

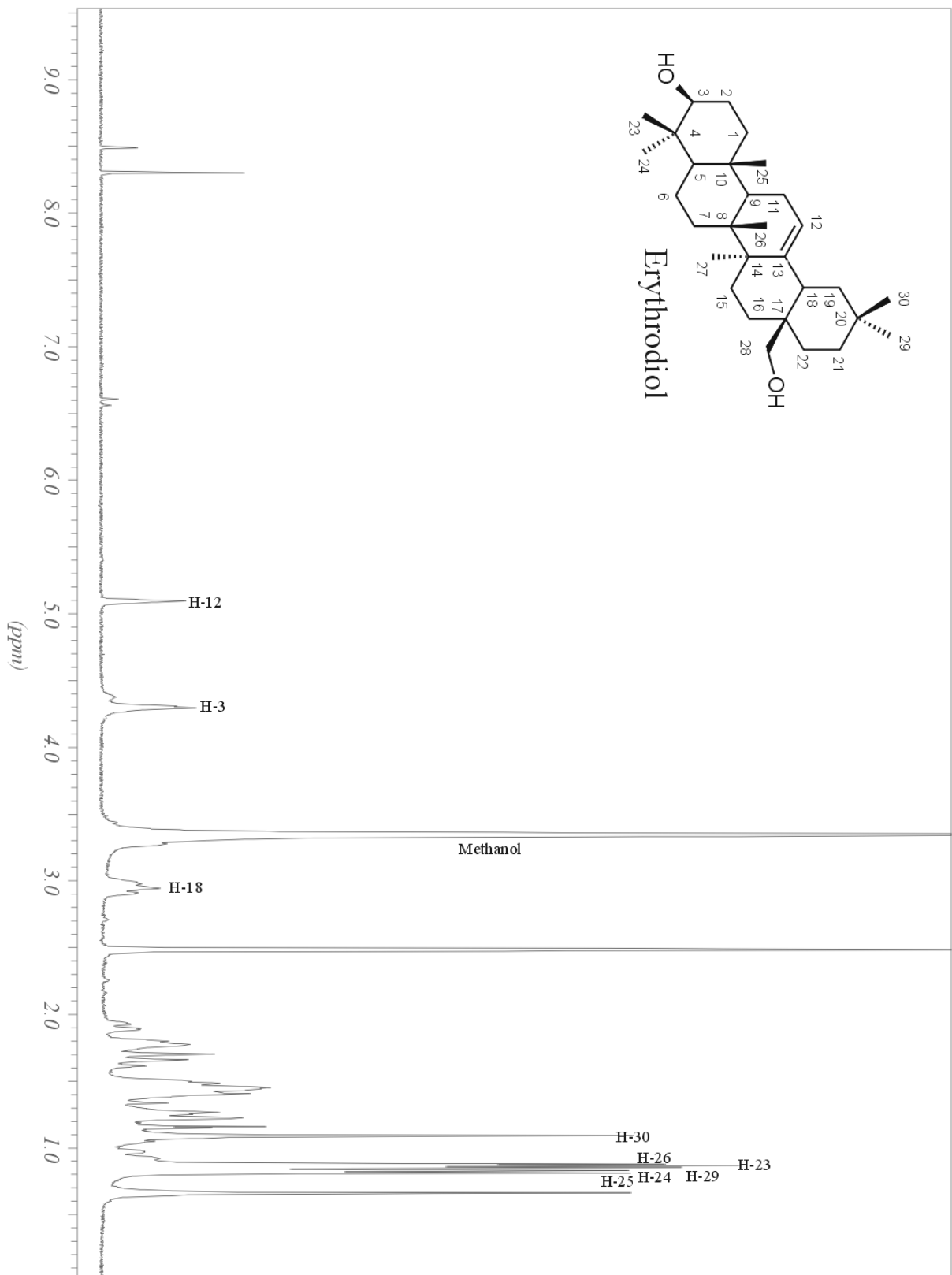
δ 15,5 (q, C-25), 16,2 (q, C-24); 16,6 (q, C-26); 18,2 (t, C-6); 21,8 (t); 23,2 (t); 23,7 (q); 25,3 (t); 25,9 (q); 28,4 (t); 29,3 (q); 30,9 (s); 31,1 (t); 32,4 (t); 33,3 (q); 34,0 (t); 36,7 (s); 38,4 (t); 41,4 (s); 42,0 (d); 46,6 (t); 47,6 (d); 54,9 (d, C-9); 67,6 (t, C-28); 79,4 (d, C-3); 121,7 (d, C-12); 144,6 (s, C-13)

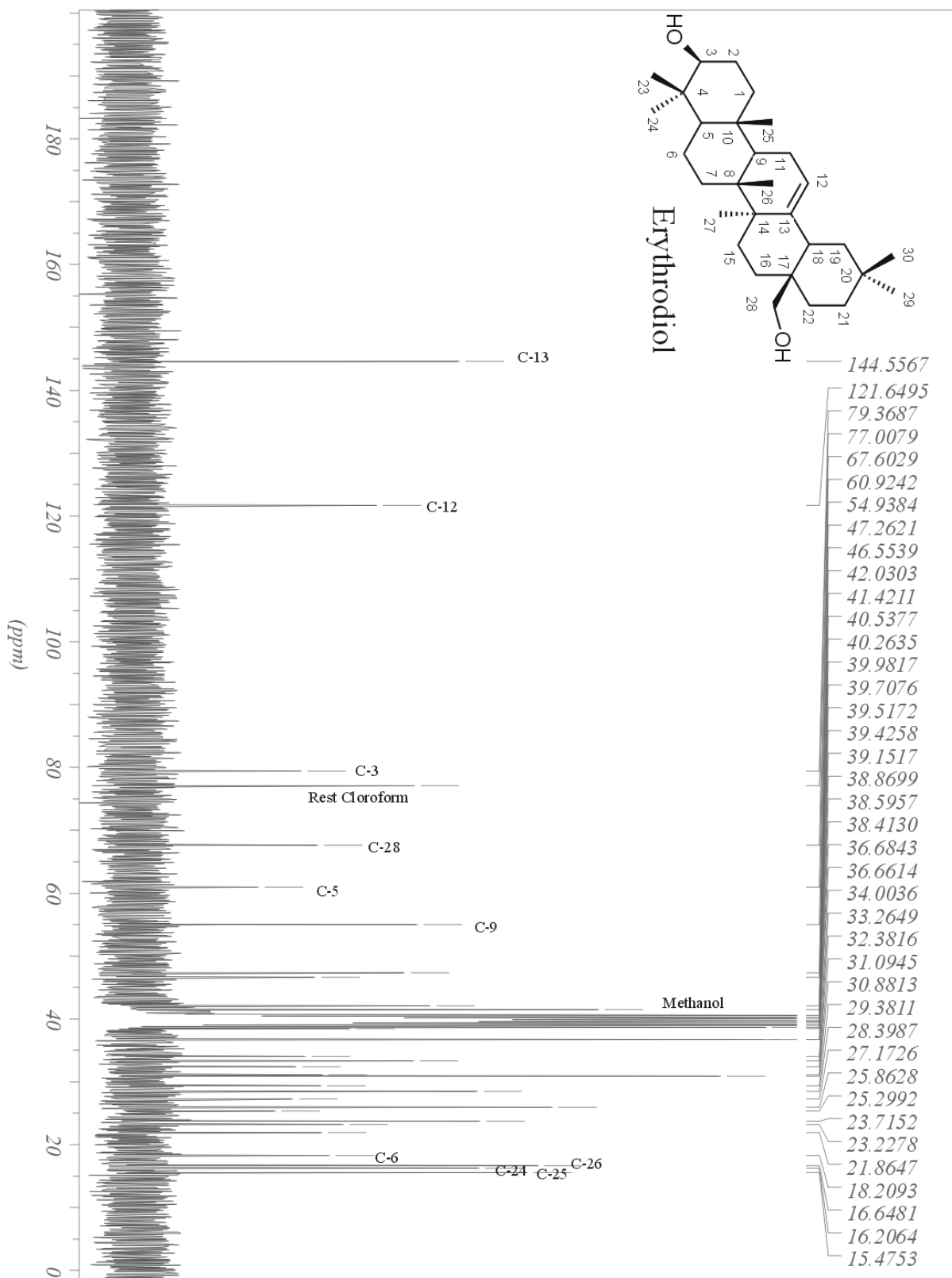
Lee et al., 2000 in CDCl_3 :

δ 15,5 (q), 15,6 (q); 16,7 (q); 18,3 (t); 22,0 (t); 23,5 (t); 23,6 (q); 25,5 (t); 25,9 (q); 27,2 (t); 28,1 (q); 30,9 (s); 31,0 (t); 32,6 (t); 33,2 (q); 34,1 (t); 36,9 (s); 38,6 (t); 38,8 (s); 39,8 (s); 41,7 (s); 42,3 (d); 46,5 (t); 47,6 (d); 55,2 (d); 69,7 (t); 79,0 (d); 122,4 (d); 144,3 (s)

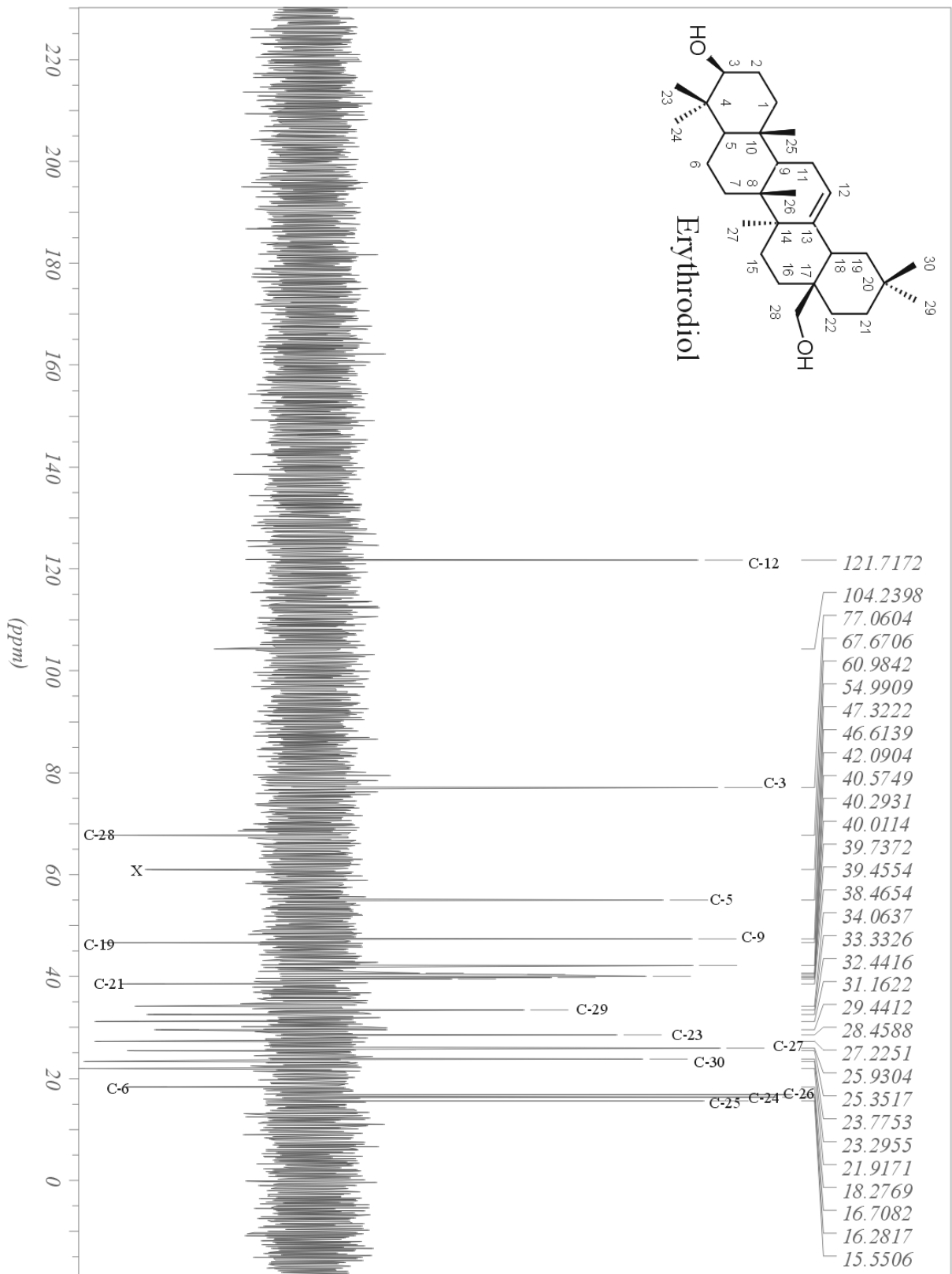


EI-MS Erythrodiol

 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Erythrodiol (300 MHz, D_3COD)



^{13}C -NMR-Spektrum Erythrodiol (300 MHz, D_3COD)



DEPT 135-Spektrum Erythrodiol (300 MHz, D₃COD)

8.7 Oleanylsuccinat

Masse : 556,3

Literatur : 556,77 (Yang et al., 1997)

¹H-NMR in CDCl₃:

δ 0,72 (3H, s); 0,82 (3H, s, H-25); 0,83 (3H, s, H-24); 0,87 (3H, s, H-29); 0,89 (3H, s, H-23); 0,90 (3H, s, H-26); 1,10 (3H, s, H-30); 2,58 und 2,62 (je 2H, m, succinyl-CH₂), 3,45 (1H, m, H-18); 4,12 (1H, dd, J = 6 und 12 Hz, H-3); 5,24 (1H, t-artig, H-12)

Kashiwada et al., 1998 in Pyridin-*d*₅, 500 MHz:

δ 0,83 (3H, s, H-25); 0,93 (3H, s, H-26); 0,96 (3H, s, H-29); 0,98 (3H, s, H-23); 0,99 (3H, s, H-26); 1,02 (3H, s, H-30); 1,27 (3H, s, H-27); 2,89 und 2,93 (je 2H, m, succinyl-CH₂), 3,29 (1H, dd, J = 4 Hz und 14 Hz, H-18); 4,48 (1H, dd, J = 5 und 11 Hz, H-3); 5,47 (1H, t-artig, H-12)

Ma et al., 1999:

δ 2,65 (m, 4H, Succinat)

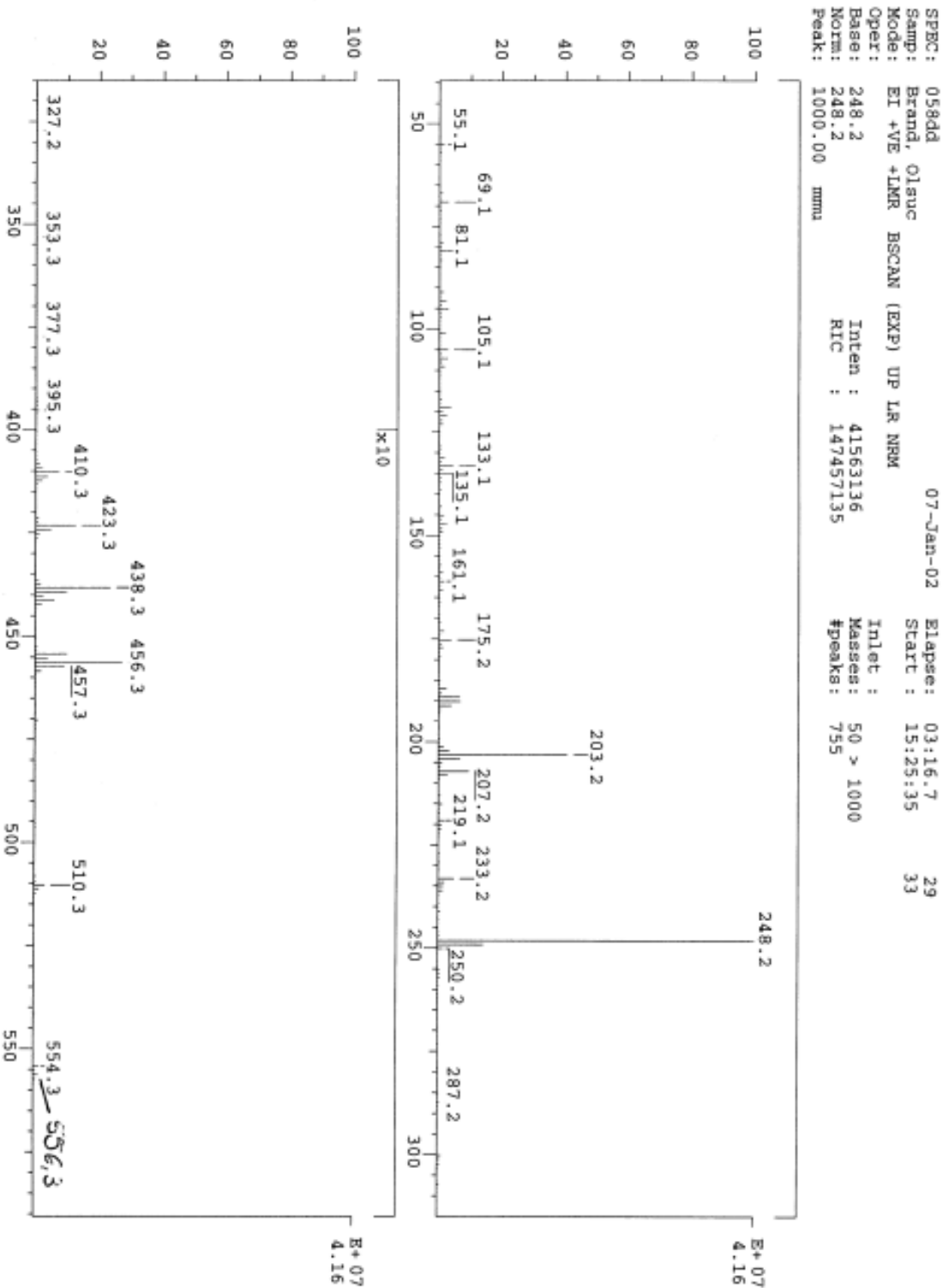
¹³C-NMR in CDCl₃:

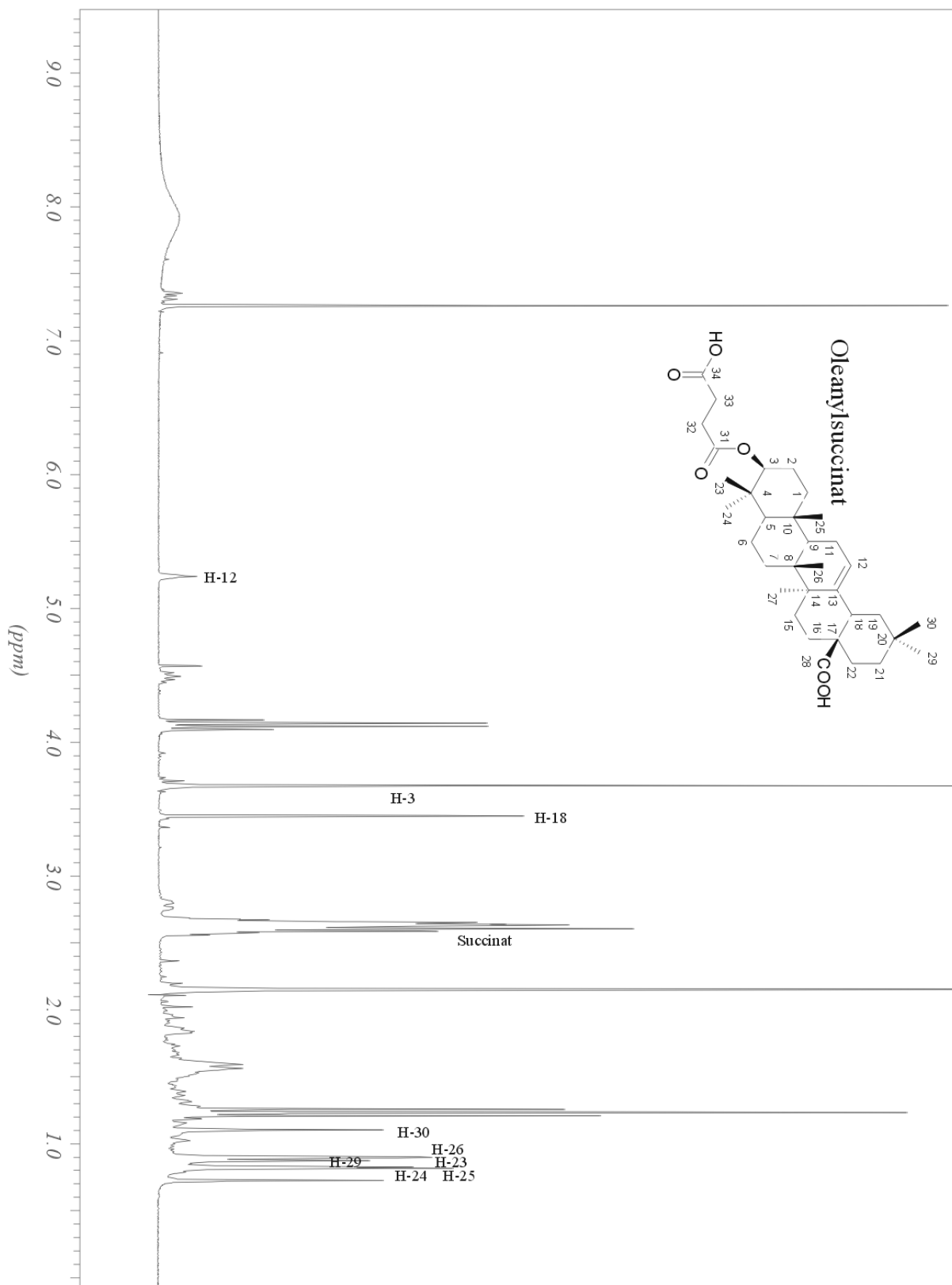
δ 14,1 (C-25); 15,3 (C-24); 16,6 (C-26); 23,4 (C-16); 25,8 (C-30); 27,9 (C-2); 28,6 (C-27); 28,8 (C-15); 32,4 (C-29); 32,9 (C-21); 41,5 (C-8); 46,5 (C-18); 47,4 (C-14); 51,8 (C-19 und C-17); 55,2 (C-9); 60,8 (C-5); 81,5 (C-3); 122,4 (C-12); 143,5 (C-13); 184,2 (C-28). Succinat: 28,8; 28,9; 172,2; 172,7

Kashiwada et al., 1998 in Pyridin-*d*₅, 100 MHz:

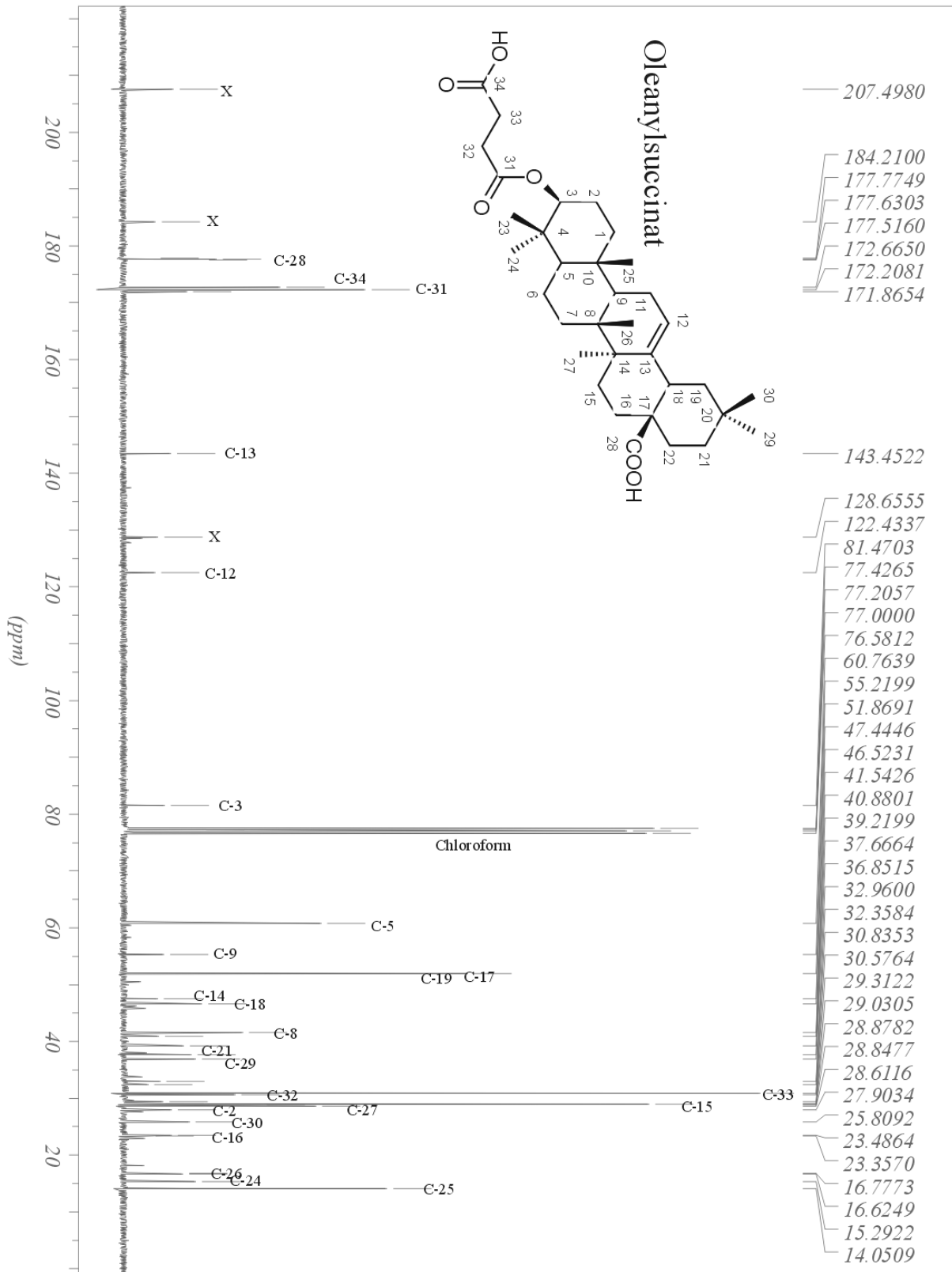
δ 15,3 (C-25); 16,9 (C-24); 17,3 (C-26); 18,4 (C-6); 23,6 (C-16); 23,7 (C-11 und C-30); 23,8 (C-2); 26,1 (C-27); 28,1 (C-23); 28,2 (C-15); 30,9 (C-20); 33,0 (C-22); 33,1 (C-7); 33,2 (C-29); 34,2 (C-21); 37,1 (C-10); 37,9 (C-4); 38,1 (C-1); 39,7 (C-8); 41,9 (C-18); 42,1 (C-14); 46,4 (C-19); 46,6 (C-17); 47,8 (C-9); 55,5 (C-5); 80,9 (C-3); 122,3 (C-12); 144,8 (C-13); 180,0 (C-28).

Succinat: 29,9; 30,3; 172,4; 174,7

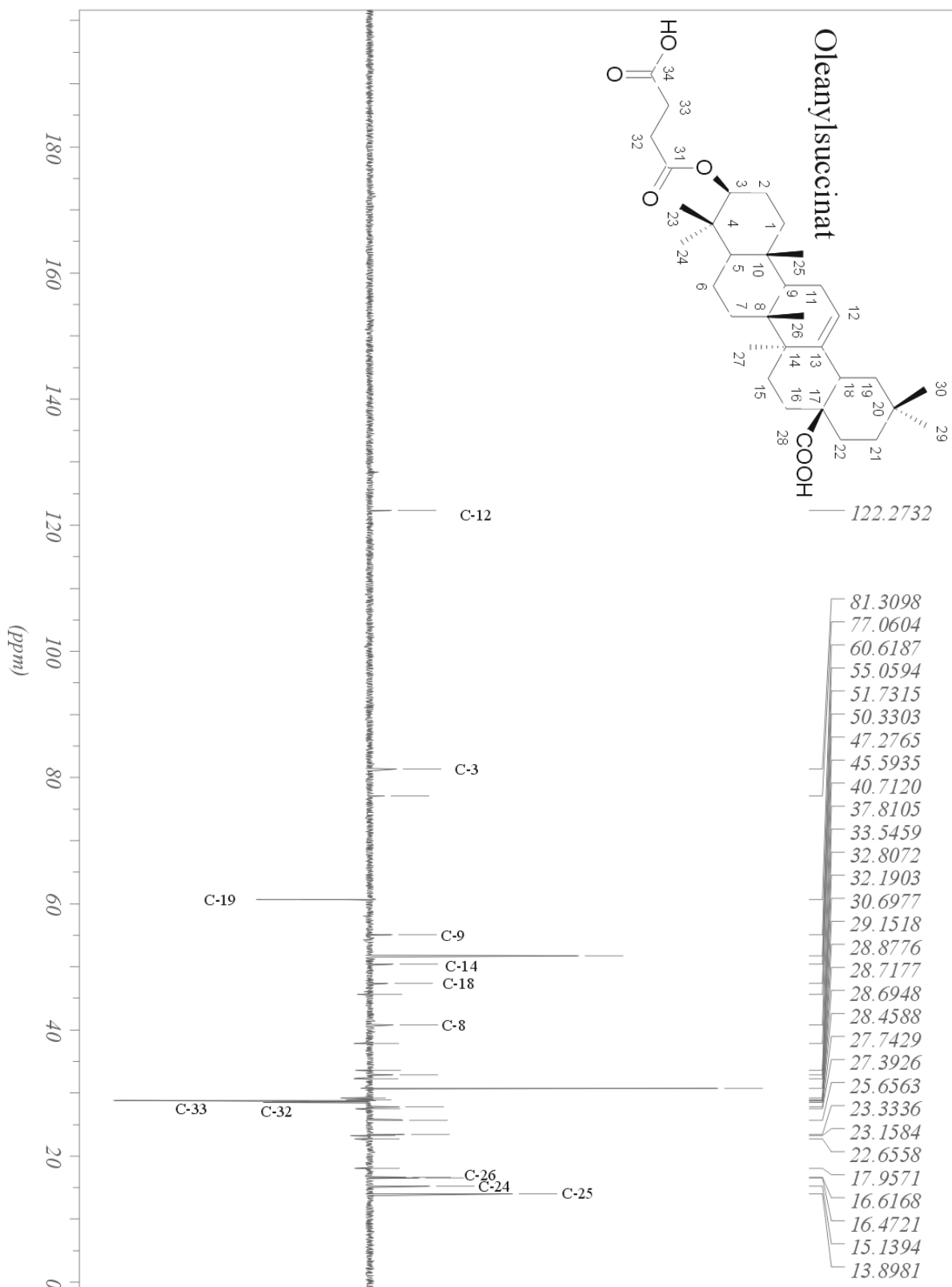




¹H-NMR-Spektrum Oleanylsuccinat (300 MHz, CDCl₃)



^{13}C -NMR-Spektrum Oleanylsuccinat (300 MHz, CDCl_3)



DEPT 135-Spektrum Oleanylsuccinat (300 MHz, CDCl₃)

8.8 Oleanylacetat

Masse: 498,3

Literatur: 498 (Kim et al., 1999)

$^1\text{H-NMR}$ in CDCl_3 :

δ 0,83 (3H, s); 0,94 (3H, s, H-25); 0,97(3H, s, H-24); 0,98 (3H, s, H-29); 0,99 (3H, s, H-23); 1,00 (3H, s, H-26); 1,05 (3H, s, H-30); 1,10 (3H, s, H-26); 1,25 (3H, s, H-39); 2,13 (3H, s, Me-OAc); 3,19 (1H, m, H-18); 4,80 (1H, dd, $J = 6$ und 12 Hz, H-3); 5,47 (1H, t-artig, H-12)

Carvalho et al., 1993 in CDCl_3 bei 300MHz :

δ 0,85 (s), 0,86 (s), 0,90 (s), 0,94 (s), (insges. 15 H, 5 Me); 1,12 (3H, s, Me); 2,05 (3H, s, Me-OAc); 2,82 (1H, dd, $J = 4$ Hz und $13,5$ Hz, H-18 β); 4,49 (1H, t-artig, H-3 α); 5,27 (1H, br. s, H-12)

Tkachev et al., 1994 :

δ 0,71 (s, H-27); 0,81 (H-5) ; 0,82 (s, H-24); 0,83 (s, H-23); 0,87 (s, H-29); 0,89 (s, H-30); 0,91 (s, H-25); 1,01 und 1,58 (H-1) ; 1,03 und 1,67 (H-15); 1,12 und 1,58 (H-19); 1,17 und 1,30 (H-21); 1,25 und 1,41 (H-7); 1,48 (2H, H-6) ; 1,54 (H-9); 1,52 und 1,73 (ddd, $J = 13,5$ und $13,5$ und $4,6$, H-22); 1,59 (2H, H-2) ; 1,58 und 1,94 (ddd, $J = 13,5$ und $13,5$ und $4,0$, H-16); 1,84 (2H, H-11); 2,79 (dd, $J = 13,5$ und $4,3$, H-18); 4,46 (m, H-3) ; 5,23 (dd, $J = 3,5$ und $3,5$; H-12).

Acetat 2,01 (3H, s)

$^{13}\text{C-NMR}$ in CDCl_3 (s. Spektrenanhang):

δ 48,3 (C-17) ; 49,0 (C-19) ; 50,0 (C-9) ;57,7 (C-5) ; 82,7 (C-3) ; 125,3 (C-12) ; 145,9 (C-13) ; 172,1 (C=O des Acetats) ; 186,5 (C-28)

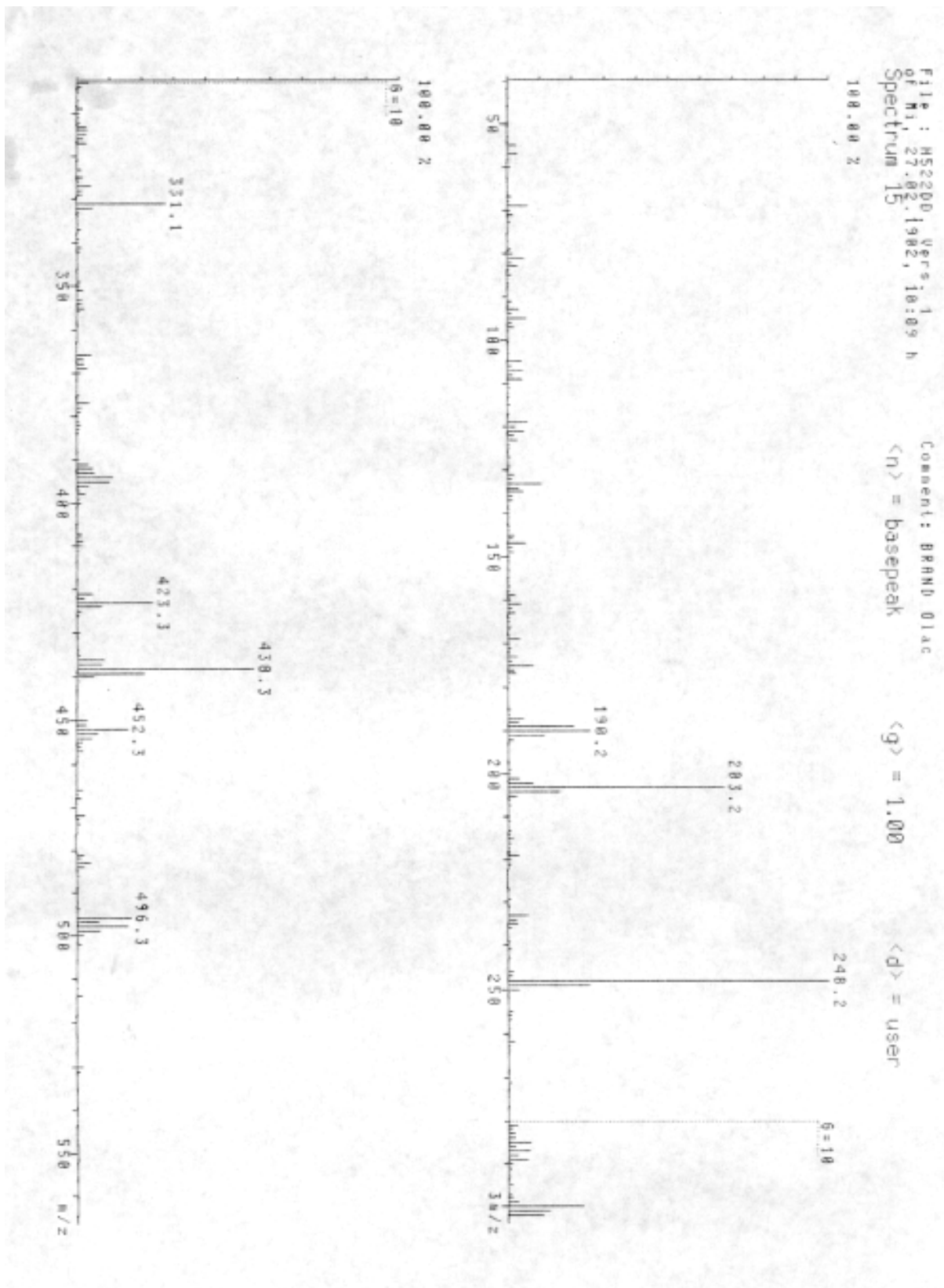
Carvalho et al., 1993 in CDCl_3 bei 300MHz :

δ 15,4 (C-25); 16,6 (C-24), 17,2 8C-26); 18,1 (C-6); 21,3 (CH_3 des Acetats); 22,8 8C-16); 23,5 (C-2); 23,6 (C-29); 25,9 (C-27); 27,6 (C-15); 28,0 (C-23); 30,6 (C-20); 32,4 (C-22); 32,5 (C-7); 33,0 (C-30) ; 33,8 (C-21) ; 37,0 (C-10) ; 37,7 (C-4) ; 38,0 (C-1) ; 39,4 (C-8) ; 40,8 (C18) ; 41,5 (C-14) ; 45,8 (C-17) ; 46,5 (C-19) ; 47,5 (C-9) ; 55,3 (C-5) ; 80,9 (C-3) ; 122,5 (C-12) ; 143,6 (C-13) ; 171,2 (C=O des Acetats) ; 184,5 (C-28)

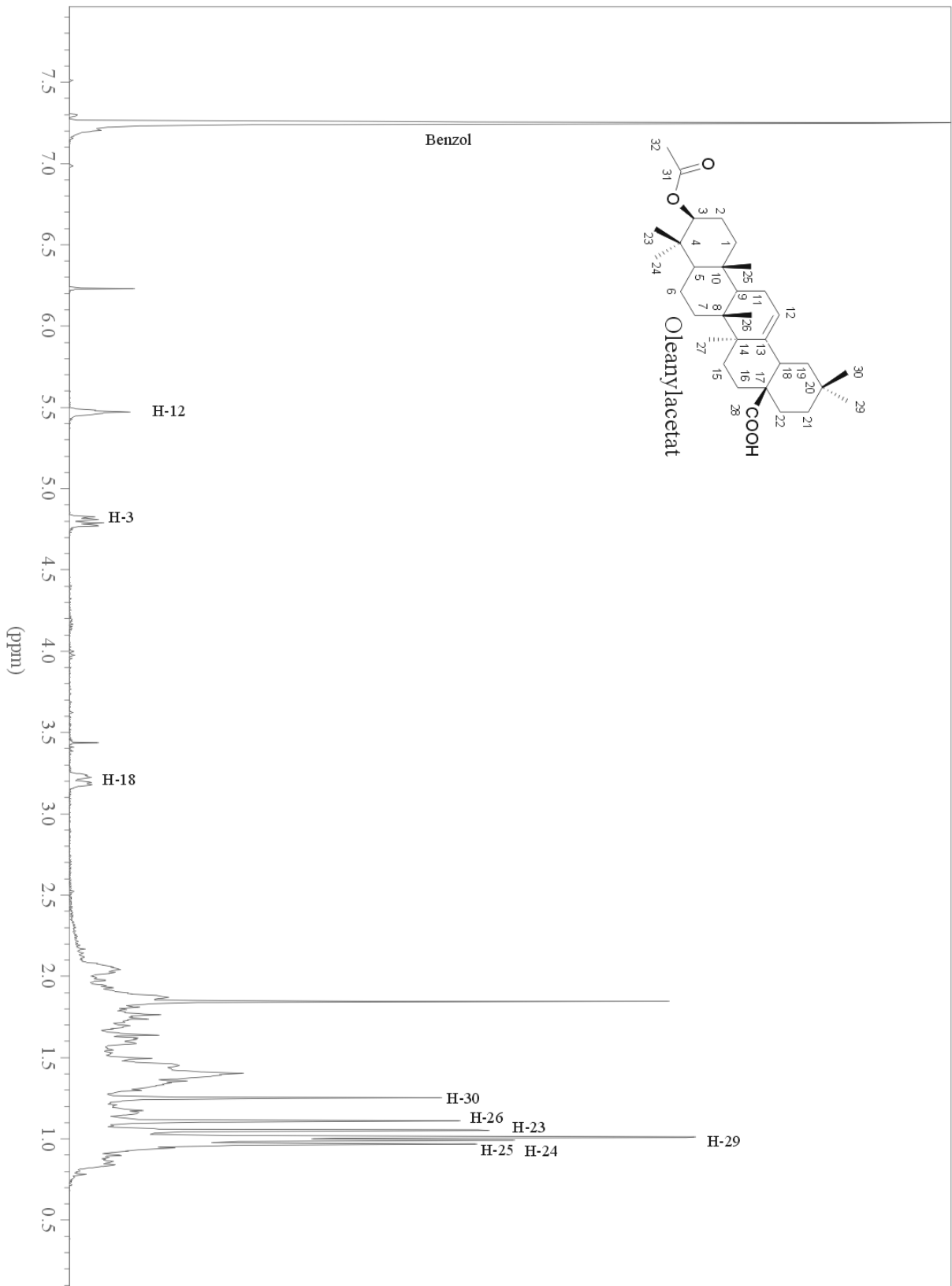
Tkachev et al., 1994 :

δ 15,42 (C-25); 16,62 (C-24); 17,00 (C-26); 17,20 (C-29); 18,09 (C-6); 22,88 (C-27); 23,44 (C-2); 23,44 (C-11); 23,85 (C30); 25,87 (C-15); 27,97 (C-23); 32,21 (C-21); 32,72 (C-7); 36,75 (C-10); 37,51 (C-4); 38,22 (C-1); 39,15 (C-20); 39,51 (C-8); 40,34 (C-22); 41,43 (C-19); 41,74 (C-14); 47, 42 (C-9); 55,19 (C-5); 60,48 (C-18); 71,94 (C-17); 80,75 (C-3); 127,51 (C-12); 137,93 (C-13);. Acetat: 21,14 und 170,92.

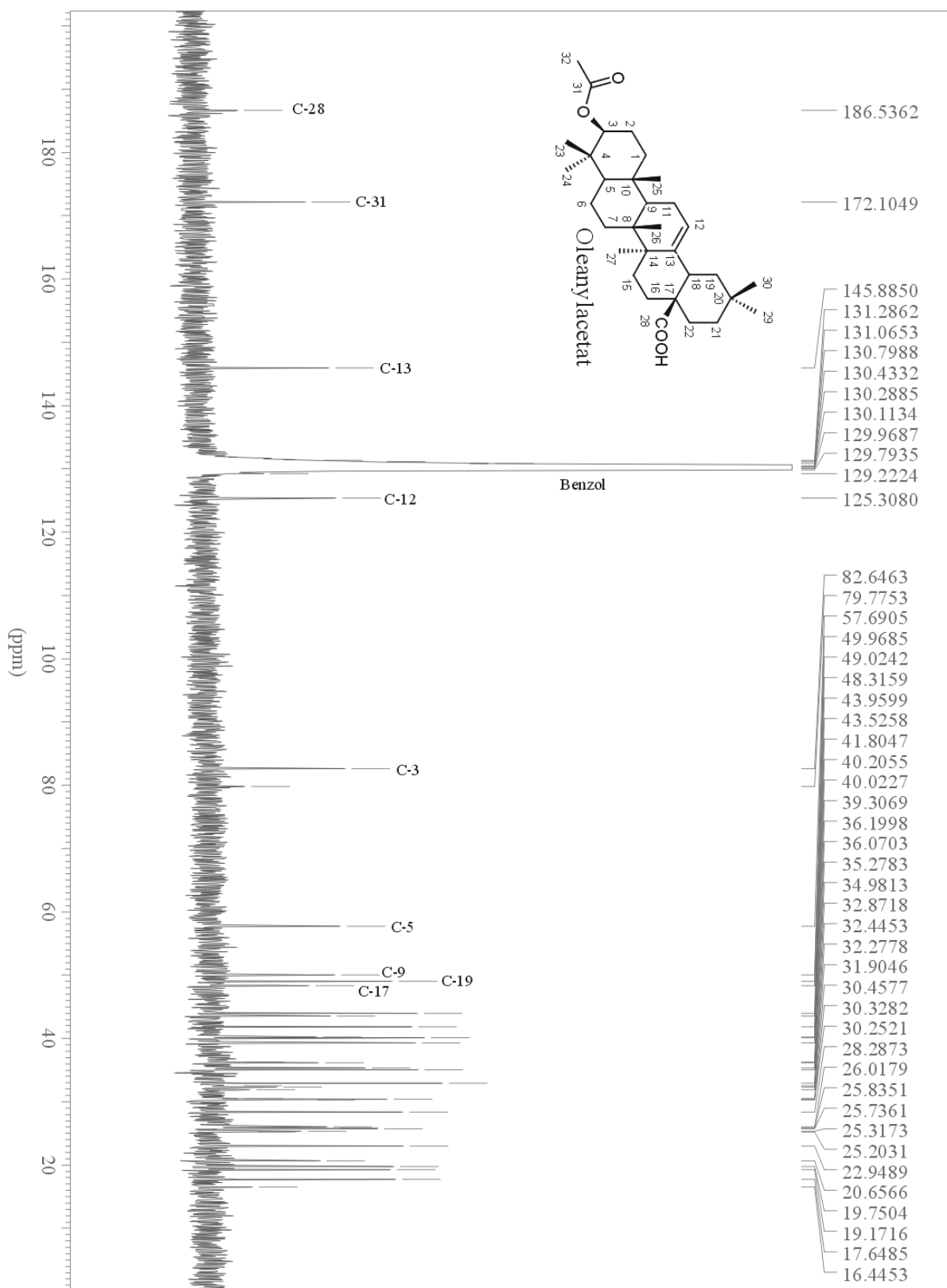
8. Spektrenanhang



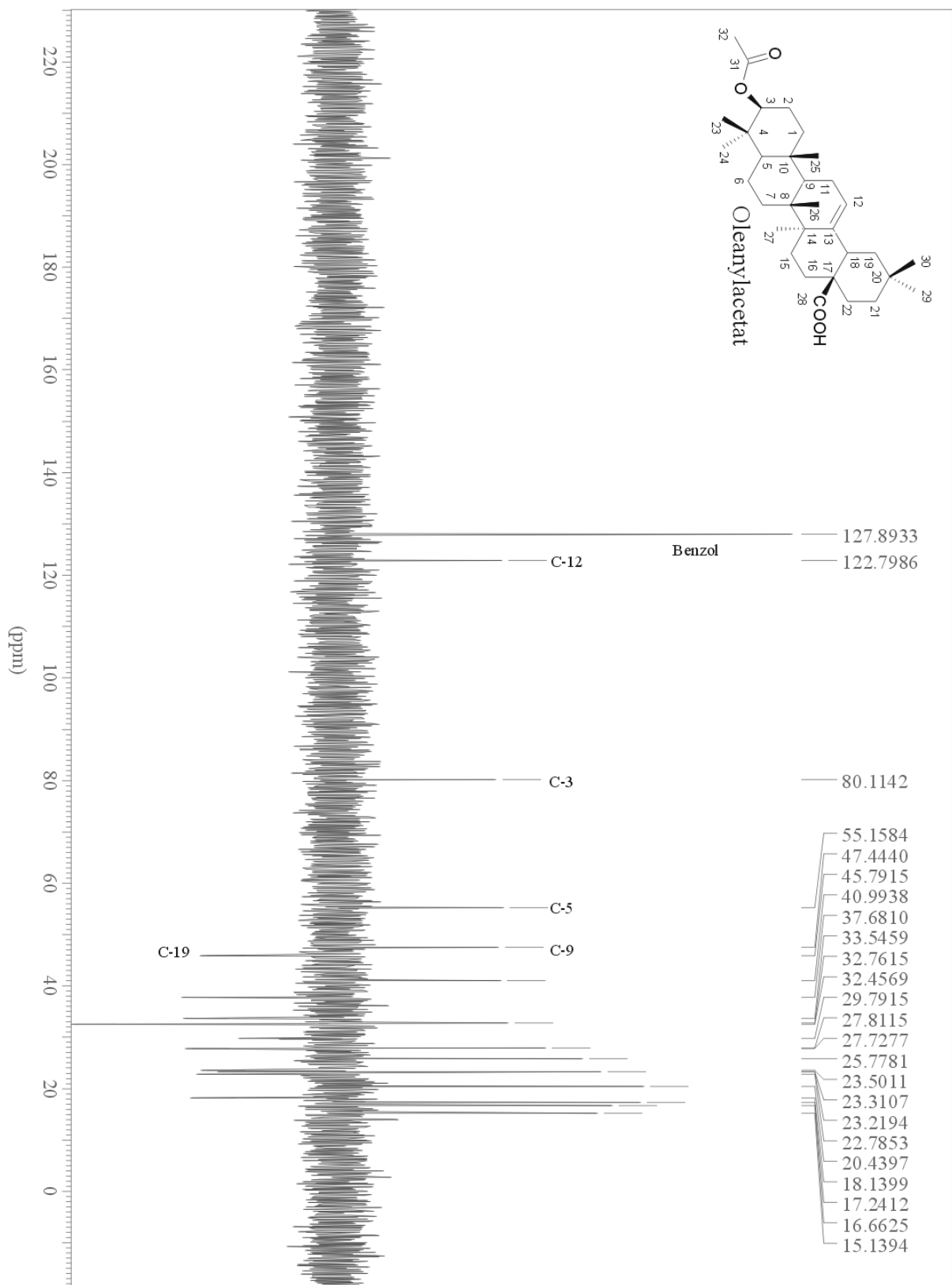
EI-MS Oleanylacetat



$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Oleanylacetat (300 MHz, C_6D_6)



¹³C-NMR-Spektrum Oleanylacetat (300 MHz, C₆D₆)



DEPT 135-Spektrum Oleanylacetat (300 MHz, C₆D₆)

9 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle PD Dr. Werner Knöss, unter dessen Leitung ich diese Arbeit angefertigt habe. Ich danke ihm für seine Unterstützung, für das unerschütterliche Interesse am Fortgang der Arbeit, und dafür, dass er auch nach seinem Wechsel zum BfArM immer ein offenes Ohr für seine Doktorandinnen behalten hat. Danke für die vielen interessanten Diskussionen.

Diese Arbeit entstand im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Theodor Dingermann und Dr. Ilse Zündorf, denen ich ebenfalls danke. Neben Pflege und Immunisierung der Mäuse, Fusion und Kultur der Hybridom-Zellen und der Versorgung mit immer neuen Überständen danke ich Ilse darüber hinaus für viele nette Besuche, für wissenschaftliche und persönliche Gespräche und Mensa mit Blick auf die Skyline von Frankfurt.

Prof. em. Karl-Werner Glombitza und Prof. Gabriele König haben mich - nacheinander - im Institut für Pharmazeutische Biologie und in ihre Arbeitsgruppen aufgenommen. Ich danke beiden für das Interesse an Person und Projekt, auch für die Möglichkeit, Einrichtungen und Geräte mit zu verwenden. Frau König gilt mein Dank zusätzlich für die Übernahme des Korreferates.

PD Dr. Michael Keusgen und Dr. Wolfgang Klein haben mir als Proteinspezialisten (und Erstversionsleser), Dr. Ingo Krest als Chemiker manchen wertvollen Tipp, manche helfende Hand und viele fruchtbare Diskussionen geschenkt. Auch die botanischen Exkursionen mit Michael werde ich vermissen, ebenso wie die Rundumversorgung durch Frau Dornbusch und Frau Gassen aus dem Geschäftszimmer, die Frischpflanzen und netten Plauschereien mit den Gärtnern und die Trost-Lackritzschnecken von Frau Dr. Koch.

Ferner möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes für Pharm. Biologie danken, besonders aber den Mitarbeitern der "Arbeitsgruppe König mit erweitertem Kreis" für viele nette Stunden im Labor, Dr. Stefan Kehraus und Lars Peters für Hilfe bei den Tücken des NMR und Harry Groß für die Einarbeitung in Cerius II.

Die Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen Oleanolsäure wäre ohne die großzügigen und vielseitigen Saponin- und Sapogenin-Spenden von Prof. Wollenweber, Darmstadt, und Prof. Hamburger, Jena, nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank dafür!

Die Pharmakologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden von Prof. Bauer, Prof. Cechinel und Dr. Kassack durchgeführt, bei denen ich mich ebenfalls bedanke.

Dann ist da noch ein Kleeblatt von Freunden, ohne die diese Arbeit ganz bestimmt nicht so geworden wäre, wie sie jetzt ist. Denn dann fehlten die flinken Finger von Wolfgang Braun an der Kopierkarte, die Argusaugen von Ramona Kann und Oliver Cordes beim Aufspüren von Tippfehlern und die Druck- und Rechner-Bastelstunden mit Jörg Horlitz... Dank Euch!

Ganz am Ende stehen meine Eltern, Gisela und Willi Brand. Ich bewundere beide für ihre Art, sich für andere einzusetzen und Ihnen Gutes zu tun. Ich danke Euch von ganzem Herzen für Eure Liebe und Unterstützung.