

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der synergistische Verstärkereffekt
von Reinsaponinen
auf zielgerichtete Proteintoxine
bei der Bekämpfung von Tumorzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Mergel
aus Bremen

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	V
Abstrakt.....	VII
Abkürzungen	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Therapieoptionen für maligne Erkrankungen.....	1
1.2 Zielgerichtete Tumorthherapie	2
1.2.1 Die Rolle von Toxinen in zielgerichteter Tumorthherapie.....	4
1.2.1.1 Saporin und Saporinfusionstoxine.....	5
1.2.1.2 Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Epidermal Growth Factor</i> , EGF) und EGF- Rezeptor (EGFR).....	6
1.2.1.3 Die beiden chimären Toxine SE und SA2E.....	7
1.3 Saponine	8
1.3.1 Natürliche Saponine und Saponingemische.....	8
1.3.2 Reinsaponine.....	10
1.4 Zielsetzung.....	12
2 Materialien und Methoden.....	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.1.1 Elektrophorese	15
2.1.1.2 Gewebeverarbeitung.....	15
2.1.1.3 Photometer	15
2.1.1.4 Westernblot.....	15
2.1.1.5 Zellkultur	16
2.1.1.6 Zentrifugen	16
2.1.1.7 Sonstige Geräte	16
2.1.2 Chemikalien.....	16
2.1.3 Saponine	17
2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Kits.....	17
2.1.5 Antikörper für die Immunodetektion im Westernblot	17
2.1.6 Computer Software.....	18
2.1.7 Bakterienstämme	18
2.1.8 Vektoren	18
2.1.9 Marker	18
2.1.10 Puffer und Medien	18
2.1.11 Medien und Lösungen für die Zellkultur	18
2.1.12 Zelllinien	19
2.1.13 Art und Herkunft der Mäuse.....	19
2.1.14 Statistische Auswertungen	19
2.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1 Transformation	20
2.2.2 DNA-Sequenzierung.....	20
2.2.3 Sequenzierungs- PCR für SA2E-DNA.....	21
2.3 Proteinbiochemische Methoden	22

2.3.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	22
2.3.2	Proteinexpression in <i>E. coli Arctic Express</i>	22
2.3.3	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie.....	23
2.3.4	Proteinaufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie	24
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	24
2.3.6	Färbung mit Commassie	26
2.3.7	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	26
2.3.8	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	26
2.3.9	Westernblot und Immunodetektion.....	27
2.3.10	Endotoxin-Entfernung.....	28
2.3.11	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i> (LAL) Test.....	28
2.3.12	Proteinaktivitätsbestimmung mittels <i>Herring Sperm DNA</i>	29
2.4	Zellbiologische Methoden.....	29
2.4.1	Kultivierung von adhärenenten Zellen	29
2.4.2	Zytotoxizitätsassay	30
2.4.3	MTT Assay	30
2.4.4	Echtzeit-Experimente mithilfe des <i>Adcon Readers</i>	31
2.5	Phytopharmakologische Methoden.....	32
2.5.1	Saponin-Agarosegelelektrophorese	32
2.5.2	Saponin Dünnschichtchromatographie.....	32
2.6	<i>Ex-vivo</i> -Methoden.....	33
2.6.1	Hämolyseaktivitätsbestimmung der Saponine	33
2.7	<i>In-vivo</i> -Experimente.....	34
2.7.1	Toxizitätsbestimmung von SO-1861 und SO-1731 <i>in vivo</i>	34
2.7.2	Kombinationstherapie im syngenem Tumormodell.....	35
2.7.3	Auswahl und Etablierung eines geeigneten Xenotransplantatmodells.....	36
2.7.4	Kombinationstherapie im Xenotransplantatmodell.....	36
2.8	Histopathologische Methoden.....	38
2.8.1	Fixierung der Organe in Formalin und Einbettung in Paraffin.....	38
2.8.2	Entwässerung und Paraffin-Infiltration im Infiltrationsautomat (Citadel 1000)....	38
3	Ergebnisse	41
3.1	Wahl des geeigneten Toxins für die Kombinationstherapie.....	41
3.1.1	Instabilität von SA2E	41
3.1.2	Allgemeine Vorbemerkungen zum Einsatz von SE.....	42
3.2	Reinsaponine in der Zellkultur.....	42
3.2.1	Effekt der Kombinationstherapie auf die Zelllinie TSA-EGFR	42
3.2.2	Echtzeit-Experimente.....	44
3.3	Hämolyseaktivitätsbestimmung von SO-1861 und SO-1731 <i>ex vivo</i>	48
3.4	<i>In-vivo</i> -Experimente.....	50
3.4.1	Akuttoxizität der Reinsaponine	50
3.4.1.1	Akuttoxizität von SO-1861	50
3.4.1.2	Akuttoxizität von SO-1731.....	54
3.4.1.3	Überlebenszeitanalysen SO-1861 und SO-1731 nach Kaplan-Meier.....	56
3.4.2	Kombinationstherapie aus Reinsaponinen und SE im syngenem Tumormodell....	58
3.4.2.1	Effekt der Tumorthherapie aus SO-1861 und SE.....	58
3.4.2.2	Effekt der Tumorthherapie aus SO-1731 und SE.....	59

3.4.3 Etablierung eines geeigneten Xenotransplantatmodells	60
3.4.4 Kombinationstherapie mit SE und SA im Xenotransplantatmodell	61
3.5 SA Fraktionen.....	62
4 Diskussion.....	67
4.1 Instabilität des Adapterproteins SA2E.....	67
4.2 Hämolyseassay <i>ex vivo</i> für Saponine.....	68
4.3 Akuttoxizität von SO-1861 und SO-1731 <i>in vivo</i>	69
4.4 Kombinationstherapie aus SO-1681 oder SO-1731 mit SE in der Zellkultur und im syngenem Tumormodell	71
4.5 SO-1861 im Impedanz basierten Echtzeit-Assay.....	73
4.6 Kombinationstherapie aus dem Saponingemisch SA und dem chimären Toxin SE im Xenotransplantatmodell.....	74
4.7 Einzelne Fraktionen des Saponingemischs <i>Saponinum album</i> und ihre Wirksamkeit auf CaSki, SiHa und HeLa-Zellen	75
4.8 Ausblick.....	77
5 Zusammenfassung.....	79
Literaturverzeichnis.....	81
Lebenslauf.....	90
Publikationsverzeichnis.....	91
Danksagung.....	92

Abstract

Targeted toxins are very promising agents in the field of tumor specific therapy. They are, however, accompanied by dose-limiting non-specific side effects. Certain plant derived triterpenoids, saponins, are very effective agents in this context. In the past, the saponin mixture saponinum album (SA) has, in vitro and in vivo, drastically enhanced the specific toxicity of the targeted toxin (Sap-3)-EGF (saporin fused to epidermal growth factor), called SE. However, the undefined raw mixture SA is not suitable for clinical use.

In the present work, therefore, two pure Saponins, SO-1861 and SO-1731, isolated from the roots of *Saponaria officinalis* by a preparative high-performance liquid chromatography (HPLC), were tested in vitro and in vivo. Their combination effect with SE was tested in cytotoxicity assays on TSA-EGFR cells (a murine cell line overexpressing the epidermal growth factor receptor (EGFR)). Via endpoint assays with MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) an enhancement factor of $> 100\ 000$ could be observed when the toxin was applied together with either of the two saponins.

SO-1861 and SO-1731 were tested for acute toxicity in BALB/c mice. Thereafter, nontoxic concentrations (15 and 30 $\mu\text{g}/\text{treatment}$) of the pure saponins were used in a syngeneic tumor model, BALB/c-mice bearing TSA-EGFR tumors. The combination of SE with SO-1861 or alternatively SO-1731 lead to a significant ($p < 0,05$) reduction of tumor volume: 5 out of 8 mice in the untreated control group had a tumor of $> 450\ \text{mm}^3$ and only one mouse showed spontaneous tumor remission. In contrast, after eightfold treatment with 30 μg SO-1861 and 0,1 μg SE, 6 out of 10 mice showed complete tumor remission and only one had a tumor of $> 450\ \text{mm}^3$. The combination therapy comprising SO-1731 even lead to complete tumor remission in all cases.

With impedance based real-time-monitoring the kinetics of cytopathic effects of the combination therapy was observed for the first time. At lower effective toxin concentrations in the cell-culture (0,003 and 0,03 nM) HeLa cells (human cervix carcinoma cells overexpressing the EGFR) first proliferated and then gradually died within 96–120 h whereas at higher effective concentrations (3 nM) almost complete cell death occurred within the first 12 h after application. This result is important to establish a better dose regimen for in vivo experimentation, where the tumor cells are exposed only a short time to the toxin and the saponin.

Abstrakt

Tumorspezifische Toxine sind vielversprechende Substanzen auf dem Gebiet zielgerichteter Tumorthherapie und scheitern dennoch oft an Dosis limitierenden unspezifischen Nebenwirkungen. In diesem Zusammenhang haben sich Saponine (pflanzliche Triterpenoide) sehr effektiv gezeigt. Die Saponinmischung *Saponinum album* (SA) hat *in vitro* und *in vivo* die Toxizität des chimären Toxins (Sap-3)-EGF (Saporin gebunden an den *Epidermal Growth Factor*), genannt SE, verstärkt und dessen therapeutische Dosis drastisch reduziert. Für den klinischen Einsatz eignet sich die undefinierte Saponinmischung SA jedoch nicht. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die zwei analytisch reinen – zuvor mithilfe von *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) aus den Wurzeln von *Saponaria officinalis* isolierten – Saponine SO-1861 und SO-1731 eingesetzt. Zunächst wurde die Kombinationstherapie aus Reinsaponin und SE an TSA-EGFR-Zellen (murine Zelllinie mit Überexpression des EGF-Rezeptors) *in vitro* getestet. Mittels Endpunkt-Assays mit MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wurde eine mehr als 100 000 fache Verstärkung der SE-Toxizität durch jedes der Saponine ermittelt.

An BALB/c Mäusen wurde die akute *In-vivo*-Toxizität von SO-1861 und SO-1731 getestet. Anschließend wurden nicht toxische Dosen der beiden Reinsaponine (15 und 30 µg/Therapieeinheit) im syngenem Mausmodell, BALB/c-Mäusen mit Tumoren aus TSA-EGFR-Zellen, eingesetzt. Die achtmalige Therapie der Kombination von SE sowohl mit SO-1861 als auch mit SO-1731 führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens ($p < 0,05$): In der unbehandelten Kontrollgruppe hatten 5 von 8 Mäusen einen Tumor von $> 450 \text{ mm}^3$ und lediglich eine Maus zeigte spontane Tumorremission. Im Gegensatz dazu wiesen nach achtfacher Behandlung mit SO-1861 (30 µg) und SE (0,1 µg) 6 von 10 Mäusen komplette Tumorremission auf und lediglich eine Maus hatte einen Tumor von $> 450 \text{ mm}^3$. Nach Kombinationstherapie mit SO-1731 kam es sogar in allen Fällen zur vollständigen Remission.

Erstmalig wurde mithilfe eines Impedanz basierten Echtzeit-Assays die Kinetik zytopathogener Effekte der Kombinationstherapie untersucht. Niedrigere effektive Toxinkonzentrationen (0,003 and 0,03 nM) führten zunächst zur Zellproliferation von HeLa-Zellen (humane Zervixkarzinomzellen, die eine Überexpression des EGFRs aufweisen) und dann zum allmählichen Zelltod innerhalb von 96–120 Stunden. Höhere effektive Toxinkonzentrationen (3 nM) führten be-

Abstrakt

reits innerhalb der ersten 12 h zum schnellen nahezu vollständigen Tod der Zellverbände. Diese Information ist von großer Relevanz für die *In-vivo*-Applikation der Therapie, da dort vermutlich nur eine kurze Expositionszeit gegenüber SE und Saponin gewährleistet wird.

Abkürzungen

Ak1	Primärantikörper
Ak2	Sekundärantikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
BSA	Bovines Serum Albumin
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-2	Elongationsfaktor-2
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ESI-TOF-MS	<i>Electrospray Ionization-Time-of-Flight-Mass Spectrometry</i>
ESP	Endosomal Spaltbare Peptidsequenz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAR*	<i>Goat-anti-Rabbit</i> mit Peroxidase konjugiert (in der Ziege hergestellter Antikörper, gegen ein Kaninchen-Epitop)
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HE	Hämatoxylin-Eosin
His-tag	Histidin-tag aus sechs Histidinresten
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KG	Körpergewicht
λ	Wellenlänge
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth Medium</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

Abkürzungen

MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD	Optische Dichte
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pI	Isoelektrischer Punkt
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RIP	Ribosomen inaktivierendes Protein (<i>Ribosome-Inactivating Protein</i>)
SA	<i>Saponinum album</i>
SA2E	zielgerichtetes Toxin aus Saporin, molekularem Adapter und EGF
SAP-3	Saporin-3
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	zielgerichtetes Toxin aus Saporin und EGF
SI	<i>Survival Index</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Triton X-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
Triton X-114	Octylphenoxy (ethyleneoxy) ethanol
tRNA	<i>transfer-RNA</i>
ÜN	über Nacht
v/v	Konzentrationsangabe als Volumenanteil am Gesamtvolumen
w/v	Konzentrationsangabe als Gewichtsanteil in Gramm am Gesamtvolumen in Millilitern
× g	×-faches der Erdbeschleunigung
5-J-ÜLR	5-Jahres-Überlebensrate

1 Einleitung

1.1 Therapieoptionen für maligne Erkrankungen

Krebserkrankungen gehören zu den führenden Todesursachen weltweit. Laut *World Health Organisation* (WHO) waren sie im Jahr 2008 verantwortlich für 13 % aller weltweiten Todesfälle und somit den Tod von 7,6 Millionen Menschen. Für das Jahr 2030 wird ein Anstieg der krebsinduzierten Todesfälle auf 11 Millionen prognostiziert [1]. In Deutschland ist Krebs nach Herz-Kreislauferkrankungen die häufigste Todesursache. Das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert-Koch-Institut ermittelte für das Jahr 2008 in der BRD insgesamt 246 700 Neuerkrankungen für Männer und 223 100 für Frauen und prognostiziert – wie auch die WHO – deren deutliche Zunahme [2]. Nach wie vor stellen Krebserkrankungen eine große Herausforderung für Ärzte, Patienten und Wissenschaftler dar, da es für viele Tumoren bisher keine kurative Therapie gibt. Die durchschnittlichen 5-Jahres-Überlebensraten (5-J-ÜLR) differieren von über 90 % bei Hodenkrebs oder Melanom der Haut bis hin zu weniger als 10 % bei Krebs der Bauchspeicheldrüse. Durchschnittlich werden vom ZfKD für das Jahr 2006 5-J-ÜLR von etwa 61–62 % für Frauen und 54–57 % für Männer angegeben.

Die gängigen Behandlungsstrategien bestehen in der Regel aus interdisziplinären Maßnahmen, insbesondere der chirurgischen Entfernung des Tumors sowie Radio- und Chemotherapie. Diese Therapieansätze stellen alle drei allein und in Kombination eine starke Belastung für den Patienten dar. Nach Radiotherapie kommt es trotz computergestützter Tumorlokalisierung im Vorfeld sowie hoher Präzision der Bestrahlung nicht selten zu Spätreaktionen durch Schädigung des Tumor umgebenden Gewebes. Hierzu zählen Fibrosierungen, insbesondere der Lunge, Stenosierungen von Magen-Darm-Trakt und Gefäßen, Verfärbungen der Haut, Verhärtungen des Fettgewebes und Zerstörung von Drüsengewebe wie Speichel- oder Keimdrüsen mit den entsprechenden Folgen. Zudem birgt Radiotherapie das Risiko strahleninduzierter Zweitmalignome [1, 3]. Chemotherapie bedeutet den Einsatz von Zytostatika, d.h. Medikamenten, die über unterschiedliche Mechanismen das Zellwachstum und/oder die Zellteilung hemmen. Beispiele für chemotherapeutische Wirkungen sind die Quervernetzung von DNA-Strängen durch Alkylanzien, der Einbau falscher Bausteine in DNA oder RNA durch Antimetabolite, die Blockade der Topoisomerase durch zytotoxische Antibiotika oder die chemische Intervention in die Mitosespindel durch Vinca-Alkaloide. Von den ca. 60 Substanzen, die in konventioneller Chemotherapie eingesetzt

werden, wirkt nicht selektiv auf Tumorzellen.

Nur ein Teil der jeweils eingesetzten Zytostatika erreicht das eigentliche Ziel, der Rest entfaltet seine Wirkung auf gesundes Gewebe. Es kommt zu Nebenwirkungen, die sich durch den generellen Effekt auf hoch proliferative Zellen erklären lassen, darunter Haarausfall und Wundheilungsstörungen der Schleimhäute sowie – durch Hemmung der Blutbildung im Knochenmark – Anämie und Infektanfälligkeit. Auch langfristige Nebenwirkungen treten auf. Typisch sind periphere Neuropathien durch Vincristin, Lungenfibrose durch Bleomycin, Kardiomyopathie durch Doxorubicin und Nierenversagen durch Cisplatin.

Durch die richtige Kombination von Chemotherapeutika konnten bei einigen Erkrankungen wie Hodgkin-Lymphom, Gebärmutterhals-, Brust- und Hodenkrebs gute Erfolge erzielt und die 5-J-ÜLR in den letzten 20 Jahren signifikant verbessert werden. Doch auch wenn die Verbesserung hier bei 10–40 % liegt, trägt Chemotherapie insgesamt nur wenig mehr als 2 % zur Erhöhung der 5-J-ÜLR aller Krebserkrankungen bei [4]. Die relativen 5-J-ÜLR der Männer haben sich von 38 % Anfang der 1980er Jahre bis auf 53 % für die Diagnosejahre 2000 bis 2004 verbessert. Im gleichen Zeitraum sind diejenigen der Frauen von 50 % auf 60 % angestiegen. Die Gründe dafür sind zahlreich. Sie umfassen neben der Optimierung konventioneller Chemotherapie die frühere Diagnosestellung der Erkrankungen sowie die Optimierung von Chirurgie und Radiotherapie.

Neben den drei beschriebenen Therapieformen gibt es weitere Therapieansätze, die unter den Begriff „Zielgerichtete Tumorthherapie“ fallen und in den letzten 20 Jahren den weitaus größten Anteil neuer Medikamente in der Krebstherapie stellen.

1.2 Zielgerichtete Tumorthherapie

Die eingesetzten Therapeutika zielgerichteter Tumorthherapie wirken auf spezielle Zielmoleküle, die an Wachstum und Proliferation von Tumoren beteiligt sind. Hierdurch sollen andere Gewebe und Organe geschont werden.

Die Geschichte zielgerichteter Tumorthherapie beginnt im engeren Sinne mit der Substanz *Tamoxifen* (*Nolvadex*®), die als selektiver Estrogenrezeptormodulator (SERM) das erste definierte Ziel in der Tumorthherapie, den Östrogen-Rezeptor der Brust, bindet und kompetitiv hemmt. Diese Substanz, die von dem Institut Imperial Chemical Industries (ICI) entdeckt wurde und ur-

sprünglich eine Anti-Baby-Pille werden sollte, wurde 1973 in Großbritannien zur Behandlung des metastasierten Brustkrebs zugelassen [5, 6]. Sie war Wegweiser für ein Umdenken in der Tumorthherapie durch die Erkenntnis, dass das pharmakologische Prinzip der Rezeptortheorie auf die Behandlung maligner Erkrankungen übertragen werden kann. Rezeptor bedeutet in diesem Zusammenhang jede spezifische Zielstruktur, durch deren Bindung eine bestimmte Wirkung ausgelöst werden kann. Andere Entdeckungen und Errungenschaften wie die Herstellung monoklonaler Antikörper [7] sowie die Entdeckung von tumorspezifischen Signalwegen machten den neuen Therapiansatz der zielgerichteten Tumorthherapie möglich. Relevant ist in diesem Zusammenhang auch die Kenntnis von Protoonkogenen, d.h. Genen, die durch Mutation Tumorenstehung und Wachstum fördern, sowie den von ihnen kodierten Proteinen, die für Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung wichtig sind.

Die Therapie besteht meist aus monoklonalen Antikörpern, die mit Antigenen auf der Zelloberfläche interagieren oder Peptiden und anderen niedermolekularen Substanzen, die ihre Zielstrukturen oft im Zellinneren haben. Wichtige Beispiele für Substanzen, die klinisch eingesetzt werden, sind *Trastuzumab*, *Cetuximab* und *Imatinib*. Der monoklonale Antikörper *Trastuzumab* richtet sich gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu und ist zugelassen für die Behandlung HER2-positiven Brustkrebs. *Cetuximab*, ein Antikörper gegen den humanen epidermalen Wachstumsrezeptor EGFR, ist für die Behandlung von Dickdarmkrebs zugelassen. Das Phenylamino-Pyrimidin-Derivat *Imatinib* blockiert die krankhaft aktive Tyrosinkinase ABL-BCR und kommt bei der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie zum Einsatz. Die drei beschriebenen Substanzen sind zugleich Ziel bindende und wirkende Komponente.

Es besteht auch die Möglichkeit, eine Ziel bindende Substanz mit der eigentlich wirksamen oder potenteren zu koppeln. Auf diese Weise gelangen hoch effektive Wirkstoffe, die bei alleiniger systemischer Gabe eine hohe Toxizität aufweisen würden, durch ihren Liganden an den gewünschten Zielort und entfalten erst dort ihre Wirkung. Beispiele für wirksame Komponenten sind **Radionuklide** wie in ⁹⁰Y-ibritumomab (Zevalin, 2002) und ¹³¹I-tositumomab (Bexxar, 2003), beides Radionuklid gekoppelte (anti)-CD20 Antikörper, die in der Therapie des Non Hodgkin Lymphoms zum Einsatz kommen [8], **Interleukine** (IL-2) oder auch **Toxine**, wie in *Denileukin diftitox* (*Ontak*), einem Interleukin(IL)-2–Diphtheriatoxin-Fusionsprotein (s. 1.2.1).

Ein Wirkstoff kann durch chemische Konjugation *in vitro* kovalent mit der Ziel bindenden Komponente verbunden werden. Ist die zielbindende Komponente ein Protein und der Wirkstoff

ein Proteintoxin, so besteht zusätzlich die Möglichkeit, durch rekombinante DNA Technologie ein Fusionsprotein herzustellen, d.h. die DNA Sequenz in ein Bakterium einzuschleusen und das fertige Konstrukt von dem Bakterium exprimieren zu lassen.

1.2.1 Die Rolle von Toxinen in zielgerichteter Tumorthherapie

Wichtige Vertreter zielgerichteter Tumorthapeutika sind Toxinkonjugate. Das verwendete Toxin stammt meistens entweder aus Bakterien oder Pflanzen, seit einigen Jahren werden aber auch menschliche Enzyme wie die Protease *Granzyme B*, die RNase *Angiogenin* oder der *Apoptose induzierende Faktor (AIF)* erforscht [9, 10]. Die zielgerichtete Komponente eines Proteintoxins kann prinzipiell jede Substanz sein, die mit einer bestimmten gewünschten Zielstruktur wechselwirkt. Meist sind dies monoklonale Antikörper, Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Nach selektiver Bindung wird das zielgerichtete Toxin in die Zelle aufgenommen und gelangt durch – je nach Toxin unterschiedliche – teils noch unbekannte Mechanismen ins Zytosol, wo es seine enzymatische Wirkung entfaltet. Es hemmt für das Überleben der Zelle wichtige Stoffwechselwege und führt so den Zelltod herbei. Typischerweise sind der Elongationsfaktor-2 (EF-2) – ein Enzym, das die Translation bei der Proteinbiosynthese katalysiert – sowie verschiedene RNAs oder Proteine, die im Apoptoseprozess beteiligt sind, involviert.

Das erste bezüglich zielgerichteter Tumorthherapie beschriebene und bislang einzige zugelassene Toxin ist Diphtheriatoxin des *Corynebacterium diphtheriae* [11]. Als Bestandteil von *Denileukin diftitox (Ontak)* ist es seit 1999 in den USA zur Behandlung von therapierefraktärem T-Zell-Lymphom zugelassen. Das Diphtheriatoxin gehört zur Klasse ADP-ribosylierender Enzyme. Zur selben Klasse zählen auch die beiden bakteriellen Toxine *Exotoxin A* aus *Pseudomonas aeruginosa* sowie das *Choleraexotoxin* aus *Vibrio cholerae*, die ebenfalls in der Forschung als Komponente zielgerichteter Toxine eingesetzt werden [12, 13].

Neben bakteriellen werden auch viele pflanzliche Toxine in der Tumorforschung erprobt. Sie wirken als Ribosomen inaktivierende Proteine (RIPs), die über katalytische Inaktivierung von Ribosomen die zelluläre Proteinbiosynthese hemmen. Einige von ihnen wurden bereits als Komponente zielgerichteter Toxine in klinischen Studien eingesetzt. Zu diesen zählen Gelonin (*Gelonium multiflorum* A. Juss.), Ricin (*Ricinus communis* L.) und Saporin (*Saponaria officinalis* L.) [14–16].

Trotz zielgerichteter Komponente weisen alle genannten Toxinkonjugate eine zielunabhängi-

ge Dosis limitierende Toxizität auf. Insbesondere kommt es zu Leber- und Nierenzellschäden und Vascular-Leak-Syndrom [17-19]. Deswegen ist es eine Herausforderung für die aktuelle Forschung, derartige allgemeine Nebeneffekte zu minimieren und auf diese Weise die Erfolgsaussichten zielgerichteter Toxine zu erhöhen.

Im Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin wurden bestimmte pflanzliche Glykoside, Saponine, als mögliche Verstärker von RIPs entdeckt [20]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Fuchs eine Kombinationstherapie entwickelt, die aus einem zielgerichteten Saporin basierten Toxin und dem pflanzlichen Glykosid Saponin besteht. Mithilfe von *Saponinum album* (SA, Merck), einem komplexen Gemisch aus Triterpensaponinen, ist es gelungen, die gewünschte Toxinwirkung *in vitro* mehr als 100 000fach und *in vivo* mehr als 50fach zu steigern und somit dessen Dosis und unerwünschte Toxizität drastisch zu reduzieren [21, 22].

1.2.1.1 Saporin und Saporinfusionstoxine

Saporine sind toxische Proteine, die von der Pflanze *Saponaria officinalis* (Linn.), gewöhnlichem Seifenkraut, gebildet werden. Die toxische Wirkung des Saporins beruht auf seiner Funktion als RIP vom Typ 1. RIPs sind N-Glykosidasen und spalten eine bestimmte N-glykosidische Bindung der ribosomalen 28S-RNA, wodurch Adenin freigesetzt wird [23, 24]. Das Ribosom ist dadurch nicht mehr in der Lage den Elongationsfaktor(EF)-2, der eine wichtige enzymatische Rolle bei der Translation einnimmt – nämlich die Peptidkette an ihre eigentliche Bindungsstelle transloziert –, zu binden. Auf diese Weise wird die zelluläre Proteinbiosynthese gehemmt und die Zelle stirbt daraufhin durch Apoptose [25, 26]. Die Glykosidaseaktivität des Saporins beschränkt sich nicht nur auf 28S-rRNA, sondern betrifft auch andere RNA und DNA. Diese Eigenschaft wird bei Enzymaktivitätsassays genutzt [27].

RIPs werden in Typ 1- und Typ 2-RIPs unterteilt. Typ 1-RIPs wie Saporin bestehen lediglich aus einer einzigen katalytischen A-Polypeptidkette von 26–32 kDa, wohingegen Typ 2-RIPs wie z.B. Ricin aus A- und B-Kette bestehen, die kovalent miteinander verbunden sind. Die B-Polypeptidkette besitzt eine Zellbindungsdomäne, über die sie an kohlenhydrathaltige Rezeptoren der Zelloberfläche bindet [28].

Für Saporin, das keine B-Kette besitzt, ist der Aufnahmemechanismus in die Zelle sowie der weitere intrazelluläre Transport bisher noch nicht genau geklärt. Saporin allein und Saporin in

Kombination mit Saponin (s. 1.3) weisen hier unterschiedliche Mechanismen auf. Saporin allein und als Bestandteil des chimären Toxins SE zeigte sich unabhängig von der Blockierung Clathrins oder Aktins und auch die Abnahme des endosomalen pH erwies sich als irrelevant für dessen Toxizität [25, 29]. In der Kombination mit Saponinen hingegen erfolgt die Aufnahme von Saporin und SE vermutlich durch Clathrin vermittelte Endozytose und die Freisetzung ins Zytosol geschieht in Abhängigkeit von saurem pH in den Endosomen [25, 30]. Der genaue Mechanismus der Verstärkerwirkung des Saponins ist hierbei nicht eindeutig geklärt. Vermutlich lagern sich Saponine in endosomale Membranen ein und vermitteln den Austritt, „*Endosomal Escape*“, des Saporins [31] (s. 1.3).

Die Rolle von Saporinen in Pflanzen ist bisher unklar. Einige RIPs, darunter auch Saporinfraktionen, sind über noch unbekannte Mechanismen in der Lage, virale Replikation zu hemmen, wobei sich die Aktivität auf die anfänglich infizierten Zellen beschränkt und somit nur lokale Infektionen bekämpft werden [32, 33]. Saporin kommt in verschiedenen Isoformen in fast allen Pflanzenbestandteilen von *S. officinalis* vor, wobei besonders in Wurzeln und reifen Samen eine hohe Saporinaktivität gemessen werden konnte [34].

Saporine können rekombinant hergestellt werden [35], sind bemerkenswert resistent gegenüber Denaturierung und Proteolyse *in vitro* [36] und werden in der Forschung zur Produktion verschiedener zielgerichteter Toxine eingesetzt [37-40].

Das in dieser Arbeit als toxische Komponente eines zielgerichteten Toxins eingesetzte Saporin-3 (SAP-3) stammt aus den Samen und hat eine molekulare Masse von 29 kDa [41].

1.2.1.2 Epidermaler Wachstumsfaktor (*Epidermal Growth Factor*, EGF) und EGF-Rezeptor (EGFR)

Der EGFR ist ein 170 kDa großes Glykoprotein in Zellmembranen von Wirbeltieren und dient als Rezeptor für den EGF sowie den *Transforming growth factor* (TGF α). Er gehört einer Unterfamilie von Rezeptor-Tyrosinkinasen an, der ErbB-Familie, zu der neben dem EGFR1/HER1 (ErbB-1) auch HER2/c-neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4) gezählt werden. Ein EGFR-Monomer besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranen α -Helix und einer katalytischen Region im Zytoplasma mit Tyrosinkinaseaktivität. Die Bindung des Liganden führt zur Dimerisierung des Rezeptors, wodurch die Tyrosinkinaseaktivität stimuliert wird und eine Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne stattfindet. Verschiedene intrazelluläre Signalwege werden gestartet, die zu DNA-Synthese und Zellprolife-

ration führen sowie den programmierten Zelltod verhindern [42].

Viele Tumorentitäten weisen eine Überexpression des EGFR auf. Insbesondere sind dies Plattenepithelkarzinome verschiedenster Ursprungsorgane, wie beispielsweise Karzinome von Lunge, Speiseröhre, Haut und Gebärmutterhals. Es gibt aber auch diverse andere Neoplasien mit EGFR-Expression, darunter hepatozelluläre Karzinome, Nierenzellkarzinome und Glioblastoma multiforme [43, 44].

Der humane EGF ist ein Polypeptid aus 53 Aminosäureresten und hat eine molekulare Masse von ungefähr 6 kDa [45, 46].

1.2.1.3 Die beiden chimären Toxine SE und SA2E

In dieser Arbeit soll eines der rekombinanten Proteine SE oder SA2E eingesetzt werden (Abb. 1 und Abb. 2). Dabei handelt es sich um chimäre Proteine bestehend aus einem N-terminalen $6 \times \text{His-Tag}$ zur Aufreinigung, dem pflanzlichen Toxin SAP-3 und der zielführenden Komponente, dem EGF als natürlichem Liganden des EGFR. SA2E enthält zusätzlich einen molekularen Adapter, der Toxin und Ligand verbindet und aus einer endosomal spaltbaren Peptidsequenz (ESP), einer Transmembrandomäne und einer zytosolisch spaltbaren Peptidsequenz (CSP) besteht. Er soll über eine verstärkte endosomale Freisetzung und Akkumulation des Toxins im Zytosol zu dessen besserer Wirksamkeit und weiterer Dosisreduktion führen. Auf diese Weise sollen Nebenwirkungen auf anderes Gewebe noch weiter reduziert werden [19].



Abbildung 1: schematische Darstellung des chimären Toxins SE. Ein N-terminaler His-Tag wird gefolgt von dem Ribosomen inaktivierenden Protein Saporin und dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF (spezifischer Ligand des EGFR).



Abbildung 2: schematische Darstellung des chimären Adaptortoxins SA2E. Ein N-terminaler His-Tag wird gefolgt von dem Ribosomen inaktivierenden Protein Saporin, das über einen zwischengeschalteten molekularen Adapter mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF (spezifischer Ligand des EGFR) verbunden ist.

1.3 Saponine

1.3.1 Natürliche Saponine und Saponingemische

Saponine sind natürlich vorkommende Substanzen, die hauptsächlich von Pflanzen, aber auch von niederen Meerestieren und einigen Bakterien gebildet werden [47]. Sie sind eine heterogene Gruppe von Glykosiden mit steroidalem oder triterpenoidem Grundgerüst und ein bis drei gebundenen Zuckerketten. Das Grundgerüst oder auch „Aglykon“ wird als Sapogenin bezeichnet und enthält bei steroidalen Saponinen meist 27 und bei triterpenoidalen Saponinen meist 30 Kohlenstoffatome. Unterschiede im Aufbau des Aglykons sowie Anzahl und Struktur der Zuckerketten ermöglichen eine große Saponinvielfalt. Ein typisches Grundgerüst der Triterpensaponine ist pentazyklisches Oleanan (Abb. 3), Steroidsaponine weisen als typisches Grundgerüst Spirostan auf (Abb. 4).

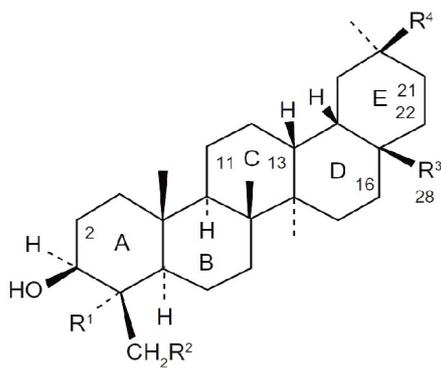


Abbildung 3: pentazyklisches Oleanan, typisches Grundgerüst von Triterpensaponinen, aus [48].

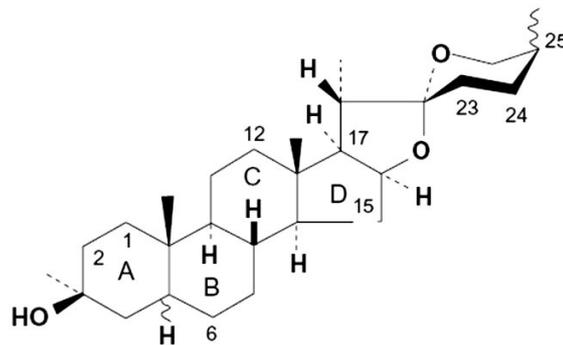


Abbildung 4 : Spirostan, typisches Grundgerüst von Steroidsaponinen, aus [48].

Monodesmoside (eine Zuckerkette) haben ihren Zuckerrest normalerweise an der C3 Position, bei Bidesmosiden (zwei Zuckerketten) kommt ein zusätzlicher Zuckerrest an Position C26 oder C28 hinzu. Aufgrund ihrer Struktur sind Saponine oberflächenaktive Substanzen, die in wässriger Lösung stabilen Schaum bilden. Diese Eigenschaft verleiht ihnen auch den Namen, der von der lateinischen Bezeichnung für Seife, *Sapo*, abgeleitet wurde. Die Funktion von Saponinen in Pflanzen ist noch nicht vollständig erforscht. Man geht davon aus, dass sie Teil des pflanzlichen Verteidigungssystems sind und die Pflanze insbesondere vor Pilzbefall und Insektenfraß schützen sollen.

Auf den tierischen Organismus haben Saponine eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkungen

wie beispielsweise Membranpermeabilisierung, Immunstimulation, Senkung des Cholesterolspiegels und Auslösen von Hypoglykämien. Sie können Einfluss auf Wachstum und Reproduktion nehmen, haben fungizides und bakterizides Potential und bei einigen wurde eine zytostatische Wirkung auf maligne Zellen nachgewiesen [47, 49–51]. Aufgrund ihrer immunstimulatorischen Wirkung werden Saponine als Adjuvantien für Impfstoffe eingesetzt [52]. Saponine sind insbesondere bekannt dafür, dass sie zelluläre Membranen permeabilisieren und Membranporen bilden, wobei die benötigte Saponinmenge wesentlich geringer ist, wenn die Zellwand Cholesterol enthält [47, 53, 54]. Auch ihr hämolytisches Potential, insbesondere das von Estersaponinen, ist bekannt.

Bisher war es noch nicht möglich die einzelnen Wirkungen spezifischen Strukturelementen der Saponine zuzuordnen. Es scheint jedoch deutliche Unterschiede zwischen Monodesmosiden und Bidesmosiden zu geben. Monodesmoside zeigten sich in der Regel aktiver als Bidesmoside. Letztere besitzen z. B. meistens keine hämolytische Aktivität, bilden weder Komplexe mit Cholesterol aus, noch wirken sie bakterio- oder fungizid [55–59].

In Abhängigkeit von der Art ihrer Aufnahme können Saponine verschiedene toxische Reaktionen im tierischen Organismus hervorrufen. Für die orale Aufnahme von Saponinen ist im Wesentlichen eine geringe Toxizität beschrieben worden, die sich nach Aufnahme großer Mengen in sehr unterschiedlichen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Appetitverlust aber auch Paralyse äußert. Wesentlich stärkere Toxizität weisen Saponine nach parenteraler Aufnahme auf. Für Triterpensaponine wurden Leberzellschäden bis hin zu Nekrose, Atemversagen, Krämpfen und Koma beschrieben [60].

Der für diese Arbeit entscheidende Effekt der Saponine ist deren synergistische Verstärkung chimärer Toxine. Es konnte gezeigt werden, dass SA, ein Saponingemisch, das kommerziell aus Schleierkraut (*Gypsophila paniculata* Linn.) gewonnen wurde, die Toxizität von dem Proteintoxin Saporin bis zu 100 000fach und diejenige des chimären Toxins SE bis zu 385 000fach verstärkt [21, 61]. Dieser Verstärkereffekt konnte an verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden [21, 30, 61, 62]. Die Verstärkung der Toxizität anderer Toxine mit Glykosidaseaktivität – wie der A-Kette des Ricins, *Diphtheriatoxin*, *Nigrin B* oder *Microcystin-LR* – konnte hingegen nicht nachgewiesen werden [63]. Der beschriebene Effekt von SA wurde in Konzentrationen unterhalb von membranpermeabilisierenden Eigenschaften erzielt, bei denen SA keine Eigentoxizität aufweist, sondern die Wirkung auf einer eindeutig nachgewiesenen synergistischen Verstärkung der Zyto-

toxizität des Proteintoxins beruht.

Welcher Mechanismus der Verstärkerwirkung zugrunde liegt konnte zwar bisher nicht vollständig geklärt werden und ist noch Gegenstand aktueller Forschung, aber es konnten bereits wichtige Erkenntnisse gewonnen werden: Weng et al. haben festgestellt, dass eine Aufnahme des Saponins in die Zellmembran eine lang anhaltende Sensibilisierung gegenüber Saporin hervorruft [64]. Auch konnte gezeigt werden, dass Saponine die Endozytose des Saporins über Clathrin vermitteln und sich vermutlich in endosomale Membranen einlagern, wo sie den Austritt, „*Endosomal Escape*“, des Toxins aus den Endosomen unterstützen [25, 30, 31].

1.3.2 Reinsaponine

Bisher wurde in unserer Arbeitsgruppe *in vivo* ausschließlich das Saponingemisch SA eingesetzt. Für den klinischen Einsatz ist es jedoch wichtig, einzelne reine Saponine zu verwenden. Sie ermöglichen die Produktion nach Richtlinien zur *Good Manufacturing Practice* (GMP), Regelwerken zur Qualitätssicherung der Produktionsabläufe in der pharmazeutischen Produktion.

Durch Mazeration mit 90 % Methanol und anschließender Reinigung mittels HPLC und präparativer Elektrophorese ist es in unserer Arbeitsgruppe gelungen, mehrere Triterpensaponine aus den Pflanzen *Gypsophila paniculata* und *Saponaria officinalis* zu isolieren [65, 66 und unveröffentlicht]. Wir hielten es für sinnvoll Saponine einzusetzen, die genau wie das von uns verwendete Toxin Saporin aus der Pflanze *S. officinalis* stammen, da wir annehmen, dass die beiden Substanzen auch in der Natur einen kooperierend toxischen Effekt ausüben, der sich evolutionär entwickelt hat. Die im ESI-TOF-Massenspektrogramm reinen und aufgrund erster vergleichender Versuche im Zytotoxizitätsassay Erfolg versprechendsten Saponine, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen aus den Wurzeln von *S. officinalis* und wurden entsprechend ihrer jeweiligen Masse SO-1861 und SO-1731 genannt.

Jia et al. haben Saponariosid A, ein Triterpensaponin aus *S. officinalis* (m/z 1831), isoliert und mithilfe extensiver MS und NMR Studien dessen Struktur analysiert (Abb. 5). Im Falle von SO-1861, das sich lediglich um m/z 30 von dem abgebildeten Saponin unterscheidet, ist anzunehmen, dass geringfügige Unterschiede der Zuckerkette an C28 vorliegen. Sehr wahrscheinlich wurde hier eine Pentose durch eine Hexose ersetzt.

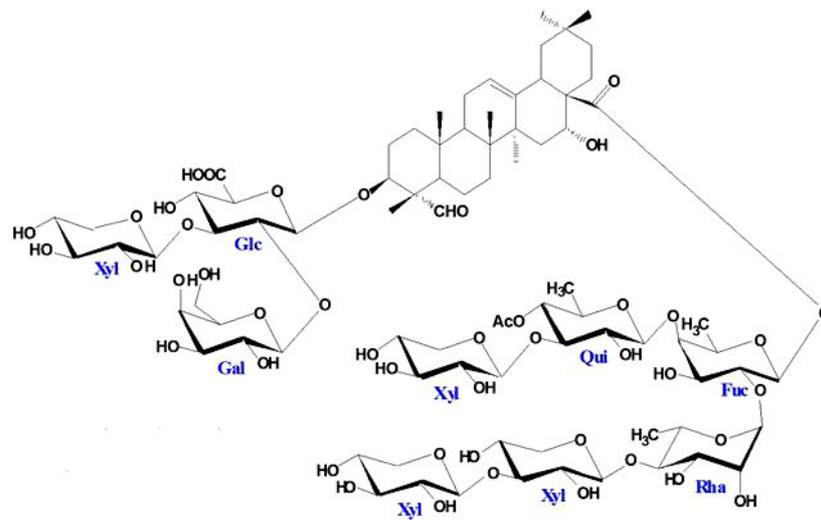


Abbildung 5: isolierte Struktur eines Saponins von *S. officinalis* mit m/z 1831, aus [67].

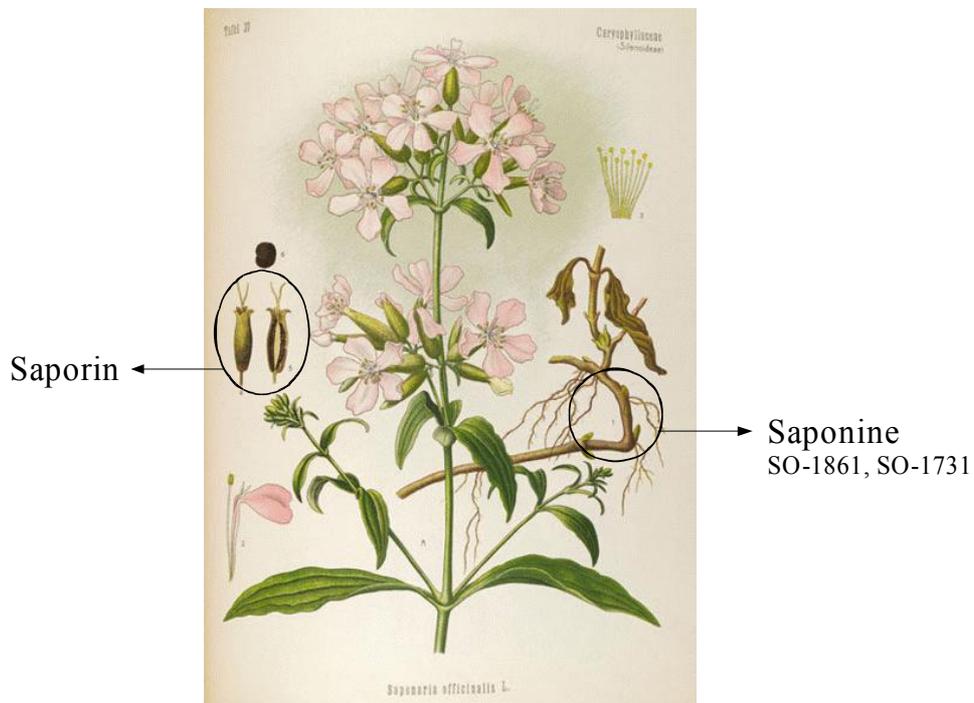


Abbildung 6: *S. officinalis*, markiert sind die Herkunftsorte des Toxins Saporin (Samen) und der beiden isolierten Saponine SO-1861 und SO-1731 (Wurzel), Bild von www.Botanical.com.

1.4 Zielsetzung

Zielgerichtete Toxine (s. 1.2.1) sind vielversprechende Substanzen für eine gezielte, effektive und nebenwirkungsarme Tumorthherapie. Zahlreiche zielgerichtete Toxine haben in Präklinik und Klinik eine sehr gut Antitumorwirkung gezeigt [18]. Dennoch ist bisher lediglich das Immuntoxin Ontak von der FDA zur Tumorthherapie zugelassen. Der scheinbare Widerspruch zwischen Wirksamkeit und fehlender Zulassung liegt in der geringen therapeutischen Breite der Toxinkonjugate begründet. Trotz ihres zielführenden Liganden weisen sie eine zielunabhängige Dosis limitierende Toxizität auf [18, 19]. In der Arbeitsgruppe von Professor Fuchs wurde eine Kombinationstherapie entwickelt, die aus einem chimären Saporin basierten Toxin (s. 1.2.1.3) und dem pflanzlichen Glykosid Saponin (s. 1.3) besteht und sich gegen Tumoren mit verstärkter Expression des EGFR (s. 1.2.1.2) richtet. Durch syngene Verstärkerwirkung des Saponins konnte die Toxindosis bei dieser Kombinationstherapie mehr als 100 000fach reduziert werden. Das grundlegende Prinzip der Kombinationstherapie wurde in der Zellkultur und in einem syngenem Mausmodell mit dem Saponingemisch SA, einem kommerziellen Pflanzenextrakt aus der Pflanze *G. Paniculata*, bewiesen [22]. Für den klinischen Einsatz der Therapie ist es jedoch essentiell, kein Saponingemisch, sondern einzelne analytisch reine Saponine zu verwenden, die die Produktion nach den GMP-Richtlinien zur Qualitätssicherung der Produktionsabläufe in der pharmazeutischen Produktion ermöglichen. In unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, mehrere Saponine aus den Pflanzen *G. paniculata* und *S. officinalis* zu isolieren (s. 1.3.2).

Grundlegendes Ziel der vorliegenden Arbeit war, das bisher erfolgversprechende Prinzip der Kombinationstherapie aus Saponin und zielgerichtetem Saporin basiertem Toxin präklinisch im Hinblick auf den gewünschten späteren klinischen Einsatz voranzubringen. Hierzu sollten die beiden reinen Saponine SO-1861 und SO-1731 aus *S. officinalis* in der Kombinationstherapie mit SE oder SA2E getestet werden. Der Einsatz von Saponinen, die genau wie das von uns verwendete Toxin Saporin aus der Pflanze *S. officinalis* stammen, ist insofern sinnvoll, da anzunehmen ist, dass die beiden Substanzen auch in der Natur als Teil des pflanzlichen Abwehrsystems einen kooperierend toxischen Effekt ausüben.

Zunächst sollte in der Zellkultur ein Dosis-Wirkungs-Profil für verschiedene Toxinkonzentrationen allein und in Kombination mit den beiden Reinsaponinen generiert werden. Da Triterpensaponine im tierischen Organismus Hämolyse bewirken können, sollte ein Hämolyseassay entwickelt werden, der vor der *In-vivo*-Applikation das hämolytische Potential von Saponinen aufzeigt

und in diesem Fall das von SO-1861 und SO-1731 mit dem des bereits erprobten SA vergleicht. Daraufhin sollte die Akkuttoxizität geeigneter Saponinkonzentrationen und in Abhängigkeit davon die Kombinationstherapie im *In-vivo*-Versuch getestet werden. Da Triterpensaponine insbesondere hepatotoxisch sind, sollte hierbei der Schädigungsgrad der Leber laborchemisch sowie histologisch untersucht werden.

Bisher wurden in der Zellkultur Endpunkt-Assays durchgeführt, d.h. Assays, die lediglich zu einem Zeitpunkt durch Bestimmung des Anteils vitaler Zellen Auskunft über die Toxizität der Therapie geben können. Für eine weitere Optimierung des Therapieregimes ist es wichtig, den zeitlichen Ablauf der Therapiewirkung auf ihre Zielzellen zu kennen. Im Hinblick darauf war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Wirkung der Kombinationstherapie in der Zellkultur in ihrem zeitlichen Verlauf darzustellen und Aussagen über Proliferations- und Sterbeverhalten der Zellen zu treffen.

Die bisherigen *In-vivo*-Versuche wurden an syngenem Maustumormodellen durchgeführt, wobei die Maustumorzellen mit dem humanen EGFR transfiziert waren, um als Zielzellen erkannt werden zu können. Im Hinblick auf eine klinische Studie ist es notwendig, die Übertragbarkeit der existierenden Ergebnisse von Maustumoren auf humane Tumoren zu zeigen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, ein humanes Xenotransplantatmodell mit Tumoren, die eine Überexpression des EGFR aufweisen, zu etablieren, und in diesem Modell die Kombinationstherapie mit dem im syngenem Mausmodell bereits bewährten SA zu testen.

2 Materialien und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten, geschützten Warenzeichen sind nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen einer solchen Kennzeichnung kann nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von Rechten Dritter ist. Alle in der Arbeit beschriebenen Methoden wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Veränderte Temperaturbedingungen sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

2.1.1.1 Elektrophorese

- Horizontal-Elektrophoresesystem Mini Sub Cell GT System; Bio-Rad
- Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele MGV-202; CBS

2.1.1.2 Gewebeverarbeitung

- Histokinette Shandon Citadel 1000; Thermo Fisher Scientific
- Kühlplatte COP 20; Medite Medizintechnik
- Paraffinstreckbad Typ 24900; Medax
- Schlittenmikrotom HM 400R; Microm GmbH

2.1.1.3 Photometer

- Analog-Spektrallinienphotometer 1101 M; Eppendorf
- Mikroplatten-Photometer Spectra MAX 340 PC; Molecular Devices
- Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer; peQLab

2.1.1.4 Westernblot

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

2.1.1.5 Zellkultur

- CO₂-Inkubator Modell 311; Forma Scientific (Thermo)
- Impedanz basiertes Echtzeit-Messsystem Adcon Reader; Bionas Discovery
- Lichtmikroskop Axiovert 25; Zeiss
- Neubauer Zählkammer; LO-Laboroptik
- Sterile Werkbank Herasafe; Heraeus

2.1.1.6 Zentrifugen

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

2.1.1.7 Sonstige Geräte

- Cobas 8000 *Modular Analyzer*; Roche Diagnostics
- Gefriertrockner Heto-Holten A/S CT 110; Leybold Heraeus
- Genetic Analyzer ABI PRISM 310 ; Advanced Biolab Service
- Hochdruck-Aufschluss-System French Press; Thermo Electron Corporation
- Heizblock QBT; Grant Instruments
- Inkubationsschüttler Unitron; HT-Infors
- Ultraschall-Desintegrator Branson Sonifier 250; G. Heinemann

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in pro Analyti Qualität bezogen.

- Acrylamid 4K - Lösung (30 %) - Mix 37,5 : 1 Acrylamid : Bisacrylamid; AppliChem
- Agarose NEEO Ultra; Roth
- Ampicillin-Natriumsalz; Roth
- Complete Protease-Inhibitor Mix without EDTA; Roche Diagnostics
- Coomassie Brilliantblau R-250; AppliChem
- *Enhanced Chemiluminescence* -Westernblot-Detektionsreagenz Immobilon Western; Millipore

- Formalin 10%, neutral buffered; Sigma-Aldrich
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid; AppliChem
- MTT; Calbiochem
- Ni-NTA-Agarose; Qiagen
- Paraffin Paraplast Plus; Roth
- Q-Sepharose Fast Flow; GE Healthcare
- Triton X-100; Sigma-Aldrich
- Triton X-114; Sigma-Aldrich

2.1.3 Saponine

Die Isolierung der Saponine aus der Pflanze *Saponaria officinalis* erfolgte durch Dr. Mayank Thakur (FU Berlin).

- *Saponinum album* aus *Gypsophila paniculata*; Merck
- Saponin SO-1681, isoliert aus *Saponaria officinalis*
- Saponin SO-1731, isoliert aus *Saponaria officinalis*

2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Kits

- *Advanced Protein Assay Reagent*; Cytoskeleton
- LAL Test; PYROGENT *Single Test Vials*; Lonza
- Mikrokonzentriersäulen Amicon 30 kDa, 5 kDa; Millipore
- Mikroplatteneinsätze Maxi Sorb U16 Module; Nunc
- Nitrozellulosemembran Hybond *Enhanced Chemiluminescence*; Amersham Biosciences
- PD-10 *Desalting Column*; Amersham Biosciences
- Röntgenfilme Hyperfilm ECL Amersham Biosciences; GE Healthcare
- Universal-Einbettkassetten; Langenbrinck

2.1.5 Antikörper für die Immunodetektion im Westernblot

- Primärantikörper: anti-Saporin monoklonales Kaninchen IgG, Verdünnung 1:500
- Sekundärantikörper: GAR* Polyklonales Ziegen IgG gegen Kaninchen IgG mit Peroxidase konjugiert, DAKO, Verdünnung 1:3000

2.1.6 Computer Software

- Compute pI/Mw tool ExPASy, Swiss Institute of Bioinformatics

2.1.7 Bakterienstämme

- *E. coli* ArcticExpress Competent Cells; Agilent Technologies
- *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS; Novagen

2.1.8 Vektoren

- pET11d zur Proteinexpression in *E. coli*; Invitrogen

2.1.9 Marker

- *Page Ruler Prestained Marker*; Fermentes
- *Molecular Weight Marker*; Fermentas

2.1.10 Puffer und Medien

Hier werden allgemeine Lösungen aufgeführt, die für mehrere Methoden eingesetzt wurden. Spezielle für einzelne Methoden benötigte Puffer sind bei der jeweiligen Methode aufgelistet. Die Herstellung der Puffer erfolgte mit Hilfe von MilliQ-Wasser (Reinstwasser).

PBS-Puffer : 150 mM Natriumchlorid, 8,33 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,67 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4

LB-Medium : 10 g / l Pepton, 5 g / l Hefeextrakt, 10 g / l Natriumchlorid, pH 7,0

LB_{Amp} : LB-Medium mit 50 µg / ml Ampicillin-Natriumsalz

LB_{Tetra} : LB-Medium mit 50 µg / ml Tetrazyklin-Hydrochlorid

2.1.11 Medien und Lösungen für die Zellkultur

- *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (4,5 g/l) mit L-Glutamin; PAA
- *Dulbecco's PBS* mit Calcium und Magnesium (0,9 mM Calcium, 0,5 mM Magnesium); PAA
- *Dulbecco's PBS* ohne Calcium und Magnesium; PAA
- *Fetal Bovine Serum*; Biochrom AG
- *Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (A/A)*; PAA

- Trypsin-EDTA (0,25 % w/v Trypsin, 1 mM EDTA); PAA
- Gelatine; Merck

2.1.12 Zelllinien

Tabelle 1: Auflistung in der Arbeit verwendeter Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
NIH-3T3	murine embryonale Fibroblasten	DSMZ
HER14	murine embryonale Fibroblasten (NIH-3T3) stabil transfiziert mit humanem EGFR	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. J. J. van Zoelen, Department of Cell Biology, University of Nijmegen, Niederlande
TSA-EGFR	murine (BALB/c) Mammakarzinomzellen, stabil transfiziert mit humanem EGFR	Zur Verfügung gestellt von Dr. S. Bulfone-Paus, Institut für Immunologie, Freie Universität Berlin, Transfektion durchgeführt im Institut für Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
ECV-304	humane Blasenkarzinomzelllinie	DSMZ
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen	Zur Verfügung gestellt von Dr. A. M. Kaufmann, Klinik und Poliklinik für Gynäkologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
SiHa	humane Zervixkarzinomzellen	
CaSki	humane Zervixkarzinomzellen	

2.1.13 Art und Herkunft der Mäuse

- BALB/c, immunkompetente Albinomäuse, Charles River
- CD1 nu/nu, athymische Nacktmäuse, Charles River

2.1.14 Statistische Auswertungen

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm *IBM SPSS Statistics 20* durchgeführt. Für die Berechnungen der Signifikanzen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Eine 2seitige asymptotische Signifikanz von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant interpretiert. Zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde für die Toxizitätsstudien eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation

Die Transformation von chemisch kompetenten *E.-coli*-Zellen erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. Durch den Hitzeschock bildet das mit Calciumchlorid vorbehandelte Bakterium Membranporen aus und die DNA kann in die Zelle gelangen. 100 µl Bakterien wurden auf Eis langsam aufgetaut und nach Zugabe von 0,5 µl Plasmid-DNA 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C im Heizblock. Bei *E. coli* ArcticExpress RP kompetenten Zellen wurde 30 min auf Eis inkubiert und der Hitzeschock erfolgte für 20 s. Danach wurden die transformierten Zellen 30 s auf Eis abgekühlt. Es wurden 300 µl LB-Medium dazugegeben, der Ansatz dann bei 37 °C für 30 min inkubiert und zum Animpfen einer Übernachtskultur verwendet.

2.2.2 DNA-Sequenzierung

Der eigentlichen Sequenzierung ging die PCR der zu analysierenden DNA voraus (s. 2.2.3). Die Konzentration der DNA von SA2EpET11 wurde mittels *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* bei 260 nm bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte durch den *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* nach der *BigDye-Terminator*-Sequenziermethode, einer Didesoxymethode oder auch Kettenabbruchsynthese. Die DNA-Doppelhelix wird zunächst durch Erwärmung denaturiert und somit in ihre Einzelstränge getrennt. Ausgehend von einem Primer, d. h. einer kurzen bekannten Sequenz der zu analysierenden DNA, wird einer der beiden komplementären DNA-Stränge mithilfe einer DNA-Polymerase (*AmpliTaq DNA-Polymerase*) synthetisiert. Neben den Nukleinbasen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) stehen hierfür für jede Base auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zur Verfügung, die keine 3'-Hydroxygruppe besitzen und zum Kettenabbruch des neu synthetisierten Stranges führen. Die vier verschiedenen ddNTPs sind durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe markiert und erlauben die spätere Analyse. Die Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, durch einen Laser wird die Fluoreszenz angeregt, die verschiedenen Wellenlängen werden von einem Detektor erkannt und werden dann dem jeweiligen ddNTP zugeordnet.

Die DNA Sequenzierung wurde durchgeführt, um die Integrität der DNA von SA2E zu überprüfen und gegebenenfalls Mutationen herauszufinden, die der Grund für dessen Instabilität sind.

2.2.3 Sequenzierungs- PCR für SA2E-DNA

Tabelle 2: PCR MasterMix für die Sequenzierung des SA2E Inserts

Reagenz	Menge
H ₂ O- RNase frei	5,5 µl
DNA	(200 ng/µl) 1 µl
Primer	1 µl
BigDye Terminator 5× Sequenzierungs Puffer	1,5 µl
BigDye Terminator Mix	1 µl
	10 µl

Tabelle 3: PCR Programm im Thermocycler für die Sequenzierung des SA2E Insert

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Initialisierung	96°C	1 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	96°C	10 s	
Primerhybridisierung	55°C	5 s	
Elongation	60°C	4 min	

Folgende Primer wurden verwendet: Ein Vorwärts-Primer am T7 Promotor 5'-TAATACGACT-CACTATAG-3' sowie ein Rückwärts-Primer des pET11 Vektors am 3'-Ende des Inserts 5'-CCAAATTCAGTGTGTACG-3'.

Der PCR Master-Mix für die Sequenzierung (Tab. 2) wurde vorbereitet und die PCR Reaktionen (Tab. 3) durchgeführt. Danach wurde die DNA in NucleoSEQ-Säulen aufgereinigt, um nicht inkorporierte *Dye Terminators* zu entfernen. Die erhaltenen 10 µl des aufgereinigten PCR Produkts wurden unter Vakuum 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es wurden dann 25 µl Formamid hinzugegeben und das Gemisch für 3 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren (PicoFuge) wurden die Proben luftblasenfrei in Sequenziergefäße (*Genetic Analyzer Sample Tubes* 0,5 ml von ABI PRISM) überführt und mit *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* sequenziert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression der Proteintoxine SE und SA2E erfolgte durch *E.-coli*-Zellen vom Stamm Rosetta(DE3)pLysS. Dieser *E.-coli*-Stamm enthält zusätzliche Gene für tRNAs, die in *E. coli* selten vorkommen, wodurch die Translationseffizienz eukaryontischer Proteine gesteigert wird. Für die Expression wurden *E.-coli*-Zellen zuvor mit der entsprechenden Plasmid-DNA von SE oder SA2E transformiert (s. 2.2.1). Mit den transformierten Bakterien wurden anschließend 400 ml LB_{Amp} angeimpft und die Bakterienkultur dann über Nacht (ÜN) in einem Warmluftrundschüttler bei 180 U/min geschüttelt. Am nächsten Tag wurden je 100 ml der Übernachtskultur in 300 ml LB_{Amp} überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD_{578nm}) von 0,6–0,8 (in der Regel 2–3 h) unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Bei der gewünschten OD wurde die Expression durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM gestartet. IPTG bindet an den *Lac Repressor*, der den Promotor des gewünschten Gens bis zu diesem Zeitpunkt gebunden und abgeschaltet hatte, verhindert seine Bindung an die DNA und leitet auf diese Weise gezielt die Proteinexpression ein. Nach 3 h wurden die Kulturen zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 10 min). Die Zellpellets wurden in PBS resuspendiert und bei 20 °C bis zur Weiterverarbeitung (Zellaufschluss, Proteinaufreinigung (s. 2.3.3)) eingefroren.

2.3.2 Proteinexpression in *E. coli* Arctic Express

Aufgrund der Instabilität von SA2E und dem Anfallen großer Mengen des Spaltprodukts Saporin wurde das Protein in *E. coli* RP kompetenten (enthält Extrakopien von *argU* und *proL* tRNA Genen) Arctic-Express-Zellen in der Hoffnung exprimiert, dass durch geringere Erwärmung der Kulturen Proteasen weniger aktiv sind und dementsprechend weniger Spaltprodukte anfallen. Außerdem fehlt den Zellen natürlicherweise die *Lon Protease*, die rekombinante Proteine abbauen kann. Für die Expression wurden Arctic-Express-Zellen zuvor mit SA2E-Plasmid-DNA transformiert (s. 2.2.1). Anschließend erfolgte direkt das Animpfen von 400 ml LB_{Tetra} und die Inkubation im Schüttler bei 37 °C ÜN. Am nächsten Tag wurden je 100 ml der ÜN-Kultur in 300 ml LB_{Tetra} überführt und bis zu einer OD_{578nm} von 0,6–0,8 weiter bei 37 °C geschüttelt. Dann wurden die Proben im Schüttler 30 min auf 13 °C abgekühlt, die Expression durch Zugabe von IPTG gestartet und bei 13 °C ÜN fortgesetzt. Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C,

10 min) und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Es erfolgte Zellaufschluss und Proteinaufreinigung (s. 2.3.3, 2.3.4).

2.3.3 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

- PBS₂₀** : PBS mit 20 mM Imidazol
- PBS₅₀** : PBS mit 50 mM Imidazol
- PBS₇₀** : PBS mit 70 mM Imidazol
- PBS₂₅₀** : PBS mit 250 mM Imidazol

Die Aufreinigung der Proteins erfolgte unter nativen Bedingungen durch Affinitätschromatographie mit einer NiNTA-Säule. Die resuspendierten Zellen wurden wenn nötig zunächst im Wasserbad aufgetaut oder direkt mittels Ultraschall (5×20 Impulse, Pulslänge 1 s, max 50 % Leistung, auf Eis) aufgeschlossen. Bei SA2E-haltigen Zellen wurde auch die *French Press* eingesetzt. Der Aufschluss erfolgte hier über Hochdruck und – anders als beim Ultraschall, wo eine Erwärmung der Probe trotz externer Kühlung mit Eis nicht gänzlich verhindert werden konnte – fand hier keine Hitzeentwicklung statt, wodurch die Proteaseaktivität der Bakterien und somit das Auftreten von Spaltprodukten vermindert werden sollte. Nach dem Zellaufschluss wurden die Proben zentrifugiert (30 min, $16\ 100 \times g$, $4\ ^\circ\text{C}$). Der Überstand wurde abpipettiert und auf die zuvor mit PBS äquilibrierte NiNTA-Säule geladen. Anschließend wurde die Säule mit je 5 ml PBS₂₀ und PBS₅₀ gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säulenmatrix zu entfernen. Bei den folgenden Imidazolkonzentrationen 50 und 70 mM wurden 5 Fraktionen von je 1 ml zur späteren Analyse in Eppendorf Gefäßen aufgefangen. Mit 5 ml PBS₇₀ wurde das Protein bereits teilweise, mit PBS₂₅₀ gänzlich von der Säule eluiert. Die aufgefangenen Fraktionen wurden anschließend durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) und Commassie-Färbung analysiert (s. 2.3.5, 2.3.6). Die Proben, die das gewünschte Protein ohne Spaltprodukt enthielten, wurden dann im Amicon (MWCO 30 kDa) aufkonzentriert, mittels Gelfiltration in einer *Sephadex PD-10 Säule* entsalzt und erneut aufkonzentriert. Anschließend wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung sowie zum Vergleich erneut eine SDS-Page mit der Probe und BSA-Standards (0,075 / 0,15 / 0,225 / 0,3 mg/ml) durchgeführt. Das Protein wurde aliquotiert und bei $-20\ ^\circ\text{C}$ eingefroren.

2.3.4 Proteinaufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie

pI (SA2E)	:	pH = 9,0
Äquilibrationspuffer	:	Ethanolamin, pH = 9,8
Elutionspuffer	:	Ethanolamin, pH 9,8 + NaCl 0,1 / 0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 / 0,6 / 0,7 / 0,8 / 0,9 / 1 M

Lediglich im Falle von SA2E erfolgte neben der Aufreinigung durch Affinitätschromatographie auch eine Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie.

In Abhängigkeit ihrer Nettoladung weisen Proteine unterschiedlich starke elektrostatische Wechselwirkungen mit der positiv geladenen Säulenmatrix auf und können so aufgetrennt werden. Der verwendete Anionenaustauscher Q-Sepharose besteht aus einer Säulenmatrix aus Agarose, die quartäre, positiv geladene Ammoniumgruppen trägt. Liegt der pH Wert des Äquilibrationspuffer oberhalb des isoelektrischen Punkts (pI) des Proteins, weist dieses eine negative Nettoladung auf. Das online Programm *Compute pI/Mw* von *Expasy Proteomics Server* wurde zur Ermittlung des pI verwendet. Die resuspendierten Zellen wurden wenn nötig zunächst im Wasserbad aufgetaut oder direkt mittels Ultraschall (5 × 20 Impulse, Pulslänge 1 s, max 50 % Leistung) aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden die Proben zentrifugiert (30 min, 16 100 × g, 4 °C). Der Überstand wurde abpipettiert und auf die zuvor mit Ethanolamin äquilibrierte Q-Sepharose-Säule geladen. Anschließend wurde die Säule mit 6 ml Ethanolamin gewaschen. Dann wurden die gebundenen Substanzen mit je 3 ml Elutionspuffer, beginnend mit der niedrigsten Konzentration von NaCl, eluiert und Fraktionen von 1 ml in Eppendorfgefäßen aufgefangen. Die Fraktionen wurden anschließend durch SDS-Page und Commassie-Färbung analysiert (s. 2.3.5, 2.3.6).

2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer	:	192 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS
4 × Probenpuffer	:	0,25 M Tris, 40 % (v/v) Glycerol, 8 % (w/v) SDS, 8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 0,004 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Trenngelpuffer	:	1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	:	0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
Acrylamidmix	:	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
Marker	:	Unstained Protein Molecular Weight Marker (M. W. 14,4–116 kDa)

Es wurde eine diskontinuierliche SDS-Page nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt, um die Proteine aufzutrennen. Hierfür wurden 12%ige Trenngele und 4,5%ige Sammelgele verwendet.

Tabelle 4: Ansätze für Trenn- und Sammelgele

Reagenz	12 % Trenngel	4,5 % Sammelgel
Wasser	2 × 744 µl	720 µl
Trenngelpuffer	2 × 531 µl	—
Sammelgelpuffer	—	300 µl
30 % Acrylamid	2 × 850 µl	180 µl
10 % APS	30 µl	10 µl
TEMED	3 µl	3 µl

Gießen: 5 × 830 µl Trenngel, 2 × 560 ml Sammelgel

Die durchgeführte Elektrophorese ist denaturierend. Der Probenpuffer enthält Natriumdodecylsulfat (SDS) und wird zur Probenvorbereitung im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben. Beim Erhitzen der Probe werden Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufgebrochen. Durch das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene 2-Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten. SDS wird von Proteinen im konstanten Verhältnis von ca. 1,4 g SDS/g Protein gebunden. Wegen der großen Zahl an SDS-Molekülen pro Proteinmolekül, besitzt der SDS-Protein-Komplex eine negative Gesamtladung. Da die Masse der SDS-Protein-Komplexe der ursprünglichen Proteinmasse proportional ist, wird eine Trennung dieser Komplexe im elektrischen Feld anhand ihrer Größe ermöglicht, wobei kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern als größere. Es wurden je 15 µl Proteinlösung mit 5 µl Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C erhitzt, kurz zentrifugiert (*PicoFuge*) und dann neben den Marker vollständig auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 50 min bei 200 V und 30 mA pro Gel.

2.3.6 Färbung mit Coomassie

- Färbelösung** : 0,1 % (w/v) Coomassie Blau R-250, 40 % (v/v) Methanol,
10 % (v/v) Essigsäure
- Entfärber** : 10 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) Ethanol
- Fixierlösung** : 25 % (v/v) Methanol, 4 % (v/v) Glycerol

Der Triphenylmethanfarbstoff *Coomassie Blau R-250* lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit Proteine unspezifisch an. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel mindestens 30 min auf einer Schüttelplatte mit der Färbelösung eingefärbt. Das Gel wurde dann kurz mit Wasser gespült und ca. 60 min unter Schütteln entfärbt, wobei alle 5–10 min die Entfärbelösung gewechselt wurde, bis nur noch eindeutige Banden sichtbar waren. Zum Trocknen wurde das Gel anschließend zuerst mindestens 30 min in Wasser und dann 60 min in Fixierlösung gelegt und dann zwischen zwei in Wasser getränkten Einmachfolien luftblasenfrei auf eine Glasplatte geklemmt.

2.3.7 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Die Aufkonzentrierung der Proteinlösungen erfolgte in der Regel sowohl vor als auch nach der Entsalzung mittels Ultrazentrifugation durch Amiconfilter mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa. Die Zentrifugation erfolgte für einige Minuten (4 °C, 3000 × g) bis das Volumen der Proteinlösung auf 2,5 ml (Fassungsvolumen der PD-10 Säule) vor und 0,5 ml nach Entsalzung eingeengt worden war.

2.3.8 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der aufgereinigten und aufkonzentrierten Probe wurde mithilfe des *Advanced Protein Assay Reagent Kits* von *Cytoskeleton* bestimmt. Hierzu wurden je 200 µl Färbereagenz und 10 µl Proteinlösung, Wasser oder BSA Proteinstandards (0,075 / 0,15 / 0,225 / 0,3 mg/ml) in einer Mikroplatte gut durchmischt und dann die Absorption bei $\lambda = 595$ nm durch ein Mikroplattenphotometer bestimmt. Mithilfe der BSA Standards wurde dann die gesuchte Proteinkonzentration ermittelt.

2.3.9 Westernblot und Immunodetektion

Nassblotpuffer	:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10% (v/v) Ethanol
PBSB_{0,2}	:	PBS mit 0,2% (w/v) Brij 58
Magermilchlösung	:	PBSB _{0,2} mit 5% (w/v) Magermilch
Chemilumineszenzlösung	:	1 ml Lösung A (0,1M Tris (pH 8,6), 250 mg/l Luminol); 100 µl Lösung B (1,1 mg/ml para-Cumarinsäure in DMSO); 1 µl 30% (v/v) Wasserstoffperoxid
primärer Antikörper	:	anti-Saporin monoklonales Kaninchen IgG, Verdünnung 1:500
sekundärer Antikörper	:	GAR* Polyklonales Ziegen IgG gegen Kaninchen IgG mit Peroxidase konjugiert, DAKO, Verdünnung 1:3000

Der Westernblot erfolgte zum immunologischen Nachweis des chimären Toxins SA2E und des erwarteten Spaltproduktes Saporin. Mit dem aufgereinigten und bereits aufkonzentrierten SA2E wurde zunächst eine SDS-Page durchgeführt (s. 2.3.5). Als Marker wurde hier ein *Prestained Marker* eingesetzt, der neben der Bestimmung der Molekülmasse auch die Kontrolle des anschließenden Proteintransfers auf die Blotmembran ermöglichte. Mithilfe eines Nassblotverfahrens erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Das Gel, eine gleichgroße Nitrozellulosemembran sowie zwei ebenso große Filterpapier wurden kurz in dem Nassblotpuffer vorinkubiert und dann luftblasenfrei übereinander gelegt. Da die Proteine durch SDS negativ geladen sind, wandern sie zur Anode und es wurde dementsprechend zwischen Kathode und Anode der Westernblotkammer folgende Anordnung gewählt: Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier. Der Transfer erfolgte für 30 min bei 50 Volt. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Blotmembran zunächst 10 min in Magermilchlösung unter Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:500 verdünnt in 5 %iger Magermilchlösung) auf einem Kippschüttler für 90 min bei Raumtemperatur. Um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran 5 × 5 min mit PBSB_{0,2} gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:3000 verdünnt in PBSB_{0,2}) für 30 min. Ungebundener Sekundärantikörper wurde anschließend durch erneutes Waschen der Membran (12 × 5 min mit PBSB_{0,2}) entfernt. Für die Detektion der gebundenen Antikörper wurde die Membran 1 min mit der Chemilumineszenzlösung inkubiert, kurz zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und in eine Folie gelegt. In der Dunkel-

kammer wurde ein Film auf die Folie aufgelegt, in einer lichtundurchlässigen Filmkassette für 10 s belichtet und anschließend entwickelt.

2.3.10 Endotoxin-Entfernung

Triton X-114 : Octylphenoxypoly (ethyleneoxy) ethanol, SIGMA

Bevor SE im Mausmodell eingesetzt wurde, wurden potentiell vorhandene bakterielle Endotoxine aus der Proteinlösung entfernt. Dies geschah mittels Phasenseparation durch Triton X-114. Bei einer Temperatur unter 20 °C dissoziieren die Lipopolysaccharide durch Triton X-114 vom Protein in homogene Lösung. Bei über 20 °C bindet Triton X-114 die hydrophoben Moleküle inklusive der dissoziierten Endotoxine und kann gemeinsam mit diesen abzentrifugiert werden. Zu der aufkonzentrierten Proteinlösung wurde Triton X-114 in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) gegeben. Das Gemisch wurde bei 4°C unter Rühren 30 min inkubiert, um eine homogene Lösung zu erzeugen. Anschließend wurde es 7 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert und dann zentrifugiert (20 000 × g, 10 min, 25 °C). Der ganze Vorgang wurde einmal wiederholt und anschließend zum Nachweis der Endotoxinfreiheit der Probe ein LAL Test (s. 2.3.11) durchgeführt.

2.3.11 *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) Test

Der LAL Test dient zum Nachweis der Endotoxinfreiheit einer Probe. Er wurde nach Endotoxin-entfernung mit Triton X-114 vor der *In-vivo*-Applikation des Toxins SE durchgeführt. Das von Pfeilschwanzkrebsen gewonnene Lysat aus gewaschenen Amöbozyten (Blutzellen) enthält Koagulogen, das in Gegenwart von Endotoxinen zu Koagulin umgewandelt wird. Durch Selbstassoziation von Koagulin bildet sich ein Gel aus. Wenn in unserer Probe im Unterschied zur Positivkontrolle kein Gelclot entstand, konnte sie als endotoxinfrei angesehen werden. Bei *In-vivo*-Experimenten wurden lediglich endotoxinfreie Proteine eingesetzt.

Prinzip:

Proenzym $\xrightarrow{\text{Endotoxin}}$ Koagulase

Koagulogen $\xrightarrow{\text{Koagulase}}$ Koagulin

2.3.12 Proteinaktivitätsbestimmung mittels *Herring Sperm* DNA

Puffer : 50 mM Natriumacetat pH 4.0 und 100 mM Kaliumchlorid

Die Proteinaktivitätsbestimmung erfolgte mittels *Herring Sperm* DNA [68]. Bei dieser Methode wurde die Glykosidaseaktivität von SE gemessen. 30 pmol des Proteins (v/v) wurden mit 10 μ l *Herring Sperm* DNA vermischt und mit dem kaliumchloridhaltigen Acetatpuffer auf ein Endvolumen von 50 μ l aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 1 h bei 50 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde es in ein Ultrazentrifugationsgefäß mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa überführt und zentrifugiert (4°C, 15000 \times g, 45 min). Hierbei gelangt Adenin ($m \approx 135$ Da) durch die Membran und die übrige DNA bleibt zurück. Im Nanodrop wurde die Absorption des Filtrats bei 260 nm, eine Wellenlänge bei der Nukleotide und auch die Nukleinbase Adenin ein Absorptionsmaximum aufweisen, gemessen. Anhand einer Adeninkalibriergerade (Absorption als Funktion der Adeninkonzentration) konnte die Adeninkonzentration der Probe näherungsweise berechnet werden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Kulturmedium : Dulbecco's *Modified Eagle Medium* (DMEM) High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin / Amphotericin B (A/A), 10 % *Fetal Calf Serum* (FCS)

Gelatinelösung : 0,1 % Gelatine in Wasser

Alle Zellen (s. 2.1.12) wurden in Zellkulturschalen unter sterilen Bedingungen bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die verwendeten Zelllinien weisen alle ein adhärenentes Wachstum in Monolayern auf. Für NIH-3T3 und HER-14 Zellen wurden die Kulturschalen zur besseren Haftung mit 0,1%iger Gelatine beschichtet. Hierzu wurde die Schale für mindestens 5 min mit Gelatinelösung inkubiert und die Lösung vor Zugabe der Zellen wieder abgesaugt. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte folgendermaßen: Das Kulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit Dulbecco's PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen und dann mit 300 μ l Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert bis sie sich vom Boden der Kulturschale gelöst hatten. Die Zellen wurden in 2 ml PBS – zur

besseren Vereinzelnung der Zellen wurde hier PBS und nicht DMEM eingesetzt – resuspendiert und dann 200 µl Zellsuspension in eine neue Kulturschale mit 10 ml frischem Medium überführt.

2.4.2 Zytotoxizitätsassay

Im Zytotoxizitätsassay wurde die Eigentoxizität von Saponinen und Toxinen sowie deren Wirksamkeit in der Kombinationstherapie *in vitro* getestet. Hierzu wurde mit konfluenten Zellen gearbeitet. Die Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben mit Dulbecco's PBS gewaschen, trypsinisiert und in PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauerkammer gezählt und auf die gewünschte Menge mit Kulturmedium verdünnt. Anschließend wurden 2000 (HER-14, NIH 3T3, TSA-EGFR) oder 4000 (CaSki, HeLa, SiHa) Zellen in je 100 µl Kulturmedium in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden unter den in Abschnitt 2.4.1 beschriebenen Bedingungen inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Zugabe des Toxins sowie des Saponins, jeweils in Kulturmedium. Zunächst erfolgte die Inkubation mit 180 µl Saponin (2 µg / ml) und 10 min später die Zugabe von 20 µl SE oder SA2E in den Endkonzentrationen 0,0003–30 nmol. Um die Eigentoxizität sowohl des Toxins als auch des Saponins zu testen, wurde die andere Komponente jeweils durch Kulturmedium ersetzt. Die Zellkontrolle, bei der am Versuchsende die Zellzahl gleich 100 % gesetzt wurde, wurde lediglich mit 200 µl Kulturmedium inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h folgte die Auswertung mittels MTT-Assay (s. 2.4.3).

2.4.3 MTT Assay

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

Formazan-Solubilizer : 205 ml Isopropanol, 25 ml 10% SDS, 20 ml 1M HCl

Der MTT-Assay dient dem Nachweis vitaler Zellen und wurde zur Auswertung der Zytotoxizitätsassays verwendet. Hierbei wird der gelbe wasserlösliche Farbstoff MTT durch Reduktion in das wasserunlösliche blauviolette Formazan umgewandelt. Die Reduktion erfolgt vermutlich im wesentlichen durch NADH und NADPH im Zytoplasma und teilweise durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenase (Berridge and Tan 1993), d. h. nur durch metabolisch aktive und somit vitale Zellen. Zu den Zellen wurden ohne vorheriges Abpipettieren des Mediums 30 µl MTT (5 mg/ml) gegeben. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurden Medium und MTT abpipettiert und das in den *wells* zurückgebliebene Formazan durch Zugabe von 50 µl Formazan-Solubi-

lizer unter Schütteln gelöst. Nach vollständiger Lösung wurde die Absorption der einzelnen Vertiefungen im Mikroplatten-Photometer bei $\lambda = 570$ nm bestimmt. Anhand der Absorption wurde der Anteil der überlebenden Zellen bezogen auf die Zellkontrolle (100 %) und eine Negativkontrolle ohne Zellen (0 %) bestimmt und damit der Überlebensindex als Maß der Vitalität berechnet.

2.4.4 Echtzeit-Experimente mithilfe des *Adcon Readers*

Ein Zytotoxizitätsassay mit der Kombinationstherapie aus Reinsaponinen und SE wurde sowohl an ECV-Zellen als auch an HeLa-Zellen unter Echtzeit-Monitoring mittels Adcon-Reader durchgeführt. Das System beruht auf der Bestimmung von Impedanz, die mit Zelladhäsion und somit Zellvitalität korreliert. Es beinhaltet eine spezielle 96-Well-Platte mit im Plattenboden integrierten Fingerkondensatoren. Diese Platte wird auf einer zugehörigen Plattenstation (*Adcon Reader*) im Zellinkubator befestigt, die mit einem analysierenden Computer verbunden ist. An einem angeschlossenen Monitor kann die Impedanz der einzelnen *Wells* direkt überwacht und die Ergebnisse anschließend mit der zugehörigen Software ausgewertet werden. Vor Start des Experiments wurde der *Adcon-Reader* im CO₂-Inkubator platziert, mit Netzgerät (*power supply unit*) und zugehöriger Software verbunden. Die 96-Well-Platte mit 200 μ l Kulturmedium / *Well* wurde auf den *Adcon-Reader* geklemmt, wodurch der elektrische Kontakt zwischen Platte und Reader hergestellt wurde. Die Elektroden wurden einer Wechselstromspannung von $+ / - 1$ mV bei einer fixierten Frequenz von 10 kHz ausgesetzt und die Impedanz der einzelnen *Wells* wurde durch die Software berechnet. Die Impedanz wurde dann adjustiert, das System pausiert und die 96-Well-Platte zwecks Zugabe der Zellen wieder entnommen. Die Zellen wurden wie üblich zweimal mit PBS gewaschen, mit 300 μ l Trypsin-EDTA bei 37°C inkubiert bis sie sich vom Plattenboden gelöst hatten, in 2 ml PBS resuspendiert, gezählt, und mit Kulturmedium verdünnt. Von HeLa-Zellen wurden 4000/8000/12000 und 16000/*Well* in je 50 μ l Kulturmedium in die 96-Well-Platte ausgesät. Von ECV-Zellen wurden 5000/*Well* ausgesät. Die Platte wurde 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit die Zellen sich bei Start der Messung bereits am *Well*-Boden niedergelassen hatten. Dann wurde die Platte wieder auf den Reader geklemmt und die Impedanzmessung fortgeführt. Nach ca. 24 Stunden erfolgte die Zugabe von Saponin und im Falle der HeLa-Zellen auch von SE. Hierzu wurde die Messung pausiert und die 96-Well-Platte entnommen. Das Medium wurde abpipettiert, es erfolgte zunächst die Inkubation mit 180 μ l Saponin (1,5 μ g / ml

in Kulturmedium) und 10 min später die Zugabe von 20 µl SE in den Endkonzentrationen 0,003–3 nmol. Um die Eigentoxizität sowohl des Toxins als auch des Saponins zu testen, wurde die andere Komponente in diesen *Wells* jeweils durch Kulturmedium ersetzt. Die Zellkontrolle wurde lediglich mit 200 µl Kulturmedium inkubiert. Nach Zugabe von SE wurde die Platte wieder auf die Station geklemmt und die Impedanzmessung fortgeführt. Im Falle der HeLa-Zellen wurde das Experiment für eine Gesamtdauer von ca. 144 und im Falle der ECV-Zellen für eine Gesamtdauer von ca. 26 Stunden durchgeführt.

2.5 Phytopharmakologische Methoden

2.5.1 Saponin-Agarosegelelektrophorese

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

Die Auftrennung des Saponingemischs SA erfolgte nach Thakur et al. durch Gelelektrophorese [69]. Es wurden 40 mg SA in 95 %iger Glycerollösung gelöst und in einem 1%igen Agarosegel in einzelne Saponinfraktionen aufgetrennt. Hierzu wurden je 100 µl in die Geltaschen pipettiert. Nach durchgeführter Elektrophorese (1000 mA, 120 V, 50 min) erfolgte eine Aufnahme des Gels unter UV Licht bei 258 nm, da Saponine bei dieser Wellenlänge eine Eigenfluoreszenz aufweisen. Die isolierten Saponinfraktionen wurden mit dem Gel exzidiert und zurückgewonnen. Hierzu wurde das Gel im Zellhomogenisator zerkleinert und in 12 ml Methanol (70 %) ÜN gedreht. Anschließend wurde das Gel-Methanol-Gemisch gefiltert, das Volumen des Filtrats durch Verdampfung auf 1 ml reduziert und dann gefriergetrocknet.

2.5.2 Saponin Dünnschichtchromatographie

Mobile Phase : Buthanol, Essigsäure 100 %, Wasser (Verhältnis 4/1/5)

Stationäre Phase : Kieselgel 60 F 254 auf Alufolie (Merck)

Sprühreagenz : Anisaldehyd 0,5 ml, Essigsäure 100 % 15 ml, Methanol 85 ml, 5 ml Schwefelsäure

Von je 10 µl Filtrat (s. 2.5.1) wurde nach Verdampfen des Methanols eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt, um die Anwesenheit von Saponin zu prüfen. 10 µl des jeweiligen Filtrats der Fraktionen wurden auf eine gemeinsame Startlinie der Kieselgelplatte aufgetragen. Als Negativkontrolle diente eine Probe aus einem Abschnitt des Agarosegels ohne Saponin, die der glei-

chen Prozedur unterlag wie die Saponine. Zum Vergleich wurde SA (in Wasser gelöst) aufgetragen. Die Platte wurde senkrecht in eine geschlossene Chromatographiekammer mit dem Fließmittel gestellt. Kurz bevor die Fließfront das obere Plattenende erreicht hatte, wurde die Platte der Kammer entnommen und getrocknet. Die Banden konnten durch das Sprühreagenz und anschließendes Erhitzen (105 °C, 3 min) sichtbar gemacht werden.

2.6 *Ex-vivo*-Methoden

2.6.1 Hämolyseaktivitätsbestimmung der Saponine

Um das hämolytische Potential der Reinsaponine mit dem des Saponingemischs SA zu vergleichen, wurden Hämolysetests modifiziert nach Oguiura et al. [70] durchgeführt. Zunächst erfolgte die Abnahme von Vollblut in einem EDTA Röhrchen (*BD Vacutainer System*). Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (440 × g, 4 °C, 10 min) und das Plasma abpipettiert. Das Erythrozytenkonzentrat wurde vorsichtig mit 10 ml NaCl 0,9% resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (440 × g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde abpipettiert und der Waschschrift anschließend noch einmal wiederholt. Dann wurde eine 4 %ige Erythrozytenlösung in NaCl (0,9 %) hergestellt und davon 150 µl/well in eine Mikroplatte pipettiert und mit je 50 µl verschiedener Saponinkonzentrationen 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente Triton X-100 (0,1%), als Negativkontrolle isotonische Natriumchloridlösung. Bei stattgefundenener Hämolyse tritt Hämoglobin ins Plasma über, was optisch durch eine Rotfärbung des Überstands nach Zentrifugation festgestellt wird und über Absorption gemessen werden kann. Nach der Inkubation wurde die Mikroplatte 10 min bei 800 × g zentrifugiert. Je 100 µl des Überstands wurden auf eine andere Mikroplatte überführt und die Absorption der einzelnen wells im Mikroplattenphotometer bei $\lambda = 405$ nm gemessen. Da die Absorption teilweise zu hoch für die Bestimmung war, wurde der Überstand in einem weiteren Schritt 1 : 5 verdünnt. Die prozentuale Hämolyse wurde berechnet als $[(A_{405nm} \text{ Saponin} - A_{405nm} \text{ NaCl}) / (A_{405nm} \text{ Triton X-100} - A_{405nm} \text{ NaCl})] \times 100$.

2.7 *In-vivo*-Experimente

Die Versuche wurden unter der Genehmigungsnummer G0260/10 des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin durchgeführt. Sie erfolgten streng nach dem im genehmigten Tierversuchsvorhaben „Prüfung einer Kombination von Saponinen und Fusionsproteinen zur Tumorthherapie in Mausmodellen“ ausgearbeiteten Versuchsplan. Die Versuche wurden an 6–8 Wochen alten BALB/c oder CD1 nu/nu Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen von Temperatur (21–24 °C), Luftfeuchtigkeit (40–60%) und 12-Stunden-hell-dunkel-Zyklen in sterilisierten Plexiglaskäfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Nach Ankunft hatten sie vor Versuchsstart mindestens eine Woche Akklimatisierungszeit.

2.7.1 Toxizitätsbestimmung von SO-1861 und SO-1731 *in vivo*

SO-1861 und SO-1731 wurden *in vivo* nach erfolgreichem Einsatz in der Zellkultur zunächst auf ihre Eigentoxizität an BALB/c Mäusen getestet. Hierzu wurde je einer Kleingruppe von 3 Mäusen das Saponin SO-1861 oder SO-1731 in 100 µl PBS an Tag 1 und Tag 15 des Versuchs subkutan injiziert. Die erste Stunde nach Injektion wurden die Mäuse permanent, die weiteren 6 Stunden nach Injektion engmaschig, beobachtet. Anschließend wurden sie täglich gewogen und hinsichtlich Auffälligkeiten von Erscheinungsbild und Verhalten beobachtet (struppiges Fell, verändertes Fressverhalten, Isolierung, Apathie, gesenkter Kopf etc.). Die Mäuse, bei denen aufgrund ihres Verhaltens ein zu hoher Leidensdruck vermutet wurde, um den Versuch fortzusetzen, wurden aus dem Versuch entnommen und euthanasiert.

Wöchentlich wurde den Mäusen alternierend submandibulär Blut entnommen. Das entnommene Blutvolumen betrug 7,5–10 % der zirkulierenden Blutmenge und der einzelnen Maus wurde durch die alternierende Blutentnahme eine Erholungszeit von 2 Wochen gewährt [71]. Da für Triterpensaponine insbesondere hepatotoxisches Potential beschrieben wurde (s. 1.3), wurden die Enzyme AST, ALT und GLDH bestimmt, um Leberzellschäden zu erkennen. Auch die Plasmakreatininkonzentration wurde ermittelt, um starke Nierenfunktionseinschränkungen ausschließen zu können. Die Bestimmung der Enzymwerte erfolgte hierbei mithilfe des Analysegeräts Cobas 8000 von der Firma Roche.

Außerdem wurden Urinkontrollen 24 h nach Saponingabe mit anschließendem Urinquicktest durchgeführt, um Verfärbungen und freies Hämoglobin zu erkennen und Hinweise auf eine Hä-

molyse zu erhalten. Hierzu wurde die Maus bis zum Urinabgang auf eine glatte saubere Unterlage gesetzt, von der der Urin anschließend pipettiert wurde.

Nach Beendigung des Versuchs nach 28 Tagen erfolgte die histologische Auswertung des Leberparenchyms (s. 2.8, Tab. 6).

2.7.2 Kombinationstherapie im syngenem Tumormodell

Die beiden Reinsaponine SO-1861 und SO-1731 wurden in der Kombinationstherapie an BALB/c Mäusen getestet. Hierzu wurde den Mäusen subkutan ein Tumor aus TSA-EGFR-Zellen ($1,25 \times 10^5$ Zellen in 100 μ l PBS) in der rechten Flanke induziert. Sobald ein solider Tumor palpabel war, wurde die Therapie begonnen. Die Substanzen wurden in je 100 μ l PBS appliziert. Da beschrieben wurde, dass eine Präinkubation mit Saponinen den Verstärkereffekt *in vivo* erhöht [72], wurde das Saponin eine Stunde vor Injektion des Toxins verabreicht. Um Entzündung und Haarverlust an der Injektionsstelle zu vermeiden [22], wurde das Saponin subkutan in die Nackenfalte und SE subkutan in die Flanke in die unmittelbare Umgebung des Tumors injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt jeweils lediglich 100 μ l PBS. Ein Versuch dauerte 28 Tage und beinhaltete 8 Therapieeinheiten. Die Mäuse erhielten die Therapie alternierend alle drei oder alle vier Tage. Mäuse, bei denen aufgrund eines Tumorscores > 5 (Tab. 5) eine Weiterbehandlung nicht vertretbar war, wurden vorzeitig aus dem Versuch entnommen. Das Tumorwachstum sowie das Gewicht der Mäuse wurden täglich kontrolliert.

Sobald möglich wurde der Tumor alle zwei Tage und dann postmortal mit einem digitalen Messschieber gemessen und das Volumen mit der Formel $(\pi/6) \times (Länge \times Breite)^{1,5}$ berechnet. Die Tumorform wird hierbei als Halbellipsoid angenommen und die Formel ermöglicht die Berechnung der Tumorgröße bei nur zwei gegebenen Dimensionen [73]. Der Versuch wurde durch Euthanasie der Mäuse mit einer Überdosis Isofluran beendet. Tumoren und Organe wurden präpariert und gewogen, in Formalin (10 %, gepuffert) fixiert und anschließend paraffiniert. Blutentnahmen erfolgten nicht, da die *In-vivo*-Toxizität der Reinsaponine mit der von SA zu vergleichen ist (s. 3.4.1.1) und somit auch in der Kombinationstherapie hinsichtlich Organschäden von einem vergleichbaren Effekt der getesteten Saponine auszugehen ist. Auf diese Weise wurde, wie im Tierversuchsantrag zuvor festgelegt, unnötiger Stress der Mäuse vermieden. Es erfolgte postmortal in Kooperation mit „Pathodiagnostik Berlin“ (Prof. Dürkop) die histologische Auswertung von Leberparenchymschäden (Tab. 6).

2.7.3 Auswahl und Etablierung eines geeigneten Xenotransplantatmodells

Als Xenotransplantat wurden etablierte humane Zervixkarzinomzelllinien eingesetzt, die durch Überexpression von EGFR unserer zielgerichteten Therapie zugänglich sind [62]. Die drei Zellreihen CaSki, Hela und SiHa wurden parallel je einer kleinen Gruppe von 3 CD1 nu/nu Mäusen injiziert und das anschließende Tumorwachstum über 30 Tage verglichen. Es wurden je 3×10^6 Zellen in 200 µl PBS in die rechte Flanke verabreicht. Gewünscht für die Tumorthherapie war ein kontinuierliches, mäßiges Wachstum, das einerseits einen gut tastbaren Tumor, andererseits ein Überleben der Kontrollgruppe bis zum Versuchsende gewährleistet.

2.7.4 Kombinationstherapie im Xenotransplantatmodell

Die Kombinationstherapie der Nacktmäuse erfolgte mit SE und SA. SA wurde hier gewählt, weil es bereits einen guten synergistischen Effekt in der Kombinationstherapie bei tumortragenden BALB/c Mäusen gezeigt hatte [22], und weil die Behandlung mit Reinsaponinen in dieser Doktorarbeit erst etabliert werden musste. Das Therapieschema wurde gemäß des Tierversuchsantrags von vorangegangenen Versuchen mit BALB/c-Mäusen übernommen [22]. Den Mäusen wurde subkutan ein Tumor aus Hela-Zellen (3×10^6 in 200 µl PBS) in der rechten Flanke induziert. Sobald ein solider Tumor tastbar war, wurde die Kombinationstherapie begonnen. Zunächst wurde SA (30 µg in 100 µl PBS) subkutan in die Nackenfalte injiziert. Eine Stunde später erfolgte die Injektion von SE (0,1 µg in 100 µl PBS) subkutan in die rechte Flanke in Tumornähe. Der Kontrollgruppe wurden jeweils lediglich 100 µl PBS injiziert. Abschnitt 2.7.2 sind Begründungen zu Lokalisation und zeitlichen Abstand der Substanzapplikationen zu entnehmen. Ein Versuch dauerte 30 Tage und beinhaltete acht Therapieeinheiten, die alternierend alle drei oder vier Tage erfolgten. Berechnung der Tumorgröße, Abschätzung des Leidensdrucks sowie Beendigung des Versuchs erfolgte wie unter 2.7.2 beschrieben.

Tabelle 5: Score Sheet erwarteter versuchsbedingter Symptome inklusive Body Score

Symptome	Body Score	Score
Kein tastbarer Tumor und Body Score BSC3		0

<p>Tumor ≤ 5 mm und Tumor verschiebbar und keine Ulzeration, keine Automutilation des Tumors und <i>Body Score BSC3</i></p>		<p>1</p>
<p>Kein tastbarer Tumor und <i>Body Score BSC4</i></p>		<p>1</p>
<p>Kein tastbarer Tumor oder Tumor ≤ 5 mm und <i>Body Score BSC2</i></p>		<p>2</p>
<p>Tumor > 5 mm und ≤ 10 mm und Tumor verschiebbar und keine Ulzeration, keine Automutilation des Tumors und <i>Body Score BSC3</i></p>		<p>2</p>
<p>Tumor > 5 mm und ≤ 10 mm und Tumor verschiebbar und keine Ulzeration, keine Automutilation des Tumors und <i>Body Score BSC2</i></p>		<p>3</p>
<p>Tumor > 10 mm und ≤ 15 mm und Tumor verschiebbar und keine Ulzeration, keine Automutilation des Tumors und <i>Body Score BSC3</i> und Haarverlust ≤ 1 cm²</p>		<p>3</p>
<p>Tumor > 10 mm und ≤ 15 mm und Tumor verschiebbar und keine Ulzeration, keine Automutilation des Tumors und <i>Body Score BSC2</i> oder/und Haarverlust > 1 cm²</p>		<p>4</p>
<p>Tumor > 15 mm oder Tumor nicht verschiebbar oder Tumorulzeration oder Automutilation des Tumors oder <i>Body Score BSC1</i> oder Rezidiv unabhängig von der Größe, sofern mehr als 14 Tage nach der letzten Behandlung vergangen sind und keine sofortige erneute Behandlung vorgesehen ist</p>		<p>5</p>

2.8 Histopathologische Methoden

2.8.1 Fixierung der Organe in Formalin und Einbettung in Paraffin

Nach der Präparation wurden die Organe und Tumoren der Mäuse in Einbettkassetten 24–48 h in 10 % neutral gepuffertem Formalin (4 % Formaldehyd) fixiert. Danach wurden sie mit destilliertem Wasser gewaschen und mithilfe eines Automaten entwässert und paraffiniert.

Formalin sorgt für die Quervernetzung von Proteinen und verhindert auf diese Weise dessen Zerfall. Mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe wird das Gewebe entwässert und dann eine Zeit lang in dem Intermedium Xylol inkubiert, das sich sowohl mit Ethanol als auch mit Paraffin vermischt und letztendlich durch flüssiges Paraffin ersetzt wird.

2.8.2 Entwässerung und Paraffin-Infiltration im Infiltrationsautomat (Citadel 1000)

- 60 min Ethanol, 70 % in aqua dest., Nr. 1
- 60 min Ethanol, 70 % in aqua dest., Nr. 2
- 60 min Ethanol, 80 % in aqua dest., Nr. 1
- 60 min Ethanol, 80 % in aqua dest., Nr. 2
- 60 min Ethanol, 96 % in aqua dest., Nr. 1
- 60 min Ethanol, 96 % in aqua dest., Nr. 2
- 120 min Ethanol, 100 %, Nr. 1
- 120 min Ethanol, 100 %, Nr. 2
- 1 h Xylol, Nr. 1
- 2 h Xylol, Nr. 2
- 4 h Paraffin, 55 °C–65 °C, Nr. 1
- 8-16 h Paraffin, 55°-65°C, Nr. 2

Nach dem Paraffinieren wurden die Organe eingeblockt. Hierzu wurden sie in Gießformen gelegt und die Form mit heißem Paraffin gefüllt. Die Einbettkassette wurde als Träger aufgesetzt und der Block konnte nach Erkalten des Paraffins aus der Form gelöst werden. Mit einem Schlittenmikrotom wurden dann vom gekühlten Block 4 µm dicke Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden anschließend in ca. 42 °C warmem Wasser geglättet und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden im Referenzzentrum für Lymphom- und Hämatopathologie „Pathodiagnostik

Berlin“ mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt und von Herrn Professor Dürkop histologisch begutachtet. Das Leberparenchym wurde den in Tabelle 6 aufgeführten Graden zugeordnet.

Tabelle 6: Grade der Leberparenchymschädigung

Grad	Leberarchitektur
0	Normales Leberparenchym ohne Veränderungen
1	Geringe toxische Veränderungen, ggf. wenige Einzelzellnekrosen, Epithelregeneration
2	Kleinere Gruppenzellnekrosen
3	Größere Nekrosen bis hin zur Totalnekrose

3 Ergebnisse

3.1 Wahl des geeigneten Toxins für die Kombinationstherapie

3.1.1 Instabilität von SA2E

SA2E lässt durch seinen molekularen Adapter eine höhere Aktivität erwarten als das sonst identische Toxin SE (s. 1.2.1.3) und sollte deshalb ursprünglich bevorzugt in der Kombinationstherapie eingesetzt werden. Nach Expression und Aufreinigung von SA2E fielen stets große, häufig sogar äquivalente oder größere Mengen des Spaltprodukts Saporin (optisch im Westernblot bestätigt, Abb. 7) an, die sich auch mithilfe eines Ultrazentrifugalfilters mit einem MWCO von 30 kDa nicht entfernen ließen. Die korrekte Nukleotidsequenz der für SA2E kodierenden DNA konnte mittels Sequenzierung (s. 2.2.3) bestätigt werden.

Durch Änderungen der Expressions- und Aufreinigungsbedingungen wurde im Folgenden versucht, die Stabilität des Adapterproteins zu erhöhen. Um die Temperatur während des Expressions- und Aufreinigungsprozesses möglichst gering zu halten, in der Hoffnung, die Proteaseaktivität der Bakterien zu vermindern, wurde die Expression in *Arctic Express* Zellen (s. 2.3.2) und die Aufreinigung im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte mittels *French Press* über Hochdruck und nicht wie zuvor über Ultraschall, der trotz Kühlung zu deutlicher Erwärmung der Probe geführt hatte. Das Anfallen des Spaltproduktes Saporin ließ sich hierdurch nicht vermindern. Auch der Einsatz von Proteaseinhibitoren zeigte keinen langfristigen Erfolg. Zwar konnte die Spaltung von SA2E zunächst vermindert werden, aber bereits nach der Entsalzung der entsprechenden Fraktionen war ein Großteil des Adapterproteins zu Saporin abgebaut worden.

In weiteren Versuchen wurde die NiNTA- Affinitätschromatographie (s. 2.3.3) durch eine Anionenaustauschchromatographie (s. 2.3.4) ersetzt, mit der Hoffnung, dass SA2E und Saporin in unterschiedlichen Fraktionen eluiert werden. Doch nach der Elution zeigte sich in allen Fraktionen mit SA2E auch ein entsprechendes Spaltprodukt. Abbildung 8 zeigt den Vergleich von dem in seinem Reinheitsgrad höchsten SA2E und SE, jeweils nach Endotoxinentfernung. Die höhere molekulare Masse von SA2E gegenüber SE resultiert aus dem in SA2E zusätzlich vorhandenen Adapter.

Aufgrund der hier beschriebenen Instabilität von SA2E und da davon auszugehen ist, das Saponine genau wie auch der molekulare Adapter den Austritt des Toxins aus den Endosomen unterstützen (s. 1.3), wurden sämtliche Kombinationstherapien aus chimärem Toxin und Saponin in dieser Arbeit mit dem stabilen Toxin SE durchgeführt.

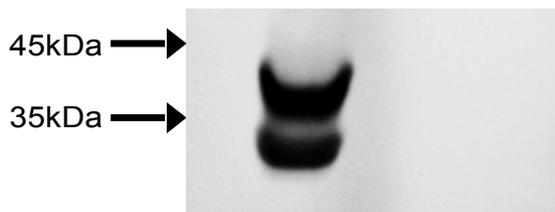


Abbildung 7: Westernblot mit SA2E und Spaltprodukt. Ak1 = α -Saporin, Ak2 = GAR*

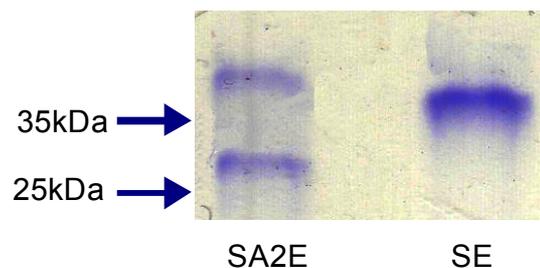


Abbildung 8: SA2E und SE nach Aufreinigung und Endotoxinentfernung, aufgetrennt im Coomassie gefärbten SDS-Gel

3.1.2 Allgemeine Vorbemerkungen zum Einsatz von SE

Die Toxizität von SE und seine EGFR-spezifische Wirkung auf Zielzellen wurden bereits nachgewiesen [62]. In allen Experimenten mit Verwendung von SE wurden ausschließlich Proteintoxine eingesetzt, die eine Reinheit von mindestens 90 % aufwiesen (wie über Färbung mit Coomassie ermittelt wurde) und eine Freisetzung von mindestens 400 pmol Adenin pro pmol Toxin pro Stunde bewirkten (s. 2.3.12). Bei den *In-vivo*-Experimenten wurden ausschließlich endotoxinfreie Toxine eingesetzt (s. 2.3.10).

3.2 Reinsaponine in der Zellkultur

3.2.1 Effekt der Kombinationstherapie auf die Zelllinie TSA-EGFR

Die beiden Reinsaponine SO-1861 und SO-1731 wurden in Kombination mit SE an der Mauszelllinie TSA-EGFR, die später im *In-vivo*-Experiment eingesetzt wurde (s. 3.4.2), zunächst in der Zellkultur im Zytotoxizitätsassay (s. 2.4.2) getestet. Die Saponine wurden in der Konzentration 2 μ g/ml eingesetzt und SE in Konzentrationen von 0,0003–30 nM. Die Auswahl der Konzentrationen basiert auf vorangegangenen Experimenten in unserer Arbeitsgruppe mit SE und dem Saponingemisch SA, bei denen in dem gewählten Bereich die halbmaximale Toxizität (50 % Zellüberleben) sowohl des Toxins als auch der Kombinationstherapie ermittelt und somit

der Verstärkungsfaktor genau berechnet werden konnte. Eine Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ von SO-1861 und SO-1731 hatte sich zuvor als eindeutig untoxisch für die Zellen erwiesen. Abbildung 9 zeigt die Wirkung von SE allein und die Wirkung der Kombination bei verschiedenen SE-Konzentrationen. Die Kombination der beiden Substanzen zeigte sich toxisch in Konzentrationen, in denen die Einzelsubstanzen keine Toxizität aufwiesen. Hier lag also ein eindeutig synergistischer Effekt vor. Der zytotoxische Effekt von SE auf die Zielzellen wurde durch die Saponine mehr als 100 000 fach verstärkt: Bei der alleinigen Gabe von SE zeigt dieses sich auch bei einer Konzentration von 30 nM untoxisch auf die Zellen, wohingegen es in der Kombination mit sowohl SO-1861 als auch SO-1731 bis zu einer Konzentration von 0.0003 nM mehr als 60% der Zellen abtötet. Die hohe Wirksamkeit der beiden Reinsaponine als Verstärker des Toxins SE wurde dadurch bewiesen. Aufgrund einer zu diesem Zeitpunkt begrenzten Menge aufgereinigter Saponine wurde auf erneute Versuche zur Ermittlung des exakten Verstärkungsfaktors verzichtet, zumal der Schwerpunkt der Arbeit auf der Entwicklung einer Behandlungsstrategie *in vivo* lag.

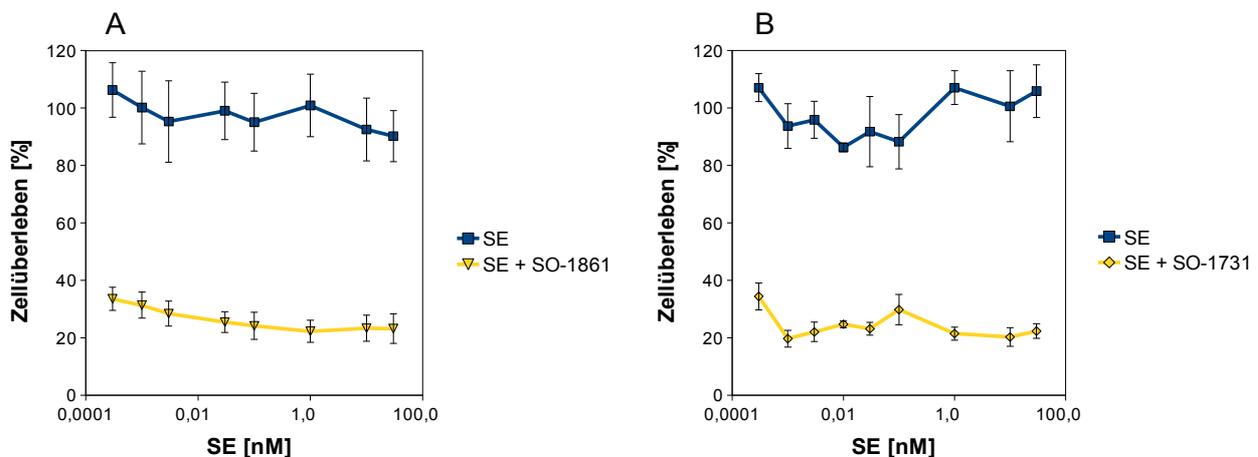


Abbildung 9: Zytotoxizität des zielgerichteten Toxins SE allein und in Kombination mit den Reinsaponinen SO-1861 (A) und SO-1731 (B) auf TSA-EGFR-Zellen. Die ausgesäte Zellzahl betrug 2000 und die Toxinkonzentrationen 0,0003–30 nM. Das jeweilige Saponin wurde in der Konzentration 2 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, die sich zuvor als eindeutig untoxisch für die Zellen erwiesen hatte. Die Zellen wurden 48 h mit SE oder SE / Reinsaponin inkubiert. Dann wurde der Anteil überlebender Zellen in Bezug zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Assay (s. 2.4.3) ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen in Vierfachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

3.2.2 Echtzeit-Experimente

Im *Adcon Reader* (s. 2.4.4) wurden auf einer speziellen mit Goldfilmelektroden versehenen 96-Well-Platte verschiedene Zellaassays durchgeführt, um Kinetik von Zellproliferation und Zelltod erstmalig in Echtzeit zu untersuchen. Der kontinuierlich über einen Zeitraum von je nach Experiment 26–144 h gemessene Wechselstromwiderstand (Impedanz) korreliert mit der Zellvitalität.

Um die richtige Zellzahl für den Zytotoxizitätsassay zu bestimmen, wurden zunächst verschiedene Zellzahlen ausgesät und deren Proliferationsverhalten miteinander verglichen. Abbildung 10 zeigt die standardisierte Impedanz in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium der Zellen durch neues ersetzt und hierzu die Messung pausiert, was sich auf der Abbildung in Form eines Peaks zeigt. Der Medienwechsel wurde durchgeführt, um die gleichen Grundbedingungen wie für den bevorstehenden Zytotoxizitätsassays herzustellen, bei dem ebenfalls nach 24 Stunden das alte Nährmedium gegen neues mit den entsprechenden Substanzen ausgetauscht werden sollte (vgl. Abb. 12).

Bei einer Ausgangskonzentration von 4000 Zellen/*Well* zeigte sich die Impedanz und somit die Zellzahl nach zunächst kontinuierlicher Proliferation- bis zu 140 Stunden nach Experimentbeginn stabil, wohingegen höhere Ausgangskonzentrationen bereits nach 80 Stunden zu Impedanzabnahme und somit beginnendem Zelltod führten. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden 4000 Zellen/*Well* als Ausgangskonzentration für Zytotoxizitätsassays für die Impedanzmessung ausgewählt.

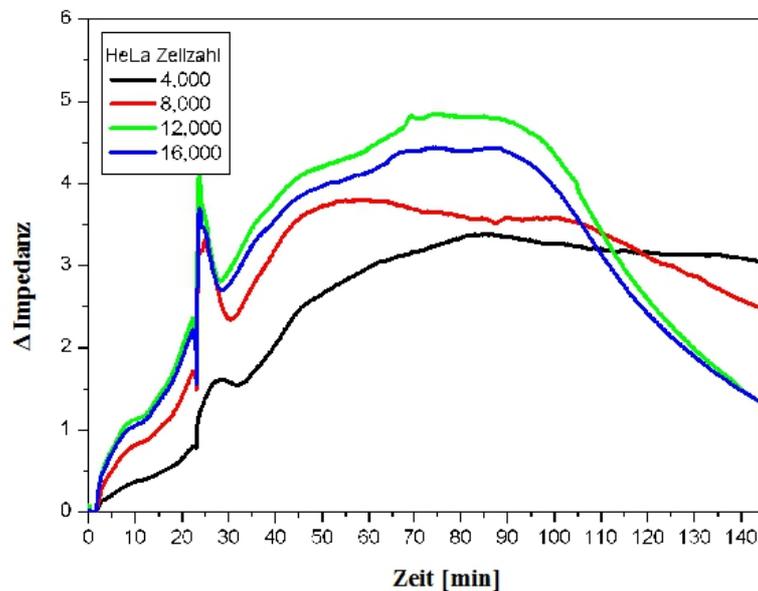


Abbildung 10: Proliferationsprofil verschiedener HeLa-Zellzahlen. Ausgesät wurden 4000, 8000, 12000 und 16000 Zellen. Es erfolgte eine Impedanzmessung mithilfe des Adcon Readers (s. 2.4.4). Vor Zugabe der Zellen wurde das System adjustiert und die Impedanz gleich Null gesetzt. Die Impedanz wurde kontinuierlich über 144 h aufgezeichnet. Die dargestellten Kurven ergeben sich aus Mittelwerten von Vierfachbestimmungen.

Um Auskunft über die Eigentoxizität von SO-1861 in Echtzeit zu erhalten, wurden ECV304-Zellen mit diesem Saponin in den Konzentrationen 1, 2, 3, 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert (Abb. 11). Als Positivkontrolle diente Digitonin – von dem bekannt ist, dass es die Permeabilisierung von Zellmembranen bewirkt – in der Konzentration 40 $\mu\text{g/ml}$. Da die meisten Experimente zum Wirkmechanismus von Saponinen in unserer Arbeitsgruppe mit ECV304-Zellen durchgeführt wurden (vgl. [30, 31, 64]), wurde diese Zelllinie auch für dieses Experiment ausgewählt. Der Effekt der verschiedenen Konzentrationen von SO-1861 sowie von Digitonin auf die Zellen ist Abbildung 11 zu entnehmen. In den beschriebenen Konzentrationen zeigte SO-1861 keinen toxischen Effekt auf die Zellen, was sich in einer unveränderten Zunahme der Impedanz äußert. Das membranpermeabilisierende Saponin Digitonin hingegen führte in der eingesetzten Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ zu einer drastischen Impedanzabnahme.

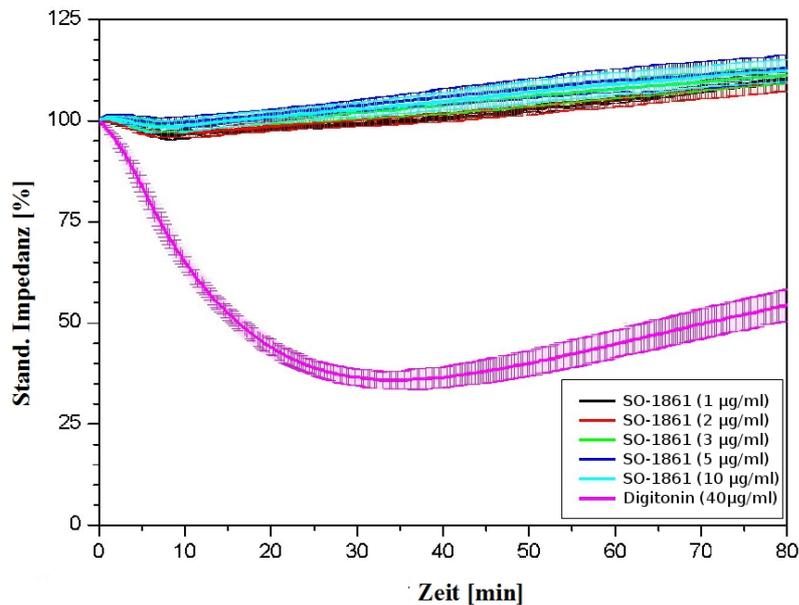


Abbildung 11: Effekt von SO-1861 in den Konzentrationen 1, 2, 3, 5 und 10 µg/ml auf ECV-304 Zellen. Die ausgesäte Zellzahl betrug 4000. SO-1861 sowie Digitonin wurden nach 24stündiger Zellproliferation zugegeben. Zeitpunkt Null ist der Zeitpunkt, an dem die Komponenten zugegeben wurden. Es erfolgte eine kontinuierliche Impedanzmessung mithilfe des Adcon Readers (s. 2.4.4) über einen Zeitraum von 80 min. Die dargestellten Kurven ergeben sich aus Mittelwerten von Vierfachbestimmungen sowie den zugehörigen Standardabweichungen.

Des Weiteren wurde ein Zytotoxizitätsassay (s. 2.4.2) mit SO-1861 und SE an HeLa-Zellen durchgeführt, um den Effekt der Kombinationstherapie in Echtzeit zu verfolgen. Hierbei wurde SO-1861 in der Konzentration 2 µg/ml eingesetzt, bei der das Saponin allein keinen Effekt auf die Zellen hat (vgl. Abb. 11). SE wurde allein und in der Kombination mit SO-1861 in den Konzentrationen 0,003, 0,03 und 3 nM getestet. Abbildung 12 zeigt die standardisierte Impedanz in Abhängigkeit von der Zeit. 100 % ist hierbei der Impedanzwert vor Zugabe der Substanzen. SE allein zeigte in den drei eingesetzten Konzentration keinen von der Kontrolle abweichenden Effekt auf die Zellen. Hier kam es zunächst zu einer Impedanzzunahme und dann zu gleichbleibender Impedanz bis zu 120 h nach Substanzzugabe. Die Kombination aus 3 nM SE und SO-1861 zeigte sich sehr toxisch und führte zu einer schnellen und drastischen Impedanzabnahme, die bereits nach 12 h weniger als 20 % betrug. Die Kombinationen aus 0,03 und 0,003 nM mit SO-1861 führten zu allmählicher Impedanzabnahme innerhalb von 120 h.

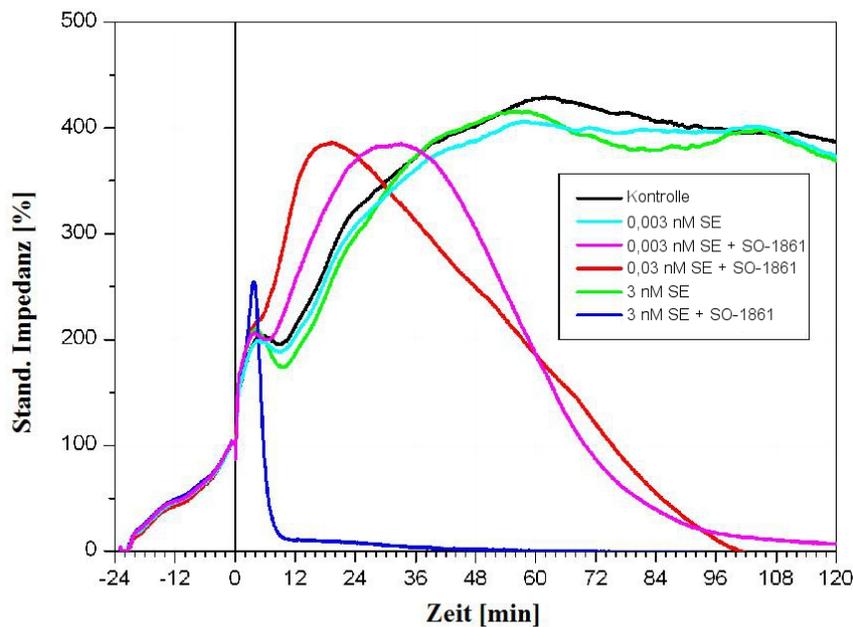


Abbildung 12: Effekt des chimären Toxins SE und des Saponins SO-1861 (Sap) auf HeLa Zellen (4000/well). Es wurden anfänglich 4000 Zellen ausgesät und es erfolgte eine Impedanzmessung mithilfe des Adcon Readers (s. 2.4.4). Zeitpunkt 0 h definiert den Zeitpunkt, an dem die Komponenten zugegeben wurden. SE wurde in den aufgeführten Konzentrationen allein und in Kombination mit SO-1861 (2 µg/ml) getestet. Die Impedanz wurde kontinuierlich über 144 h aufgezeichnet. Die dargestellten Kurven ergeben sich aus Mittelwerten von Vierfachbestimmungen.

Ein interessanter aus Abbildung 12 zu entnehmender Effekt ist die anfängliche Impedanzzunahme nach Zugabe von Toxin und Saponin. Dies könnte sowohl morphologische Veränderung als auch zeitweilige Proliferationsszunahme der Zellen bedeuten (eine Diskussion darüber ist in Abschnitt 4.5 zu finden). Um eine mögliche Proliferationsszunahme festzustellen, wurde nach den Echtzeitmessungen eine Messreihe mit MTT-Endpunkt-Assays (s. 2.4.3) durchgeführt, bei der HeLa-Zellen in sechs 96-Well-Platten mit SE und SO-1861 behandelt wurden. Nach 6, 12, 48, 60, 72 und 96 h wurde mit jeweils einer Platte der MTT-Assay durchgeführt. Abbildung 13 zeigt den Effekt von SE in den Konzentrationen 0,03, 0,003 und 0,0003 nM in Kombination mit SO-1861 zu den beschriebenen Zeitpunkten. Bereits innerhalb der ersten 6 h kam es bei allen drei gewählten SE-Konzentrationen in der Kombinationstherapie zur Reduktion der Zellzahl um > 10 %. Die etwas höhere Effektivität der Therapie im Vergleich zur Echtzeitmessung erklärt sich durch die Verwendung eines anderen, frisch hergestellten SE. Die gemessene Abnahme der

Zellzahl bereits in den ersten 6–12 h im MTT-Assay legt nahe, dass die Zunahme der Impedanz auch bei der Echtzeitmessung nicht auf Zellproliferation zurückzuführen ist.

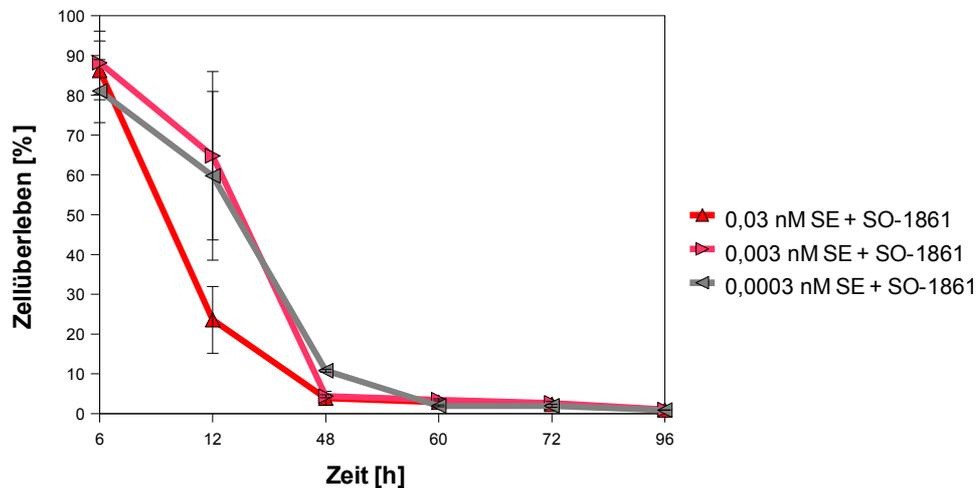


Abbildung 13: Effekt der Kombinationstherapie aus SE und SO-1861 auf HeLa Zellen bestimmt durch MTT-Endpunkt-Assays. Zu jedem Zeitpunkt wurde ein MTT-Assay mit einer anderen Mikroplatte durchgeführt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus einer Vierfachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert.

3.3 Hämolyseaktivitätsbestimmung von SO-1861 und SO-1731 *ex vivo*

Die Hämolyseaktivität der Reinsaponine SO-1861 und SO-1731 wurde mit derjenigen des Saponingemischs SA in einem selbst etablierten Hämolyseassay (s. 2.6.1) verglichen. Humane 4%ige Erythrozytenlösung wurde hierbei jeweils 30 min mit einer der drei Substanzen inkubiert. Da die Saponine für den Einsatz im Tierversuch eingewogen werden, wurden hier die gleichen Saponinmassen verglichen. Eingesetzt wurden sechs verschiedene Konzentrationen von 3,91 µg/ml–125 µg/ml. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt. Die drei Saponine weisen, wie insbesondere sehr gut aus Abbildung 14 zu entnehmen ist, ein vergleichbares Hämolyseprofil auf. Bei allen drei Saponinen tritt Hämolyse bei einer Konzentration zwischen 7,81 und 15,63 µg/ml ein: Während nach Inkubation mit 7,81 µg/ml noch keine Hämolyse stattgefunden hatte, waren durch eine Konzentration von 15,63 µg/ml bereits 32 % der Erythrozyten im Falle von SO-1731 und 64 bzw. 74 % im Falle von SA und SO-1861 lysiert worden. SO-1731 wirkte geringfügig weniger hämolytisch als SA: Bei einer Konzentration von 31,25 µg/ml von sowohl SA als auch SO-1861 war bereits nahezu 100%ige Lyse eingetreten, wohingegen SO-1731 in derselben Konzentration lediglich bei ca. 70 % der Erythrozyten zur Lyse führte. Zu

beachten ist im letzten Fall jedoch die hohe Standardabweichung von 17 % (Abb. 15), die zeigt, dass auch SO-1731 in einigen Vertiefungen bei dieser Konzentration bereits fast 100%ige Hämolyse auslöste.

Im In-vivo-Versuch konnten aufgrund des vergleichbaren Hämolyseprofils unter dem Aspekt der Hämolyse die gleichen Konzentrationen an Reinsaponinen eingesetzt werden wie die des bewährten Saponingemischs SA.

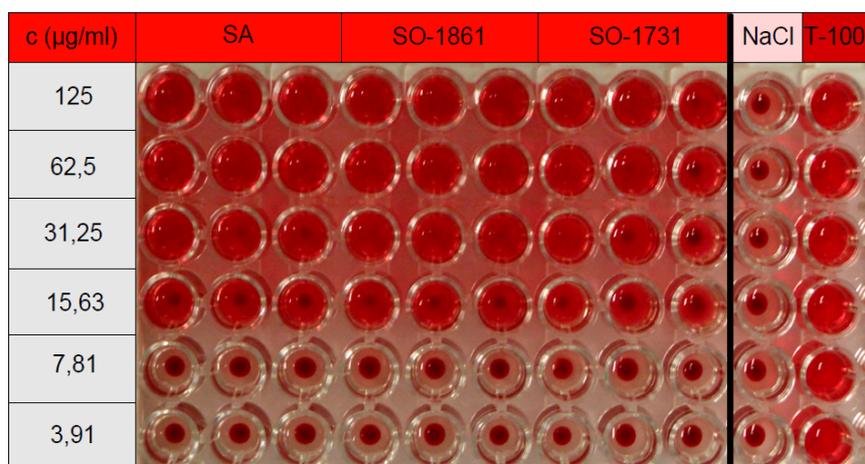


Abbildung 14: Hämolysewirkung des Saponingemischs SA und der Reinsaponine SO-1861 und SO-1731 im Vergleich. Als Positivkontrolle diente 0,1%iges Triton X-100 (T-100), als Negativkontrolle isotonische Natriumchloridlösung (NaCl). Die Saponine wurden mit einer 4 %igen Erythrozytenlösung 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Abbildung zeigt die Mikroplatte nach Inkubation und Zentrifugation. Bei intakten Erythrozyten ist der Überstand klar und die Erythrozyten sind als Pellet am Boden der Wells zu sehen.

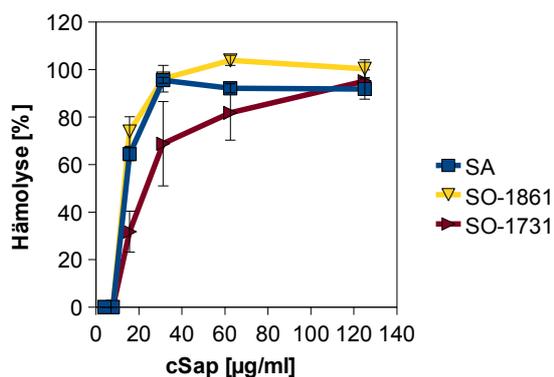


Abbildung 15: relative Hämolysewirkung des Saponingemischs SA und der Reinsaponine SO-1861 und SO-1731. Der Überstand des Hämolyseassays nach Zentrifugation (Abb. 14) wurde in eine zweite Mikroplatte überführt, 5fach verdünnt und die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Absorption der Positivkontrolle (0,1 %iges Triton X-100) wurde definiert als 100 %.

3.4 *In-vivo*-Experimente

3.4.1 Akuttoxizität der Reinsaponine

3.4.1.1 Akuttoxizität von SO-1861

Vor dem Einsatz von SO-1861 in der Kombinationstherapie wurde dessen Akuttoxizität *in vivo* getestet. Gruppen von je 3 Balb/c Mäusen wurden die Mengen 15, 30, 60, 100 und 200 µg des Saponins in je 100 µl PBS injiziert (s. 2.7.1). Das Kontrollblut wurde zwei Mäusen vor der ersten Saponininjektion entnommen. Die übrigen Blutentnahmen erfolgten nach dem in Tabelle 8 gezeigten Schema. Die Saponindosierungen richten sich nach Erfahrungswerten mit SA [22], da SO-1861 sowohl beim Zytotoxizitätsassay (s. 2.4.2) als auch im Hämolyseassay (2.6.1) ein vergleichbares Wirkprofil aufwies wie das Gemisch, und wurden zweimalig, an Tag 1 und Tag 14, verabreicht. Die Versuchsdauer betrug 28 Tage.

Die Dosis von 200 µg Saponin (ca. 10 mg/kg KG) war letal. Zwei der drei Mäuse starben bereits innerhalb der ersten 18 Stunden, eine von ihnen unmittelbar nach der Blutentnahme. Die aus ihrem Blutplasma bestimmten Werte der Transaminasen AST und ALT waren sehr stark erhöht und sind zwecks besserer Darstellung gesondert aufgeführt (Tab. 7). Der Wert für die GLDH, die ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert ist und erst bei vollständiger Zellzerstörung ins Blut gelangt, war ebenfalls sehr stark erhöht (Tab. 7). Somit war von einem tiefgreifenden Leberzellschaden auszugehen. Dieses Ergebnis konnte auch bei der histologischen Auswertung der Leber bestätigt werden. Die dritte Maus musste aufgrund zu hohen beobachteten Leidensdrucks nach 48 Stunden aus dem Versuch genommen und euthanasiert werden. Zeitgleich mit dem Auftreten starker Toxizitätssymptome (struppiges Fell, Stopp der Nahrungsaufnahme, Apathie) wies der bei diesen drei Versuchstieren gewonnene Urin eine leicht rotbräunliche Farbe auf und mittels Urinteststreifen konnte freies Hämoglobin –entsprechend einem Hämoglobingehalt aus mehr als 5–10 Erythrozyten/µl– im Urin nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Enzymwerte 16 h nach Applikation von 200 µg SO-1861, zum Vergleich Werte der unbehandelten Maus.

Enzym	SO-1861 c [U/l]	unbehandelt c [U/l]
AST	3586,6	73,5
ALT	2287,8	39,2
GLDH	790,2	13,4

Die Mäuse, die die übrigen Saponindosen (15, 30, 60 und 100 µg) erhalten hatten, zeigten sich klinisch völlig unauffällig. Wie Abbildung 18 zu entnehmen ist, wurden Saponinmengen bis zu 100 µg (ca. 5 mg/kg KG) gut toleriert. Im Versuchsverlauf zeigten sich insbesondere bei den höheren Dosierungen von 60 oder 100 µg moderate Erhöhungen der Werte für AST, ALT und GLDH, die sich bei Versuchsende dann aber wieder normalisiert hatten. Kreatinin wies während des gesamten Versuchsverlaufs in allen Fällen unauffällige Plasmakonzentrationen auf (Abb. 18D), so dass von einer normalen Filtrationsleistung der Niere auszugehen ist.

Tabelle 8: Blutentnahmeschema. Die Blutentnahmen erfolgten wöchentlich und zwar alternierend, da der einzelnen Maus entsprechend der Tierschutzbedingungen eine Erholungszeit von 14 Tagen gewährt werden musste. Die Entnahme erfolgte für die Saponindosierungen 15 µg, 30 µg, 60 µg und 100 µg nach dem gleichen Schema. Die Blutentnahmen sind durchnummeriert und rot hinterlegt.

	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4
Maus 1	1		4	
Maus 2		2		5
Maus 3		3		6

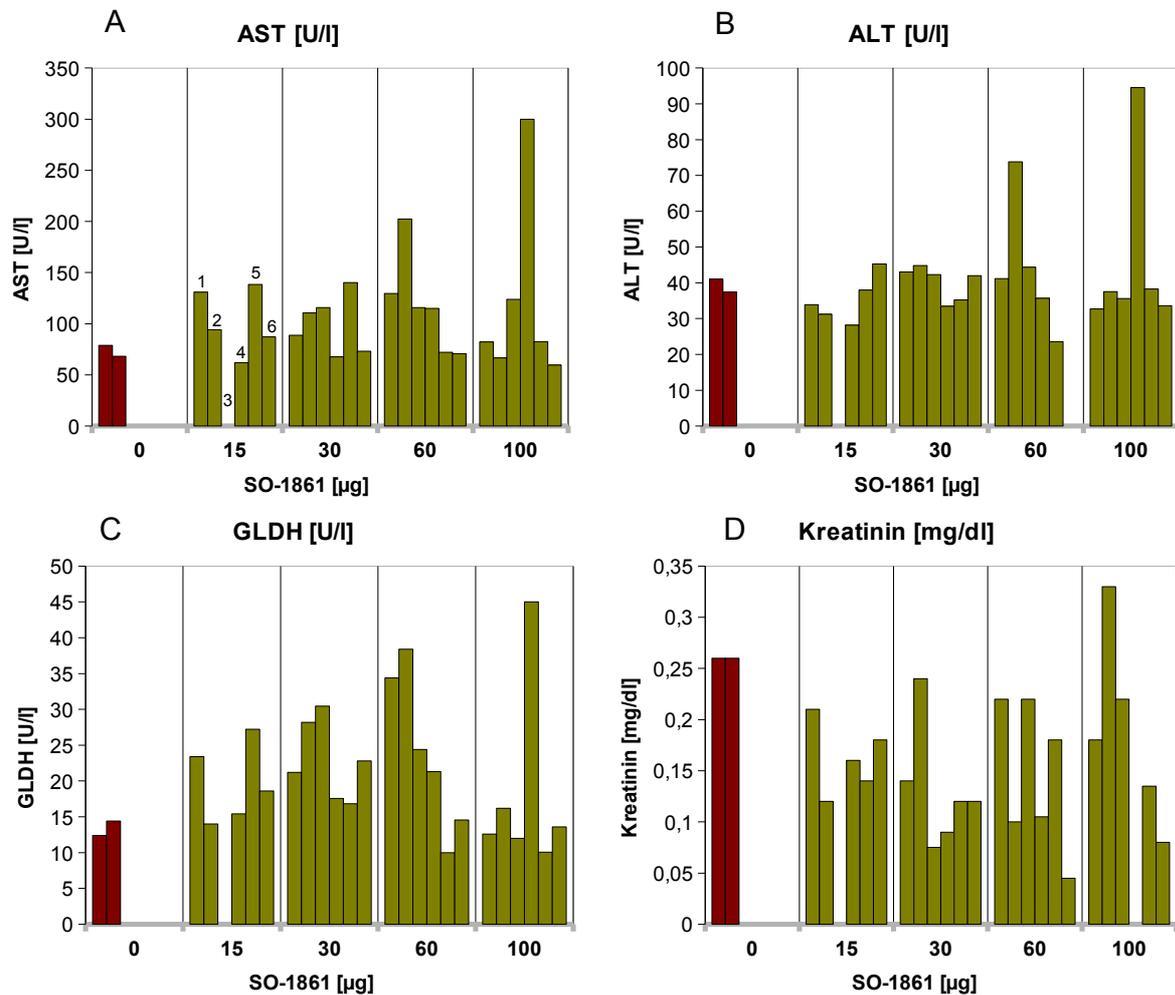


Abbildung 16: Plasmaaktivitäten von AST (A), ALT (B), GLDH (C) sowie die Plasmakonzentration von Kreatinin (D) nach Gabe des Reinsaponins SO-1861. Die Blutentnahme erfolgte wöchentlich und zwar alternierend gemäß obigem Schema (s.Tab. 8). Jeder Balken repräsentiert eine Blutprobe; die Zuordnung zum Entnahmeschema ist bei allen Grafiken gleich und für 15 µg SO-1861 bei AST exemplarisch dargestellt. Fehlende Balken zeigen an, dass diese Proben nicht ausgewertet werden konnten, z. B. aufgrund zu geringer Blutmenge. Die hohen Enzymaktivitäten, die nach Gabe von 200 µg SO-1861 gemessen werden konnten, sind in Tab. 7 gesondert aufgeführt.

Die histologische Auswertung der Paraffinschnitte der Leber erfolgte in Kooperation mit Herrn Professor Dürkop aus dem Pathologiezentrum „Pathodiagnostik Berlin“. Das beurteilte Leberparenchym wurde vier verschiedenen Graden zugeordnet (Tab. 6, Seite 39). Abbildung 17 zeigt HE-gefärbte Schnitte des Leberparenchyms ausgewählter Beispiele, die diesen vier Graden entsprechen. Die genaue Zuordnung der jeweiligen Saponindosis zum Grad der Parenchymschädigung ist Tabelle 9 zu entnehmen. Bei den Dosen 15 und 30 µg zeigte sich in zwei Fällen normales Leberparenchym ohne Veränderung (vgl. Abb. 17A), bei Dosen bis 100 µg zeigten sich

geringe toxische Veränderungen mit Einzelzellnekrosen (vgl. Abb. 17B). Lediglich bei einer Maus, die 100 µg Saponin erhalten hatte, waren mäßige toxische Veränderungen in Form von kleineren Gruppennekrosen zu finden (vgl. Abb. 17C). Die Dosis von 200 µg führte in einem Fall zu starker Nekrose bis hin zu Totalnekrose der Leber. Das histologische Bild zeigte hier eine völlig zerstörte Leberarchitektur mit zahlreichen Nekrosen und Einblutungen (vgl. Abb. 17D).

Tabelle 9: Anzahl der Mäuse mit einem bestimmten Schädigungsgrad des Leberparenchyms in Abhängigkeit der verabreichten Dosis SO-1861 (Vgl. Tab 6 im Methodenteil).

Schädigungsgrad	c[SO-1861]				
	200 µg	100 µg	60 µg	30 µg	15 µg
0	0	0	0	1	1
1	1	2	3	2	2
2	1	1	0	0	0
3	1	0	0	0	0

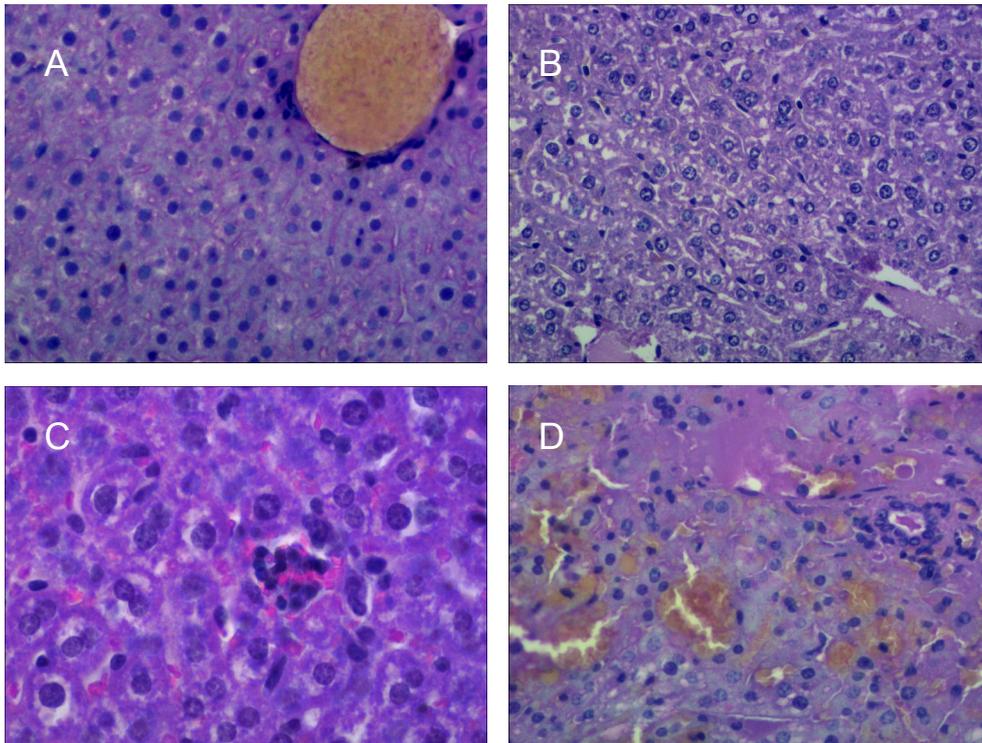


Abbildung 17: Histologie der Leber der BALB/c Mäuse nach zweifacher s.c. Applikation von Reinsaponin. Gezeigt sind HE-gefärbte Schnitte, die vier verschiedenen Graden akut toxischer Leberparenchymschädigung zuzuordnen sind (vgl. Tab. 6, S. 39). A zeigt normales Leberparenchym ohne Veränderung mit quer angeschnittener intakter Zentralvene. B zeigt leichte toxische Veränderungen mit Einzelzellnekrosen und vereinzelter Doppelkernigkeit von Hepatozyten. Auf Abbildung C ist zentral eine Gruppenzellnekrose zu sehen, die bei mäßigem toxischen Leberschädigung auftritt. D zeigt eine stark zerstörte Leberarchitektur mit großflächigen Nekrosen und Einblutungen, was einer akuten hochtoxischen Leberschädigung entspricht.

3.4.1.2 Akuttoxizität von SO-1731

Analog zu SO-1861 wurde auch die Akuttoxizität von SO-1731 getestet, bevor das Saponin *in vivo* in der Kombinationstherapie eingesetzt wurde. Die Saponindosierungen richteten sich hier nach den Erfahrungswerten aus der Toxizitätsstudie mit Saponin SO-1861, aus der auch die Kontrollwerte stammen (s. 3.4.1.1). Gruppen von je 3 BALB/c Mäusen wurden die Mengen 15, 30, 60, 100 und 150 µg von SO-1731 in je 100 µl PBS injiziert. Das Saponin wurde während einer Versuchsdauer von 28 Tagen zweimalig, an Tag 1 und an Tag 14, verabreicht (s. 2.7.1).

Die Höchstdosis von 150 µg (ca. 7,5 mg/kg KG) SO-1731 war letal. Eine der drei Mäuse starb bereits innerhalb der ersten 24 Stunden. Die beiden anderen überlebten weitere 48 Stunden. Es konnte in beiden Fällen ein Gewichtsverlust von mehr als 10 % verzeichnet werden. Laborpa-

parameter wurden bei diesen Mäusen nicht bestimmt, um ihr Überleben durch den Blutverlust nicht zu gefährden. Der gewonnene Urin wies wie auch bei der letalen Dosis von SO-1861 eine leicht rotbräunliche Färbung auf und im Urinschnelltest konnte freies Hämoglobin aus mehr als 5–10 Erythrozyten/ μl nachgewiesen werden (vgl. 3.4.1.1). Die Mäuse, die die übrigen Saponinkonzentrationen erhalten hatten, waren klinisch während des gesamten Versuchsverlaufs unauffällig. Wie Abbildung 19 zu entnehmen ist, wurden Saponinmengen bis zu 100 μg (ca. 5 mg/kg KG) gut toleriert. Wie auch nach Gabe von SO-1861 (vgl. 3.4.1.1) zeigten sich im Versuchsverlauf insbesondere bei den höheren Saponinmengen von 60 und 100 μg moderate Erhöhungen der Werte für AST, ALT und GLDH, die sich bei Versuchende wieder normalisiert hatten. Kreatinin wies durchweg unauffällige Plasmakonzentrationen auf (Abb. 19D), so dass wie auch bei SO-1861 von einer normalen Filtrationsleistung der Niere auszugehen ist.

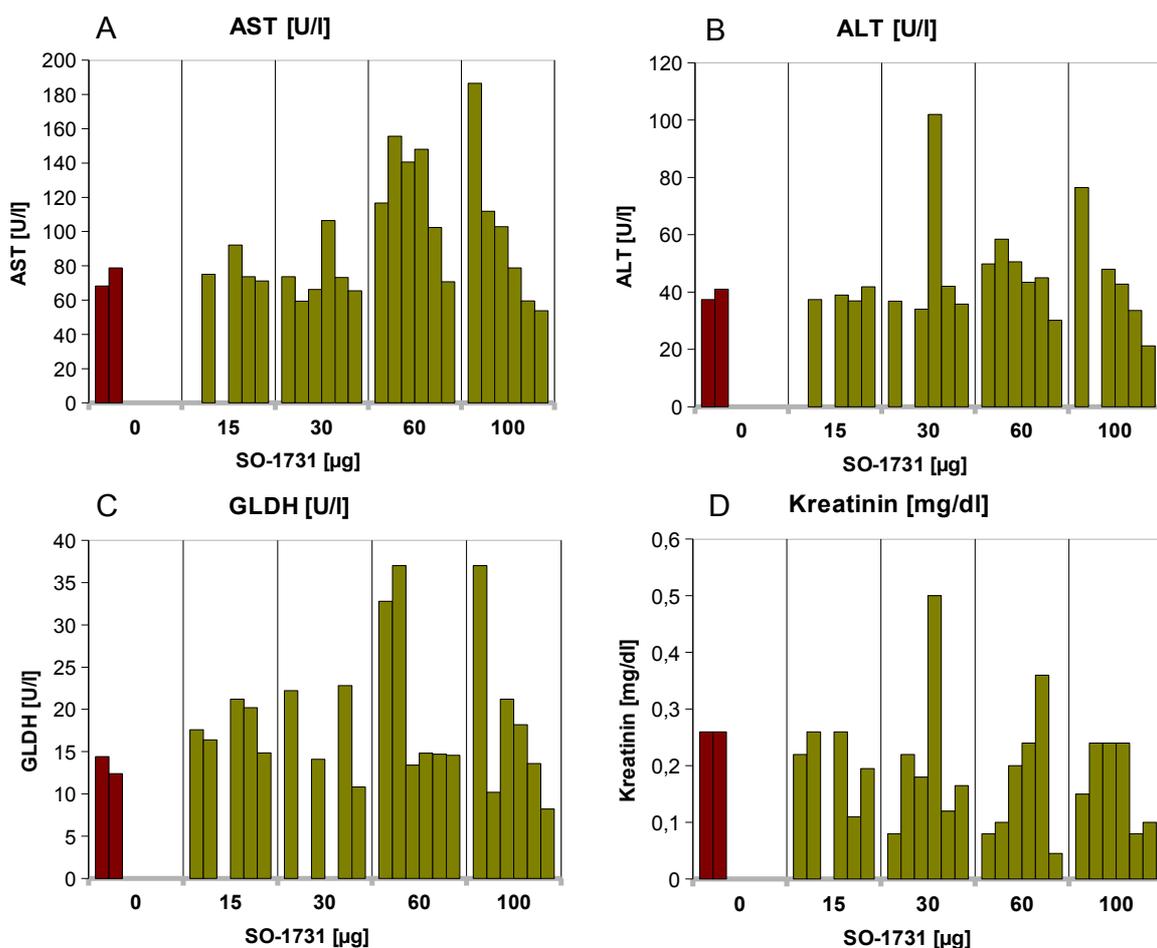


Abbildung 18: Plasmaaktivitäten von AST (A), ALT (B), GLDH (C) sowie die Plasmakonzentration von Kreatinin (D) wie auf Abb. 16, jedoch nach Gabe des Reinsaponins SO-1731 statt SO-1861.

Die histologische Auswertung der Paraffinschnitte der Leber erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1.1 beschrieben. Der jeweilige Grad der Leberparenchymschädigung der einzelnen Mäuse ist in Tabelle 10 aufgeführt. Die letale Dosis von 150 µg führte in zwei Fällen zu starker Nekrose bis hin zur Totalnekrose der Leber (vgl. Abb. 17C). Bei den übrigen Konzentrationen zeigten sich leichte bis mäßige toxische Veränderungen mit teils kleinen Gruppenzellnekrosen. Im Unterschied zu den histologischen Ergebnissen nach Gabe des Reinsaponins SO-1861 traten hier bereits bei den geringen Saponindosen 15 und 30 µg Gruppenzellnekrosen auf. SO-1731 zeigte sich in Zusammenschau mit dem Hämolyseassay (Abb. 15, S. 49) demnach geringgradig weniger hämolytisch und etwas stärker hepatotoxisch als SO-1861.

Tabelle 10: Anzahl der Mäuse mit einem bestimmten Schädigungsgrad des Leberparenchyms in Abhängigkeit der verabreichten Dosis von SO-1731 (vgl. Tab 6, S. 39, im Methodenteil)

Schädigungsgrad	c[SO-1731]				
	150 µg	100 µg	60 µg	30 µg	15µg
0	0	0	0	0	0
1	0	2	0	2	1
2	1	1	3	1	2
3	2	0	0	0	0

3.4.1.3 Überlebenszeitanalysen SO-1861 und SO-1731 nach Kaplan-Meier

Die Überlebenswahrscheinlichkeit für die verschiedenen Dosierungen der Reinsaponine wurde nach Kaplan-Meier ermittelt. Die zugehörigen Grafiken (Abb. 11A und 11B) machen noch einmal deutlich, dass lediglich die eingesetzten Höchstdosen von sowohl SO-1861 (200 µg) als auch SO-1731 (150 µg) letal waren. Hier ist die Überlebenswahrscheinlichkeit nach 4 Tagen bereits gleich null, wohingegen sie bei den übrigen Konzentrationen bis Tag 28, d. h. Versuchsende, bei 1 – also 100 % – liegt.

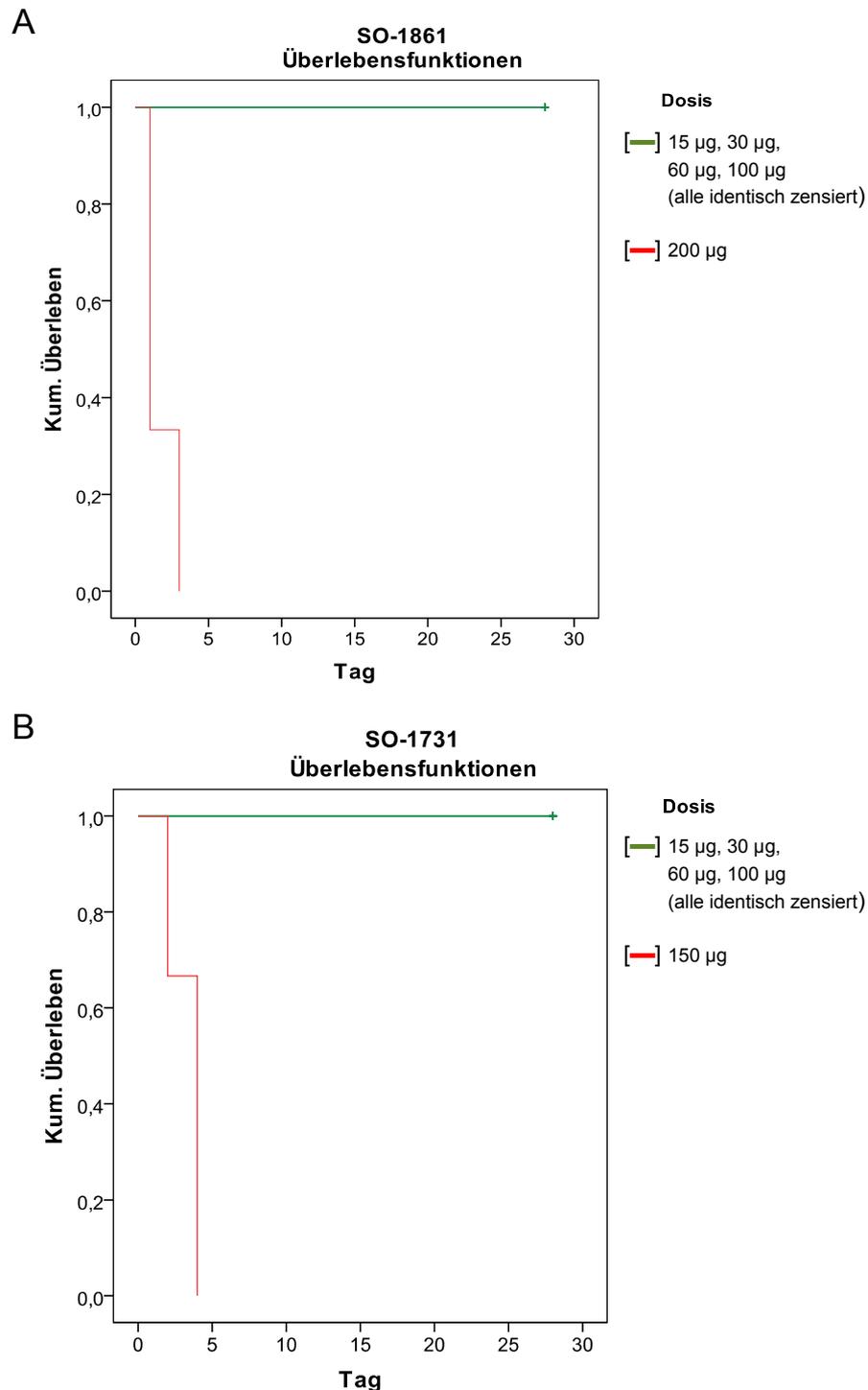


Abbildung 19: Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier nach Applikation des Reinsaponins SO-1861 (A) und SO-1731 (B) an Tag 0 und Tag 15. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit für eine Maus, die die jeweils aufgeführte Dosierung des Reinsaponins erhalten hat, zum gegebenen Zeitpunkt. Die Funktion der Höchstdosis ist jeweils rot dargestellt. Die Überlebensfunktionen aller übrigen Konzentrationen sind grün und identisch. An Tag 28 wurden die Daten der Konzentrationen 15–100 µg zensiert, da der Versuch hier beendet und der Tod der Mäuse künstlich herbeigeführt wurde.

3.4.2 Kombinationstherapie aus Reinsaponinen und SE im syngenem Tumormodell

Die Kombinationstherapie der beiden Reinsaponine mit dem zielgerichteten Toxin SE wurde auf der Basis der vorangehenden Ergebnisse durchgeführt. Hierzu zählen die Eigentoxizitätsexperimente mit SO-1861 (s. 3.4.1.1) und SO-1731 (s. 3.4.1.2) *in vivo* sowie deren nachgewiesener Verstärkereffekt auf SE *in vitro* (s. 3.2.1). In der Kombinationstherapie wurde der Effekt des jeweiligen Reinsaponins mit SE auf TSA-EGFR Tumoren von BALB/c Mäusen untersucht.

Die Dosis des Toxins SE sowie die Dosierung der Saponine richtete sich nach bereits durchgeführten *In-vivo*-Studien von Bachran et al. mit dem Saponingemisch SA [22]. Es wurden jeweils 30 µg Saponin und 0,1 µg SE s.c. verabreicht (s. 2.7.2). Da sich SO-1731 in der Zellkultur bei der histologischen Auswertung der Leber etwas toxischer zeigte als SO-1861 (Tab. 10), wurden hier parallel die Saponinmengen 15 und 30 µg mit 0,1 µg SE kombiniert, um zu prüfen, ob auch die geringere Menge für eine Therapie ausreicht.

Nach 28 Tagen und insgesamt 8 Therapieeinheiten im Abstand von abwechselnd 3 und 4 Tagen wurde der Versuch beendet und Gewicht und Größe der präparierten Tumoren von Therapie- und Kontrollgruppen verglichen. Als Kontrollgruppe werden hier Mäuse bezeichnet, die statt der Kombinationstherapie aus Saponin und SE lediglich PBS erhielten.

3.4.2.1 Effekt der Tumorthherapie aus SO-1861 und SE

Die Ergebnisse für die Kombinationstherapie aus SO-1861 und SE sind in Abbildung 20 dargestellt. Wie dieser zu entnehmen ist, erwies sich die Therapie als sehr effektiv. 6 von 10 Mäusen der Therapiegruppe wiesen makroskopisch eine komplette Tumorremission auf und lediglich eine Maus hatte einen Tumor, der schwerer als 300 mg war. In der Kontrollgruppe hingegen wies lediglich eine von acht Mäusen eine komplette makroskopische Remission auf und fünf Mäuse zeigten Tumoren, die schwerer als 300 mg waren. Eine mittlere Tumorgöße von 142 mm³ in der Therapiegruppe stand einer von 761 mm³ in der Kontrollgruppe gegenüber. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant ($p \leq 0,022$). Bei der histologischen Auswertung der Leber durch den Pathologen Herrn Professor Dürkop konnten keine Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollmäusen festgestellt werden.

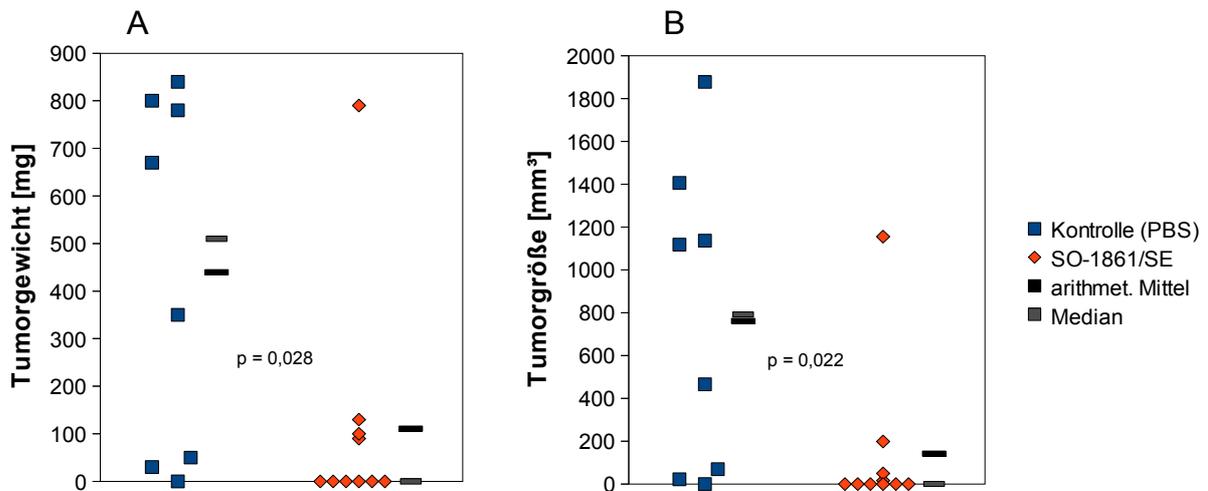


Abbildung 20: Gewicht (A) und Größe (B) syngener TSA-EGFR-Tumoren von BALB/c Mäusen nach Behandlung mit SO-1861/SE. Die Versuchsdauer betrug 28 Tage und es wurde 8 × (alternierend alle drei und vier Tage) mit einer Kombinationstherapie aus 30 µg SO-1861 und 0,1 µg SE behandelt. Die Kontrollmäuse erhielten lediglich PBS. Neben der jeweiligen Datenreihe sind der zugehörige Median und Mittelwert dargestellt. Die Tumormenge wurde mit der Formel $(\pi/6) \times (\text{Länge} \times \text{Breite})^{1,5}$ (s. 2.7.2) berechnet.

3.4.2.2 Effekt der Tumorthherapie aus SO-1731 und SE

Die Ergebnisse für die Kombinationstherapie aus SO-1731 und SE sind in Abbildung 21 dargestellt. Wie der Abbildung zu entnehmen ist zeigte sich die Kombinationstherapie mit beiden Saponindosierungen (15 und 30 µg) hochgradig effektiv. Bei allen therapierten Mäusen kam es zur kompletten makroskopischen Remission des Tumors, wohingegen die Kontrollmäuse in sieben von acht Fällen einen Tumor aufwiesen. Das mittlere Tumorgewicht betrug hierbei 440 mg und die mittlere Tumormenge 762 mm³. Vier der acht Kontrollmäuse wiesen sogar einen Tumor auf, der schwerer als 600 mg und größer als 1000 mm³ war. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant ($p = 0,007$). Bei der Präparation der Mäuse konnte beobachtet werden, dass diejenigen, die 15 µg Saponin erhalten hatten, an der Stelle, an der ursprünglich der Tumor lokalisiert war, einen Strang rötlichen, weichen Gewebes aufwiesen. Bei den Mäusen, die 30 µg Saponin erhalten hatten, unterschied sich diese Stelle nicht von der umgebenden Subkutis.

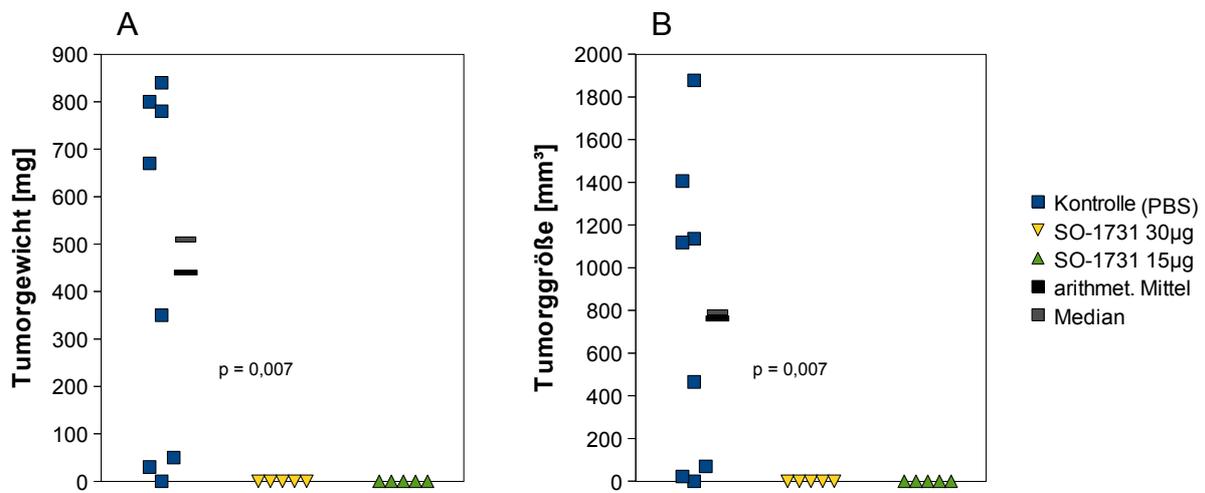


Abbildung 21: Gewicht (A) und Größe (B) syngener TSA-EGFR-Tumoren von BALB/c Mäusen nach Behandlung mit SO-1731/SE. Die Versuchsdauer betrug 28 Tage und es wurde 8 × (alternierend alle drei und vier Tage) mit einer Kombinationstherapie aus SO-1731 und 0,1 µg SE behandelt. Fünf Mäusen wurden bei jeder Therapieeinheit 30 µg Saponin und weiteren fünf Mäusen 15 µg Saponin appliziert. Die Kontrollmäuse erhielten lediglich PBS. Neben der Datenreihe der PBS-behandelten Kontrolle sind der zugehörige Median und Mittelwert dargestellt. Die Tumorgroße wurde mit der Formel $(\pi/6) \times (\text{Länge} \times \text{Breite})^{1,5}$ (s. 2.7.2) berechnet.

3.4.3 Etablierung eines geeigneten Xenotransplantatmodells

Wie in der Zielsetzung detailliert dargelegt (s. 1.4) ist es im Hinblick auf eine klinische Studie notwendig, die Übertragbarkeit des im syngenem Mausmodell erzielten Therapieerfolgs auf humane Tumoren zu zeigen. Hierzu wurde ein geeignetes Xenotransplantatmodell mit athymischen CD1 nu/nu Mäusen etabliert: Die drei humanen Zervixkarzinomzelllinien CaSki, SiHa und HeLa, die durch Überexpression des EGFR prinzipiell unserer zielgerichteten Therapie zugänglich sind [62] wurden parallel je einer Gruppe von drei Mäusen injiziert (s. 2.7.3) und das Wachstum verglichen.

Das Tumorwachstum für SiHa und HeLa-Zellen ist in Abbildung 22 dargestellt. CaSki-Zellen wuchsen erst gar nicht an. SiHa Zellen formten nach fünf bis sechs Tagen in allen drei Mäusen solide stecknadelkopfgröße Tumoren, die weitere zwei bis vier Tage deutlich wuchsen, jedoch dann wieder an Größe abnahmen, bis an Tag 29 schließlich kein Tumor mehr getastet werden konnte. Im Falle der HeLa Zellen waren bereits an Tag drei oder vier solide stecknadelkopfgröße Tumore zu tasten. Diese zeichneten sich im weiteren Verlauf durch ein kontinuierliches Wachs-

tum bis zu Tag 30 aus. Die Tumore waren gut verschieblich und die Mäuse zeigten sich klinisch völlig unauffällig.

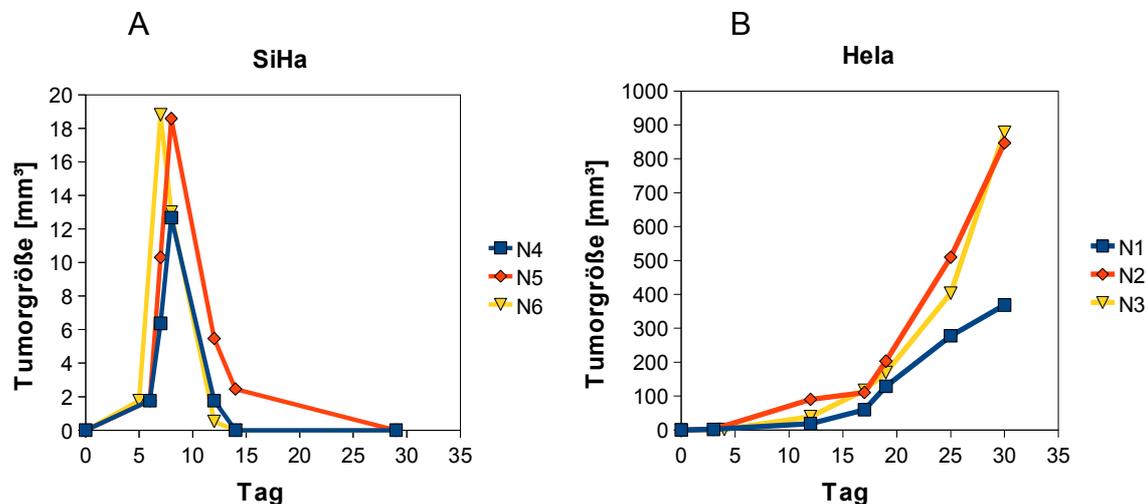


Abbildung 22: Wachstum der beiden humanen Zervixkarzinom-Zelllinien SiHa (A) und HeLa (B) als Xenotransplantat. Je drei Mäusen (N1–N3, N4–N6) wurden an Tag Null 3×10^6 Zellen der jeweiligen Zellreihe in die rechte Flanke injiziert. Länge und Breite der Tumoren wurde mit einem elektronischen Messschieber gemessen und das Volumen mithilfe der Formel $(\pi/6) \times (\text{Länge} \times \text{Breite})^{1,5}$ (s. 2.7.2) berechnet.

3.4.4 Kombinationstherapie mit SE und SA im Xenotransplantatmodell

Das Saponingemisch SA kann als bisheriges Standardsaponin unserer Arbeitsgruppe angesehen werden. Die Therapieschemata mit Reinsaponinen in der vorliegenden Arbeit basieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* alle auf vorhergehenden erfolgreichen Versuchen mit dem Saponingemisch (vgl. 3.4.1.1 und 3.4.2). Nun war es sinnvoll auch im Xenotransplantatmodell zunächst die Wirksamkeit des bereits etablierten SA zu prüfen, um von diesen Ergebnissen ausgehend einen weiteren Therapieplan entwerfen zu können. CD1 nu/nu Mäuse mit Tumoren aus der Zervixkarzinomzelllinie HeLa stellen aufgrund der vorangehenden Ergebnisse (s. 3.4.3) ein geeignetes Tumormodell für die Kombinationstherapie aus SE und dem Saponingemisch SA dar. In einem 30 Tage währenden Versuch wurde der Effekt einer 8fachen Kombinationstherapie aus 0,1 μg SE und 30 μg SA auf HeLa-Tumoren in CD1 nu/nu Mäusen untersucht (s. 2.7.4).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Eine Maus der Therapiegruppe verstarb plötzlich aus ungeklärten Gründen an Tag 15 des Versuchs. Ihre Daten sind hier nicht aufgeführt. Bei den Mäusen der Therapiegruppe konnte an der Injektionsstelle des Saponins bereits nach der

zweiten Injektion eine bindegewebige Verhärtung beobachtet werden. In Tumorumgebung zeigten sich nach Injektion des Toxins bei einzelnen Mäusen Entzündungsreaktionen, d.h. Rötung, Überwärmung und Schwellung eines Areals von 1–2 cm Durchmesser. Das Verhalten der Tiere war jedoch stets unauffällig. Gewicht und Größe der Tumoren am Ende des Versuchs zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Therapiemäusen (Abb. 23; $p > 0,05$). Die Therapie war demnach in den gegebenen Konzentrationen ineffektiv.

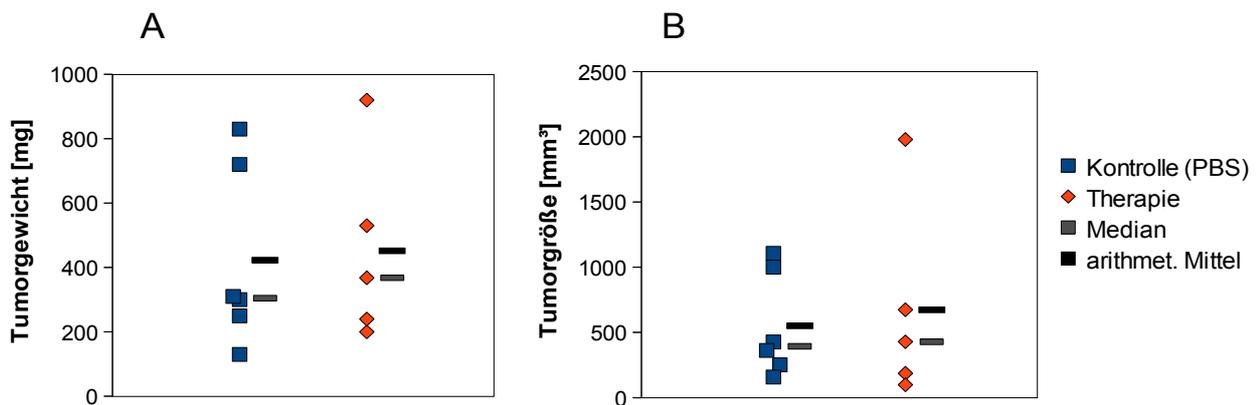


Abbildung 23: Gewicht (A) und Größe (B) einzelner HeLa-Tumoren von *CD1 nu/nu* Mäuse nach einer Behandlung mit SA/SE. Die Versuchsdauer betrug 30 Tage und es wurde $8 \times$ (alternierend alle drei und vier Tage) mit einer Kombinationstherapie aus $30 \mu\text{g}$ SA und $0,1 \mu\text{g}$ SE behandelt. Die Kontrollmäuse erhielten lediglich PBS. Ein Punkt repräsentiert den jeweiligen Tumor einer Maus. Neben den jeweiligen Datenreihen sind der zugehörige Median und Mittelwert dargestellt. Die Tumorgröße wurde mit der Formel $(\pi/6) \times (\text{Länge} \times \text{Breite})^{1,5}$ (s. 2.7.2) berechnet.

3.5 SA Fraktionen

Von Thakur et al. konnte SA bereits mittels Agarosegelelektrophorese in vier Fraktionen aufgeteilt werden, von denen zwei in der Kombinationstherapie mit SE wirksam auf murine Zelllinien waren [69]. Da die Therapie mit dem Saponingemisch SA im Xenotransplantatmodell in der Kombinationstherapie mit SE unwirksam war (s. 3.4.4), sollte SA in diesem Versuch in verschiedene einzelne Fraktionen aufgeteilt werden, um die grundlegende Wirksamkeit der Fraktionen auf die drei humanen Zelllinien CaSki, SiHa und Hela zu prüfen. Der gezielte Einsatz einer Saponinfraktion oder eines Reinsaponins im Xenotransplantatmodell wird vermutlich wirksamer sein als das Gemisch und auch eine geringere Entzündungsreaktion an der Einstichstelle hervorrufen. Trotz dem Vorliegen der Reinsaponine SO-1731 und SO-1861 ist das Testen von SA-Frak-

tionen sinnvoll, da diese einfache Art der Auftrennung eine potentielle Option zur Gewinnung künftiger Reinsaponine darstellt. Letztendlich soll dies zu einem größeren Handlungsspielraum bei der Wahl von Reinsaponinen führen, die im Xenotransplantatmodell erprobt werden können.

Das Saponingemisch SA wurde elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen wurden wieder zurückgewonnen (s. 2.5.1). Abbildung 24 zeigt eine Aufnahme des Gels unter UV Licht bei 258 nm. Die Fraktionen wurden in Abhängigkeit ihrer Laufgeschwindigkeit TOP (am schnellsten), 2nd, 3rd und BOT (am langsamsten) genannt. Sie wurden in Kombination mit SE im Zytotoxizitätsassay (s. 2.4.2) an CaSki, SiHa und Hela-Zellen getestet. SE wurde in den Konzentrationen 0,3, 3 und 30 nM eingesetzt und mit 2 µg der jeweiligen SA-Fraktion kombiniert. 3 nM SE wurden außerdem mit 10 µg der jeweiligen SA-Fraktion kombiniert. Dies sollte eine erste Orientierung bezüglich der Wirksamkeit der einzelnen Fraktionen auf die Zervixkarzinomzelllinien erlauben.

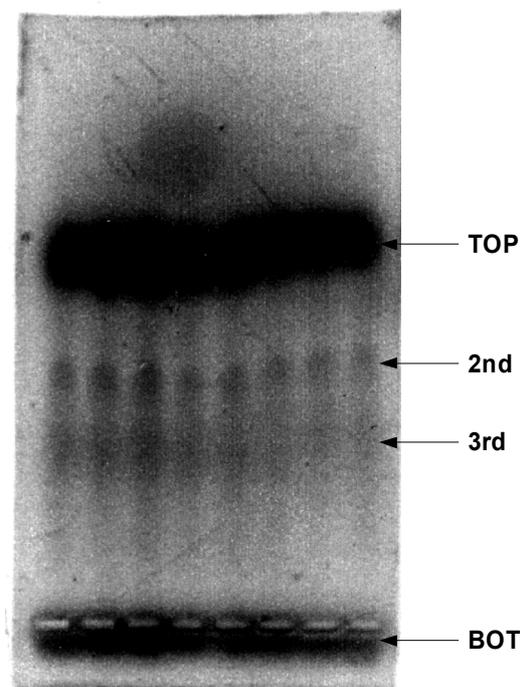
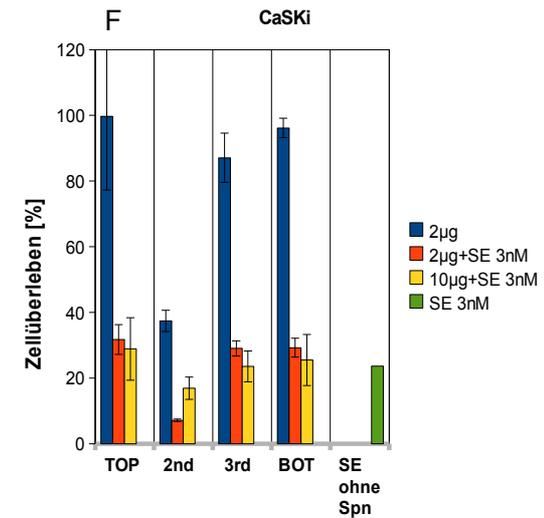
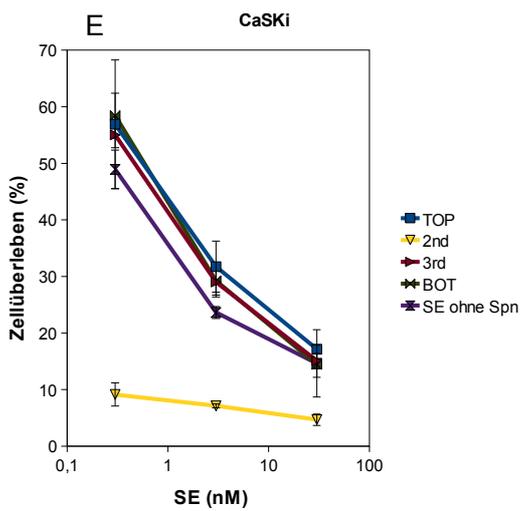
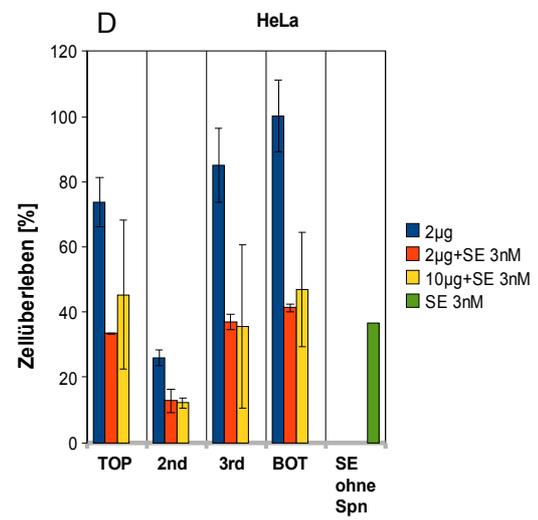
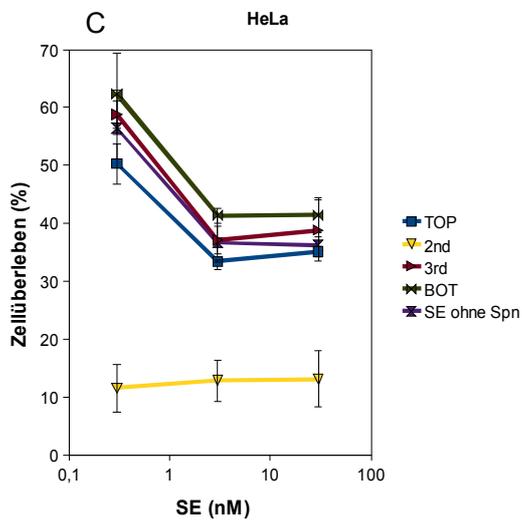
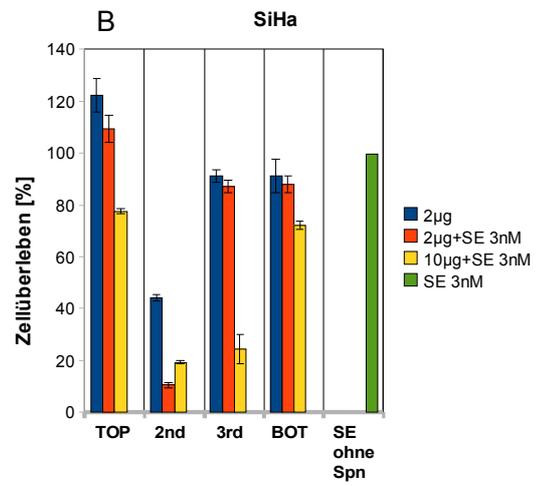
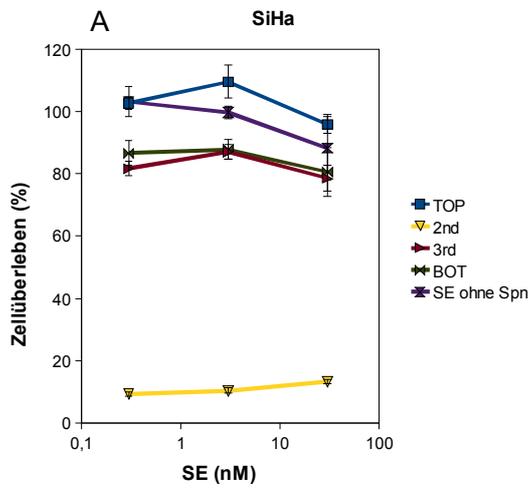


Abbildung 24: Eigenfluoreszenz von 4 Saponinfraktionen bei 258 nm nach Elektrophorese des Saponingemischs Saponinum album (SA) im 1%igen Agarosegel (1000 mA, 120 V, 50 min). TOP ist die schnellste, BOT die langsamste Fraktion.

Die Fraktion 2nd wirkte bei einer Konzentration von 2 µg/ml in Kombination mit SE auf alle drei Zelllinien toxisch (Abb. 25A, C und E). Hier liegt ein eindeutig synergistischer Verstärkereffekt vor.

fekt vor, da die Eigentoxizität der Fraktion bei dieser Konzentration deutlich geringer war (Abb. 25B, D und F). Jedoch ist die Eigentoxizität von 2nd hier für eine Behandlung zu hoch und es sollten noch geringere Konzentrationen getestet werden. Die Fraktion 3rd wirkte bei einer Konzentration von 10 µg/ml in Kombination mit SE toxisch auf SiHa-Zellen (Abb. 25B), allerdings wurde die Eigentoxizität von 3rd bei dieser Konzentration nicht getestet. Ob dieser Effekt auch auf die beiden anderen Zelllinien zutrifft, lässt sich nicht beurteilen, da SE allein hier bereits in gleichem Maße toxisch wirkte. Die Fraktionen TOP und BOT zeigten in Kombination mit SE weder bei 2 µg noch bei 10 µg eine toxische Wirkung auf die drei Zelllinien, die sich von der des SE allein unterscheidet (Abb. 25, S. 65).

Abbildung 25, S. 65: Zytotoxizität der vier elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen TOP, 2nd, 3rd und BOT des Saponingemischs SA in Kombination mit dem zielgerichteten Toxin SE auf die Zervixkarzinomzelllinien SiHa (A und B), HeLa (C und D) und CaSki (D und E). Es wurden jeweils 4000 Zellen ausgesät und nach 24 h für 72 h mit SE oder SE/SA-Fraktion inkubiert. Der Anteil überlebender Zellen wurde in Bezug zu unbehandelten Zellen mittels MTT-Assay (s. 2.4.3) ermittelt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte einer Vierfachbestimmung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen vom Mittelwert. Die jeweils linke Abbildung zeigt den Effekt von 2 µg der jeweiligen SA-Fraktion in Kombination mit drei verschiedenen SE-Konzentrationen (0,3, 3 und 30 nM) sowie den Effekt von SE allein. Die jeweils rechte Abbildung zeigt den Effekt von 2 µg und 10 µg der jeweiligen Fraktion in Kombination mit SE. SE wurde hier lediglich in der Konzentration 3 nM zugegeben. Außerdem ist auf der rechten Abbildung die Eigentoxizität von jeweils 2 µg der Saponinfraktionen dargestellt.



4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Verwendung von Impedanz basierendem Echtzeit-Monitoring erstmalig die Kinetik zythopathogener Effekte der Kombinationstherapie aus Saponin und Saporin basierendem Toxin dargestellt. Es wurde ein einfach durchzuführender Hämolyseassay entwickelt, der die Hämolyseaktivität von Saponinen aufzeigt und das Risiko für einen *In-vivo*-Einsatz abschätzen hilft. Es wurden analytisch reine Saponine, die eine Produktion nach den EU Richtlinien zur GMP ermöglichen, *in vivo* auf ihre Akuttoxizität getestet und dann erfolgreich in der Kombinationstherapie mit zielgerichteten Toxinen eingesetzt. Erstmalig wurde auch die Kombinationstherapie aus einem Saporin basierten Toxin und Saponin im Xenotransplantatmodell getestet.

4.1 Instabilität des Adapterproteins SA2E

SA2E ist ein zielgerichtetes Proteintoxin, das genau wie SE aus dem RIP Saporin (s. 1.2.1.1) und humanem EGF (s. 1.2.1.2) besteht, jedoch zusätzlich einen inkorporierten rekombinanten Adapter enthält, der über eine verstärkte endosomale Freisetzung zu verbesserter Wirksamkeit und weiterer Dosisreduktion des Toxins führen soll. Der Adapter setzt sich zusammen aus einer endosomal spaltbaren Peptidsequenz (ESP), einer Membrantransferdomäne und einer zytosolisch spaltbaren Peptidsequenz (CSP). Er verbindet den Liganden mit dem Toxin und soll dessen effektiven und unidirektionalen Membrantransfer ins Zytosol sicherstellen, so dass es zur Akkumulation des Toxins in der Zielzelle kommt.

In dieser Arbeit sollte ursprünglich SA2E in der Kombinationstherapie mit den Reinsaponinen SO-1861 und SO-1731 gegen Tumorzellen eingesetzt werden. Das Adapterprotein zeigte sich jedoch bereits während des Expressions- und Aufreinigungsprozesses instabil und es fielen äquivalente Mengen des Spaltprodukts Saporin an (Abb. 7, S. 42). Die endosomal spaltbare Sequenz des Adapters beinhaltet zwei jeweils aus *Pseudomonas* Exotoxin A und *Diphtheria* Toxin entstammende Schnittstellen für die Proproteinkonvertase Furin. Die Instabilität der ESP-haltigen Adapterproteins während der Expression und Aufreinigung deutet daraufhin, dass nicht nur Furin sondern auch andere, in diesem Fall bakterielle, Peptidasen eine Abspaltung der ESP bewirken können. Heisler hat bereits durch eine unvollständige Inhibierung des Degradationsprozesses mittels Fu-

rinconvertase-Inhibitor gezeigt, dass nicht ausschließlich Furin für die Spaltung verantwortlich ist [19]. Verschiedene Änderungen des Expressions- und Aufreinigungsprozesses wie die Expression in *Arctic Express* Zellen (s. 2.3.2), Aufreinigung bei 4°C, Aufschluss der Bakterienzellen mittels Hochdruck und nicht wie sonst über Hitzeschock und der Einsatz von Proteaseinhibitoren wurden unternommen, um Proteaseaktivität der Bakterien zu verringern. Auch wurde versucht SA2E mithilfe von Zentrifugalfiltern und Anionenaustauschchromatographie (s. 2.3.4) von seinem Spaltprodukt Saporin zu isolieren. Weder die Abspaltung von Saporin ließ sich verhindern, noch konnte Saporin aus der Proteinlösung entfernt werden (Abb. 8, S. 42). Hetzel et al. haben denselben Adapter in ein Immunotoxin integriert, das aus einem Einzelketten-Antikörperfragment gegen CD64 und der humanen Rnase Angiogenin besteht, und dabei festgestellt, dass er dessen Serumstabilität stark reduziert [74].

Der *In-vivo*-Einsatz des Adaptertoxins war aufgrund der dargelegten Ergebnisse problematisch und es wurde in dieser Arbeit für die Kombinationstherapie mit Reinsaponinen das stabile zielgerichtete Toxin SE (s. 3.1.2) eingesetzt. Es ist davon auszugehen, dass Saponine genau wie auch der molekulare Adapter den Austritt des Toxins aus den Endosomen unterstützen, und zwar hocheffektiv (s. 1.3). Dennoch sollten in Zukunft weitere Versuche unternommen werden, die Stabilität des Adapterproteins herzustellen. Beispiele sind Adaptervarianten ohne ESP [74].

4.2 Hämolyseassay *ex vivo* für Saponine

In höheren Konzentrationen weisen viele Saponine eine ausgesprägte hämolytische Aktivität auf (s. 1.3). Die Ursache hierfür ist noch nicht eindeutig klar. Ursprünglich wurde angenommen, dass Saponine durch ihre Ampiphilie die Oberflächenspannung zwischen wässriger und lipider Phase der Erythrozytenmembran herabsetzen, dadurch Wasser in die hyperosmolare Zelle einströmen kann und diese zum Platzen bringt. Abe et al. [75] konnten jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen Hämolyseaktivität bestimmter Saponine und deren membranpermeabilisierender Eigenschaft herstellen und auch in anderen Fällen war Hämolyse nicht mit einer Verringerung der Oberflächenspannung der Zellmembran korreliert [76, 77].

Früher war es üblich, die Hämolysewirkung von Saponinen mittels des hämolytischen Index (H.I.) anzugeben. Der H.I. ist der reziproke Wert der Verdünnung, bei der 1 g Saponin gerade noch totale Hämolyse einer Rinderblutlösung hervorruft. Es zeigte sich, dass die hämolytische

Aktivität verschiedener Saponine enorm differiert [78], aber es konnten bisher keine allgemeingültigen Regeln zur Strukturwirkung formuliert werden. Beispielsweise weisen Monodesmoside typischerweise eine höhere hämolytische Aktivität auf als Bidesmoside, in Einzelfällen ist dies aber auch umgekehrt [59]. Einige Saponine mit Acylrest haben keine hämolytische Aktivität gezeigt [79], wohingegen in anderen Fällen nur acetylierte Triterpenoidsaponine in niedrigen Konzentrationen in der Lage waren Membranaktivität zu verändern [80]. Da Hämolyse nach Gabe unterschiedlicher Saponine extrem variiert und lebensbedrohlich für den tierischen und menschlichen Organismus sein kann, ist es erforderlich, das hämolytische Potential der jeweiligen Saponine vor dem *In-vivo*-Einsatz zu testen.

Es wurde in dieser Arbeit ein einfach durchzuführender Hämolyseassay (s. 2.6.1 und 3.3) etabliert, der *ex vivo* an humanen Erythrozyten die Hämolysewirkung von Saponinen aufzeigt. Die zu testenden Saponine werden hierbei in unterschiedlichen Konzentrationen in einer Mikroplatte mit einer 4%igen Erythrozytenlösung inkubiert. Der Assay erlaubt den direkten optischen Vergleich (Abb. 14, S. 49) sowie die Messbarkeit der prozentualen Hämolyse über Absorption im Photometer (Abb. 15, S. 49).

Es konnte gezeigt werden, dass das hämolytische Potential der Reinsaponine SO-1861 und SO-1731 mit dem des *in vivo* bereits erprobten SA vergleichbar ist und sie unter diesem Aspekt in gleichen Konzentrationen im Mausmodell eingesetzt werden können (Abb. 14 und Abb. 15, S. 49). Nach den *In-vivo*-Versuchen stellte sich heraus, dass subkutan bezogen auf das Blutvolumen der Maus die achtfache Saponindosis derjenigen verabreicht werden konnte, die im Hämolyseassay unterhalb der Hämolysegrenze liegt, ohne dass bei der Maus eine lebensbedrohliche Anämie auftrat. Dies ist ein wichtiger Anhaltspunkt für Tierversuche mit weiteren Saponinen in Zukunft.

Die Hämolysewirkung von Saponinen sollte vor ihrem *In-vivo*-Einsatz in Zukunft immer mit dem Hämolyseassay, auch im unmittelbaren Vergleich mit einem der bewährten Reinsaponine SO-1861 oder SO-1731 als Standard, abgeschätzt werden.

4.3 Akuttoxizität von SO-1861 und SO-1731 *in vivo*

Erstmalig wurden in dieser Arbeit analytisch reine Saponine *in vivo* eingesetzt. Von Bachran et al. wurde bereits das kommerziell erworbene Saponingemisch SA *in vivo* auf seine Toxizität

überprüft und dann in der Kombinationstherapie mit einem chimärem Toxin eingesetzt [22]. Von den EU-Richtlinien zur GMP, dt. „guten Herstellungs-Praxis“, wird für den klinischen Einsatz von Substanzen oder Substanzgemischen zunächst deren eindeutige Zusammensetzung sowie ein geeignetes Produktionsprotokoll gefordert, um dann in einem weiteren Schritt den Herstellungsprozess unter GMP-Bedingungen durchzuführen. Durch Mazeration mit 90 % Methanol und anschließender Auftrennung mittels HPLC und präparativer Elektrophorese ist es in unserer Arbeitsgruppe gelungen, mehrere Triterpensaponine aus den Pflanzen *Gypsophila paniculata* und *Saponaria officinalis* zu isolieren [65, 66 und unveröffentlicht].

Die zwei analytisch im ESI-TOF-Massenspektrogramm reinen und aufgrund ausreichender Menge und erster vergleichender Versuche im Zytotoxizitätsassay Erfolg versprechendsten Saponine SO-1861 und SO-1731 wurden in dieser Arbeit zunächst in der Zellkultur eingesetzt. Hier zeigten sie sich beide durch synergistische, mehr als 100 000fache, Verstärkung des chimären Toxins SE hocheffektiv in der Kombinationstherapie (s. 3.2.1), woraufhin sie in Vorbereitung auf den Einsatz in der Kombinationstherapie *in vivo* auf Akuttoxizität in BALB/c-Mäusen getestet wurden. Insbesondere die für Triterpensaponine typische Hepatotoxizität wurde hierbei untersucht. Für die parenterale Aufnahme von Triterpensaponinen allgemein wurden Leberzellschäden bis hin zu Nekrose, Atemversagen, Krämpfen und Koma beschrieben [60].

Nach Gabe einer letalen Dosis von 200 µg im Falle von SO-1861 bzw. 150 µg im Falle von SO-1731 zeigten histologische Untersuchungen von HE-Schnitten der Leber bei der Hälfte dieser Mäuse größere Nekrosen bis hin zur Totalnekrose (Tab. 9, S. 53, Tab. 10, S. 56 und Abb. 17D, S. 54). Laborchemisch manifestierte sich dies in mehr als 100fach erhöhten Werten der Enzyme AST, ALT und GLDH (Tab. 7, S. 51). Klinisch fiel auf, dass der Urin bei diesen Mäusen bereits sichtbar rötlich verfärbt war. Es konnte freies Hämoglobin im Urin nachgewiesen werden und eine Blutentnahme führte unmittelbar zum Tod der betroffenen Maus (s. 3.4.1.1). Diese Vorkommnisse weisen auf eine massive hämolytische Anämie hin. Aufgrund laborchemischer und histologischer Ergebnisse sowie klinischer Beobachtungen ist demnach davon auszugehen, dass die Todesursache der Mäuse, die letale Saponinmengen erhielten, entweder eine akut toxische Lebernekrose und/oder eine fulminant hämolytische Anämie war.

Die übrigen Dosierungen der beiden Reinsaponine (15, 30, 60 und 100 µg) wurden gut toleriert. Im Versuchsverlauf zeigten sich insbesondere bei den höheren Saponindosen, 60 und 100 µg, im Vergleich zur Kontrollgruppe moderate Erhöhungen der Werte für AST, ALT und

GLDH (Abb. 18, S. 55 und Abb. 19, S. 57). Da die AST nicht leberspezifisch ist und auch in den Erythrozyten vorkommt, können erhöhte Werte auch auf eine Hämolyse hinweisen. Zum Versuchsende hatten sich alle Werte normalisiert (Abb. 18 und Abb. 19). Die histologische Auswertung der Leber ergab normales Parenchym bis zu leichten toxischen Veränderungen für SO-1861 (Tab. 6, S. 39, Tab 9, S. 53 und Abb. 11A und B, S. 46) und leichte bis mäßige toxische Veränderungen für SO-1731 (Tab. 6, Tab. 10, S. 56 und Abb. 11B und C). Klinisch waren die Mäuse während des gesamten Versuchsverlaufs unauffällig.

Die Ergebnisse entsprechen hinsichtlich der tolerierten Dosierungen denen von Bachran et al., die die *In-vivo*-Toxizität von SA untersucht haben. Über die Todesursache der Mäuse findet sich bei Bachran et al. hingegen keine Aussage.

4.4 Kombinationstherapie aus SO-1681 oder SO-1731 mit SE in der Zellkultur und im syngenem Tumormodell

Um Tumorthérapien zu verbessern und spezifischer zu gestalten wurden insbesondere in den letzten zwanzig Jahren Substanzen entwickelt, die mit spezifischen Tumor assoziierten Molekülen wechselwirken (s. 1.2). Im Gegensatz zu den gängigen unspezifischen Behandlungsoptionen wie Radio- und Chemotherapie sollen einerseits die Heilungschancen der Patienten erhöht und andererseits unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden. Zielgerichtete Toxine mit toxischer Domäne und zielführendem Liganden sind zukunftssträchtige Therapeutika auf dem Gebiet der zielgerichteten Tumorthérapie. Dennoch ist bisher erst ein tumorspezifisches Toxin (*Denileukin difitox (Ontak)*) zur Therapie zugelassen. Ein wichtiger Grund für das Scheitern vieler Toxine in der klinischen Phase sind die trotz vergleichsweise spezifischer Wirkung Dosis limitierenden unspezifischen Nebenwirkungen auf den Organismus [17, 18].

SE, ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein aus dem pflanzlichen Toxin Saporin und dem humanen EGF, wirkt spezifisch gegen Zellen, die eine Überexpression des EGFR aufweisen [37]. Der Einsatz eines Toxins, das sich gegen den EGFR richtet, ist insofern sinnvoll, da die meisten Tumorentitäten diesen Rezeptor massiv überexprimieren (s. 1.2.1.2). Die Kombination von SE mit dem kommerziellen Saponingemisch SA hat durch dessen synergistische Verstärkerwirkung zu einer über 100 000fachen Dosisreduktion des Toxins geführt [22]. Es ist davon auszugehen, dass auch die Nebenwirkungen des Toxins in der Klinik hierdurch drastisch verringert werden.

Da die Zusammensetzung des Saponingemischs SA nicht klar definiert ist und es aus diesem Grund nicht klinisch eingesetzt werden kann, wurden in dieser Arbeit die zwei zuvor mit HPLC isolierten analytisch reinen Saponine SO-1861 und SO-1731 eingesetzt. Sie wurden in Kombination mit dem chimären Toxin SE gegen Tumorzellen mit erhöhter Expression des EGFR zum Einsatz gebracht. In der Zellkultur wurde der toxische Effekt der Kombinationstherapie auf die mit humanem EGFR transfizierte murine Brustkrebszelllinie TSA-EGFR und auf die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa bewiesen (s. 3.2.1, 3.2.2). Die Toxinwirkung wurde in beiden Fällen mehr als 100 000fach verstärkt. Sowohl die Saponine als auch SE wurden in alleine nicht-toxischen Konzentrationen eingesetzt, so dass es sich eindeutig um einen synergistischen Effekt handelt. Dies kongruiert mit Ergebnissen, die mit dem Saponingemisch SA von Bachran et al. erzielt wurden [22].

Nach dem erfolgreichen Einsatz von SO-1861 und SO-1731 in der Zellkultur, Befreiung des Toxins von bakteriellen Endotoxinen (s. 2.3.10), Überprüfung der Toxinaktivität (s. 2.3.12) sowie vorausgehender Toxizitätsstudie der Saponine (s. 3.4.1.1) wurde die Kombinationstherapie aus den beiden Reinsaponinen mit SE an BALB/c Mäusen mit syngenem Tumoren aus TSA-EGFR-Zellen getestet. Die Tumorthherapie mit sowohl SO-1861 als auch SO-1731 in Kombination mit SE war hochgradig erfolgreich ($p < 0,05$). Die Mäuse waren während des gesamten Versuchsverlauf klinisch unauffällig und bei der histologischen Begutachtung der Leber wurden keine Unterschiede zu den Kontrollmäusen festgestellt. 28 Tage nach Tumorzellinjektion und achtmaliger Kombinationstherapie kam es im Falle von SO-1861 bei 6 von 10 Mäusen zu kompletter makroskopischer Tumorremission und einer mittleren Tumorgröße von $141,73 \text{ mm}^3$, wohingegen die Kontrollgruppe eine mittlere Tumorgröße von $761,89 \text{ mm}^3$ und lediglich einen Fall kompletter Remission aufwies (Abb. 20, S. 59).

Die Behandlung mit SO-1731 und SE erfolgte mit zwei unterschiedlichen Saponindosierungen ($15 \mu\text{g}$ und $30 \mu\text{g}$). Sie führte bei allen Mäusen zu kompletter Remission, wohingegen die Kontrolle lediglich einen Fall kompletter Remission und in mehr als der Hälfte der Fälle (5 von 8) einen Tumor aufwies, der größer als 400 mm^3 und schwerer als 300 mg war (Abb. 21, S. 60). Bei Präparation der Mäuse wurde festgestellt, dass diejenigen, die $15 \mu\text{g}$ Saponin erhalten hatten, an der Stelle, an der ursprünglich der Tumor lokalisiert war, einen Strang rötlichen, weichen Gewebes aufwiesen, wohingegen sich dieses Areal bei den Mäusen, die $30 \mu\text{g}$ Saponin erhalten hatten, nicht von der umgebenden Subkutis unterschied. Vermutlich handelte es sich bei dem be-

schriebenen Gewebe um bindegewebig ersetztes Tumorgewebe, das durch langsameren Therapieeffekt noch nicht vollständig resorbiert worden war. Für eine zukünftige Behandlung empfiehlt sich aufgrund der größeren Effizienz die höhere Dosierung.

Durch den erfolgreichen Einsatz analytischer reiner Saponine *in vitro* und *in vivo* hat die Kombinationstherapie aus Saponin und SE einen essentiellen Fortschritt im Hinblick auf spätere klinische Studien gemacht. Im Gegensatz zu dem bisher eingesetzten Saponingemisch SA, dessen Zusammensetzung nicht klar definiert ist und von Gebrauch zu Gebrauch variieren kann, ermöglichen SO-1861 und SO-1731 die Produktion nach den EU-Richtlinien zur GMP.

4.5 SO-1861 im Impedanz basierten Echtzeit-Assay

Über die Kinetik der zytopathogenen Effekte nach Gabe der Kombinationstherapie aus Saponinen und Saporin basierten Toxinen war bisher nichts bekannt. Es wurden in der Zellkultur lediglich Endpunkt-Assays mit MTT oder FDA eingesetzt. Endpunkt Assays werden zu einem definierten Zeitpunkt durchgeführt und geben an diesem den Anteil lebender Zellen in Zellverbänden an. Sie liefern keine Informationen über den zeitlichen Ablauf von Zellproliferation und Zellsterben.

Im Impedanz basierten Echtzeit-Assay (s. 2.4.4) konnte die Saponinwirkung erstmalig unter Echtzeitbedingungen nachvollzogen werden. In diesem Assay wurde das Zellverhalten von HeLa-Zellen kontinuierlich an einem angeschlossenen Monitor überwacht und Zellproliferation und Zellsterben nach Behandlung mit SE in Abwesenheit und Anwesenheit von Saponinen beobachtet. Es konnte hierbei festgestellt werden, dass bei höheren effektiven SE-Konzentrationen in Gegenwart von Saponin der Zelltod nahezu vollständig bereits innerhalb der ersten 12 h nach Zugabe der Substanzen eintrat, wohingegen es bei niedrigeren effektiven SE-Konzentrationen bis zu 120 h nach Substanzgabe dauerte bis alle Zellen tot waren (Abb. 12, S. 47). Diese Unterschiede werden in einem Endpunkt-Assay so nicht festgestellt und sind von besonderer Relevanz, da es *in vivo* vermutlich nur zu einer kurzen Expositionszeit der Zellen gegenüber Toxin und Saponin kommt. SA wurde beispielsweise häufig schon innerhalb einer Stunde fast komplett ausgeschieden [72].

Es zeigte sich weiterhin bei der Echtzeitmessung, dass in allen Fällen, in denen es aufgrund der Therapie zu einer Impedanzänderung kam, immer die kontinuierliche weitere Abnahme der

Impedanz bis hin zur Nulllinie, d.h. bis zum Tod aller Zellen, folgte (Abb. 12). Eine Zellschädigung mit anschließender Erholung kam nicht vor. Dies legt nahe, dass die Wirkung der Kombinationstherapie *in vitro* einem Alles-oder-Nichts-Gesetz folgt: Es ist vermutlich ein Schwellenwert nötig, ab dem dann der sichere Zelltod eintritt.

Der Echtzeit-Assay erlaubte außerdem Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus von Saponinen. In Gegenwart höherer Saponinkonzentrationen ist die Bildung von Membranporen und auch das Anschwellen von Zellen beschrieben worden [53, 81, 82]. Xiao et al. haben explizit für Impedanzmessungen kontinuierlicher Zellschichten beschrieben, dass Änderungen der Zellform zu Änderungen des Impedanzwerts führen [83]. Durch das Echtzeit-Monitoring konnte gezeigt werden, dass die Gabe von SO-1861 bis zu 10 µg/ml, einer Konzentration, die deutlich höher ist als diejenige, die in der Kombination eingesetzt wird, zu keiner von der Kontrolle abweichenden Impedanzveränderung führte (Abb. 11, S. 46). Die Bildung von Membranporen und starkes Anschwellen von Zellen konnte also ausgeschlossen werden.

Nach Behandlung von Zellen mit der Kombinationstherapie hingegen konnte festgestellt werden, dass die Impedanz zunächst zunahm, und zwar stärker als diejenige der Kontrolle, um dann direkt oder allmählich bis zum vollständigen Zelltod abzunehmen. Die Impedanzzunahme ist möglicherweise auf ein Anschwellen der Zellen zurückzuführen. Die Möglichkeit, dass durch die Anwesenheit von EGF zunächst die Proliferation angeregt wurde ist unwahrscheinlich, da dies bei der Gabe von SE allein nicht der Fall war und auch im entsprechenden MTT-Assay (Abb. 13, S. 48) keine Proliferation der Zellen nachgewiesen wurde.

Insgesamt ist der beschriebene Echtzeit-Assay einem Endpunkt-Assay deutlich überlegen. Er ist weniger arbeitsaufwendig und auch weniger störanfällig für interpersonelle Unterschiede bei der Experimentdurchführung, da nach Zugabe der Substanzen die automatische Messung durch den angeschlossenen Computer erfolgt. Er liefert durch kontinuierliche Überwachung der Zellvitalität wesentlich mehr Informationen als eine Endpunktmessung und erlaubt dadurch eine bessere Planbarkeit von *In-vivo*-Experimenten und klinischen Studien.

4.6 Kombinationstherapie aus dem Saponingemisch SA und dem chimären Toxin SE im Xenotransplantatmodell

Die Kombinationstherapie aus Saporin basiertem Toxin und SA wurde bereits erfolgreich gegen syngene Tumoren in BALB/c Mäusen eingesetzt [22]. Für den Übergang von präklinischer Prü-

fung zur klinischen Forschung ist es sinnvoll, die Therapie zunächst an humanen Tumoren im Xenotransplantatmodell einzusetzen. Da die Wirksamkeit des Saponingemischs SA *in vivo* bereits erwiesen wurde und die Therapie mit Reinsaponinen in dieser Arbeit erst etabliert werden musste, wurde hierfür SA eingesetzt. Als Modell dienten athymische Nacktmäuse (CD1 nu/nu) mit Tumoren aus der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa, die genauso wie die beiden humanen Zervixkarzinomzelllinien CaSki und SiHa der Kombinationstherapie *in vitro* sehr gut zugänglich ist [62]. HeLa Zellen hatten sich zuvor in dieser Arbeit durch das beste *In-vivo*-Wachstum der drei Zelllinien ausgezeichnet (s. 3.4.3). Die zu applizierenden Mengen von Toxin und Saponin für die Therapie wurden wie von der Tierversuchskommission gefordert und im Tierversuchsantrag festgelegt vom syngenem Mausmodell übernommen. In den vorgegebenen Konzentrationen erwies sich die Kombinationstherapie als unwirksam gegen die HeLa-Tumoren der Nacktmäuse. Dreißig Tage nach Tumorzellinjektion und 8maliger Therapie aus SA und SE trugen alle Mäuse von Therapie und Kontrollgruppe solide Tumoren, deren mittleres Gewicht in der Therapiegruppe 451 mg und in der Kontrollgruppe 423 mg betrug (Abb. 23, S. 62).

Es gibt verschiedene Gründe, die für das Therapieversagen verantwortlich sein können. Wahrscheinlich lassen sich die verabreichten Mengen von Saponin und chimärem Toxin nicht einfach vom syngenem BALB/c-Modell auf das CD1 nu/nu-Modell übertragen, da die athymischen Nacktmäuse anders auf die Substanzen reagieren als die immunkompetenten BALB/c-Mäuse. Klinisch zeigten die Nacktmäuse beispielsweise Entzündungs- und Fibrosereaktionen an den Einstichstellen, die bei den BALB/c Mäusen nicht aufgetreten waren. Eine Maus der Therapiegruppe verstarb sogar aus ungeklärten Gründen im Therapieverlauf. Ein weiterer Aspekt ist, dass die Nacktmäuse im Durchschnitt 5 g (25 %) schwerer waren als die gleichaltrigen BALB/c-Mäuse, was vermutlich eine höhere Menge von Toxin und Saponin erfordern würde. Ebenfalls nicht zu vernachlässigen ist die Tatsache, dass SA ein Gemisch aus verschiedenen Saponinen ist, deren Zusammensetzung nicht klar definiert ist und somit selbst bei sonst identischen Bedingungen nicht dieselbe Wirksamkeit gewährleistet wird.

4.7 Einzelne Fraktionen des Saponingemischs *Saponinum album* und ihre Wirksamkeit auf CaSki, SiHa und HeLa-Zellen

Von Thakur et al. wurde in unserer Arbeitsgruppe eine einfache elektrophoretische Methode zur Auftrennung von Saponingemischen entwickelt. Das kommerziell erworbene Saponingemisch

SA konnte mittels Agarosegelelektrophorese in vier Fraktionen aufgeteilt werden, deren synergistische Verstärkerwirkung von SE auf HER-14 Zellen (murine embryonale Fibroblasten (NIH-3T3) stabil transfiziert mit humanem EGFR) und untransfizierte NIH-3T3 Zellen getestet wurde. Die bezogen auf ihre elektrophoretische Mobilität zweite Fraktion zeigte sich hierbei mit einer 9800fachen Verstärkerwirkung des Toxins auf HER-14 Zellen am effektivsten. Die dritte Fraktion war ebenfalls in der Lage die Toxizität von SE zu verstärken, war jedoch mit einem Verstärkungsfaktor von 3200 deutlich ineffektiver als Fraktion 2. Erste und vierte Fraktion erwiesen sich als ineffektiv. ESI-MS-Analysen der isolierten Fraktionen ergaben, dass erste und vierte Fraktion mehrere niedermolekulare Komponenten mit einem maximalen Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von 1479 enthielten, wohingegen die beiden effektiven Fraktionen im wesentlichen hochmolekulare Saponine enthielten. Die Hauptkomponente von Fraktion zwei war m/z 1641, die Hauptkomponenten von Fraktion 3 m/z 1295, 1525, 1641 und 1803 [69].

Nach dem Misserfolg der Kombinationstherapie mit dem Saponingemisch SA im Nacktmausmodell (s. 3.4.4) wurde SA in dieser Arbeit gelelektrophoretisch in vier Fraktionen aufgetrennt, die dann nach Thakur et al. über Methanolextraktion und Gefriertrocknung aus dem Gel zurückgewonnen wurden (s. 2.5.1). In der Zellkultur wurde die Wirkung der Saponinfraktionen auf die drei Zervixkarzinomzelllinien CaSki, HeLa und SiHa in ersten vergleichenden Versuchen in der Kombinationstherapie getestet. Fraktion 2 (2nd) zeigte sich in der üblicherweise eingesetzten Konzentration von 2 μg in Kombination mit SE toxisch auf alle drei Zelllinien, und zwar deutlich toxischer als die Fraktion allein (Abb. 25B, D und F, S. 64). Die übrigen drei Fraktionen waren unwirksam.

Es wäre denkbar Fraktion 2 oder nur ihre Hauptkomponente m/z 1641 im Nacktmausmodell einzusetzen. Der gezielte Einsatz einer wirksamen Saponinfraktion von SA oder eines Reinsaponins aus SA wird sich im Tiermodell wahrscheinlich effektiver zeigen als der Einsatz des Gemischs und vielleicht auch geringere Entzündungsreaktionen an der Einstichstelle hervorrufen. Hierzu müsste zunächst durch weitere Gelelektrophoresen wesentlich mehr Saponinmaterial gewonnen werden. Um reines m/z 1641 zu erhalten müsste dieses mittels HPLC aus der Fraktion isoliert und mittels ESI-TOF-MS auf seine Reinheit überprüft werden. In der Zellkultur müsste dann die Toxizität der Fraktion bzw. die des isolierten m/z 1641 und auch das Wirkprofil mit SE noch genauer untersucht werden, bevor der Einsatz im Tiermodell in Frage kommt.

4.8 Ausblick

Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte zielgerichtete Tumorthherapie aus chimärem Proteintoxin SE und Reinsaponin ist eine vielversprechende Tumorthherapie, die die therapeutische Breite des Toxins massiv erhöht. In dieser Arbeit hat die Therapie sich im syngenem Tumormodell unter Verwendung analytisch reiner Saponine als hocheffektiv erwiesen. Toxin induzierte Nebenwirkungen können durch die mehr als 100 000fache Verstärkerwirkung des Saponins und die damit einhergehende drastische Dosisreduktion des Toxins minimiert werden. Die Verstärkerwirkung ist auch unter ökonomischen Gesichtspunkten relevant, da die Produktionskosten des Toxins gesenkt werden können.

Ein wichtiger Aspekt für die Zukunft zielgerichteter Tumorthherapie ist, dass Saporin nicht nur mit EGF, sondern auch mit anderen Antigenen, kleinen Molekülen oder Antikörpern verlinkt werden kann. Es wurde mithilfe des Liganden EGF zunächst die Wirksamkeit der Kombination aus Saponin und Saporin bewiesen. Das Konzept der Verstärkerwirkung des Saponins kann auch auf andere zielgerichtete Saporin basierte Toxine übertragen werden. Andere Forschungsgruppen, die mit solchen Toxinen arbeiten, haben die Austauschbarkeit des zielführenden Liganden *in vitro* bereits bewiesen. Ippoliti et al. haben ein Fusionsprotein aus Saporin und hCASK (*Human calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase*), das sich gegen humane Glioblastomazellen richtet, *in vitro* erfolgreich mit einem von uns erhaltenen Reinsaponin kombiniert [84]. Flavell et al. haben ebenso das Konzept von uns übernommen und Saponine, insbesondere SA und Quillaja Saponine, *in vitro* erfolgreich in Kombination mit OKT10-Saporin, einem anti CD 38 Immunotoxin gegen Leukämie- und Lymphomzelllinien, eingesetzt [85].

Interessanterweise haben Flavell et al. hierbei kein Zeitintervall zwischen der Gabe des Saponins und des Toxins berücksichtigt und trotzdem eine mehr als 100 000-fache Verstärkerwirkung des Saponins beobachtet. Bisher ging man basierend auf Experimenten von Heisler et al. [21] und Weng et al. [64] davon aus, dass die Interaktion von Saponin mit der Zellmembran die Zellen für eine verbesserte Aufnahme des Toxins vorbereitet. Weng et al. hatten in der Zellkultur die Aufnahme und Freisetzung von [(3)H]-SA durch ECV304 Zellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass ein kleiner Teil der Saponinmoleküle dauerhaft mit der Zelle assoziiert blieb. Dieser kleine Teil reichte aus, um eine drastische Wirkverstärkung von Saporin hervorzurufen, was auf eine langanhaltende Sensibilisierung der Zellen gegenüber dem Toxin hindeutete. Aufgrund der Ergebnisse von Flavell ist es denkbar, dass ein Zeitintervall, so wie es bisher *in vitro*

und auch *in vivo* eingehalten wurde, nicht unbedingt nötig ist. Möglicherweise hat es im Falle des Xenotransplantats in dieser Arbeit durch zu raschen Abbau des Saponins sogar zum Therapieversagen geführt. In einer Studie von Bachran et al. wurde gezeigt, dass SA nach subkutaner Injektion sehr schnell vom Körper eliminiert wird. Der Großteil des [(3)H]-markierten Saponins wurde bereits innerhalb von 30 Minuten von den Versuchsmäusen über den Urin ausgeschieden [72]. Die Pharmakokinetik und der Metabolismus von Saponinen im tierischen Organismus ist ansonsten schlecht erforscht und auch die genauen Veränderungen, die durch solch niedrige Saponinkonzentrationen wie wir sie einsetzen in Zellen hervorgerufen werden, sind bisher nicht genau bekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass sie den Austritt des Toxins aus den Endosomen unterstützen [31]. Möglicherweise wirkt Saponin auch dann, wenn das Toxin bereits an die Zelle gebunden hat. Es wäre sogar denkbar, dass Saponin in diesem Fall vermehrt zu den gewünschten Zellen gelangt, da es dort zu erhöhtem Verbrauch und Abbau kommt.

Das Zeitfenster zwischen Gabe von Saponin und Toxin sollte erneut überdacht und gegebenenfalls angepasst werden. Idealerweise würde in einem nächsten Schritt die Distribution radioaktiv markierter Substanzen, d.h. sowohl des Saponins als auch des zielgerichteten Toxins, in einer Bildgebung wie z.B. einer Tier-PET an tumortragenden BALB/c-Mäusen beobachtet. Hier sollte sowohl für die vorherige Gabe des Toxins als auch des Saponins untersucht werden. In Abhängigkeit der Ergebnisse kann das Therapieregime dann weiter optimiert werden.

Es wäre daraufhin sinnvoll, da die Behandlung mit Reinsaponinen in dieser Arbeit im syngenen Mausmodell etabliert wurde, Reinsaponine auch im Xenotransplantatmodell einzusetzen. Da die zu applizierenden Saponin und Toxinmengen, wie sich in dieser Arbeit gezeigt hat, nicht eins zu eins von einem auf das andere Modell übertragen werden können, sollte für das Xenotransplantatmodell zunächst mithilfe von Mäusekleingruppen ein Dosis-Wirkungs-Profil der Kombination aus SE und Saponin erstellt werden und in Abhängigkeit davon die Therapie in einer größeren Gruppe von Mäusen durchgeführt werden.

Weiterhin sehr interessant für die Zukunft der Kombinationstherapie ist, dass die US-amerikanische Firma *Advanced Targeted Systems* (ATS) mehr als 30 zielgerichtete Saponinkonjugate vertreibt, für die das Kombinationssystem mit Saponinen sinnvoll sein kann.

5 Zusammenfassung

In der Krebstherapie sind neue innovative Medikamente gefragt, die die meist unzureichenden Therapieregime verbessern. Zielgerichtete Tumorthherapie ermöglicht durch Binden spezifischer Strukturen, die wichtig für Wachstum oder Proliferation von Tumorzellen sind, eine gezieltere Wirkung gegen Tumorzellen als Radio- oder Chemotherapie. Zielgerichtete Toxine sind vielversprechende Substanzen auf diesem Gebiet, dennoch ist *Ontak* bisher das einzige tumorspezifische Toxin, das von der *Food and Drug Administration* (FDA) zur Therapie zugelassen wurde.

Ein wichtiger Grund für das Scheitern vieler Toxine in der klinischen Phase sind die – trotz vergleichsweise spezifischer Wirkung – Dosis limitierenden unspezifischen Nebenwirkungen auf den Organismus. In diesem Zusammenhang haben sich Gemische aus pflanzlichen Triterpenoiden, Saponine, sehr effektiv gezeigt. Sie haben *in vivo* drastisch die Toxizität des chimären Toxins Saporin(Sap-3)-EGF, genannt SE, verstärkt und konnten auch in der Zellkultur dessen Effektivdosis mehr als 100 000fach reduzieren und dadurch Nebenwirkungen minimieren. Für den klinischen Einsatz eignen sich undefinierte Saponinmischungen jedoch nicht.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die zwei zuvor mithilfe von *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) aus den Wurzeln von *Saponaria officinalis* isolierten analytisch reinen Saponine SO-1861 und SO-1731 *in vitro* und *in vivo* eingesetzt. Der Effekt der Kombinationstherapie aus Reinsaponinen und SE wurde in der Zellkultur an Zellen mit Überexpression des EGF-Rezeptors (TSA-EGFR) unter Verwendung eines Endpunkt-Assays mit MTT erfolgreich getestet. Hierbei wurden SE Konzentrationen von 3×10^{-13} M bis 3×10^{-8} M eingesetzt und es konnte eine mehr als 100 000 fache Verstärkung der SE-Toxizität durch jedes der Saponine festgestellt werden.

Die akute *In-vivo*-Toxizität von SO-1861 und SO-1731 in fünf verschiedenen Konzentrationen (15, 30, 60, 100 und 200 µg/Applikation im Fall von SO-1861 und 15, 30, 60, 100 und 150 µg/Applikation im Fall von SO-1731) wurde an BALB/c Mäusen getestet. Hierbei erwies sich die jeweils höchste Dosis als letal und nach laborchemischer und histologischer Analyse stellten sich akute Hepatotoxizität und akut fulminante Hämolyse als wahrscheinlichste Todesursachen heraus. Danach wurden nicht toxische Dosen der beiden Reinsaponine (15 und 30 µg/Therapieeinheit) auf ihre synergistische Verstärkerwirkung von SE im syngenem Mausmodell, BALB/c-Mäusen mit Tumoren aus TSA-EGFR-Zellen, getestet. Die Kombination von SE

sowohl mit SO-1861 als auch mit SO-1731 führte zu einer signifikanten Reduktion des Tumorumfangs ($p < 0,05$). In der unbehandelten Kontrollgruppe hatten 5 von 8 Mäusen einen Tumor von $> 450 \text{ mm}^3$ und lediglich eine Maus zeigte spontane Tumorremission. Im Gegensatz dazu wiesen 6 von 10 Mäusen nach achtfacher Behandlung mit SO-1861 ($30 \mu\text{g}$) und SE ($0,1 \mu\text{g}$) komplette Tumorremission auf und lediglich eine Maus hatte einen Tumor von $> 450 \text{ mm}^3$. Nach Kombinationstherapie mit SO-1731 kam es sogar in allen Fällen zur vollständigen Remission. Dieser enorme Therapieerfolg zeigt, dass die beiden Reinsaponine SO-1861 und SO-1731 als synergistische Verstärker eines Saporin basierten Toxins großes klinisches Potential haben.

Die Kombinationstherapie des Saponingemischs *Saponinum album* mit SE wurde erstmalig im Xenotransplantatmodell, CD1 nu/nu-Mäuse mit Tumoren aus der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa, eingesetzt. Bei den eingesetzten Dosierungen der beiden Substanzen war die Therapie nicht erfolgreich. Dies weist darauf hin, dass die Substanzmengen von SE und Saponin nicht vom syngenen auf das Xenotransplantatmodell übertragen werden können. Das Therapieregime für dieses Modell muss mithilfe eines Dosis-Wirkungs-Profiles optimiert werden. Da die Therapie mit den beiden Reinsaponinen SO-1861 und SO-1731 in der vorliegenden Arbeit erfolgreich im syngenen Mausmodell etabliert wurde, sollten diese in Zukunft auch im Xenotransplantatmodell anstatt des Saponingemischs eingesetzt werden.

Erstmalig wurde mithilfe eines Impedanz basierten Echtzeit-Assays die Kinetik zytopathogener Effekte der Kombinationstherapie untersucht. Nach Applikation niedriger effektiver Toxinkonzentrationen kam es zunächst zur Zellproliferation der verwendeten HeLa-Zellen und dann zum allmählichen Zelltod innerhalb von 96–120 Stunden. Höhere effektive Toxinkonzentrationen führten bereits innerhalb der ersten 12 h zum schnellen nahezu vollständigen Tod der Zellverbände. Diese Information ist von großer Relevanz für die *In-vivo*-Applikation der Therapie, da dort vermutlich nur eine kurze Expositionszeit gegenüber SE und Saponin gewährleistet wird.

Bei allen mit der Kombinationstherapie behandelten Zellgruppen kam es zu starker anfänglicher Impedanzzunahme, die in Zusammenschau mit entsprechenden MTT-Assays als Zellschwellung gedeutet wurde. Im Echtzeit-Essay konnte auch gezeigt werden, dass die Gabe von SO-1861 allein bis zu $10 \mu\text{g/ml}$ – einer Konzentration, die deutlich höher ist, als diejenige, die in der Kombination eingesetzt wird – zu keiner von der Kontrolle abweichenden Impedanzveränderung führte. Die Bildung von Membranporen und starkes Anschwellen von Zellen durch alleinige Gabe des Saponins konnte also ausgeschlossen werden.

Literaturverzeichnis

1. [cited 2013 20 February]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
2. [cited 2013 20 February]; Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/krebs_in_deutschland_2012.pdf
3. Seegenschmiedt, M., Müller R, Höffken K, Junginger T, Sauer H, *LENT-SOMA-Kriterien, Interdisziplinäre Bewertung von langfristigen Therapiefolgen in der Onkologie*. Dt Ärztebl 2000; 97: A 2395-2401 [Heft 37].
4. Morgan, G., R. Ward, and M. Barton, *The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2004. **16**(8): p. 549-60.
5. Jaiyesimi, I.A., A.U. Buzdar, D.A. Decker, and G.N. Hortobagyi, *Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later*. J Clin Oncol, 1995. **13**(2): p. 513-29.
6. Jordan, V.C., *Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy*. Eur J Cancer, 2008. **44**(1): p. 30-8.
7. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
8. Milenic, D.E., E.D. Brady, and M.W. Brechbiel, *Antibody-targeted radiation cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(6): p. 488-99.
9. Gao, X. and Z. Xu, *Mechanisms of action of angiogenin*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(7): p. 619-24.
10. Rosenblum, M.G. and S. Barth, *Development of novel, highly cytotoxic fusion constructs containing granzyme B: unique mechanisms and functions*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(23): p. 2676-92.
11. Moolten, F.L. and S.R. Cooperband, *Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells*. Science, 1970. **169**(3940): p. 68-70.
12. Andersson, Y., S. Juell, and O. Fodstad, *Downregulation of the antiapoptotic MCL-1 protein and apoptosis in MA-11 breast cancer cells induced by an anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin a immunotoxin*. Int J Cancer, 2004. **112**(3): p. 475-83.

13. Sarnovsky, R., T. Tendler, M. Makowski, et al., *Initial characterization of an immunotoxin constructed from domains II and III of cholera exotoxin*. *Cancer Immunol Immunother.*, 2010. **59**(5): p. 737-46.
14. Duzkale, H., L.C. Pagliaro, M.G. Rosenblum, et al., *Bone marrow purging studies in acute myelogenous leukemia using the recombinant anti-CD33 immunotoxin HuM195/rGel*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2003. **9**(6): p. 364-72.
15. French, R.R., A.J. Bell, T.J. Hamblin, A.L. Tutt, and M.J. Glennie, *Response of B-cell lymphoma to a combination of bispecific antibodies and saporin*. *Leuk Res*, 1996. **20**(7): p. 607-17.
16. Falini, B., A. Bolognesi, L. Flenghi, et al., *Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin*. *Lancet*, 1992. **339**(8803): p. 1195-6.
17. Frankel, A.E., R.J. Kreitman, and E.A. Sausville, *Targeted toxins*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(2): p. 326-34.
18. Frankel, A.E. and J.H. Woo, *Bispecific immunotoxins*. *Leuk Res*, 2009. **33**(9): p. 1173-4.
19. Heisler, I., *Bedeutung spaltbarer Peptidlinker für die Funktion rekombinanter Saporin-EGF-Immunotoxine*, in Dissertation *FB Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2003, FU Berlin.
20. Hebestreit, P. and M.F. Melzig, *Cytotoxic activity of the seeds from *Agrostemma githago* var. *githago**. *Planta Med*, 2003. **69**(10): p. 921-5.
21. Heisler, I., M. Sutherland, C. Bachran, et al., *Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells*. *J Control Release*, 2005. **106**(1-2): p. 123-37.
22. Bachran, C., H. Durkop, M. Sutherland, et al., *Inhibition of tumor growth by targeted toxins in mice is dramatically improved by saponinum album in a synergistic way*. *J Immunother*, 2009. **32**(7): p. 713-25.
23. Stirpe, F., S. Bailey, S.P. Miller, and J.W. Bodley, *Modification of ribosomal RNA by ribosome-inactivating proteins from plants*. *Nucleic Acids Res*, 1988. **16**(4): p. 1349-57.
24. Endo, Y., K. Mitsui, M. Motizuki, and K. Tsurugi, *The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins*. *J Biol Chem*, 1987. **262**(12): p. 5908-12.

25. Bachran, D., S. Schneider, C. Bachran, A. Weng, M.F. Melzig, and H. Fuchs, *The endocytic uptake pathways of targeted toxins are influenced by synergistically acting Gypsophila saponins*. Mol Pharm. **8**(6): p. 2262-72.
26. Bergamaschi, G., V. Perfetti, L. Tonon, et al., *Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis*. Br J Haematol, 1996. **93**(4): p. 789-94.
27. Heisler, I., J. Keller, R. Tauber, M. Sutherland, and H. Fuchs, *A colorimetric assay for the quantitation of free adenine applied to determine the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins*. Anal Biochem, 2002. **302**(1): p. 114-22.
28. Peumans, W.J., Q. Hao, and E.J. Van Damme, *Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?* Faseb J, 2001. **15**(9): p. 1493-506.
29. Vago, R., C.J. Marsden, J.M. Lord, et al., *Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells*. Febs J, 2005. **272**(19): p. 4983-95.
30. Weng, A., C. Bachran, H. Fuchs, and M.F. Melzig, *Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type I ribosome-inactivating protein*. Chem Biol Interact, 2008. **176**(2-3): p. 204-11.
31. Weng, A., C. Bachran, H. Fuchs, E. Krause, H. Stephanowitz, and M.F. Melzig, *Enhancement of saporin cytotoxicity by Gypsophila saponins--more than stimulation of endocytosis*. Chem Biol Interact, 2009. **181**(3): p. 424-9.
32. Stirpe, F., A. Gasperi-Campani, L. Barbieri, A. Falasca, A. Abbondanza, and W.A. Stevens, *Ribosome-inactivating proteins from the seeds of Saponaria officinalis L. (soapwort), of Agrostemma githago L. (corn cockle) and of Asparagus officinalis L. (asparagus), and from the latex of Hura crepitans L. (sandbox tree)*. Biochem J, 1983. **216**(3): p. 617-25.
33. Vandebussche, F., W.J. Peumans, S. Desmyter, P. Proost, M. Ciani, and E.J. Van Damme, *The type-1 and type-2 ribosome-inactivating proteins from Iris confer transgenic tobacco plants local but not systemic protection against viruses*. Planta, 2004. **220**(2): p. 211-21.

34. Ferreras, J.M., L. Barbieri, T. Girbes, et al., *Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant Saponaria officinalis L. (Caryophyllaceae)*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1216**(1): p. 31-42.
35. Benatti, L., M.B. Saccardo, M. Dani, et al., *Nucleotide sequence of cDNA coding for saporin-6, a type-1 ribosome-inactivating protein from Saponaria officinalis*. Eur J Biochem, 1989. **183**(2): p. 465-70.
36. Santanche, S., A. Bellelli, and M. Brunori, *The unusual stability of saporin, a candidate for the synthesis of immunotoxins*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **234**(1): p. 129-32.
37. Bachran, C., I. Heisler, D. Bachran, et al., *Chimeric toxins inhibit growth of primary oral squamous cell carcinoma cells*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(2): p. 237-42.
38. Cimini, A., S. Mei, E. Benedetti, et al., *Distinct cellular responses induced by saporin and a transferrin-saporin conjugate in two different human glioblastoma cell lines*. J Cell Physiol. **227**(3): p. 939-51.
39. Flavell, D.J., A. Noss, K.A. Pulford, N. Ling, and S.U. Flavell, *Systemic therapy with 3BIT, a triple combination cocktail of anti-CD19, -CD22, and -CD38-saporin immunotoxins, is curative of human B-cell lymphoma in severe combined immunodeficient mice*. Cancer Res, 1997. **57**(21): p. 4824-9.
40. Flavell, D.J., *Saporin immunotoxins*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **234**: p. 57-61.
41. Fabbrini, M.S., E. Rappocciolo, D. Carpani, et al., *Characterization of a saporin isoform with lower ribosome-inhibiting activity*. Biochem J, 1997. **322 (Pt 3)**: p. 719-27.
42. Nyati, M.K., M.A. Morgan, F.Y. Feng, and T.S. Lawrence, *Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 876-85.
43. Herbst, R.S. and D.M. Shin, *Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy*. Cancer, 2002. **94**(5): p. 1593-611.
44. Salomon, D.S., R. Brandt, F. Ciardiello, and N. Normanno, *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. Crit Rev Oncol Hematol, 1995. **19**(3): p. 183-232.
45. Herbst, R.S., *Review of epidermal growth factor receptor biology*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **59**(2 Suppl): p. 21-6.

46. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor*. Annu Rev Biochem, 1979. **48**: p. 193-216.
47. Francis, G., Z. Kerem, H.P. Makkar, and K. Becker, *The biological action of saponins in animal systems: a review*. Br J Nutr, 2002. **88**(6): p. 587-605.
48. Thakur, M., Melzig MF, Fuchs H, Weng A, *Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties*. Botanics: Targets and Therapy, 2011. **2011**:1: p. 19-29.
49. Rao, A.V. and M.K. Sung, *Saponins as anticarcinogens*. J Nutr, 1995. **125**(3 Suppl): p. 717S-724S.
50. De Marino, S., M. Iorizzi, E. Palagiano, F. Zollo, and C. Roussakis, *Starfish saponins. 55. Isolation, structure elucidation, and biological activity of the steroid oligoglycosides from an Antarctic starfish of the family Asteroiidae*. J Nat Prod, 1998. **61**(11): p. 1319-27.
51. Yokosuka, A. and Y. Mimaki, *Steroid saponins from the whole plants of Agave utahensis and their cytotoxic activity*. Phytochemistry, 2009. **70**(6): p. 807-15.
52. Kensil, C.R., *Saponins as vaccine adjuvants*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996. **13**(1-2): p. 1-55.
53. Bangham, A.D., R.W. Horne, A.M. Glauert, J.T. Dingle, and J.A. Lucy, *Action of saponin on biological cell membranes*. Nature, 1962. **196**: p. 952-5.
54. Gogelein, H. and A. Huby, *Interaction of saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers*. Biochim Biophys Acta, 1984. **773**(1): p. 32-8.
55. Tschesche, R. and G. Wulff, *[On the antimicrobial action of saponins]*. Z Naturforsch B, 1965. **20**(6): p. 543-6.
56. Wolters, B., *[The effect of some triterpenes and saponins on fungi]*. Naturwissenschaften, 1966. **53**(10): p. 23.
57. Romussi, G., S. Cafaggi, and G. Bignardi, *Hemolytic action and surface activity of triterpene saponins from Anchusa officinalis L. Part 21: On the constituents of Boraginaceae*. Pharmazie, 1980. **35**(8): p. 498-9.
58. Kawai, H., M. Kuroyanagi, K. Umehara, A. Ueno, and M. Satake, *Studies on the saponins of Lonicera japonica THUNB*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1988. **36**(12): p. 4769-75.
59. Hostettman, K., Marston A, *Saponins*. 1995, Cambridge: Cambridge University Press.
60. Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*. 28. ed. 1982, London: The Pharmaceutical Press.

61. Bachran, C., M. Sutherland, I. Heisler, P. Hebestreit, M.F. Melzig, and H. Fuchs, *The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(4): p. 412-20.
62. Bachran, D., S. Schneider, C. Bachran, et al., *Epidermal growth factor receptor expression affects the efficacy of the combined application of saponin and a targeted toxin on human cervical carcinoma cells*. Int J Cancer. **127**(6): p. 1453-61.
63. Hebestreit, P., A. Weng, C. Bachran, H. Fuchs, and M.F. Melzig, *Enhancement of cytotoxicity of lectins by Saponinum album*. Toxicon, 2006. **47**(3): p. 330-5.
64. Weng, A., C. Gorick, and M.F. Melzig, *Enhancement of toxicity of saporin-based toxins by Gypsophila saponins--kinetic of the saponin*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(8): p. 961-6.
65. Weng, A., K. Jenett-Siems, P. Schmieder, et al., *A convenient method for saponin isolation in tumour therapy*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. **878**(7-8): p. 713-18.
66. Weng, A., D. Bachran, C. Gorick, C. Bachran, H. Fuchs, and M.F. Melzig, *A simple method for isolation of Gypsophila saponins for the combined application of targeted toxins and saponins in tumor therapy*. Planta Med, 2009. **75**(13): p. 1421-2.
67. Jia, Z., K. Koike, and T. Nikaido, *Major triterpenoid saponins from saponaria officinalis*. J Nat Prod, 1998. **61**(11): p. 1368-73.
68. Fermani, S., G. Tosi, V. Farini, et al., *Structure/function studies on two type I ribosome inactivating proteins: Bouganin and lychnin*. J Struct Biol, 2009. **168**(2): p. 278-87.
69. Thakur, M., A. Weng, D. Bachran, et al., *Electrophoretic isolation of saponin fractions from Saponinum album and their evaluation in synergistically enhancing the receptor-specific cytotoxicity of targeted toxins*. Electrophoresis.
70. Oguiura, N., M. Boni-Mitake, R. Affonso, and G. Zhang, *in vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake Crotalus durissus*. J Antibiot (Tokyo). **64**(4): p. 327-31.
71. Diehl, K.H., R. Hull, D. Morton, et al., *A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes*. J Appl Toxicol, 2001. **21**(1): p. 15-23.

-
72. Bachran, C., A. Weng, D. Bachran, et al., *The distribution of saponins in vivo affects their synergy with chimeric toxins against tumours expressing human epidermal growth factor receptors in mice*. Br J Pharmacol. **159**(2): p. 345-52.
73. John P. Feldman, R.G., Shlomo Mark et al., *A Mathematical Model for Tumor Volume Evaluation using Two-Dimensions*. Journal of Applied Quantitative Methods, 2009. **4**: p. 455-462.
74. Hetzel, C., C. Bachran, R. Fischer, H. Fuchs, S. Barth, and M. Stocker, *Small cleavable adapters enhance the specific cytotoxicity of a humanized immunotoxin directed against CD64-positive cells*. J Immunother, 2008. **31**(4): p. 370-6.
75. Abe, H., M. Sakaguchi, H. Konishi, T. Tani, and S. Arichi, *The effects of saikosaponins on biological membranes. 1. The relationship between the structures of saikosaponins and haemolytic activity*. Planta Med, 1978. **34**(2): p. 160-6.
76. Steurer, S., M. Wurglics, W. Likussar, K. Burmistrov, A. Michelitsch, and M. Schubert-Zsilavec, *Lack of correlation between surface and interfacial activities of saponins and their hemolytic properties*. Pharmazie, 1999. **54**(10): p. 766-7.
77. Pillion, D.J., J.A. Amsden, C.R. Kensil, and J. Recchia, *Structure-function relationship among Quillaja saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin*. J Pharm Sci, 1996. **85**(5): p. 518-24.
78. Hänsel, R., Sticher O, *Pharmakognosie Phytopharmazie*. 9. ed. 2010, Heidelberg: Springer-Verlag.
79. Oda, K., H. Matsuda, T. Murakami, S. Katayama, T. Ohgitani, and M. Yoshikawa, *Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants*. Biol Chem, 2000. **381**(1): p. 67-74.
80. Melzig, M.F., G. Bader, and R. Loose, *Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins*. Planta Med, 2001. **67**(1): p. 43-8.
81. Arias, M., J.C. Quijano, V. Haridas, J.U. Gutterman, and V.V. Lemeshko, *Red blood cell permeabilization by hypotonic treatments, saponin, and anticancer avicins*. Biochim Biophys Acta. 2010. **1798**(6): p. 1189-96.
82. Gauthier, C., J. Legault, K. Girard-Lalancette, V. Mshvildadze, and A. Pichette, *Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins*. Bioorg Med Chem, 2009. **17**(5): p. 2002-8.

83. Xiao, C., B. Lachance, G. Sunahara, and J.H. Luong, *An in-depth analysis of electric cell-substrate impedance sensing to study the attachment and spreading of mammalian cells*. Anal Chem, 2002. **74**(6): p. 1333-9.
84. Ippoliti, R. *PDZ Domains and Membrane Nucleolin in the Engineering and Production of Chimeric Toxins Against Cancer cells*. in *8th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology, 3rd Targeted Tumor Therapies*. Berlin 2012.
85. Flavell, D.J. *Improving Immunotoxin Potency with Triterpenoid Saponins*. in *8th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology, 3rd Targeted Tumor Therapies*. Berlin 2012.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katharina Mergel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der synergistische Verstärkereffekt von Reinsaponinen auf zielgerichtete Proteintoxine bei der Bekämpfung von Tumorzellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

26.05.2013

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten (in Fachzeitschriften)

M. Thakur, A. Weng, A. Pieper, **K. Mergel**, B. von Mallinckrodt, R. Gilabert-Oriol, C. Görrick, MF. Melzig, H. Fuchs

Agarose gel electrophoresis as a simplified method for isolation of saponins from Saponaria officinalis Linn.
Carbohydrate Research (2013), *submitted*

R. Gilabert-Oriol, **K. Mergel**, M. Thakur, M F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng

Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins
Bioorganic and Medicinal Chemistry; DOI: 10.1016/j.bmc.2013.01.061. (2013)

M. Thakur*, **K. Mergel***, A. Weng, B. von Mallinckrodt, R. Gilabert-Oriol, H. Dürkop, MF Melzig, H. Fuchs
Targeted tumor therapy by epidermal growth factor appended toxin and purified saponin: an evaluation of toxicity and therapeutic potential in syngeneic tumor bearing mice
Molecular Oncology; DOI: 10.1016/j.molonc.2012.12.004. (2012)

M. Thakur*, **K. Mergel***, A. Weng, S. Frech, R. Gilabert-Oriol, D. Bachran, MF. Melzig, H. Fuchs

Real time monitoring of the cell viability during treatment with tumor-targeted toxins and saponins using impedance measurement
Biosens Bioelectron. 2012 May 15;35(1):503-6. (2012)

Vorträge (Vortragender unterstrichen)

M. Thakur, **K. Mergel**, A. Weng, A. Pieper, B. von Mallinckrodt, R. Gilabert-Oriol, MF. Melzig, H. Fuchs

Isolation Techniques of Saponins and their in Vivo Evaluation as Enhancers in Targeted Tumor Therapy
8th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology: The 3rd Targeted Tumor Therapies,
21.-23.03.2012 Berlin, Germany
23.03.2012

Abstracts (in Tagungsbänden)

R. Gilabert-Oriol, A. Weng, M. Thakur, **K. Mergel**, B. von Mallinckrodt, D. Bachran, MF. Melzig, H. Fuchs
Saporin-HRP Endo/Lysosomal Escape Enhancement in Isolated Organelles

In: 8th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology: The 3rd Targeted Tumor Therapies (Fabisch-Stiftung, H. Fuchs, Herausgeber), Page 72, Berlin, Germany 2012

*authors contributed equally to the paper

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Hendrik Fuchs bedanken, der mir ermöglicht hat diese für mich hochinteressante und lehrreiche Arbeit in seinem Arbeitskreis durchzuführen. Ihm danke ich auch für die ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung sowie den zwanglosen unhierarchischen Umgang, in dem ich gerne Ideen geäußert und diskutiert habe.

Bedanken möchte ich mich mit großer Herzlichkeit und großem Respekt bei meinem unmittelbaren Betreuer und inzwischen guten Freund Mayank Thakur, mit dem ich eng zusammen gearbeitet habe. Von ihm habe ich sehr viel gelernt, angefangen von wissenschaftlicher Herangehensweise im Allgemeinen bis hin zum *Handling* von Labortieren. Er hat auch die Reinsaponine bereitgestellt, die den Kern meiner Forschung bilden und diese Arbeit wäre ohne ihn nicht möglich gewesen. Außerdem haben mich seine wissenschaftliche Probierefreude und sein Ideenreichtum sehr beeindruckt und bleibend beeinflusst. Ich bedanke mich für die tolle Unterstützung, viele fruchtbare Diskussionen und freundschaftliche Gespräche!

Ich danke den hilfsbereiten MitarbeiterInnen des Endometriose Forschungslabors sowie der AG Kaufmann des *CervixCentrums* und auch Ursula Kastner für die hilfreiche Kooperation, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke Andrea, Carola, Sina und Julia für die Einführung in die Kunst des Gewebeschnitts und die Mitbenutzung Eurer Geräte.

Großer Dank gilt auch Prof. Horst Dürkop für die Kooperation bei der histopathologischen Begutachtung der Gewebeschnitte. Es war eine sehr interessante Zusammenarbeit und ich bedanke mich herzlich für die Zeit die Sie sich für Auswertung, Gespräche und ausführliche Erläuterungen genommen haben.

Besonders danke ich selbstverständlich allen meinen KollegInnen und MitarbeiterInnen der AG Fuchs und AG Dervedde für das stets offene Ohr und die Unterstützung! Vielen Dank Diana für das stetige Beantworten von Fragen und das Einführen in die praktische Labortätigkeit. Vielen Dank Alex, Alexandra, Benedikta, Brigitte, Claudia, Daniel, Fadime, Figen, Luise, Mariam, Marianne, Nicole, Paul, Roger, Sebastian, Temesgen und Thomas.

Liebe Luise und lieber Thomas, ich habe mich sehr gefreut in Eure kleine Bürorunde aufgenommen zu werden. Ich danke Euch für Eure Unterstützung und Euer abgezapftes Blut. Neben Dir meine Bürotätigkeit ausführen zu dürfen war eine reine Freude Thomas, mein lieber Medizinerkollege. Danke für viele geistreiche und auch verrückte Gespräche. Roger, Dein Einstieg in die Arbeitsgruppe war eine immense Bereicherung. Danke für viele Gespräche und gutes wissenschaftliches sowie sonstiges Teamwork.

Auch meinen lieben Freunden und Korrekturlesern Heiner, Manu und Meike gilt ein herzliches Dankeschön.

Danke Andreas. Danke Doro. Es ist wunderbar, dass es Euch gibt.

Meine lieben Eltern, vor Allem danke ich Euch! Ich danke Euch aus tiefstem Herzen für Eure ständige und liebevolle Unterstützung, für den Respekt und den beständigen guten Austausch!