

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie der
Freien Universität Berlin
und dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Kombinationstherapie von Anti-Tumor-Toxinen und Reinsaponinen am Maus-Tumormodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Benedicta-Leonie von Mallinckrodt
Tierärztin aus Neuss am Rhein

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3753

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Fuchs
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, growth models, saponins, neoplasms, xenografts, toxins,
ribosome-inactivating proteins, receptors

Tag der Promotion: 17.04.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-589-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Historie des Tierversuchs	1
1.1.1	Maustumormodelle.....	1
1.1.2	Nacktmäuse in der Tumorforschung	2
1.2	Immuntoxine als Therapieansatz	3
1.2.1	Monoklonale Antikörper	4
1.2.2	Zielgerichtete antitumorale Toxine	4
1.3	Ribosomen inaktivierende Proteine als zielgerichtete Toxine	5
1.4	Effekt-verstärkende Substanzen	7
1.5	Saponine, eine Lösung für den „Endosomal Escape“	7
1.6	Zielsetzung	12
2	Materialien und Methoden	13
2.1	Geräte	13
2.1.1	Elektrophorese.....	13
2.1.2	Gewebeverarbeitung.....	13
2.1.3	Photometer.....	13
2.1.4	Westernblot.....	13
2.1.5	Zellkultur	13
2.1.6	Zentrifugen	14
2.1.7	<i>In vivo</i> bildgebende Geräte.....	14
2.1.8	Medizinische Geräte.....	14
2.1.9	Geräte zur Messung von Radioaktivität	14
2.1.10	Sonstige Geräte.....	14
2.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.2.1	Chemikalien.....	15
2.2.2	Reinsaponine	15
2.2.3	ESI-TOF-MS (Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)	16
2.2.4	Materialien für Tierexperimente und Histologie.....	16
2.2.5	Materialien für Biochemische Assays	16
2.2.6	Antikörper für Immundetektion (Westernblot/Immunhistochemie)	17

2.2.7	Medikamente.....	17
2.2.8	Computer Software	17
2.2.9	Bakterienstämme.....	17
2.2.10	Vektoren.....	17
2.2.11	Marker	18
2.2.12	Puffer und Medien.....	18
2.2.13	Medien und Lösungen in der Zellkultur.....	18
2.2.14	Zelllinien	19
2.2.15	Art und Herkunft der Mausstämme.....	19
2.3	Statistische Methoden	20
2.4	Molekularbiologische Methoden	20
2.4.1	Transformation.....	20
2.4.2	Sequenzierungs-PCR für DE.....	21
2.4.3	Methode der DNA Sequenzierung von DE.....	22
2.5	Proteinbiochemische Methoden	22
2.5.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	22
2.5.2	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	23
2.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Gel)	24
2.5.4	Färbung mit Coomassie.....	25
2.5.5	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	25
2.5.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	25
2.5.7	Endotoxin-Entfernung	26
2.5.8	Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test [Bang, 1956].....	26
2.5.9	Proteinaktivitätsbestimmung mittels Adenin-Release Assay.....	26
2.6	Zellbiologische Methoden	28
2.6.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	28
2.6.2	Kultivierung unterschiedlicher adhärenter Zellen.....	29
2.6.3	Zytotoxizitätsassay	29
2.6.4	MTT-Assay	30
2.6.5	Echtzeit-Impedanzmessung mittels xCelligence-Reader	30
2.6.6	Westernblot zur Bestimmung der EGFR-Rezeptorexpression bei NIH3T3, TSA-EGFR, HCT116 und MDAMB231 Zellen	31
2.7	<i>Ex-vivo</i> -Methoden	32
2.7.1	Hämolyseaktivitätsbestimmung der Saponine mit und ohne Toxin.....	32

2.7.2	Hämatologische Untersuchungen.....	33
2.8	<i>In-vivo</i> -Methoden	34
2.8.1	Toxizitätsbestimmung von GS16, SA1641, SO1861 <i>in vivo</i>	35
2.8.2	Maustumormodelle.....	36
2.8.3	Kombinationstherapie im syngenem Maustumormodell.....	37
2.8.4	Etablierung eines Metastasen Modells via Tumorresektion.....	39
2.8.5	Chirurgische Tumorentfernung	40
2.8.6	Auswahl und Etablierung geeigneter Xenotransplantatmodelle	40
2.8.7	Xenotransplantatmodelle.....	41
2.9	<i>In vivo</i> bildgebende Methoden	42
2.9.1	Computertomographie (CT)	42
2.9.2	Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	42
2.10	Histopathologische Methoden	43
2.10.1	Fixierung der Organe und Tumore in Formalin und Einbettung in Paraffin	43
2.10.2	Entwässerung und Paraffin- Infiltration im Infiltrationsautomat (Citadel 1000).....	43
2.11	Chiroptische spektroskopische Methoden	44
3	Ergebnisse	47
3.1	DE und SE im Vergleich	47
3.1.1	Expressionslevel und Stabilität in der Gelelektrophorese	47
3.1.2	Zirkulardichroismus-Spektroskopie	50
3.2	Bestimmung der EGFR-Expression	53
3.2.1	<i>In vitro</i>	53
3.2.2	<i>Ex vivo</i>	54
3.3	Charakterisierung und Auswahl der Saponine	55
3.3.1	ESI-TOF-MS	55
3.3.2	Hämolytische Aktivität von GS16, SO1861 und Album (SA1641) mit und ohne Zugabe von DE.....	56
3.4	<i>In vitro</i> Zytotoxizitäts-Ergebnisse	58
3.4.1	MTT-Assay von SE + GS16 (mit TSA-EGFR-Zellen).....	59
3.4.2	Eigentoxizität der Saponine GS16/SO1861/SA1641 im xCelligence-Reader	60

3.4.3	Ergebnisse der Untersuchung von DE in Kombination mit den Saponinen GS16, SO1861, und SA1641 an HER14 und NIH3T3-Zellen.....	62
3.4.4	Ergebnisse der Untersuchung von DE in Kombination mit den Saponinen GS16, SO1861 und SA1641 an TSA-EGFR Zellen	63
3.4.5	DE + SO1861 mit HCT116-Zellen	64
3.4.6	DE/SE + SO1861 mit MDA-MB231-Zellen.....	66
3.5	<i>In-vivo</i> -Ergebnisse	68
3.5.1	Akute Toxizität nach Injektion mit GS16, SO1861 und 1641 in Balb/c-Mäusen	68
3.5.2	Blutausstrich nach Toxizitätstest mit GS16	70
3.5.3	Chirurgische Tumorexzision zur Etablierung eines Metastasen-Modells in Balb/c-Mäusen	71
3.5.4	Untersuchung von SE + GS16 als Therapie eines soliden TSA-EGFR-Zell-Tumors in einem syngenem Modell in Balb/c-Mäusen	73
3.5.5	SE + SA1641 als Therapie eines TSA-EGFR-Zell-Tumors in einem syngenem Modell in Balb/c-Mäusen.....	74
3.5.6	Untersuchung von DE + SO1861 als Therapie eines soliden HCT116-Zell-Tumors in einem Xenotransplantatmodell in Nacktmäusen	76
3.5.7	Ergebnisse der PET Untersuchung von soliden HCT116-Zell-Tumoren in Nacktmäusen	78
3.5.8	Entwicklung eines disseminierten Tumormodells mit MDAMB Zellen in Nacktmäusen.....	80
4	Diskussion	83
4.1	Vergleich der Stabilität und der enzymatischen Aktivität von SE und DE	83
4.2	Charakterisierung der Saponine	86
4.3	Untersuchung der EGFR-Expression	86
4.4	Bestimmung der Zytotoxizität	87
4.4.1	Endpunktmessungen.....	87
4.4.2	Echtzeitmessungen	88
4.5	<i>Ex-vivo</i> -Ergebnisse	90
4.6	<i>In-vivo</i> -Ergebnisse	90
4.6.1	Tumorthherapie mit GS16 und SA1641 am syngenem Mausmodell	91

4.6.2	Tumorthherapie am Xenotransplantat-Modell mit SO1861	91
4.6.3	Disseminierte Tumormodelle	92
4.7	Ausblick	93
5	Literaturverzeichnis	99
6	Publikationsliste	106
7	Danksagung	110
8	Selbständigkeitserklärung	111

Abkürzungsverzeichnis

[¹⁸ F]FDG	2-Fluor-2-desoxy-D-glucose, radioaktives Fluor-18 Isotop.
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CD	Circulardichroismus
CT	Computertomographie
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate
DE	Dianthin-EGF
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ESI-TOF-MS	<i>Electrospray-Ionization-Time-Of-Mass Spectrometry</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAR*	<i>Goat anti Rabbit</i> Antikörper
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
His-tag	Histidin-Tag aus 6 Histidinresten
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
i.v.	intravenös
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyraosid
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth Medium</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
p.i.	<i>post injectionem</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RAM*	<i>Rabbit anti Mouse</i> Antikörper
RIP	Ribosomen inaktivierendes Protein
s.c.	subkutan

SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Gel	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Saporin-EGF
t-RNA	transfer-DNA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Triton X-100	Octyphenolpolyethylenglycolether
Triton X-114	Octyphenolpoly(ethyleneoxy)ethanol
V.	<i>Vena</i>
v/v	Konzentrationsangabe als Volumenanteil am Gesamtanteil
w/v	Konzentrationsangabe als Gewichtsanteil in Gramm am Gesamtvolumen in Millilitern
z. B.	zum Beispiel
λ	Wellenlänge
$\times g$	\times -faches der Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Historie des Tierversuchs

Schon im ersten medizinischen Handbuch des Abendlandes, dem *Corpus Hippocratum*, das in Fassungen aus dem fünften und dritten Jahrhundert v. Chr. erhalten ist, finden sich Schilderungen von Tierversuchen [1]. Nach Hippokrates war es Galenos (146 n. Chr.), der zweite bedeutende Arzt der Antike, der Vivisektionen durchführte [2]. Vesalius (1514-1564) [3] führte einige der Experimente von Galenos in verbesserter Form durch und fast ein ganzes Jahrhundert später (1638) publizierte W. Harvey die ersten wissenschaftlichen Experimente an Tieren [4]. Seit dem ersten Bericht über wissenschaftlichen Versuche mit Mäusen im Jahre 1664 hat die Bedeutung der Maus in der biomedizinischen Forschung stetig zugenommen [5]. Heute sind 90% aller in der Forschung verwendeten Tiere Mäuse [6, 7].

1.1.1 Maustumormodelle

Seit den 1920er Jahren wurden spezielle Mausstämme, die besonders anfällig für die spontane Entstehung von Tumoren waren, untersucht [7]. Besonders in der pharmakologischen Forschung liefern Mausmodelle sehr aufschlussreiche und übertragbare Daten im Bezug auf Dosierungen, Verabreichungsschemata sowie positive und unerwünschte Wirkungen [8].

Vor der Entdeckung immundefizienter Mäuse wurden syngene, transplantable Mäusetumorsysteme, thymektomierte Mäuse oder autochthone Rattentumoren als die hauptsächlichen oder einzigen Hilfsmittel bei der Entwicklung antitumoraler Medikamente eingesetzt [9-11]. Viele der heute in der Klinik verwandten Chemotherapeutika wurden mit Hilfe dieser Nagetiertumormodelle entwickelt [7, 12, 13]. Bis Mitte der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden menschliche Tumoren auf verschiedene, künstlich immunsupprimierte Tiere mit sehr geringen Erfolgsraten implantiert [7].

Die am meisten verwendeten Tiermodelle wurden für Leukämien (L1210, P388) und das Melanom B16 entwickelt. In diesen Systemen konnten jedoch nur wenige Verbindungen als aktiv und somit nutzbar deklariert werden [9, 14, 15].

Durch die Entwicklung von immundefizienten Mausmodellen mit humanen Tumorzellen wurde es möglich, die Tumorsensitivität und Toxizität neuer Medikamente zu untersuchen. Genetisch modifizierte (transgene) Mäuse wurden entwickelt, um die molekularen und genetischen Ursachen von Krankheiten aufzuklären und neue therapeutische Ansätze voranzutreiben [16-19].

1.1.2 Nacktmäuse in der Tumorforschung

In Glasgow entstanden 1961 infolge einer Spontanmutation in einem Albinostamm (NMRI) unbehaarte Mäuse die keinen Thymus entwickelt hatten. Diese Tiere wurden als Nacktmaus bezeichnet. Die Mutante unterliegt einem autosomal-rezessivem Erbgang, wobei Haarlosigkeit und Thymusaplasie untrennbar miteinander verbundene Eigenschaften sind [20]. Die Haarlosigkeit liegt an einer Defizienz an Sulfhydrylgruppen und beruht damit auf einer abnormalen Keratinisierung der Haarfollikel [20].

Es stellte sich heraus, dass sich Nacktmäuse besonders für heterologe Transplantationen (Xenograft-Transplantationen) eignen, da die Thymusaplasie dieser Tiere mit immunologischen Defiziten einhergeht. Während die B-Zellpopulation der Lymphozyten normal ist, fehlen reife, funktionelle T-Lymphozyten [21]. Die Nacktmaus ist also ein idealer Wirt für heterologe Transplantate, denn es kann nicht mit immunologischen Komplikationen und damit einer Abstoßungsreaktion gerechnet werden [7].

Im Jahr 1971 dokumentierten Rygaard und Povlsen erstmals die erfolgreiche Transplantation eines humanen Kolonkarzinoms auf die Nacktmaus [22]. Weitere Gruppen konnten die verschiedensten humanen Tumoren erfolgreich transplantieren [23]. Auch in der Zellkultur wachsende, humane Tumorzelllinien führten nach subkutaner Injektion in der Nacktmaus zur Ausbildung solider Tumoren [24].

1.2 Immuntoxine als Therapieansatz

Im Jahr 1978 berichten Thorpe *et al.* zum ersten Mal von einer gesteigerten Toxizität des Diphtheriatoxins auf lymphoblastoide Zellen durch ein Diphtheriatoxin, das an antilymphozytäres Globulin gebunden war [25]. Seitdem hat sich die Entwicklung neuer Medikamente von der Anwendung generell zytotoxischer Mechanismen in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts zu zielgerichteten Behandlungsstrategien verlagert. Es besteht heute eher die Notwendigkeit, Tumortypen und individuelle Patiententumoren zu identifizieren, die bestimmte Oberflächenstrukturen exprimieren und so von selektiveren Therapien profitieren können [26].

Die therapeutische Wirksamkeit nahezu aller in der Krebstherapie eingesetzten Substanzen ist auf eine antiproliferative Wirkung der als Zytostatika bezeichneten Arzneistoffe zurückzuführen. Davon sind gleichermaßen maligne und schnell proliferierende gesunde Zellen betroffen. Diese geringe Spezifität führt zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Alopecie, Vomitus oder Fatigue [27, 28]. Durch die Entwicklung zielgerichteter antitumoraler Konzepte konnte die Wirkspezifität anti-tumoraler Therapien erheblich verbessert werden.

Toxinkonjugate sind hierbei ein wichtiges Beispiel für zielgerichtete Tumormedikamente. Dabei kann das genutzte Toxin aus den unterschiedlichsten Quellen (z.B. Bakterien, Pilzen, Pflanzen) gewonnen werden. Der an das Toxin gebundene Antikörper erkennt die Antigene, die auf der Oberfläche von Tumorzellen vorhanden sind. Aus diesem Grund sind Immuntoxine in der Lage spezifisch Krebszellen zu eliminieren. Dies geschieht nach Bindung an das Antigen durch die Toxinkomponente.

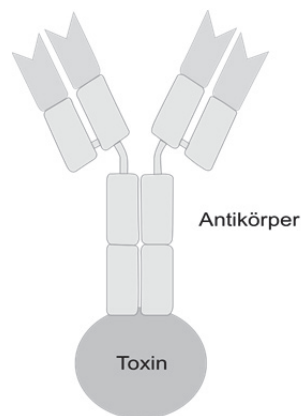


Abbildung 1: Immuntoxin. Es besteht aus einem Antikörper der an ein Toxin gekoppelt ist.

1.2.1 Monoklonale Antikörper

Die Einführung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin[®], Roche) bedeutete einen enormen Fortschritt in der Therapie des Mammakarzinoms. Herceptin[®] bindet spezifisch an das tumorassoziierte Oberflächenantigen HER2/neu. HER2/neu gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Durch die Bindung des Antikörpers auf der Zelloberfläche kommt es zur Hemmung der Tumorzellproliferation infolge von Apoptose und von Antikörper-abhängiger Zerstörung der Tumorzellen durch das Immunsystem [29].

Problematisch während der Therapie mit monoklonalen Antikörpern ist die zunehmende Resistenzbildung der Tumorzellen [30, 31]. Bei Herceptin[®] wird dies unter anderem auf Adaptionsvorgänge in den Tumorzellen zurückgeführt, wodurch alternative, die Zellproliferation induzierende Signaltransduktionswege ermöglicht werden. Auch wurden bereits erfolgreich *In-vitro*-Experimente durchgeführt, bei denen das Ribosomen inaktivierende Protein Saporin an Trastuzumab gekoppelt wurde. Das besondere an dieser Studie war, dass hierbei zusätzlich ein Triterpensaponin als Effekt verstärkende Substanz verwendet wurde. Dadurch konnte die Konzentration des Toxins drastisch reduziert [32] und Resistenzbildung umgangen werden.

1.2.2 Zielgerichtete antitumorale Toxine

Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern, deren Wirksamkeit auf der Blockade tumorassoziiertes Antigene beruht, bestehen zielgerichtete Anti-Tumor-Toxine aus zwei Komponenten: einem zielzellspezifischen Liganden, der die Bindung an Oberflächen-Rezeptoren vermittelt und einer Toxinkomponente, die nach Endozytose die Tumorzelle eliminiert [33]. Die kontinuierliche Entwicklung zielgerichteter Anti-Tumor-Toxine führte 1999 zur Zulassung von DAB(389)IL-2 (Ontak[®]) durch die FDA [34]. Ontak[®] besteht aus Interleukin-2 und einem Fragment des Diphtheriatoxins und ist für die Behandlung von T-Zell-Lymphomen zugelassen. Das Diphtheriatoxin gehört zu Klasse der ADP-ribosylierenden Enzyme. Zur gleichen Klasse gehören auch die bakteriellen Toxine Exotoxin A (*Pseudomonas aeruginosa*) und das Cholera toxin (*Vibrio Cholerae*). Diese beiden Komponenten werden in der Forschung ebenfalls als Bestandteile zielgerichteter Toxine genutzt [35, 36].

1.3 Ribosomen inaktivierende Proteine als zielgerichtete Toxine

Ribosomen inaktivierende Proteine (RIP's) existieren als Typ 1 (Hemitoxine) mit nur einer Peptidkette und einer Größe von ca. 30 kDa und als Typ 2 (Holotoxine) bestehend aus zwei Peptidketten. In diesem Fall bestehen sie jeweils aus einer A-Kette (30 kDa), die enzymatische Aktivität besitzt, und einer B-Kette (35 kDa) mit Lektin-Aktivität, welche an Oligosaccharide binden kann, die Galaktose enthalten [37]. Die beiden Ketten sind über eine Disulfidbrücke mit einander verbunden.

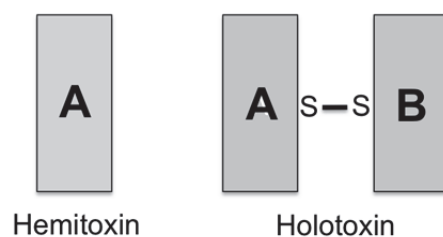


Abbildung 2: Schematische Struktur von Typ 1 und Typ 2 RIP's. Saporin, Dianthin, Bryodin und Gelonin sind Typ 1 RIP's und somit Hemitoxine, die nur eine enzymatisch aktive Domäne besitzen (A). Typ 2 RIP's haben eine enzymatisch aktive- (A) und eine Bindungsdomäne (B). Zu ihren Vertretern gehören unter anderem Ricin und Abrin. Angelehnt an [38].

Einige dieser RIP's wurden bereits als ein Teil von zielgerichteten Toxinen in klinischen Studien eingesetzt [39-41].

Sie alle besitzen eine hochspezifische N-Glykosidase-Aktivität, durch die unter Entstehung einer AP-Stelle ein einziges Adenin (Adenin-4324) der 28 S-Untereinheit von der rRNA abgespalten wird. Eine AP-Stelle (*apurinic* bzw. *apyrimidinic site*) enthält weder Purine noch Pyrimidine. Bleibt eine AP-Stelle unrepariert wird dadurch der gesamte Translationsapparat inaktiviert und die Apoptose der Zelle eingeleitet. Die beschriebene Erkennungsstelle für die hochspezifische Aktion der RIP's liegt in einem Bereich der rRNA-Sekundärstruktur.

Die N-Glykosidase-Aktivität wird zusätzlich als Parameter zur Untersuchung der Enzymaktivität in entsprechenden Assays genutzt [42] (s. a. 2.5.9).

Saporin und Dianthin, welches die beiden RIP's sind, die für diese Arbeit verwendet wurden, haben eine strukturelle Homogenität von über 90% [43]. Sie stammen aus den Pflanzen *Saponaria officinalis L.* und *Dianthus caryophyllus L.* [44]. Für diese Toxine sind

die Aufnahmemechanismen in die Zellen noch nicht endgültig aufgeklärt. Man geht davon aus, dass Saporin und Dianthin sowohl alleine, als auch als Fusionsprotein mit EGF (*epidermal growth factor*) und einem 6 × His-Tag zur Aufreinigung (s. 2.5.2), andere Mechanismen nutzen als in Kombination mit Saponinen (s. Abschnitt 1.5.).

Am Ursprungsort der Saporine, nämlich in der Pflanze selbst, ist ihre Rolle weitgehend unerforscht. Über die Hemmung viraler Replikationen sind einige Vertreter der RIP's in der Lage auf lokaler Ebene einen Virusschutz der Pflanzenzellen zu gewährleisten [45, 46]. Saporine kommen in allen Teilen der Pflanzen (Samen, Blättern, Wurzeln) vor, wobei die größte Menge aus den Wurzeln und den reifen Samen gewonnen werden konnte [47]. Ein großer Vorteil der Saporine besteht darin, dass sie rekombinant hergestellt werden können [48]. Dabei erweisen sie sich in der Produktion als resistent gegenüber Denaturierung und Proteolyse [49]. Dies ist auch der Grund, weswegen sie in der Forschung eingesetzt werden, um unterschiedliche zielgerichtete Toxine herzustellen [50-53].

Für die vorliegende Arbeit wurden Fusionsproteine aus den beiden RIP's Saporin und Dianthin und dem epidermalen Wachstumsrezeptor (EGF) hergestellt, um an unterschiedliche Tumorentitäten, die diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche überexprimieren, binden zu können.

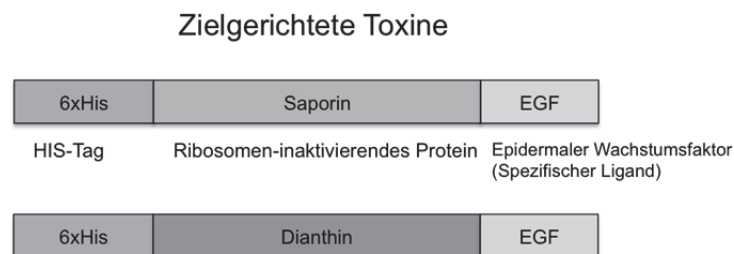


Abbildung 3: Zusammensetzung der chimären zielgerichteten Toxine Saporin-EGF und Dianthin-EGF. Sowohl ein N-terminaler His-Tag (zur Aufreinigung) als auch der epidermale Wachstumsrezeptor (EGF) wurde molekularbiologisch an die Toxine gebunden (s. a. 2.4.3). Während der Aufreinigung mit einer Nickel-Affinitätschromatographie kann Ni²⁺ im Austausch gegen Wasser mit zwei His-Resten des Proteins interagieren.

1.4 Effekt-verstärkende Substanzen

Trotz guter anti-tumoraler Ergebnisse wird die Therapie mit Anti-Tumor-Toxinen von erheblichen unerwünschten Wirkungen wie vaskulärem Leck-Syndrom, Dolor oder Hypoalbuminämie begleitet [54-56]. Dies kann auf eine unspezifische Aufnahme der Anti-Tumor-Toxine in nicht entartete Zellen zurückgeführt werden.

Darüber hinaus müssen Anti-Tumor-Toxine nach erfolgter Endozytose aus den intrazellulären Kompartimenten (Endosomen/Lysosomen) in das Zytoplasma freigesetzt werden (*Endosomal Escape*), da die zytosolische Anreicherung der Anti-Tumor-Toxine eine Grundbedingung für ihre Wirksamkeit darstellt [57]. Um einen ausreichenden *Endosomal Escape* zu gewährleisten, müssen hohe Dosen appliziert werden, was wiederum zu erhöhten unerwünschten Nebenwirkungen führt.

Ziel einiger Substanzen wie z. B. Chloroquin ist es, die unerwünschten Nebenwirkungen zu umgehen, indem sie den endosomalen pH-Wert anheben, um das Toxin so vor dem Verdau durch lysosomale Enzymen zu schützen [58]. Eine andere Strategie verfolgt die Nutzung z. B. argininreicher Peptide, die Poren in der Zellmembran verursachen, um den intrazellulären Effekt zu verstärken [59]. Bisher hat der Gebrauch dieser Substanzen dazu beigetragen, die Effektivität der einzelnen Therapiestrategien zu steigern, jedoch der Nutzen in der klinischen Anwendung ist nach wie vor limitiert.

Die in dieser Arbeit verwendete Kombinationstherapie aus einem Ribosomen inaktivierenden Proteintoxin und einem effektverstärkenden Saponin vermindert die oben beschriebenen, unerwünschten Nebenwirkungen. Der therapeutische Vorteil dieser Strategie beruht auf der saponinbedingten massiven Steigerung der Wirksamkeit des Toxins.

1.5 Saponine, eine Lösung für den „Endosomal Escape“

Der Name „Saponin“ kommt vom lateinischen Wort *sapo* = lat. für Seife. Saponine bilden einen seifenähnlichen Schaum in wässrigen Lösungen, da der hydrophile Saccharidteil und das lipophile Sapogenin eine Amphiphilie bewirken, welche die Oberflächenspannung herabsetzen [34]. Triterpensaponine, die für diese Arbeit ausschließlich genutzt wurden, setzen sich aus einem Triterpen-Aglycon – dem Sapogenin – und einer, zwei, selten auch drei daran glykosidisch gebundenen Zuckerketten zusammen. Das Aglycon weist ein

pentazyklisches (α -, β -Amyrin) oder seltener tetrazyklisches (Dammaran) Triterpensystem auf. Biogenetisch leitet sich das Triterpen-Aglycon vom Squalen ab [60].

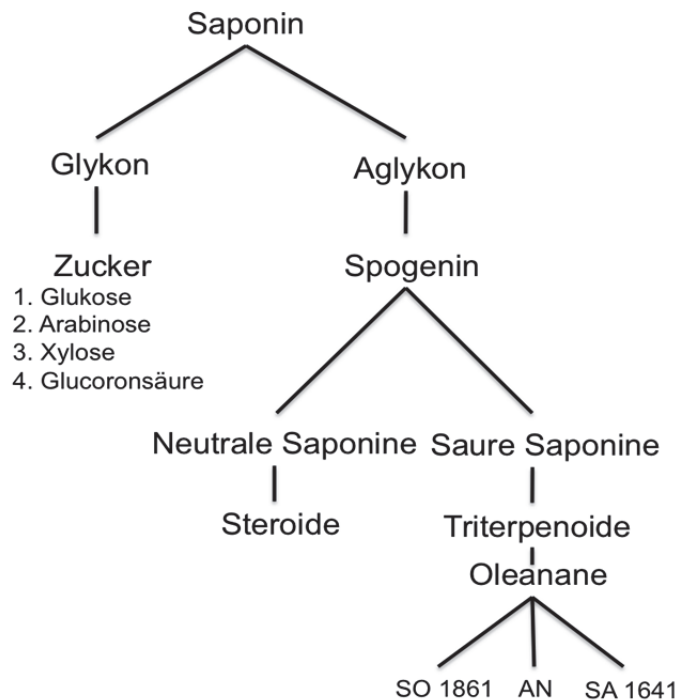


Abbildung 4: Schema über Klassifizierung der Saponine

Welche Funktion die Saponine innerhalb der Pflanze besitzen, ist nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass sie der Pflanze helfen sich vor Pilzbefall und Insektenfraß zu schützen [61].

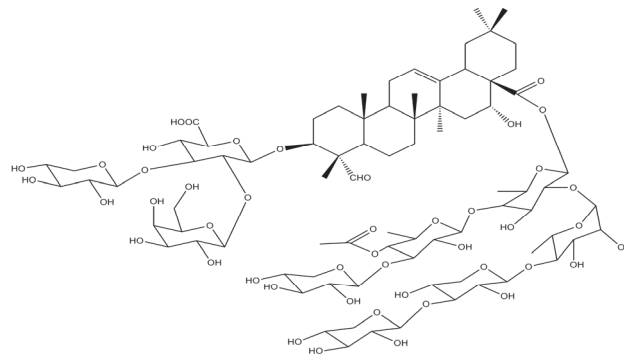


Abbildung 5: Chemische Struktur von SA1641, einem der Reinsaponine das für diese Arbeit genutzt wurde. SA1641 wurde aus der Pflanze *Gypsophila paniculata* L. isoliert. Es besteht aus einem hydrophoben C₃₀ Gerüst (Gypsogenin) und zwei abzweigenden Zuckerketten [62].

Saponine kommen als wirksamer Bestandteil in vielen Arzneimitteln therapeutisch zum Einsatz [63]. Efeublätter (*Hederae helicis folium*) und Primelwurzel (*Primulae radix*) werden zum Beispiel als Expektorantien, die Samen der Rosskastanie (*Hippocastani*

semen) als Antiexsudativa und die Ginsengwurzel (*Ginseng radix*) als Tonikum genutzt [64].

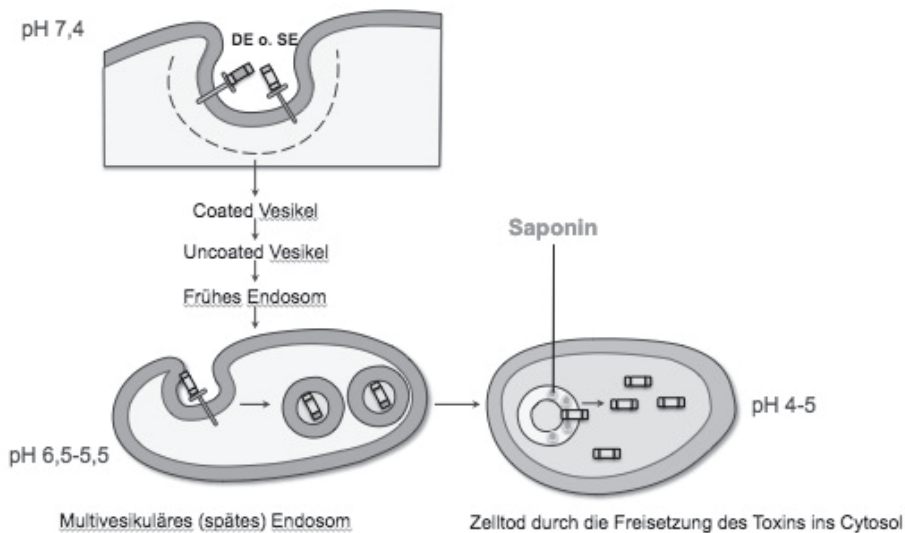
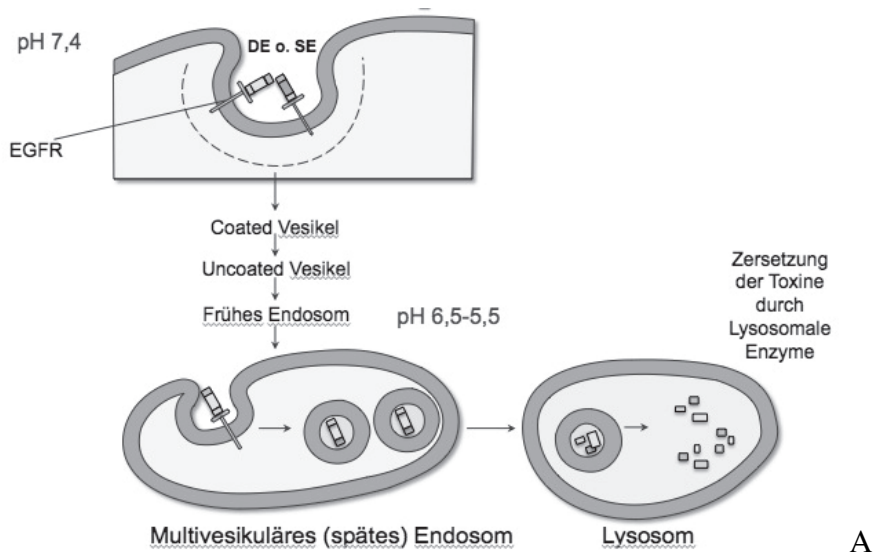
Um das Jahr 1925 wurde festgestellt, dass die Saponine der Seifenrinde (*Quillaja saponaria* M.) die Immunantwort verstärken [65]. Daneben sind entzündungshemmende, antileishmanielle, antitrichomoniale, antifungale, antivirale und antiallergische Effekte für Saponine beschrieben [66]. Werden spezifische Antigene — meistens Viren — in Kombination mit Saponinen, Cholesterol und Phospholipiden verabreicht, kommt es zu einer stärkeren Immunantwort gegen das Antigen als ohne Triterpensaponine [44-45].

Quillajasaponine werden heutzutage als Adjuvantien bei der Herstellung von ISCOMs (*Immun Stimulating Complex*) verwendet [67].

Es wurde festgestellt, dass Saponine die Zellmembranpassage anderer Substanzen erheblich verbessern, weshalb Versuche durchgeführt wurden, in denen Saponine gezielt Stoffe in einer Zielzelle anreichern. In diesem Zusammenhang konnte eine saponinvermittelte Akkumulation des Zytostatikums Cisplatin in humanen Kolonkarzinomzellen festgestellt werden [68]. Darüber hinaus konnte die Aufnahme von Heparin *in vitro* durch Zugabe entsprechender Saponine erhöht werden [69]. Weitgehend ähnliche Effekte konnten für Insulin, 4'-O-Tetrahydropyranyl-doxorubicin (THP), Aminoglykoside, und beta-Laktoglobulin festgestellt werden [70-72]. Durch ihren amphiphilen Charakter schädigen Saponine die Zellmembran, indem sie einerseits die Oberflächenspannung herabsetzen und andererseits eine emulgierende Wirkung auf Membranlipide haben. In der Folge entstehen Membranlücken, durch die der zelluläre Inhalt nach außen und Elektrolyte und Wasser nach innen gelangen können [64]. Letztlich wird die Zellmembran zerstört und es kommt zum Austritt zellulärer Bestandteile [73] (Abbildung 6a und 6b).

In bisherigen Untersuchungen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Saponine die Wirksamkeit zielgerichteter Anti-Tumor-Toxine millionenfach erhöhen [74]. In bereits veröffentlichten Studien wurde gezeigt, dass das anti-Tumor-Toxin Saporin-EGF (SE) unabhängig von der Blockierung des Clathrins und Aktins sowie unbeeinflusst vom endosomalem pH toxisch ist [75, 76]. Kombiniert man Saporin mit ganz bestimmten Triterpenoiden aus der Gruppe der Saponine, wird die Aufnahme über Clathrin vermittelte Endozytose bewerkstelligt. Die Freisetzung der Anti-Tumor-Toxine ins Zytosol findet in diesem Fall in Abhängigkeit des sauren pH-Werts statt (Abbildung 6) [75, 77].

Der genaue effektverstärkende Mechanismus des Saponins ist dabei noch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die Saponine vermutlich an die endosmalen Membranen anlagern und so den endosomalen Austritt (*Endosomal Escape*) des Saporins induzieren [78]. Nach jetzigem Erkenntnisstand geht man davon aus, dass die Saponine die Zielzellmembran langanhaltend für das Toxin (Saporin) sensibilisieren [79]. Dieser wirksamkeitssteigernde Effekt der Saponine ist dabei hoch spezifisch, tritt schon bei geringen Saponinkonzentrationen auf und wird durch eine intrazelluläre Interaktion beider Komponenten vermittelt [32, 80, 81].



B

Abbildung 6a: Es wird der endosomale Verdau der zielgerichteten Toxine DE (Dianthin-EGF) und SE (Saporin-EGF) ohne Saponine schematisch dargestellt. Zunächst ist die rezeptorspezifische Endozytose der Toxine dargestellt. Darauf folgt die Internalisierung der Toxine und die endo-lysosomale Degradation der Proteintoxine. Abbildung 6b: Durch die zellulär bedingte Ansäuerung der Endolysosomen erlangen die Saponine ihre Fähigkeit zur Wechselwirkung mit den Ribosomen inaktivierenden Proteinen (RIP's). Die internalisierten RIP's werden nicht mehr verdaut ins Zytosol der Zelle freigesetzt. Sie gelangen somit zu den Ribosomen, die sie inaktivieren. Angelehnt an [82].

1.6 Zielsetzung

Zielgerichtete Toxine sind antitumorale Wirkstoffe, die eine Krebszelle gezielt eliminieren. Die für diesen antitumoralen Effekt notwendigen, hohen Dosen führten allerdings bisher zu schweren unerwünschten Wirkungen. Durch Kombination eines chimären Toxins mit einem untoxischen pflanzlichen Saponin konnte jedoch eine Reduktion des Tumolvolumens um 94% erreicht werden, obwohl die hierfür benötigte Menge an Toxin nur $\frac{1}{50}$ dessen betrug, was bei der Monotherapie mit dem Toxin notwendig war [83]. Auf Grund der reduzierten Toxinmenge wurden keine signifikanten unerwünschten Wirkungen beobachtet. Ziel des dieser Arbeit zu Grunde liegenden Forschungsprojekts war es daher, die Kombinationstumortherapie nunmehr aus zwei zielgerichteten Toxinen mit Reinsaponinen zu entwickeln. Das grundlegende Prinzip der Kombinationstherapie wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hendrik Fuchs in einem syngenem Mausmodell und einer Saponinmischung aus einem Pflanzenextrakt bewiesen [66]. In den von mir durchgeführten Arbeiten sollten analytisch reine Saponine sowohl *in vitro* auch als *in vivo* getestet werden. Zum einen sollte dabei die hämolytische Aktivität der Saponine und ihre Toxizität sowohl in Endpunkt- als auch in *Life-Cell*-Experimenten untersucht werden. Zum anderen war es das Ziel, Dosis und Wirkung der Applikation von zwei verschiedenen Toxinen mit unterschiedlicher Immunogenität [84] in Kombination mit reinen Saponinen zu optimieren und anhand von unterschiedlichen Maustumormodellen zu untersuchen. Der Hauptfokus des Forschungsprojektes lag hierbei auf der Entwicklung einer Tumortherapie mit Dianthin-EGF, welches eine geringere Immunogenität [85] haben sollte, als Saporin-EGF. Darüber hinaus sollte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass mit der Anwendung einer zielgerichteten Tumortherapie an einem Xenotransplantatmodell ein wichtiger Schritt in Richtung einer Anwendung der Kombinationstherapie in einer klinischen Studie gemacht werden kann. Die verschiedenen Maustumormodelle, die hierfür entwickelt wurden, sind in Tabelle 13 aufgelistet.

2 Materialien und Methoden

Die Warenzeichen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind nicht als solche gekennzeichnet. Ohne Kennzeichnung kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass der Name des Produktes frei von Rechten Dritter ist. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden, wenn nicht anders erwähnt, alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Veränderte Temperaturbedingungen sind bei den jeweiligen Methoden angegeben.

2.1 Geräte

2.1.1 Elektrophorese

- Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele MGV-202; C.B.S. Scientific Company

2.1.2 Gewebeverarbeitung

- Histokinette Shandon Citadel 1000; Thermo Fisher Scientific
- Kühlplatte COP 20; Medite Medizintechnik

2.1.3 Photometer

- Analog-Spektralphotometer 1101 M; Eppendorf
- Mikroplatten-Photometer Spectra MAX 340 PC; Molecular Devices
- Spektrophotometer Nanodrop ND-1000; peQLab
- Spektropolarimeter J-810; Jasco

2.1.4 Westernblot

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

2.1.5 Zellkultur

- 96-Well E-Platten Cardio 96; Roche
- CO₂-Inkubator Modell 311; Forma Scientific (Thermo)

- Impedanz basierte Echtzeit-Messung (RTCA), xCelligence Reader Model W380; Roche (mittlerweile ACEA)
- Lichtmikroskop Axiovert 25; Zeiss
- Neubauer Zählkammer; LO-Laboroptik
- Einfriergerät Nicool LM 10; Air Liquid
- Sterile Werkbank Herasafe; Heraeus

2.1.6 Zentrifugen

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

2.1.7 *In vivo* bildgebende Geräte

- Positronen-Emissions-Tomograph Mosaic PET System; Philips Medical Systems
- Tomograph Nanospect/CT; Bioscan Mediso

2.1.8 Medizinische Geräte

- Chirurgisches Besteck; Aesculap
- Inhalationsnarkosegerät Isoflorane Vapox 19.1; Drägerwerk AG

2.1.9 Geräte zur Messung von Radioaktivität

- Aktivimeter Isomed 2010; MED

2.1.10 Sonstige Geräte

- Färbeschüttler 3016; GFL
- Gefriertrockner CT 110; Heraeus
- Heizblock QBT; Grant Instruments
- Inkubationsschüttler Unitron; HT-Infors
- Kamera AxioCam MRc; Zeiss
- Mikroskop Axioplan; Zeiss
- Quarzglasküvetten (Suprasil); Hellma

- Rotationsverdampfer WB 2000; Heidolph
- Temperatur Kontrollsystem Jaso PTC-423S Peltier Type; Jaso
- Ultraschall-Desintegrator Branson Sonifer 250; G. Heinemann
- Umwälzkühler HAAKE WKL; Haake
- Wasserbad 1086; GFL

2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurde in pro Analyse Qualität bezogen.

- [¹⁸F]2-Fluor-2-deoxy-D-glucose; Eckert & Ziegler/ F-Con
- Ampicillin-Natriumsalz; Roth
- Coomassie Brilliantblau R-250; AppliChem
- *Enhanced Chemiluminescence* Westernblot-Detektionsreagenz Immobilon Western; Millipore
- Formalin 10 %, neutral buffered, Sigma-Aldrich
- Isopropyl-β-D thiogalactopyranosid; AppliChem
- Ni-NTA-Agarose; Quiagen
- Paraffin Paraplast Plus; Roth
- Triton X-100; Sigma-Aldrich
- Triton X-114; Sigma Aldrich

2.2.2 Reinsaponine

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurden für diese Arbeit ausschließlich reine Saponine genutzt. Die Saponine wurden aus *Gypsophila panniculata sp.* und *Saponaria sp.* gewonnen.

Um diese zu erhalten, wurde zunächst eine Mazeration mit 90% Methanol und im Anschluss eine Reinigung mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und präparativer Elektrophorese durchgeführt [62, 80, 86]. Die Namen der hier verwendeten Saponine leiten sich aus den Massenangaben des ESI-TOF-Massenspektrogramms ab (s. 2.2.3).

- G16 Saponin; isoliert aus *Gypsophila sp.*, zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Matthias F. Melzig, Institut für Pharmazie, Freie Universität, Berlin
- SO1861 Saponin; isoliert aus *Saponaria officinalis sp.*, zur Verfügung gestellt durch Dr. Mayank Thakur, Institut für Laboratoriumsmedizin, klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité Universitätsmedizin, Berlin
- SA1641 Saponin; isoliert aus *Saponinum album*, zur Verfügung gestellt durch Dr. Alexander Weng, Institut für Laboratoriumsmedizin, klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité Universitätsmedizin, Berlin

2.2.3 ESI-TOF-MS (Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry)

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ESI-TOF-MS-Messungen zur Charakterisierung von GS16 wurden mit einem Agilent 6210 ESI-TOF (Santa Clara, USA) von der Serviceabteilung Massenspektrometrie der FU-Berlin Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie durchgeführt.

2.2.4 Materialien für Tierexperimente und Histologie

- 1ml Spritzen Myjector, 29 Gauge; Terumo
- Chirurgisches Besteck; Vitron
- Einmalskalpelle Typ 11; Aesculap
- Haema Schnellfärbung LT005; LT-SYS
- Immersionsöl Immersol 518; Zeiss
- Injektionslösung, 0,9 % NaCl; Fresenius
- Lanzetten *Goldenrod Animal Lancet*, 4 mm; Medipoint
- Nadel-Fadenkombination Coated Vicryl 4-0 V5, 70 cm, V230; Ethicon
- Universal-Einbettkassetten; Langenbrinck
- Urinteststreifen Combi 10 VET; Macherey-Nagel

2.2.5 Materialien für Biochemische Assays

- *Advanced Protein Assay Reagent*; Cytoskeleton
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Roth
- Heringssperma-DNA; Invitrogen

- LAL Test; PYROGENT *Single Test Vials*; Lonza
- Mikrokonzentriersäulen Amicon 30 kDa; Millipore
- Mikroplatteneinsätze Maxi Sorb U16 Module; Nunc
- Nitrozellulose Hybond *Enhanced Chemiluminescence*; Amersham Biosciences
- PD-10 *Desalting Column*; Amersham Biosciences
- Röntgenfilme Hyperfilm ECL Amersham; GE Healthcare

2.2.6 Antikörper für Immundetektion (Westernblot/Immunhistochemie)

- EGFR-Level Bestimmung, Kit EGFR pharmDx™; DAKO
- GAR* Polyklonales Ziegen IgG gegen Kaninchen IgG mit Peroxidase konjugiert; DAKO
- monoklonales anti-Saporin Kaninchen IgG, Rabbit Antikörper gegen EGFR EP38y; Abcam (0,038 mg/ml)

2.2.7 Medikamente

- Analgetikum Rompun 2 %, Xylazin; Bayer
- Anästhetikum Ketanest 25 mg/ml, Esketaminhydrochlorid; Pfizer
- Inhalationsnarkotikum Forene, Isofluran 100 %; Abbott
- Nicht steroidales Antiphlogistikum Rimadyl, Carprofen; Pfizer

2.2.8 Computer Software

- Compute pl/Mw tool ExpASy; Swiss Institute of Bioinformatics
- IBM SPSS Statistics Version 21; IBM Corporation
- Origin Version 6; OriginLab Corporation
- RTCA Software 1.2.1.1002; ACEA Biosciences
- SoftMax® Pro Data Analysis Software; Molecular Devices

2.2.9 Bakterienstämme

- *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS; Novagen

2.2.10 Vektoren

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

2.2.11 Marker

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

2.2.12 Puffer und Medien

Hierbei handelt es sich um allgemeine Lösungen, die für diverse Methoden benutzt wurden. Spezielle Puffer, die nur für einzelne Methoden benötigt wurden, sind gesondert bei der jeweiligen Methode aufgeführt.

Die Puffer wurden mit Reinstwasser (MilliQ-Wasser) hergestellt.

PBS-Puffer: 150 mM Natriumchlorid, 8,33 mM Dinatriumhydrogenphosphat,
1,67 mM Kaliumdihydrogenat, 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

2.2.13 Medien und Lösungen in der Zellkultur

- Dimethylsulfoxid (DMSO); Sigma-Aldrich
- 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
- Eurolone McCoy's 5a Medium mit L-Glutamin; GIBCO
- Fetal Bovine Serum; Biochrom AG
- Gelatine für Mikrobiologie; Merck
- Penicillin/Spreptomycin/Amphotericin B (A/A); PAA
- Trypsin-EDTA (0,25 % w/v Trypsin, 1 mM EDTA); PAA

2.2.14 Zelllinien

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten	DSMZ ^a
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
ECV304	humane Blasenkarzinomzellen	DSMZ
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
MDAMB 231	humane Mammakarzinomzellen	CLS Cell line services
HCT116	humane Kolonkarzinomzellen	Sigma Aldrich

^a Leibniz Institut, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

2.2.15 Art und Herkunft der Mausstämme

- Balb/c, immunkompetente Albinomäuse, weiblich; Charles River
- CD1 nu/nu, athymische Nacktmäuse, weiblich und männlich; Charles River

2.3 Statistische Methoden

Für die statistische Analyse des Tumorwachstums in den verschiedenen Versuchen wurde ein nicht parametrischer Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Variablen durchgeführt. Der Test wurde einseitig durchgeführt. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% festgelegt. Es wurden gleiche Varianzen für beide Verteilungen angenommen. $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die statistische Analyse wurde mittels IBM SPSS Statistics Version 21 (IBM Corporation) durchgeführt.

Für die Darstellung der Schmelzkurven Abbildung 11 wurde ein Kurvenfitting mittels der Boltzmann-Konstante durchgeführt. Die Berechnung wurde mit Origin Version 6 durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Transformation

Tabelle 2: Verwendete Medien für die Transformation

Bezeichnung	Zusammensetzung
TE Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,5
SOC Medium	0,1 mM EDTA
	2 % w/v Trypton
	0,5 % w/v Hefeextrakt
	8,6 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	20 mM Glukose auf 1000 ml MilliQ Wasser aufgefüllt

Die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurde mit Hilfe der Hitzeschock-Methode durchgeführt. Aus der Originallösung des Herstellers wurden 100 µl Rosetta™ 2(DE3)pLysS (in SOC Medium) langsam auf Eis aufgetaut. Nachdem 0,5 µl Plasmid (22,2 ng/µl für SE und 320 ng/µl für DE jeweils in TE-Puffer) hinzugegeben wurden, erfolgte die Inkubation auf Eis für weitere 10 min. Anschließend erfolgte im Heizblock ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s. Im Anschluss wurden die transformierten Zellen für 30 s auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 300 µl LB Medium wurde die Suspension bei 37°C für 30 min inkubiert und zum Animpfen einer Übernachtskultur verwendet.

2.4.2 Sequenzierungs-PCR für DE

Tabelle 3: PCR Master Mix für die Sequenzierung von DE

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

Tabelle 4: PCR Programm im Thermocycler für die Sequenzierung von DE

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

Für die Sequenzierung wurden die Primer so gewählt, dass die Stränge durch Überlappung der Basen lückenlos abgelesen werden konnten.

Folgende Primer wurden benutzt:

Rückwärtsprimer

BDEr: TTA GCG CAG TTC CCA CCA CTT CAG

Vorwärtsprimer

BDEf 1 TAA TAC GAC TCA CTA TAG G

BDEf 2 CTT AAT TTC CAA GGT CCT CGA

BDEf 3 ATG ATT GAT GGA GTG AAT AAG

BDEf 4 ACG GCA ATA TTT GGG GAT TGC

Nachdem alle Schritte des PCR Master Mix für die Sequenzierung (s. Tabelle 3) und das PCR-Programm (s. Tabelle 4) durchgeführt wurden, fand eine Aufreinigung der DNA mittels NucleoSEQ-Säule statt, um nicht aufgenommene *Dye Terminators* zu entfernen. Hierzu wurde zunächst das Pulver der Säule mit H₂O hydriert, anschließend H₂O abzentrifugiert, das gesamte Volumen aus der PCR (10 µl) auf die Säule gegeben, erneut

zentrifugiert und aufgefangen. Die nun aufgereinigten 10 µl des PCR-Produktes wurden im Vakuum für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden 25 µl Formamid hinzugefügt und das Gemisch im Heizblock bei 95°C für 3 min inkubiert.

2.4.3 Methode der DNA Sequenzierung von DE

Nach Zentrifugation mit der PicoFuge wurden die Proben (s. 2.4.2) ohne Luftblasen in Sequenziergefäße (*Genetic Analyser Sample Tubes*, 0,5 ml; ABI PRISM) gegeben. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode [87] oder auch Kettenabbruchsynthese genannt.

Die Sequenzierung von DE wurde durchgeführt, um die bereits veröffentlichte Sequenz für alle Versuche dieser Arbeit zu verifizieren.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression der Proteintoxine SE und DE erfolgte durch *E. coli* Zellen vom Stamm Rosetta™ 2(DE3)pLysS. Dieser Stamm enthält zusätzlich Gene für tRNAs, die in *E. coli* selten vorkommen. Dadurch wird die Translationseffizienz der eukariotischen Proteine verbessert.

Vor der Expression wurden die *E. coli* Zellen mit der Plasmid-DNA von SE und DE transformiert (s. 2.4.1). Im Anschluss wurden 400 ml LB_{Amp} mit gepickten Bakterienkolonien beimpft und die Bakterienkultur über Nacht im Warmluftschüttler bei 180 U/min geschüttelt. Am folgenden Tag wurden je 100 ml der Übernachtskultur in jeweils 300 ml LB_{Amp} überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD_{578 nm}) von 0,6–0,8 ca. 1,5–2 h inkubiert. Bei Erreichen selbiger wurde die Expression durch IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM initialisiert.

Nach 3 h wurden die Kulturen bei 5000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in PBS resuspendiert und bei –20°C bis zur Weiterverwendung eingefroren.

2.5.2 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Tabelle 5: PBS Konzentrationen

Abkürzung	Konzentration
PBS ₂₀	PBS mit 20 mM Imidazol
PBS ₅₀	PBS mit 50 mM Imidazol
PBS ₇₀	PBS mit 70 mM Imidazol
PBS ₂₅₀	PBS mit 250 mM Imidazol

Die Aufreinigung der Proteine (sowohl SE als auch DE) wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt. Es wurde eine NiNTA-Säule verwendet. Die transfizierten *E. coli* Zellen wurden aufgetaut oder direkt im Anschluss an 2.5.1 weiterverarbeitet. Dazu wurden die Zellen mittels Ultraschall (5 × 20 Impulse, Pulslänge 1 s, max. 50 % Leistung, auf Eis) aufgeschlossen. Nach Aufschluss der Zellen wurden die Proben bei 16100 × g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die mit PBS äquilibrierte NiNTA-Säule damit beladen. Es folgte die Spülung der Säulenmatrix mit je 5 ml PBS₂₀ und PBS₅₀, um unspezifisch gebundene Proteine herauszuwaschen. Die Eluate die durch PBS₅₀, PBS₇₀ und PBS₂₅₀ aus der Säulenmatrix gespült wurden, sind in 5 Fraktionen zu je 1 ml zur späteren Analyse aufgefangen worden. Beim Spülen mit PBS₇₀ (5 ml) wurde das Protein schon teilweise aus der Säulenmatrix herausgewaschen. Bei PBS₂₅₀ erfolgte die vollständige Elution des Proteins. Die Analyse der aufgefangenen Fraktionen erfolgte mittels eines SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (s. 2.5.3) und Färbung mit Coomassie (s. 2.5.4). Die Fraktionen, welche die Proteine ohne Spaltprodukte enthielten, wurden durch Gelfiltration in einer *Sephadex PD-10* Säule entsalzt und erneut aufkonzentriert. Anschließend wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 2.5.6) durchgeführt und das finale Protein erneut auf ein SDS-Gel geladen. Zum Vergleich wurde das Gel ebenfalls mit BSA-Standards in den Konzentrationen 0,075, 0,15, 0,225 und 0,3 mg/ml beladen. Das Protein wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Gel)

Tabelle 6: Reagenzien für SDS-Gele

Bezeichnung	Zusammensetzung
Laufpuffer	192 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS
4 × Probenpuffer	0,25 mM 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)

Zur Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-Gele nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet. Es erfolgte die Auftrennung mit 12 %igen Trenngelen in Kombination mit 4,5 %igen Sammelgelen.

Tabelle 7: Ansätze für Trenn und Sammelgele

Gießen des Gels: 5 × 830 µl Trenngel, 2 × 560 µl Sammelgel

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

Die Proben wurden auf 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen zu denaturieren. Je 15 µl des zu untersuchenden Proteins wurden mit 5 µl Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C gekocht. Danach wurden die Proben mittels Picofuge 30 s zentrifugiert und neben den Marker auf das Gel geladen. Die Dauer der Elektrophorese betrug 50 min bei 200 V und 30 mA pro Gel.

2.5.4 Färbung mit Coomassie

Tabelle 8: Reagenzien zum Färben von SDS-Gelen

Reagenz	Zusammensetzung
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

Die Gele zum Nachweis von SE und DE wurden nach der Elektrophorese für 30 min auf einem Schüttler mit Coomassie-Färbelösung eingefärbt. Nach kurzem Waschen mit H₂O wurden die Gele mit Entfärber für 1 h entfärbt. Dabei wurde die Entfärbelösung alle 7 min gewechselt, solange bis nur noch die eindeutigen Proteinbanden auf dem Gel sichtbar waren. Zur Trocknung der Gele wurden sie für 60 min in Fixierlösung gegeben und anschließend zwischen zwei H₂O getränkten Einmachfolien luftblasenfrei in eine Einspannvorrichtung geklemmt.

2.5.5 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Mittels Zentrifugation im Amiconfilter mit einem Massenausschlussfilter von 30 kDa wurden die Proteinlösungen aufkonzentriert. Die Zentrifugation erfolgte für 2–3 min bei 4°C und 3000 g bis das Volumen der Proteinlösung auf 2,5 ml (s. Fassungsvermögen der PD-10 Säule unter 2.5.2) vor und 0,5 ml nach der Entsalzung reduziert worden war.

2.5.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der aufgereinigten und aufkonzentrierten Proben wurde das *Advanced Protein Reagent Kit* von *Cytoskeleton* benutzt.

200 µl Färbelösung wurde jeweils mit 10 µl Proteinlösung, Wasser oder BSA Proteinstandard (in unterschiedlichen Konzentrationen: 0,075, 0,15, 0,225 und 0,3 mg/ml) in eine Mikroplatte pipettiert und mit einem Mikroplattenphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm ausgewertet. Anhand der BSA-Proteinstandards wurde die Proteinkonzentration berechnet.

2.5.7 Endotoxin-Entfernung

Im Rahmen der Proteinexpression (s. 2.5.1) wurden *E. coli*-Bakterien verwendet. Diese enthalten Endotoxine, welche wiederum der Gruppe der Lipopolysaccharide zugeordnet werden können. Um bei der Verabreichung der Proteintoxine SE und DE keine zusätzliche Immunreaktion der Tiere durch bakterielle Endotoxine hervorzurufen, wurden diese entfernt. Dazu wurde eine Phasenpräparation mit Triton X-114 durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden auf Eis (4°C) mit Triton X-114 (Endkonzentration 1 % (v/v)) gemischt. Bei unter 20°C dissoziieren die Lipopolysaccharide aus den Wänden der Bakterien durch Triton X-114. Sie befinden sich dann in homogener Lösung. Im beschriebenen Versuch wurde das Proteingemisch bei 4°C für 30 min gerührt bis ein homogenes Gemisch entstand.

Das Gemisch aus Protein und Triton X-114 wurde im Anschluss für 1 min in ein Wasserbad bei 37°C überführt. Es folgte die Zentrifugation bei $19.900 \times g$ für 10 min bei 25°C. Um die Endotoxinfreiheit der Probe nachzuweisen wurde der *Limulus Amebocyte Lysat* (LAL)-Test durchgeführt. (s. 2.5.8)

2.5.8 Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test [Bang, 1956]

Der LAL-Test wurde zum Nachweis der Proben auf Endotoxinfreiheit durchgeführt, um die Proben später bedenkenlos *in vivo* einsetzen zu können. In unserem Fall konnten die Proben als endotoxinfrei angesehen werden, sofern sich, im Gegensatz zur Positivkontrolle, keine Gelstruktur ausbildete.

2.5.9 Proteinaktivitätsbestimmung mittels Adenin-Release Assay

Tabelle 9: Reagenzien zur Bestimmung der N-Glykosidase Aktivität von SE und DE

Bezeichnung	Konzentration
Heringssperma-DNA	10 µg/µl (w/v)
DE/SE/BSA	60 pmol (v/v)
Puffer	50 mM Natriumacetat pH 4, 100 mM Kaliumchlorid

Um die N-Glykosidase-Aktivität von SE und DE zu bestimmen, wurden 60 pmol des Proteins (v/v) mit 10 µl Heringssperma-DNA vermischt und mit kaliumchloridhaltigen

Acetatpuffer bis auf ein endgültiges Volumen von 50 µl aufgefüllt. Im Anschluss wurde die Mischung für 1 h bei 50°C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Vorkühlen der Zentrifuge wurde das Gemisch in ein Zentrifugationsröhrchen mit einem Massenausschlussfilter von 3 kDa überführt und bei 4°C, 5000 × g für 45 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation gelangt nur das Adenin ($m \approx 135$ Da) durch den Filter. Die restliche DNA wird zurückgehalten. Je aktiver die N-Glykosidasen der Proteine sind, desto mehr Adenin wurde freigesetzt und konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen werden (Nanodrop). Bei 260 nm haben sowohl Nukleotide als auch die Nukleinbase Adenin ein Absorptionsmaximum. Im Vorfeld dieses Versuchs wurde eine Adeninkalibriergerade (Absorption als Funktion der Adeninkonzentration) erstellt. Anhand der Gerade konnte die Konzentration annähernd bestimmt werden. Als negative Kontrolle wurde eine Standardprobe von bovinem Serumalbumin verwendet, durch die keine Freisetzung von Adenin zu erwarten ist.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Tabelle 10: Reagenzien zum Auftauen, Einfrieren und Kultivieren in dieser Arbeit verwendeter Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin; 1 % Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B(A/A), 10 % FCS
Gelatinelösung	0,1 % Gelatine in MilliQ-H ₂ O
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium
2 × Einfriermedium	40 % FCS, 20 % DMSO; Sigma-Aldrich, 40 % reines Medium
Enzym zum ablösen der Zellen	Trypsin-EDTA; PAA
Reines Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium

Das Procedere des Auftauens und Einfrierens der verwendeten Zellen erfolgte für alle Zelllinien auf die gleiche Art und Weise. Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad zügig aufgetaut. Die Suspension wurde mit 14 ml Kulturmedium verdünnt und 5 min bei $134 \times g$ zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine sterile Zellkulturschale mit 10 ml Kulturmedium pipettiert.

Zum Einfrieren der Zellen wurde aus den 10 konfluenten Zellkulturschalen das Medium abgenommen und jede Schale mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin beträufelt und nach dem Ablösen vom Boden der Zellkulturschale durch wiederholtes Aufnehmen mit einer Pipette und 4 ml reinem Medium gründlich resuspendiert sowie von einander getrennt. Gleichzeitig wurde durch die Zugabe des Mediums die enzymatische Reaktion des Trypsins gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 25°C für 5 min bei $800 \times g$ zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 15 ml 2 × Einfriermedium resuspendiert und auf 1,5 ml Einfrier Röhrchen verteilt. Die Proben wurden mittels dem Einfriergerät Nicoool LM 10 heruntergekühlt, nach 40 min entnommen und bei -190°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.6.2 Kultivierung unterschiedlicher adhärenter Zellen

Alle verwendeten Zellen (s. 2.2.14) wurden unter den gleichen Bedingungen bei konstanter Temperatur von 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. In Monolayern weisen die Zellen alle ein adhärentes Wachstum auf. Um die Zelllinien NIH313 und HER14 besser kultivieren zu können wurde in die Kulturschalen vor der Aussaat der Zellen Gelatine-Lösung (0,1 % in MilliQ-H₂O) gegeben. Nach 5 min wurde diese wieder entfernt und die Zellen ausgesät.

Zur Subkultivierung der konfluenten Zellen wurde im ersten Schritt das Medium abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Es wurden 350 µl spezieller Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C hatten sich die Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst und konnten in Kulturmedium (1–2 ml, je nach Wachstumsdichte der Zellen) resuspendiert werden. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, um sie für die Zytotoxizitätsassays (s. 2.6.3) und die Echtzeit-Zellimpedanzmessung (s. 2.6.5) verwenden zu können.

2.6.3 Zytotoxizitätsassay

Vor den *In-vivo*-Versuchen wurden mit den jeweiligen Zelllinien Zytotoxizitätstests durchgeführt, um die Wirksamkeit der Kombinationstherapie zu testen. Sie folgten alle dem gleichen Schema. Zunächst wurden die Zellen in Kulturmedium in einer 96-Well-Platte (4000 Zellen/Well) ausgesät. Nach 24 Stunden folgte die Zugabe von 180 µl eines Saponins (1–5 µg/ml) und 10 min später einer SE/DE-Verdünnungsreihe von je 20 µl (0,0003–30 nmol). Zur Feststellung der Eigentoxizität von SE/DE als auch des Saponins wurde die jeweils andere Komponente durch Kulturmedium ersetzt. Das gesunde Wachstum der Zellen wurde in dafür vorgesehenen Reaktionskammern, in welchen nur Kulturmedium und Zellen inkubiert wurden, kontrolliert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h erfolgte die Auswertung der zellulären Toxizität mittels etabliertem MTT-Assay (s. 2.6.4).

2.6.4 MTT-Assay

Der MTT-Test dient der Messung der metabolischen Aktivität von Zellen zur Bestimmung des Wachstums, der IC_{50} -Werte und des Überlebens. Im beschriebenen Experiment wurde der Überlebensindex der Zellen auf eine Zellkontrolle (100 %) und eine negative Kontrolle ohne Zellen (0 %) bezogen. Somit ließ sich der Überlebensindex als Maß der Vitalität der Zellen berechnen.

Die verwendeten Zellen wurden wie unter 2.6.2 beschrieben kultiviert. Zu den Zellen wurde ohne das Abnehmen des Mediums 30 μ l MTT (5 mg/ml) hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37°C wurden das Gemisch abpipettiert und das gebildete Formazan mit 50 μ l Formazan-Solubilizer in Lösung gebracht. Die Absorption wurde im Mikroplattenphotometer bei $\lambda = 570$ nm gemessen.

Tabelle 11: Reagenzien für den MTT-Assay

Bezeichnung	Zusammensetzung
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltrazoliumbromid
Formazan-Solubilizer	205 ml Isopropanol, 25 ml 10 %SDS, 20 ml 1 M HCl

2.6.5 Echtzeit-Impedanzmessung mittels xCelligence-Reader

HER14, MDAMB231, TSA-EGFR, HCT116 und NIH3T3 sind die Zelllinien, welche im xCelligence-Reader untersucht wurden. Diese Methode beruht auf der Echtzeit-Impedanzmessung. Jede Zelle, sofern sie adhären wächst, gibt ein Signal an eine spezielle 96-Well E-Platte ab, auf deren Boden Gold-Mikroelektroden integriert sind.

Die E-Platten wurden mit 4000 Zellen pro Well und 100 μ l Kulturmedium bestückt und in den xCelligence-Reader in einem CO₂-Inkubator eingespannt. Die E-Platten haben daraufhin einen direkten Kontakt zwischen den Zellen und dem xCelligence-Reader hergestellt. Außerhalb des Inkubators wurde der xCelligence-Reader mit einem Computer verbunden der jedes Impedanz-Signal der Zellen in jeder einzelnen Vertiefung der 96 E-Platte *live* übertragen hat.

Bis zu einem Impedanz-Wert von 1–1,2 konnten die Zellen 24 h in den E-Platten wachsen. Danach erfolgte die Zugabe von 180 µl des Saponins SO1861 (2 µg/ml) in Kombination mit 20 µl SE und DE (10 nM). Um die Eigentoxizität des Saponins zu testen wurde die SE/DE-Komponente durch Medium ersetzt. In der Zellkontrolle wurde den Reaktionskammern nur 200 µl Kulturmedium hinzugefügt.

Nach weiteren 24–48 h (je nach Wachstum/Apoptose der Zellen) wurden die Ergebnisse des individuellen Zellwachstums und der Apoptoserate für den Versuch mithilfe der Software des Gerätes ausgewertet.

2.6.6 Westernblot zur Bestimmung der EGFR-Rezeptorexpression bei NIH3T3, TSA-EGFR, HCT116 und MDAMB231 Zellen

Um nachweisen zu können, ob die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien den humanen epidermalen Wachstumsfaktor auf ihrer Oberfläche und im Zellinneren exprimieren, wurde ein Westernblot durchgeführt. Hierbei sollte besonders die Expression von EGFR auf und in den nicht künstlich mit EGFR transfizierten Zellen (HCT116 und MDAMB231) begutachtet werden.

Tabelle 12: Reagenzien für die Zellyse und den Westernblot

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedien	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin; 1 % Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B(A/A), 10 % FCS Eurolone McCoy's 5a Medium mit L-Glutamin; 1 % Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B(A/A), 10 % FCS,
Ablösungs-Reagenz	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 2,3 mM; Roth Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium
Lysierungsdetergenz	1 % Triton X-100
Blocklösung	5 % Magermilchlösung in PBSB _{0,2} ; Roth
Primärantikörper	Rabbit Antikörper gegen EGFR EP38y; Abcam 0,038 mg/ml, Verdünnung 1:10000 in PBSB _{0,2}
Sekundärantikörper	GAR* Polyklonales Ziegen IgG gegen Kaninchen IgG mit Peroxidase konjugiert; DAKO 0,25 g/l, Verdünnung 1:2000 in PBSB _{0,2}

Bezeichnung	Zusammensetzung
Elektrochemolumineszenz (ECL)-Reagenz	Komponente A: 1 ml 100 mM Tris-HCl mit Luminol (250 mg/l) Komponente B: 100 µl p-Cumarinsäure, 1,1 mg/ml DMSO Komponente C: 1 µl Wasserstoffperoxid 30 %

Aus einer Menge von 1×10^6 Zellen wurde durch Zentrifugieren bei $200 \times g$ für 5 Minuten ein Pellet hergestellt. Die Pellets wurden in 50 µl Triton X-100 lysiert und im Anschluss für 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler lysiert. Danach wurden sie für 30 min und 4°C bei $16100 \times g$ zentrifugiert und mit dem Überstand eine Proteinbestimmung durchgeführt. Es wurden 30 µg Gesamtprotein auf einem 10 %igen SDS Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das SDS-Gel wurde in die Blotapparatur zwischen 2 Schwämmen, 6 Filterpapieren und der Blot-Membran übertragen und für 50 min bei 50 V geblottet.

Nach der Übertragung der Proteine auf die Blot-Membran wurde diese für 30 min mit der Blockierlösung inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht. Nach 4-maligem Waschen mit PBSB_{0,2} für 10 min wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 45 min. Nach erneutem 4-maligem waschen für 10 min mit PBSB_{0,2} wurde das ECL-Reagenz für 1 min über die Membran pipettiert, durch die photochemische Reaktion auf einem Röntgenfilm belichtet und der Film in der Entwicklermaschine entwickelt.

2.7 *Ex-vivo*-Methoden

2.7.1 Hämolyseaktivitätsbestimmung der Saponine mit und ohne Toxin

Saponine haben in höheren Konzentrationen eine hämolytische Wirkung. Um diese Wirkung genauer zu untersuchen wurde das hämolytische Potential der Saponine bestimmt und die einzelnen Saponine untereinander verglichen.

Nach Abnahme von Vollblut und Abzentrifugieren des Serums wurden humane Erythrozyten mit 10 ml 0,9 % NaCl gewaschen. Die Probe wurde bei $440 \times g$ für 10 min

bei 4°C erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschschrift wiederholt.

Mit NaCl wurde eine 4 %ige Erythrozytensuspension hergestellt. Diese wurde zu je 150 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Danach wurden jeweils 50 µl der unterschiedlichen Saponin-Fractionen in diversen Konzentrationen hinzupipettiert. Dadurch entstanden Endkonzentrationen von 15,6, 31,25, 62,5, 125 und 250 µg/ml. Auf einem Teil der gleichen 96-Well-Platte wurde zusätzlich zu den Saponin-Fractionen Dianthin-EGF in einer Konzentration von 10 µM hinzugefügt. Erythrozyten, die nur mit NaCl (0,9 %) behandelt wurden dienten als Negativkontrolle. Erythrozyten, die mit 5%iger Triton-X-100-Lösung behandelt wurden, dienten als Positivkontrolle. Die 96-Well-Platten wurden für 30 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss für 10 min bei 800 × g zentrifugiert.

Nachdem der Überstand aus jeder Reaktionskammer in eine flache Mikrotiterplatte überführt wurde, wurde der Prozentsatz an freigesetztem Hämoglobin aus der Erythrozyten durch Messung der Absorption berechnet. Dazu wurde ein Mikroplattenphotometer und eine Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm eingesetzt.

2.7.2 Hämatologische Untersuchungen

Um die hämolytische Wirkung der Saponine in den verwendeten Konzentrationen für spätere Experimente ausschließen zu können, wurde das Blut der Mäuse aus den Eigentoxizitätsversuchen im Blutausschrieb drei Tage nach Injektion der Saponine begutachtet. Hierzu wurde den Tieren nach Fixierung mit der Hand und zurückziehen der Gesichtshaut (Stauen der Vene) mit der Lanzett-Methode die *V. facialis* 3–4 mm dorsokaudal des 3. Haarwirbels am Unterkiefer punktiert. Das entnommene Blutvolumen betrug maximal 170 µl (maximal 10 % des Gesamtblutvolumens nach Empfehlung der GV-SOLAS) und den Tieren wurde nach der Entnahme eine Erholungsphase von 2 Wochen gewährt. Für den Ausschrieb wurden zwei unbeschichtete Objektträger verwendet, wobei auf den ersten im Abstand von 1 cm zu einem der schmalen Ränder ein Tropfen Vollblut aufgetragen wurde. Im Anschluss wurde sich von der freien Seite mit der Kante des zweiten Objektträgers in einem Winkel von 45° diesem Tropfen genähert bis er breiten Kontakt zu diesem gewonnen hat. Dann wurde in die andere Richtung zurückgestrichen, sodass das Blut ohne Druck wie eine Fahne ausgedünnt wurde. Die Blutzellen liegen dadurch vereinzelt und können so besser beurteilt werden.

Der Ausstrich wurde an der Luft getrocknet. Er wurde anschließend mit einer Schnellfärbung angefärbt. Dazu wurde im ersten Schritt ein Bad von 99,8 % Methanol, im zweiten Schritt ein Bad mit 1,25 g/l Eosin und im dritten Schritt ein Bad mit 1,5 g/l Azur verwendet. Der Objektträger wurde jeweils 5×1 Sekunde in jedes Bad getaucht. Anschließend wurde der Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet.

Die fertigen Ausstriche wurden unter dem Mikroskop bei 100 facher Vergrößerung mit Immersionsöl begutachtet und fotografiert.

2.8 *In-vivo*-Methoden

Die *In-vivo*-Experimente wurden mit der Unterstützung von Dr. Mayank Thakur durchgeführt. Dabei wurden die Tiere durch Dr. Thakur fixiert. Die Injektionen (i.v. und s.c.) erfolgten durch mich. Im Falle der Blutabnahmen wurde die Lanzette von Dr. Thakur geführt, wobei die Fixierung und das Aufnehmen des Blutes mit der Kapillare durch mich stattfand. Das restliche *Handling* (Erfassen des Gewichtes, Kontrolle des Tumorwachstums und des Allgemeinbefindens) der Tiere wurde durch mich durchgeführt.

Grundlage aller *In-vivo*-Experimente, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, ist der durch das Landesamt für Gesundheit und soziales genehmigte Tierversuch mit der Kennung G0260/10. Alle Versuche folgten dem im Antrag genehmigten Versuchsplan. Der Titel des angemeldeten Versuchs lautet „Prüfung einer Kombination von Saponinen und Fusionsproteinen zur Tumorthherapie in Mausmodellen“.

Die Versuche wurden an 6–8 Wochen alten weiblichen Balb/c und CD1 nu/nu-Mäusen sowie 4 Monate alten männlichen CD1 nu/nu-Mäusen durchgeführt. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen bei 21–24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 40–60 % gehalten. Sie unterlagen einem 12-Stunden hell/dunkel Rhythmus und wurden in Plexiglaskäfigen bei Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Nach Ankunft hatten die Tiere eine Woche Zeit, um sich zu akklimatisieren, bevor mit den Versuchen begonnen wurde.

2.8.1 Toxizitätsbestimmung von GS16, SA1641, SO1861 *in vivo*

Die Saponine GS16, SA1641, SO1861 wurden auf ihre Eigentoxizität in Balb/c-Mäusen getestet, nachdem sie erfolgreich *in vitro* eingesetzt wurden. Hierzu wurden in Gruppen von je 3 Tieren unterschiedliche Konzentrationen subkutan in den Nacken injiziert. Die unterschiedlichen Saponine wurden hierzu in je 100 µl PBS ohne Kalzium und Magnesium gelöst. Die Saponine wurden in Konzentrationen von 100, 60, 30 und 15 µg/ml pro Gruppe injiziert. In der ersten Stunde nach der Injektion wurden die Tiere permanent, im weiteren Verlauf alle zwei Stunden überwacht. Die Tiere wurden regelmäßig gewogen und hinsichtlich äußeren Verletzungen und Veränderungen des Allgemeinzustandes beobachtet. Hierzu zählten insbesondere struppiger werdendes Fell, Gewichtsverlust und Apathie. Diejenigen Tiere, bei denen eine solche Veränderung auftrat, wurden umgehend durch Euthanasie aus dem Versuch entfernt. 24 h nach Injektion der Saponine wurden zusätzlich Urinkontrollen durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere auf eine trockene, saubere Unterlage gesetzt und auf Spontanurin gewartet. Der Urin wurde mit einer Pipette aufgenommen und auf das Analysefeld der Teststreifen zum Schnelldiagnostik gegeben. Nach 120 sec konnte das Ergebnis abgelesen werden und es konnten erste Rückschlüsse auf eine mögliche Hämolyse gezogen werden. Nach Versuchende (28 Tage) wurden die Tiere euthanasiert und die Organe (Leber, Milz) hinsichtlich toxikologischer Veränderungen pathodiagnostisch und histologisch untersucht.

2.8.2 Maustumormodelle








Tabelle 13: verwendete Maustumormodelle



Saponine/Toxine	Dauer der Therapie [Tage]	Mausstamm	Alter bei Therapiebeginn [Wochen]	Gesamtlebensdauer [Tage]	Zelllinien	Tumormodell/Injektion	Menge der inj. Zellen
GS16 + SE (GS16: 15/30 µg/ Injektion; Saporin-EGF: 0.3 / 0.1 µg/ Injektion)	28	♀ Balb/c	6–8	70–84	TSA-EGFR (transfizierte Mauszellen)	solide, syngen/s.c.	$1,25 \times 10^5$
SA1641 + SE (SA1641: 30 µg/ Injektion; Saporin-EFG: 0.1 µg/ Injektion)	15	♀ Balb/c	6–8	70–84	TSA-EGFR (transfizierte Mauszellen)	solide, syngen/s.c.	$1,25 \times 10^5$
SO1861 + DE (SO1861: 30 µg/ Injektion; Dianthin-EGF: 0,35 µg/ Injektion)	15	♂ CD nu/nu	16–18	140–154	HCT116 (humane Kolonkarzinomzellen)	solide, Xenotransplantat/s.c.	2×10^6
–	–	♀ CD nu/nu	Nicht durchgeführt	192–206	MDA/MB231 (humane Mammakarzinomzellen)	disseminiert (+ solide), Xenotransplantat/i.v.	2×10^6

2.8.3 Kombinationstherapie im syngenem Maustumormodell

Die beiden Reinsaponine GS16 und SA1641 wurden in einer Kombinationstherapie mit Saporin-EGF (SE), einem Proteintoxin, getestet. Zu diesem Zweck wurden weiblichen Balb/c-Mäusen subkutan $1,25 \times 10^5$ TSA-EGFR-Zellen in 100 μ l PBS in die rechte Flanke injiziert. Nach 2–3 Tagen war ein solider Tumor palpabel, sodass mit der Therapie begonnen werden konnte. Die zu verabreichenden Substanzen wurden in 100 μ l PBS gelöst und appliziert. Da in der Literatur [62, 88] beschrieben ist, dass eine Präinkubation mit Saponinen die apoptotische Wirkung des Toxins auf Krebszellen verbessert, wurde das Saponin in einer Dosis von 15 oder 30 μ g/Injektion eine halbe Stunde vor Verabreichung des Toxins in die Nackenfalte der Tiere injiziert. Nach verstrichener Wartezeit wurde das Toxin in einer Konzentration von 0,3 bzw. 0,1 μ g/Injektion in unmittelbarer Umgebung des Tumors subkutan in die rechte Flanke injiziert. Im Fall von SA1641 wurde eine einzige Dosierung (30 μ g Saponin und 0,1 μ g Toxin) verwendet. Für die Kontrollgruppe wurde 100 μ l PBS als Injektionslösung verwendet. Den Tieren dieser Gruppe wurden im Versuch mit SA1641 nach Versuchsende die Tumoren chirurgisch entfernt, um eine erwartete Metastasierung von TSA-Zellen weiter zu untersuchen (2.8.5). Die Versuche wurden für eine Dauer von 28 Tagen durchgeführt. Im Fall von SA1641 wurde der Versuch nach 15 Tagen beendet, da die gewünschte Tumorrückbildung bereits zu diesem Zeitpunkt eingetreten war. Innerhalb dieser Zeitspanne wurde den Tieren alle 4 Tage die Saponin/Toxin-Kombination injiziert und das Tumorstadium sowie das Gewicht der Tiere täglich kontrolliert. Tiere bei denen ein Tumorscore > 5 (s. Tabelle 14) festgestellt wurde und somit eine Weiterbehandlung nicht zu vertreten war, wurden umgehend euthanasiert. Das Tumorstadium wurde *in vivo* und postmortal mit einer digitalen Schublehre gemessen. Dabei wurden Länge und Breite des Tumors gemessen. Da die Tumormorphologie als halbelipsoid angenommen wird, wurde die Größe nach der Formel $(\pi/6) \times (\text{Länge} \times \text{Breite})$ nach Feldmann *et al.* [3] in zwei Dimensionen berechnet. Die Tiere wurden nach Versuchsende durch Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurden den Tieren die Tumore und die Organe entnommen. Diese wurden gewogen, in Formalin (10 %, gepuffert) eingelegt und zur Weiterverarbeitung (nach Entwässerung) in Paraffin eingebettet. Die Organe und Tumoren wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Horst Dürkop vom Referenzzentrum für Lymphom- und Hämatopathologie Berlin histopathologisch ausgewertet.

Tabelle 14: Score Sheet erwarteter versuchsbedingter Symptome inklusive *Body Score*

Symptome	<i>Body Score</i>	Score
Kein tastbarer Tumor und <i>Body Score BSC3</i>	<p style="text-align: center;"><i>BSC3</i></p> 	0
Tumor ≤ 5 mm und Tumor verschiebbar und keine Ulzeration, keine Automutilation des Tumors und <i>Body Score BSC3</i>	<p style="text-align: center;"><i>BSC3</i></p> 	1
Kein tastbarer Tumor und <i>Body Score BSC4</i>	<p style="text-align: center;"><i>BSC4</i></p> 	1
Kein tastbarer Tumor oder Tumor ≤ 5 mm und <i>Body Score BSC2</i>	<p style="text-align: center;"><i>BSC2</i></p> 	2
Tumor > 5 mm und ≤ 10 mm und Tumor verschiebbar und keine Ulzeration, keine Automutilation des Tumors und <i>Body Score BSC3</i>	<p style="text-align: center;"><i>BSC3</i></p> 	2
Tumor > 5 mm und ≤ 10 mm und Tumor verschiebbar und keine Ulzeration, keine Automutilation des Tumors und <i>Body Score BSC2</i>	<p style="text-align: center;"><i>BSC2</i></p> 	3
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 cm ²	<p style="text-align: center;"><i>BSC3</i></p> 	3

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

Body Scoring: Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine nicht invasive Methode, bei der die Maus auf der Hand gehalten wird und mit dem Zeigefinger über das Iliosakralgelenk gestrichen wird. Anhand der Prominenz der *Spinae*, der Lendenwirbelkörper und Brustwirbelkörper, sowie der *Cristae iliaca* kann ein Rückschluss auf die Fettverteilung und so auf den Status der Tiere, der durch eine konsumtive Erkrankung beeinflusst werden kann, gezogen werden. Die Bewertung wurde gemäß der gezeigten Abbildungen durchgeführt. Ein Body Score BSC5 (fettleibig) wurde definitiv nicht erwartet und daher nicht aufgeführt.

2.8.4 Etablierung eines Metastasen Modells via Tumorresektion

In der Literatur wird beschrieben, dass TSA-Zellen nach Tumorresektion zur Spontanmetastasierung neigen [89]. Um unsere Proteintoxin/Saponin-Therapie auch für disseminierte Tumormodelle zu untersuchen, wurden die Tumoren chirurgisch entfernt. Für diesen Versuch wurden Tiere verwendet, die zuvor als Kontrolltiere benutzt wurden. Eine zusätzliche Gruppe wurde nur zum Zweck der Metastasenstudie und parallel zur Kontrollgruppe hinzugefügt. Allen Tieren wurden TSA-EGFR-Zellen ($1,25 \times 10^5$) subkutan in die rechte Flanke injiziert. Als Therapie bekamen sie lediglich 100 µl PBS. Bei einer Größe von 7–9 mm Durchmesser wurden die Tumore entfernt.

2.8.5 Chirurgische Tumorentfernung

Da eine Kooperation mit der Klinik für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie und dem daran angeschlossenen chirurgischen Forschungslabor (Campus CBF, Mittelbau, 2. OG, Raum 2555) besteht, war die Nutzung von Operations- und Vorbereitungsräumen gewährleistet.

Bis zu einem Körpergewicht von 22,0 g wurden die tumortragenden Mäuse mittels einer Injektion von 0,15 ml Rompun (Xylazinum 20 mg/ml) und 0,2 ml Ketanest 25 s (Esketaminhydrochlorid, 25 mg/ml) ad 1 ml NaCl 0,9 % narkotisiert. Bei einem Körpergewicht über 22,0 g wurden die Tiere mit 0,25 ml der selben Medikamentenmischung anästhesiert. die Tiefe der Narkose und die Ausbildung der Analgesie wurde durch die Prüfung des Lied- und des Zwischenzehenreflexes während der Narkose kontrolliert. Letzterer darf für schmerzhafte Eingriffe nicht mehr vorhanden sein. Danach wurden die Tiere in den Operationsraum überführt. Nach Fixierung der Tiere in Seitenlage wurde an der rechten Flanke, unmittelbar cranial des Oberschenkels, eine kutane Inzision von maximal 1 cm vorgenommen und der Tumor *lege artis* entfernt. Die Wunde wurde durch U-Hefte (Nadel-Faden Kombination: Vicryl 4.0) verschlossen und erneut desinfiziert. Die Tiere erhielten ebenfalls eine einmalige Injektion eines nicht steroidalen Antiphlogistikums mit antipyretischer und analgetischer Wirkung (Rimadyl (Carprofen 50mg/ml) 1:10 verdünnt; 0,1 ml in die Nackenfalte).

2.8.6 Auswahl und Etablierung geeigneter Xenotransplantatmodelle

Für die Etablierung der verschiedenen Tumormodelle wurden etablierte HCT116 Zellen (Humane Kolonkarzinom-Zellen) und MDAMB231 Zellen (humane Mammakarzinomzellen) eingesetzt. Beide Zelllinien weisen eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktors EGFR auf [5][6].

Dadurch waren sie für die Therapie sowohl mit SE als auch mit DE sensibel. Die beiden Zelllinien wurden CD1 nu/nu Mäusen injiziert. MDAMB231 Zellen wurden intravenös in die *V. caudalis mediana/lateralis* und HCT116-Zellen subkutan, dorsokaudal, zentral im Rückenbereich des Tieres injiziert. HCT-Zellen bewirkten ein lokales Tumorwachstum mit palpablen Tumoren nach 12 Tagen, sodass mit der Therapie begonnen werden konnte.

2.8.7 Xenotransplantatmodelle

2.8.7.1 HCT116-Zell-Modell

Die Kombinationstherapie am Xenotransplantatmodell wurde mit humanen Kolonkarzinom-Zellen (HCT116) mit DE in Kombination mit SO1861 durchgeführt. DE wurde für die *in-vivo*-Versuche eingesetzt, da die *in-vitro*-Ergebnisse dieser Arbeit erfolgreich verlaufen waren. Deswegen erschien der direkte Einsatz dieses Toxins im Xenotransplantatmodell sehr sinnvoll. Es wurde eine Anzahl von 2×10^6 Zellen subkutan injiziert. Nach 12 Tagen war ein solider Tumor palpabel. Auch SO1861 wurde schon vielversprechend getestet und deswegen für diesen Versuch ausgewählt [90].

Das Therapieschema wurde entsprechend dem Tierversuchsantrag vorheriger Versuche mit Mäusen angepasst. Da ein vorangeschrittenes menschliches Alter abgebildet werden sollte, wurde die Therapie erst mit 16–18 Wochen gestartet. Es erfolgte die Therapie für eine Dauer von 15 Tagen, da der gewünschte Effekt der Tumorreduktion bereits zu diesem Zeitpunkt eingetreten war. Mit dem Start der Therapie wurde den Tieren eine Dosis von 30 µg/Injektion SO1861 in die Nackenfalte und 5 min später 0,35 µg/Injektion DE in die unmittelbare Umgebung des Tumors injiziert. Die Kontrolltiere erhielten eine Dosis von 100 µl PBS. Um die Tumoren *in vivo* sichtbar zu machen wurden die Tiere einem PET-Scan und einem CT unterzogen (s. 2.9.2/0). Die Berechnung der Tumorgröße, die Abschätzung des Leidensdruckes und das Ende des Versuchs wurden wie unter 2.8.3 beschrieben durchgeführt.

2.8.7.2 MDAMB231-Zell-Modell

Das Modell zur Etablierung eines disseminierten Tumormodells wurde mit der humanen Mammakarzinomzelllinie MDAMB231 ohne den Einsatz einer Therapie entwickelt.

Es wurde eine Anzahl von 2×10^6 Zellen intravenös injiziert. Die Effekte der Injektion konnten erst nach insgesamt 192–206 Tagen beurteilt werden. Zu diesem Zeitpunkt sind am Schwanz einiger Tiere unmittelbar in der Nähe der Injektionsstelle der Krebszellen Tumoren aufgetreten. Es konnte davon ausgegangen werden, dass sich im restlichen Teil des Tierkörpers besonders in der Lunge Metastasen ausgebildet haben. Die Tiere wurden nach Euthanasie zur Sichtbarmachung dieser Metastasen histologisch ausgewertet (s. 2.8.3. und Ergebnissteil).

2.9 *In vivo* bildgebende Methoden

Diese Versuche fanden in Kooperation mit Prof. Dr. Winfried Brenner, Klinik für Nuklearmedizin am Small Animal Imaging Centre (SAIC), Charité-Universitätsmedizin Berlin, CVK statt. Frau Dr. vet. Med. Nicola Beindorff führte mich in die Gerätetechnik (CT und PET). Die Messungen sowie weitere Aufgaben (Injektion, Narkoseeinleitung und ihre Überwachung) erfolgten durch mich. Die Auswertung der aus CT und PET überlagerten Bilder wurde unter der Betreuung von Dr. rer. nat. Ralph Buchert (Klinik für Nuklearmedizin, Campus Charité Mitte) unter Anwendung der entsprechenden Gerätesoftware durchgeführt.

2.9.1 Computertomographie (CT)

Bevor die Tumore mittels PET-Scan sichtbar gemacht werden konnten, wurde, ebenfalls bereits unter Anästhesie, eine CT-Aufnahme von den Tieren angefertigt. Nach dieser Aufnahme wurde die Position der Tiere nicht mehr verändert, um die Lokalisation der Tumore im Tier anhand der CT-Bilder nachvollziehen zu können. Dies war möglich, da nicht das Tier allein, sondern die gesamte Lagerungskonstruktion von dem einen in das andere Gerät übertragen wurde und die Tiere somit exakt die bereits eingenommene Position beibehalten konnten. Das CT-Gerät eignet sich für solche Untersuchungen besonders gut, da im Vergleich zum herkömmlichen Röntgengerät ein besserer Weichteilkontrast sowie die Dreidimensionalität der durch den Computer zusammengeführten einzelnen Schnittbilder gegeben ist.

2.9.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Die Synthese der verabreichten 2-Fluor-2-desoxy-D-glucose (^{18}F FDG) fand unter standardisierten Bedingungen in Zusammenarbeit mit der Firma Eckert & Ziegler f-con Deutschland GmbH statt, die das SAIC routinemäßig mit ^{18}F FDG beliefert.

Die Tiere aus dem Versuch mit HCT116-Zellen (s. 2.8.7) wurden für die Messungen mit PET genutzt. Nach einer erfolgreichen Anästhesie mittels Isofluran wurde den Tieren ^{18}F FDG in die *V. caudalis mediana* oder *lateralis* injiziert und anschließend (in der Zeit der Akkumulation des ^{18}F FDG) ein CT-Scan durchgeführt. Die Menge des applizierten ^{18}F FDG wurde vorher im Aktivimeter gemessen. Pro Tier wurden ca. 20-40 mBq appliziert. Nach

Injektion des ^{18}F FDG wurde die leere Spritze erneut im Aktivimeter gemessen und die Restaktivität der Spritze von der Gesamtaktivität abgezogen. Nach einer Wartezeit von 20 min akkumulierte soviel ^{18}F FDG im Tumor, sodass eine Sichtbarmachung möglich war und der PET-Scan durchgeführt werden konnte. Der Zeitpunkt der richtigen PET-Aufnahme wurde vorher durch eine Langzeitmessung in Erfahrung gebracht.

2.10 Histopathologische Methoden

Die Vorbereitung der histologischen Proben (Entwässerung und Paraffineinbettung) wurde durch mich durchgeführt. Die Weiterverarbeitung (Schneiden der Paraffinblöcke und Färben der Schnitte) wurde durch eine technische Assistentin des Referenzzentrums für Lymphom und Hämatopathologie, Berlin durchgeführt. Die pathologische Auswertung meiner Proben wurde durch Prof. Dr. Horst Dürkop (Referenzzentrum für Lymphom und Hämatopathologie, Berlin) durchgeführt.

2.10.1 Fixierung der Organe und Tumore in Formalin und Einbettung in Paraffin

Nach dem Tod der Tiere wurden die relevanten Organe (Leber, Milz, Nieren, Herz, Tumorgewebe, Haut) entnommen, gewogen und in beschriftete Einbettkassetten gelegt. Die Einbettkassetten wurden für 24–48 h in 10 % neutral gepuffertem Formalin (4 % Formaldehyd) fixiert. Das Gewebe wurde mit heißem Paraffinwachs getränkt, welcher bei Abkühlung erstarrt.

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

Das für die spätere Verarbeitung wird das Gewebe mit heißem Paraffinwachs getränkt, welcher bei Abkühlung erstarrt. Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, muss das Gewebe vorab in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden (s. 2.10.2).

Tabelle 15: Schritte der Entwässerung; B1 = Behälter 1, B2 = Behälter 2

Zeit	Entwässerungsmedium
60 min	Ethanol, 70 % in H ₂ O, B1
60 min	Ethanol, 70 % in H ₂ O, B2

Zeit	Entwässerungsmedium
60 min	Ethanol, 80 % in H ₂ O, B1
60 min	Ethanol, 80 % in H ₂ O, B2
60 min	Ethanol, 96 % in H ₂ O, B1
60 min	Ethanol, 96 % in H ₂ O, B2
120 min	Ethanol, 100 %, B1
120 min	Ethanol, 100 %, B2
60 min	Xylol, B1
120 min	Xylol, B2
4 h	Paraffin, 55°C–65°C, B1
8-16 h	Paraffin, 55°C–65°C, B2

Nach der Entwässerung der Gewebeproben wurden diese eingeblockt. Die Organe wurden in Aluminium-Gießformen gelegt und diese mit heißem, flüssigem Paraffin aufgefüllt. Die Einbettkassette mit den Organen wurde auf die Aluminium-Gießform aufgesetzt. Nach Erkalten des Paraffins konnte der Aluminium-Teil entfernt werden. Immunhistochemische Bestimmung des EGFR-Levels von HCT 116-Zell-Tumoren

Die immunhistochemische Färbung der histologischen Schnitte zum Nachweis der EGFR Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumore wurde im Experiment mit männlichen CD1 nu/nu Mäusen und SA 1861 durchgeführt. Es wurde das EGFR pharmDx™Kit der Firma DAKO verwendet und die Färbungen entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss konnten die angefärbten Schnitte quantitativ ausgewertet werden.

2.11 Chiroptische spektroskopische Methoden

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie wurde am Institut für Chemie und Biochemie durchgeführt. In die Gerätetechnik wurde ich von Frau Kristin Folmert eingewiesen. Die anschließenden Messungen wurden durch mich durchgeführt. Frau Folmert half mir zusätzlich bei der Auswertung der Spektren und deren Interpretation.

Der Zirkulardichroismus ermöglicht eine strukturelle Aufklärung chiraler optisch aktiver Moleküle durch die Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD).

CD-Signale von Proteinen treten vor allem in zwei Spektralbereichen auf. Signale im kurzwelligen UV-Bereich von 170 bis 250 nm (der so genannten Amid-Region) sind vor allem auf die Peptidbindung zurückzuführen, während die Signale im langwelligen UV-Bereich von 250 bis 300 nm von den aromatischen Aminosäuren stammen. Die CD-Spektren im fernen UV-Bereich können verwendet werden, um den Anteil bestimmter Sekundärstrukturelemente im Protein zu bestimmen. Die α -helicalen Bereiche geben eine stark ausgeprägte, sehr charakteristische Bande im kurzwelligen UV-Bereich, während andere Sekundärstrukturelemente, wie z. B. β -Faltblätter, etwas weniger deutliche Signale geben (s. Abbildung 7).

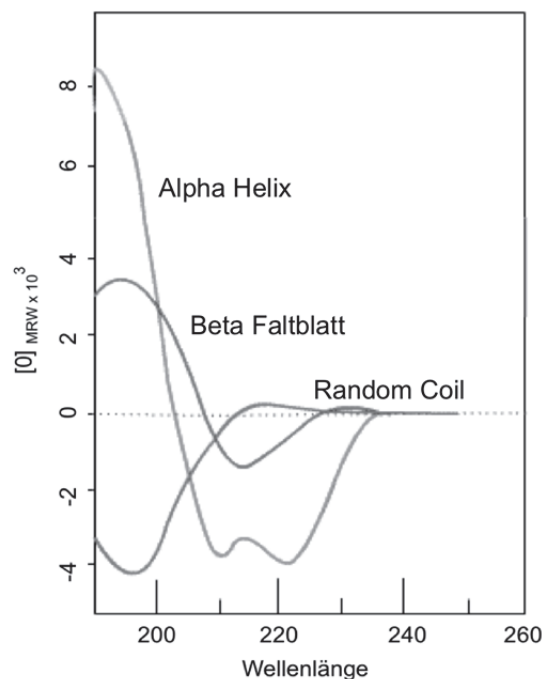


Abbildung 7: Das CD-Spektrum der Sekundärstrukturelemente α -Helix, β -Faltblatt und "Random Coil" (am Beispiel Poly-L-Lysin) Quelle: ChemgaPedia®.

Für diese Arbeit wurden die beiden Proteine DE und SE unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen und in Kombination mit und ohne SO1861 untersucht. Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-810 Spektropolarimeter mit angeschlossenen HAAKE WKL Umwälzkühler der Firma Haake aufgenommen. Die Küvetten wurden durch ein Jasco PTC-423S Peltier Type Temperatur-Kontrollsystem auf einer konstanten Temperatur von 20°C gehalten. Es wurden Quarzglas-Küvetten (Suprasil) der Firma Hellma verwendet. Die Küvetteschichtdicke betrug 2 mm und das Probenvolumen 350 μ l Proteinlösung. Die Proteinlösungen von DE und SE wurden in einer Konzentration von 10,3 μ M in PBS

miteinander verglichen. Um die Stabilität von DE und SE besser vergleichen zu können, wurden CD-Messungen nach Lagerung der Proteine bei 24 h Raumtemperatur, 24 h bei 4°C und 24 h bei -20°C durchgeführt. Da der Einfluss von SO1861 auf SE und DE hinsichtlich struktureller Veränderungen näher untersucht werden sollte, wurde das Saponin in einer gleichmolaren Konzentration zu DE und SE unmittelbar nach dem Auftauen der Proben hinzugegeben. Zusätzlich zu den Stabilitätsmessungen wurden Schmelzkurven beider Proteine in 0,5°C-Schritten gemessen, um einen eventuell vorhandenen Unterschied der Schmelzpunkte feststellen zu können. Die Schmelzkurven wurden in einem Temperaturspektrum von 0–100°C bei einer Wellenlänge von 215 nm im selben Gerät gemessen.

Tabelle 16: Messparameter der Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Messparameter	Wert
Startwellenlänge	240 nm
Endwellenlänge	195 nm
Schrittauflösung	0,5 nm
Scangeschwindigkeit	100 nm/min
Akkumulation	3
Bandbreite	2 nm
Rücklaufzeit	4 s
N ₂ -Fluss	mind. 3 l/min

3 Ergebnisse

3.1 DE und SE im Vergleich

3.1.1 Expressionslevel und Stabilität in der Gelelektrophorese

Das erste Teilziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welches der beiden Proteine DE und SE sich für die Durchführung weiterer *In-vivo*- und *In-vitro*-Experimente als besser erweisen würde. Hierzu wurden die beiden Proteine hinsichtlich pro Expression gewinnbaren Menge und ihrer Stabilität untersucht.

In Gilabert-Oriol *et al.* 2013 [43] wird beschrieben, dass die Menge an DE ($4.10 \pm 0,06$ mg/L Bakterienlösung bei $A_{600\text{nm}} = 0.9$) signifikant (t-test $p \leq 0,05$) höher ist, als die Menge an SE ($2,36 \pm 0,22$ mg/L Bakterienlösung bei $A_{600\text{nm}} = 0.9$). Das Expressionssystem, welches für die Gewinnung beider Proteine in identischer Art und Weise genutzt wurde, schafft folglich für DE eine 1,7 fach höhere Menge an Protein. Dieser Umstand war die Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten, weiteren Untersuchungen an DE und SE.

Für diese Untersuchungen wurden SDS-Gele, Adenin-Release Assays (Messung der Enzymaktivität) und die Methode der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) genutzt.

SDS-Gele bewirken eine Auftrennung der Proteine nach der Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Somit konnten die beiden zu untersuchenden Proteine im Hinblick auf die Masse, die pro Expression gewonnen wurde und auf ihre Zerfallseigenschaften hin beurteilt werden.

Bezüglich der Messung der Enzymaktivität von Ribosomen inaktivierenden Proteinen (DE und SE) ermöglichen die veröffentlichten Methoden nur eine semiquantitative Bestimmung oder erfordern eine sehr aufwendige apparative Einrichtung (s. a. 4.1). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Adenin-Quantifizierungsmethode genutzt, mit der die Enzymaktivität der RIP's in einem einzigen Reaktionsansatz bestimmt werden konnte.

Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie wurde verwendet, um nähere Aussagen über die Sekundärstruktur der verwendeten RIP's treffen zu können. Diese Methode wurde vor allem genutzt weil sie ein Abbild des Faltungszustands des Proteins erlaubt und so eine

Aussage über DE und SE hinsichtlich ihrer Konformation mit und ohne Zugabe von Saponin ermöglichte.

Während der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie (s. 2.5.2) konnten SE und DE bei einer Konzentration von 62 mM Imidazol eluiert werden (in den letzten beiden der insgesamt fünf Elutionsschritte bei dieser Konzentration). Die Elution setzte sich bis zu einer Konzentration von 125 mM fort (in den ersten drei der insgesamt fünf Elutionsschritte bei dieser Konzentration).

Vergleicht man die Menge an Protein, die man bei einer Expression unter 37°C - Bedingungen erhält, stellt man fest, dass die Menge an DE im Vergleich zu SE deutlich höher ist (Abbildung 8).

Um die Stabilität von SE mit der von DE zu vergleichen, wurden die beiden Proteine für einen bestimmten Zeitraum unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt. Anschließend wurden je 5 µl der beiden Proteine in die Taschen eines SDS-Gels geladen und die Elektrophorese gestartet. Es wurde deutlich, dass bei SE, welches für eine halbe Stunde einer Temperatur von 24°C ausgesetzt war, ein höherer Zerfall zu sehen (s. Abbildung 8) war. DE hingegen ist bei gleichen Bedingungen stabiler.

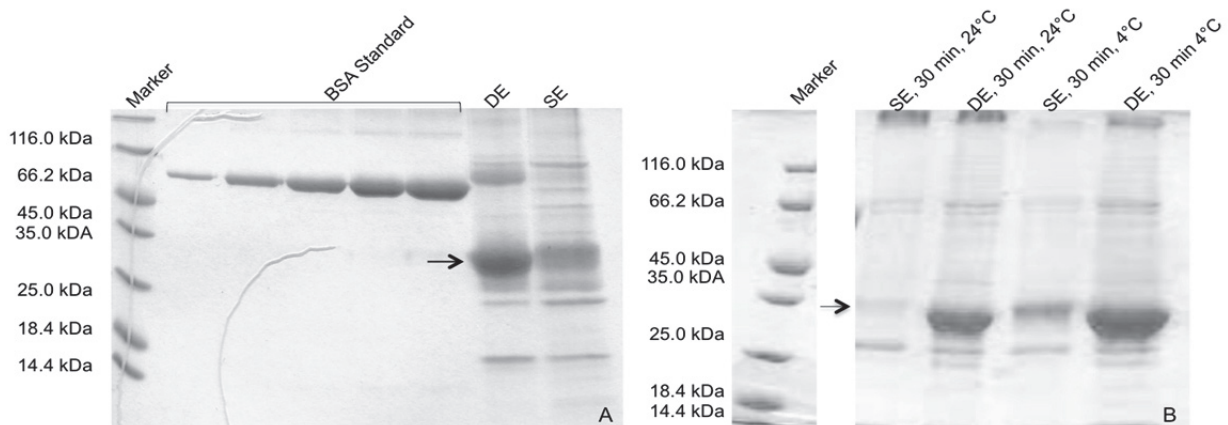


Abbildung 8: (A) BSA-Standards in den Konzentrationen 0,075, 0,15, 0,225, 0,3, 0,375 mg/ml als Hinweis auf die Konzentration der Proben DE und SE (Pfeil) auf einem SDS-Gel (12%). DE und SE wurden identisch exprimiert. Das Gel wurde mit jeweils 5 µl unverdünntem Protein, aus den letzten zwei mit 62 mM und den ersten drei mit 125 mM Imidazol eluierten und gepoolten Fraktionen, beladen. (B) DE zeigt eine Konzentration von ca. 0,375 mg/ml, SE 0,15-0,225 mg/ml Protein. Degradation der beiden Proteine nach 30 min bei 24°C; die mit einem Pfeil markierte Bande ist nach 30 min bei 24°C im Fall von SE kaum noch sichtbar.

In einem weiteren Test wurde die N-Glykosidase-Aktivität (s. 2.5.9) der beiden Proteine verglichen. Um die enzymatische Aktivität von DE und SE korrekt beurteilen zu können, wurde zunächst eine Standard-Kurve für Adenin erstellt. Bei der Kalibrierung des Assays zeigte die Messung von Adenin eine strikte Linearität in einem Messbereich von 18,75 μM –600 μM .

Bei der anschließenden Messung von DE und SE wurde nachgewiesen, dass die spezifische enzymatische Aktivität zur Freisetzung von Adenin aus Heringssperma-DNA von DE höher ist als jene von SE (Abbildung 9).

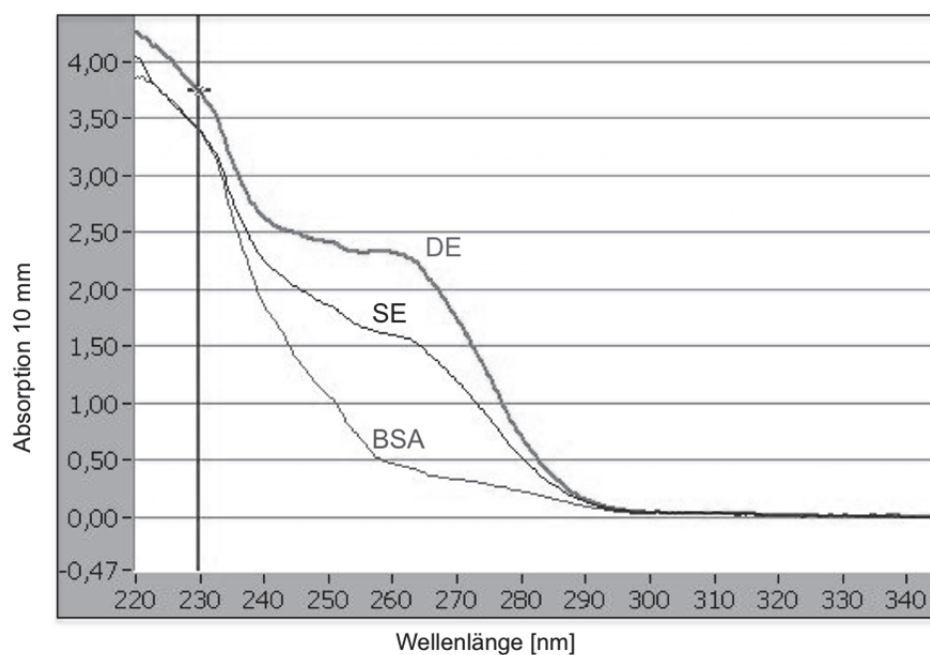


Abbildung 9: Diagramm eines Adenin-Release Assays. Gemessen wurde die Freisetzung von Adenin aus Heringssperma-DNA durch DE und SE mittels eines Nanodrop Spektrophotometers, Adenin durch DE betrug 115,7 pmol Adenin/pmol Toxin/h im Vergleich zu 79,9 pmol Adenin/pmol Toxin/h bei SE. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde als Negativkontrolle verwendet.

3.1.2 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Mit der Technik der Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) konnte im Gegensatz zur Gelelektrophorese (s. Abbildung 8) nicht nachgewiesen werden, dass SE bei einer Exposition über 24 h von 24°C schneller zerfällt als DE. In Abbildung 10 wurde übersichtshalber die β -Faltblattstruktur von Dianthin-EGF dreidimensional umgesetzt. In Abbildung 11 wurden die Einwirkungen der unterschiedlichen Temperaturexpositionen auf DE und SE graphisch dargestellt. Die Graphen sollten im Bereich von 205-240 nm betrachtet werden. Die Kurven im Bereich von 190-205 nm können als Hintergrundrauschen gelesen werden. Beim Vergleich der Kurven der Proteine (gemessen nach 24 h Lagerung bei -20°C, 4°C und 24°C) wird deutlich, dass bei DE ein Unterschied zwischen den Lagerungsbedingungen im CD-Spektrum erkennbar ist. SE zeigt keine Konformationsänderung die durch die unterschiedliche Lagerung im CD-Spektrum sichtbar wäre.

In Abbildung 12 konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von SO1861 einen Einfluss auf die Konformation der beiden Proteine haben könnte. Es wird vermutet, dass durch die Zugabe des Saponins eine Änderung der Sekundärstruktur der Proteine von einem höheren Anteil an β -Faltblattstrukturen zu einem höheren Anteil von α -Helixstrukturen stattgefunden haben könnte. β -Faltblattstrukturen sind im Bereich von 195 nm (Maximum) und 215–220 nm (Minimum) zu erwarten [90]. Vor der Zugabe des Saponins sind diese Charakteristika für SE und DE sichtbar. α -Helixstrukturen hingegen sind durch ein charakteristisches Maximum bei 195 nm und zwei charakteristische Minima bei 208 nm und 222 nm gekennzeichnet [91]. Nach Zugabe des Saponins befinden sich die beiden Minima bei 206 nm und bei 220 nm. Es ist also im Vergleich zu den Standardwerten zu einer Verschiebung in Richtung des geringeren Wellenlängenbereichs gekommen. Wahrscheinlich werden sowohl bei SE als auch DE *random-coil*-Anteile mit erfasst, was ein Verschieben der Graphen erklären könnte. Grundsätzlich lässt sich mit der Methode der CD-Spektroskopie mit einer Sicherheit von 65 % zwischen α -Helix und β -Faltblattstrukturen unterscheiden, da immer nur ein Querschnitt über die vorliegenden Sekundärstrukturen abgebildet werden kann [90].

In Abbildung 11 sind die Schmelzkurven beider Proteine dargestellt. Die Messungen wurden innerhalb einer Temperaturspanne von 20°C bis 100°C bei einer Wellenlänge von 215 nm mit einem Spektropolarimeter durchgeführt. Es wird deutlich, dass sich die Schmelzpunkte der beiden Proteine um 1°C unterscheiden.

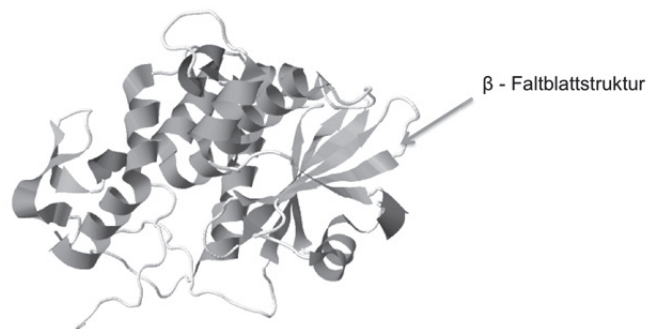


Abbildung 10: Dreidimensionale Darstellung der Struktur von Dianthin-EGF. Das mit einem roten Pfeil gekennzeichnete Areal stellt die β -Faltblattstruktur des Proteins dar.

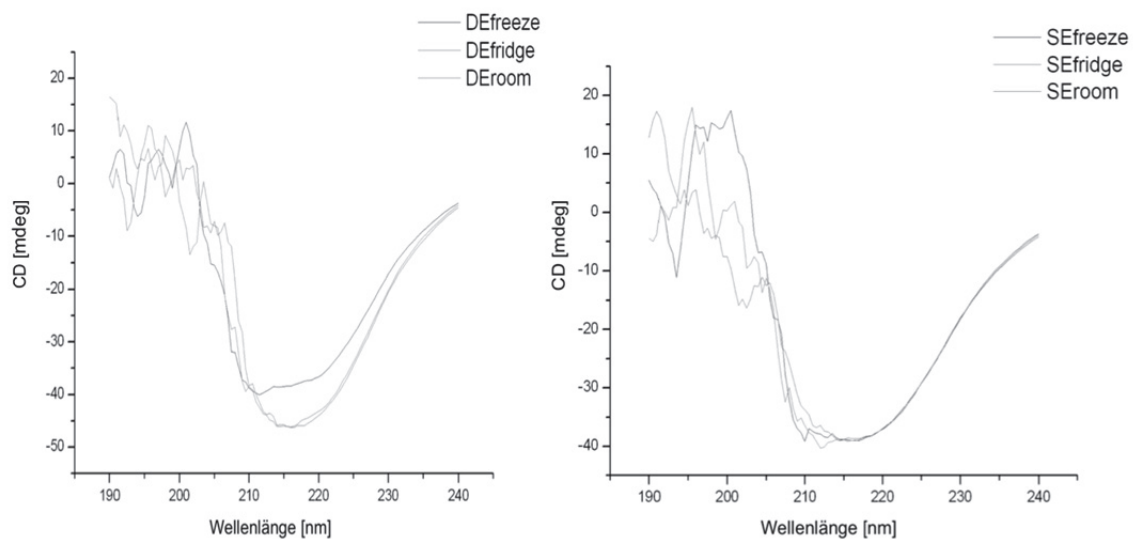


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt das CD-Spektrum von Dianthin-EGF und Saporin-EGF nach Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Messungen wurden bei beiden Proteinen mit der gleichen molaren Konzentration (10,03 nM) durchgeführt. Die Proteine wurden in 350 μ l 1 \times PBS (pH 7,4) gelöst und eine 2 mm Quarzglasküvette verwendet. Die Messungen wurden unter den Parametern wie unter 0 beschrieben durchgeführt. Die Abkürzungen DEfreeze, DEfridge und DERoom sowie SEfreeze, SEfridge und SERoom bedeuten, dass die beiden Toxine jeweils bei Temperaturen von -20°C (freeze), 4°C (fridge) und 24°C (room) getestet wurden.

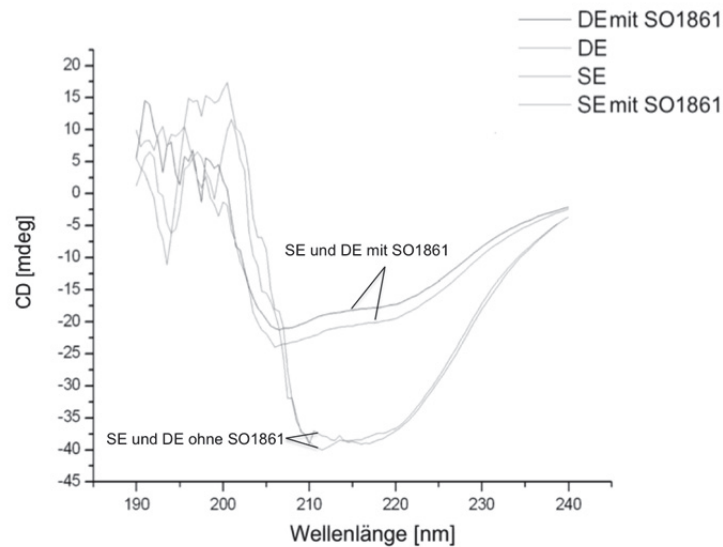


Abbildung 12: Diese Abbildung zeigt wie in Abbildung 11, die Graphen der Zirkulardichroismus-Spektroskopie. Die Messungen wurden auch hier bei beiden Proteinen mit der gleichen höchstverfügbaren molaren Konzentrationen von SE und DE (10,3 nM) durchgeführt. Die Proteine wurden in 350 μ l 1 \times PBS (pH 7,4) gelöst und eine 2 mm Quarzglasküvette verwendet. Die Messungen wurden ebenfalls unter den Parametern wie unter 0 beschrieben durchgeführt. Für diesen Versuch zusätzlich das Saponin SO1861 in einer gleichmolaren Konzentration (10,3 nM) SO1861 hinzugefügt und die Messung erneut gestartet.

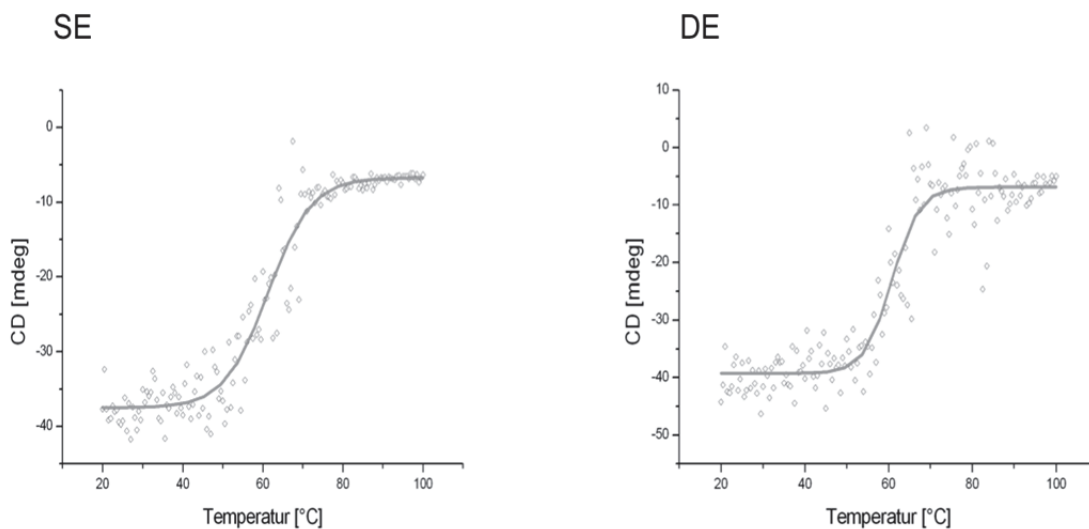


Abbildung 13: Schmelzkurven von DE und SE mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie aufgenommen. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 215 nm. Die Konzentration beider Proteine betrug 10,3 nM. Der Wendepunkt der Kurve von DE liegt bei 60,31 °C, von SE bei 61,31 °C. Beide Kurven zeigen einen sigmoidalen Verlauf.

3.2 Bestimmung der EGFR-Expression

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die ausgewählten Zelllinien auf ihre Eignung für die geplanten Versuche mit zielgerichteten Tumortoxinen hin zu untersuchen. Da ein erfolgreicher Versuch *in vivo*, also die Eliminierung der Tumoren in der Maus, maßgeblich von der Zahl der EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen abhängt wurden die verwendeten Zelllinien zunächst sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* auf ihre EGF-Rezeptorexpression getestet.

3.2.1 *In vitro*

Zur Bestimmung der Rezeptorexpression von EGFR der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt (s.2.6.6).

In Abbildung 14 ist ein Blot dargestellt, mit dem insbesondere die Expression des humanen, epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors der nicht artifiziell transfizierten Zelllinien (HCT116 und MDA-MB231) verdeutlicht werden soll. Die Überexpression von EGFR auf der Oberfläche dieser Zelllinien ist die Voraussetzung dafür, dass die zielgerichtete Therapie mit DE und SE funktionieren kann, da die Proteintoxine an diesen Rezeptor binden und in Kombination mit Saponin SO1861 die Apoptose der Tumorzellen bewirken. Für alle Zelllinien außer der EGFR-negativen Zelllinie (NIH3T3) konnte eine Überexpression von EGFR nachgewiesen werden. Dies wird durch die Bande im Westernblot bei 175 kDa, der molekularen Masse von EGFR, deutlich.

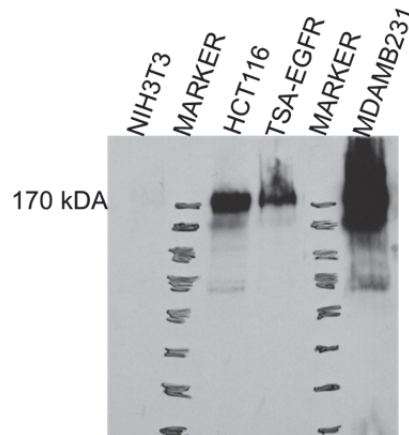


Abbildung 14: In dem dargestellten Westernblot wurde 30 µg Gesamtprotein der unterschiedlichen Zelllinien auf ein 10 % SDS-Gel geladen und nach elektrophoretischer Trennung bei 50 V für 50 min geblottet. Die Belichtungszeit für den Blot betrug 1 min. Als Primärantikörper wurde der Rabbit Antikörper gegen EGFR EP38y; Abcam 0,038 mg/ml, mit einer Verdünnung von 1:10000 in PBSB_{0,2} verwendet.

3.2.2 *Ex vivo*

Zum Nachweis Expressionslevel des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) in den Tumoren der Kontroll- und Therapiegruppen der jeweiligen Tierversuche wurden histologische Schnitte angefertigt. Diese wurden im Anschluss eingefärbt, um die Gewebe besser differenzieren zu können. Es wurden sowohl HE-Färbungen als auch immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die immunhistochemische Färbung der Tumoren von Kontrolltieren, die keine Therapie erhalten haben. Durch diese Färbung wurde besonders die prozentuale Anzahl von EGF-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche untersucht. Bei allen Tieren konnte nachgewiesen werden, dass 90–100% der Tumorzellen EGF Rezeptoren exprimieren. Dies wird durch die braune Färbung der Zellmembranen sichtbar und ist in Abbildung 15 mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Durch diese Erkenntnis wurde sichergestellt, dass die zielgerichtet rezeptorspezifische Therapie z.B. mit DE und SO1861 erfolgreich durchgeführt werden konnte.

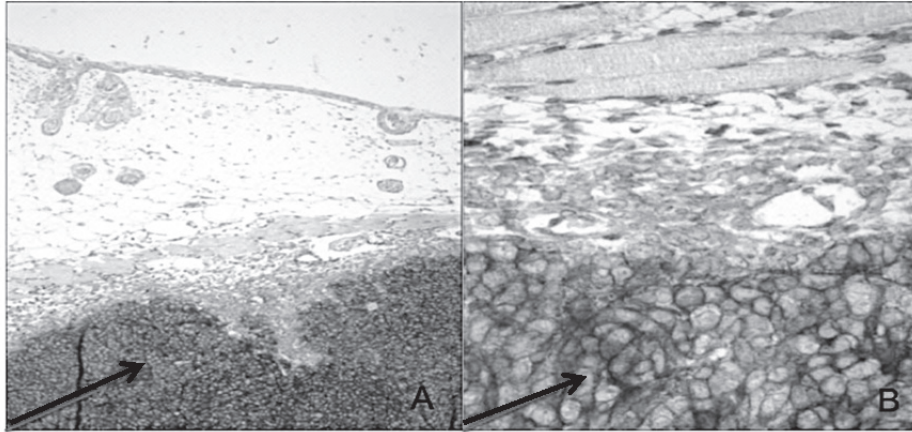


Abbildung 15: Immunhistochemische Färbung von HCT116-Zell-Kontrolltumoren aus einem Versuch mit nu/nu Mäusen. Es wurde ein EGFR pharmDx™Kit der Firma DAKO verwendet. Die Abbildung zeigt die Tumoren nach Euthanasie der Tiere und Resektion der Tumore. Die mit Pfeilen gekennzeichneten dunkelgrauen Zellmembranen signalisieren, dass 90–100% der Tumorzellen EGF Rezeptoren exprimieren. Vergrößerung: 25fach (A) und 150fach (B)

3.3 Charakterisierung und Auswahl der Saponine

Trotzdem es sich bei dem für den ersten Einsatz an Balb/c-Mäusen ausgesuchten Saponin um ein Reinsaponin handelt, sollte die Reinheit GS16 vorher überprüft werden. Hierfür wurde eine Massenspektrometrie (ESI-TOF-MS) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein anerkanntes Verfahren zum Messen der Masse von Atomen oder Molekülen. Darüber hinaus sollten die Saponine im Hinblick auf ihre Verwendung am Tier auf ihre hämolytischen Eigenschaften getestet werden. Hierzu wurde ein bereits etablierter Hämolyse-Assay verwendet der die prozentuale Hämolyse an Erythrozyten bestimmt. Somit lässt sich die hämolytische Aktivität der Saponine beurteilen.

3.3.1 ESI-TOF-MS

Die Messungen wurden von der Serviceabteilung Massenspektrometrie der FU-Berlin Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie durchgeführt. Das isolierte Saponin wurde mittels eines Agilent 6210 ESI-TOF-MS Gerätes analysiert. Die Scans wurden im Negativ-Modus durchgeführt. Im Ergebnis lässt sich erkennen, dass der Peak im Bereich von GS16 sehr deutlich ist, was auf einen hohen Reinheitsgrad des Saponins schließen lässt.

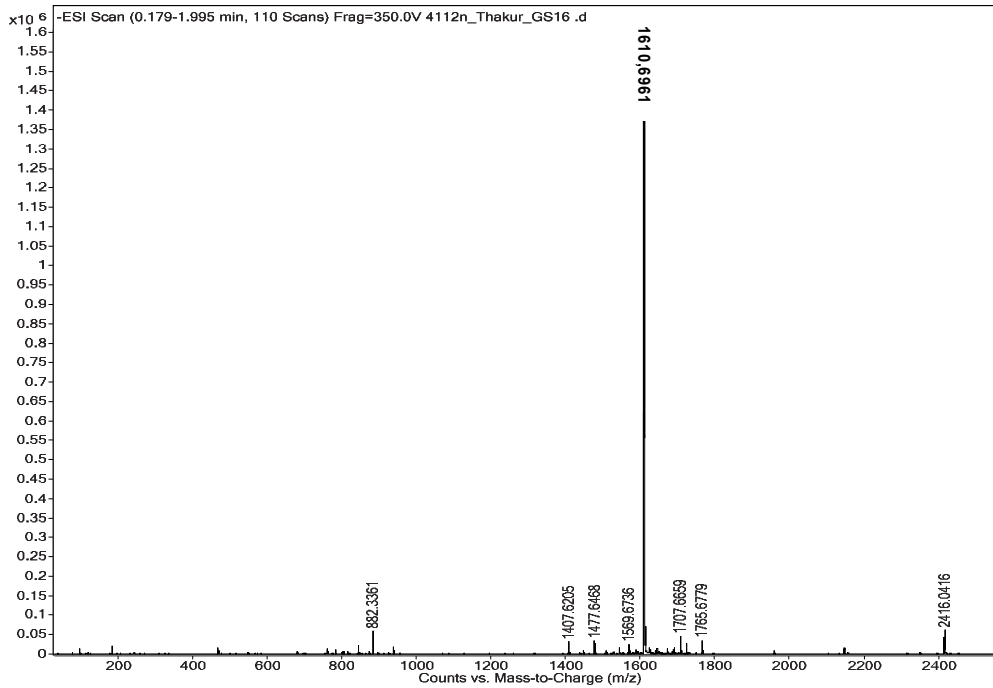
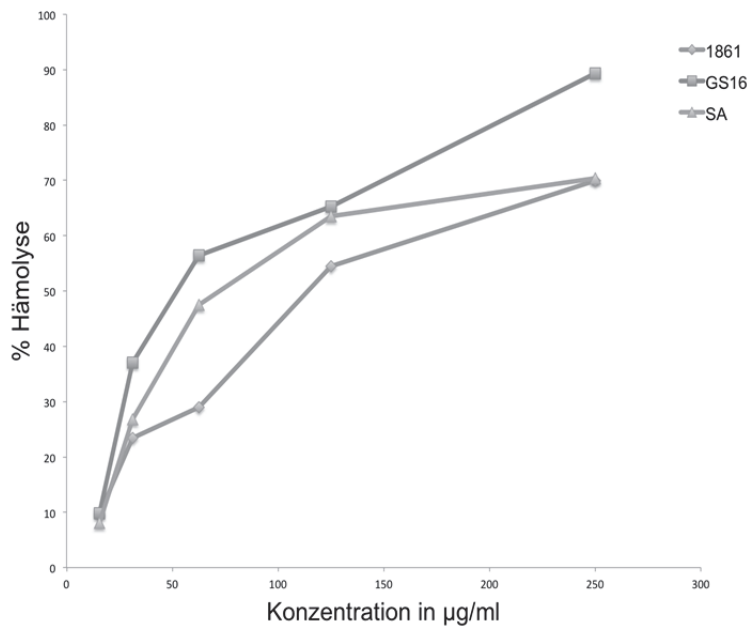


Abbildung 16: ESI-TOF MS Spektrum von GS16 m/z 1610,6961. Sichtbar ist der Peak des analysierten Saponins.

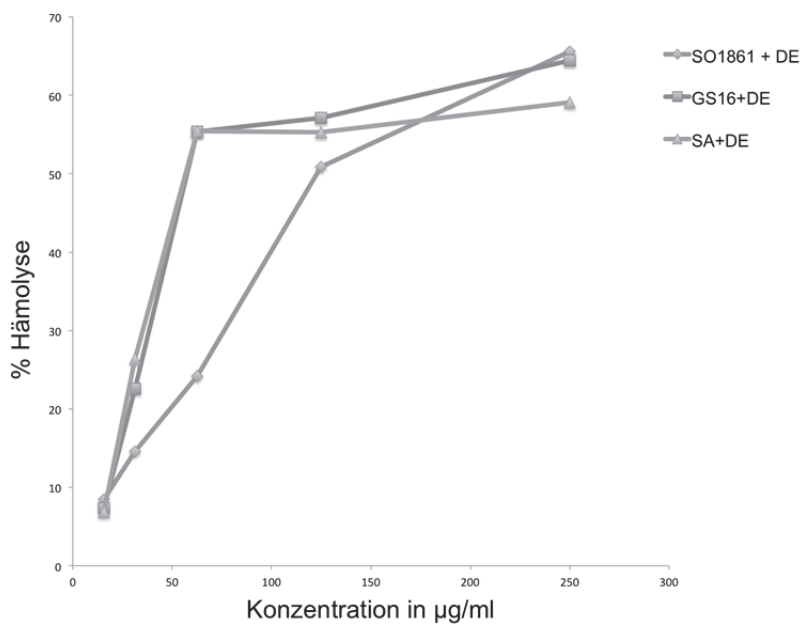
3.3.2 Hämolytische Aktivität von GS16, SO1861 und Album (SA1641) mit und ohne Zugabe von DE

Die hämolytische Aktivität der Saponine wurde berechnet und untereinander verglichen. Hierzu wurde ein Hämolyse-Assay wie unter 2.7.1 beschrieben, durchgeführt. Die Menge an hämolysierten roten Blutkörperchen wurde unter Einwirkung von GS16, SO1861 und *Saponinum album* (SA1641) in Gegenwart und Abwesenheit von DE spektrometrisch gemessen. Für alle drei Saponine konnte bis zu einer Konzentration von 15,65 µg/ml in Kombination mit DE (10 µM) keine toxische Wirkung festgestellt werden. Allerdings ist SO1861 wie auch aus Abbildung 17 ersichtlich, das am wenigsten toxische Saponin im Vergleich zu SA1641 und GS16. Ferner wird deutlich, dass keines der Saponine in seiner hämolytischen Wirkung durch die Anwesenheit von DE verstärkt wird. Vergleicht man die beiden Hämolysekurven der Saponine mit und ohne Zugabe von DE direkt, wird deutlich, dass DE sogar einen positiven Hämolyse reduzierenden Effekt aufweist. Beispielhaft wurde SO1861 in Kombination mit und ohne die Zugabe von DE direkt verglichen, um die leichte Verminderung in der Hämolyse-Aktivität des Saponins bei Anwesenheit von DE zu

verdeutlichen (s. Abbildung 18). Die Kurve von SO1861 in Anwesenheit von DE erkennbar unterhalb der Kurve von SO1861 allein.



A



B

Abbildung 17: Auswertung der Hämolyse-Aktivität von SO1861, GS-16 und SA1641 mit frisch entnommen roten Blutkörperchen durch die photometrische Messung von freigesetztem Hämoglobin. (A) Die prozentuale Hämolyse wurde mit und ohne (B) Zugabe von DE (10 µM) berechnet.

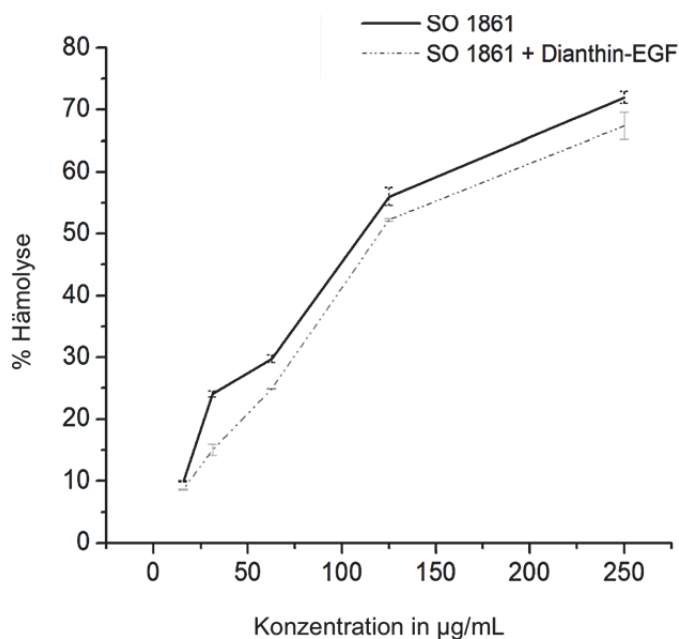


Abbildung 18: Direkter Vergleich der prozentualen Hämolyse-Aktivität von SO1861 in Anwesenheit und Abwesenheit von DE (10µM). Die prozentuale Hämolyse wurde auch hierbei an frisch entnommen roten Blutkörperchen durch die photometrische Messung von freigesetztem Hämoglobin berechnet.

3.4 *In vitro* Zytotoxizitäts-Ergebnisse

Um einen Hinweis darauf zu erhalten wie sich die Zellen (TSA-EGFR), die später verwendet werden sollten, nach Injektion der Kombinationstherapie verhalten, wurden sie *in vitro* mittels Zytotoxizitäts-Assay (MTT-Assay getestet (s. 2.6.3)). Der MTT-Assay ist eine häufig eingesetzte Methode um den Anteil geschädigter Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe (unbehandelte Zellen) zu messen. Da es sich bei dieser Methode um einen Endpunkt-Assay handelt, der nach Ablauf einer bestimmten Zeit keine weiteren Informationen über das Versuchsgeschehen liefern kann, wurden zusätzlich Echtzeit-Experimente mittels eines Impedanzmessgerätes (xCelligence) durchgeführt. Diese Methode erzielt zuverlässige und präzise impedanzbasierte Ergebnisse der Zellanalytik über einen vergleichsweise langen Zeitraum.

3.4.1 MTT-Assay von SE + GS16 (mit TSA-EGFR-Zellen)

Zunächst wurde SE (0,000001–100 nM) in Kombination mit GS16 (2 µg/ml) für dieses Experiment benutzt. Die Auswahl der dargestellten Konzentrationen beruht auf vorhandenen Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hendrik Fuchs, die in dieser Arbeitsgruppe angefertigt wurden. Das Saponingemisch SA wurde dabei in Kombination mit SE in den genannten Konzentrationen verwendet und die halbmaximale Toxizität (50% Überleben der Zellen) des Toxins SE allein und Kombination mit SA festgestellt. Somit konnte der Verstärkungsfaktor der Kombinationstherapie exakt bestimmt werden. Die Anwendung von 2 µg/ml GS16 hatte sich zuvor als nicht toxisch für die Zellen erwiesen [91]. In Abbildung 19 wird deutlich, dass Konzentrationen, bei denen SE alleine keine Toxizität aufweist, in Kombination mit GS einen toxischen Effekt zeigen. Bei einer Konzentration von 0,0001 nM SE ist in Kombination mit Saponin bereits die Hälfte aller Zellen abgestorben. Bei der Applikation von SE allein tritt dieser Effekt erst bei einer Konzentration von 10 nM auf. Der zytotoxische Effekt von SE auf die TSA-EGFR Zellen wurde mehr als 100.000-fach verstärkt. Das hohe Verstärkungspotenzial von GS16 zusammen mit SE konnte somit nachgewiesen werden.

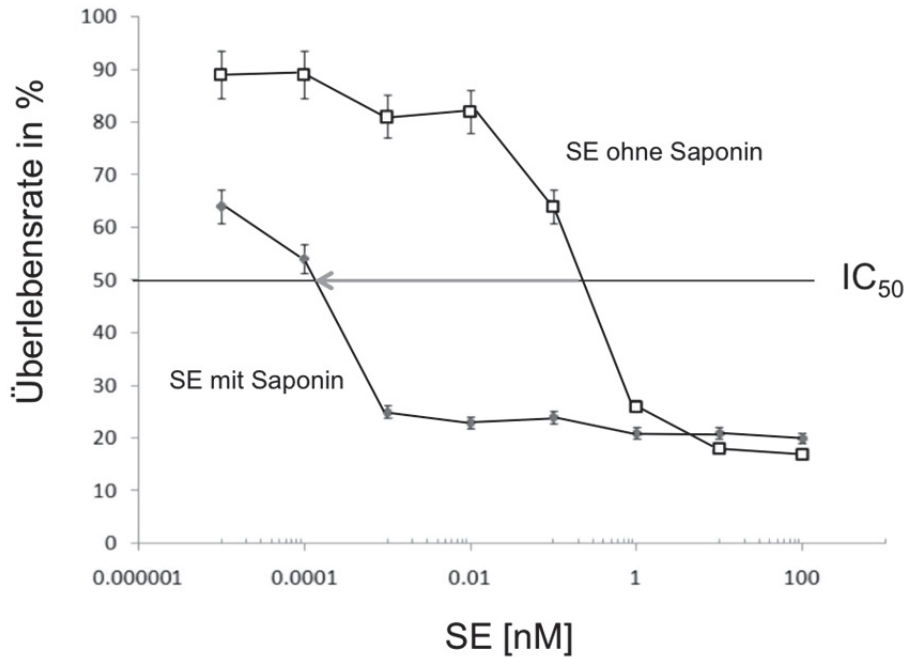


Abbildung 19: Graphische Abbildung der Zytotoxizität des zielgerichteten Toxins SE allein und in Kombination mit GS16 auf TSA-EGFR Zellen. Durch den Pfeil in der Abbildung wird die Linksverschiebung der IC₅₀-Werte des Toxins allein und in Kombination mit GS16 verdeutlicht. Der Anteil der Überlebenden Zellen wurde mittels MTT-Assay ermittelt (s. 2.6.4). Die Zahl der ausgesäten Zellen betrug 2000. Die eingesetzten Konzentrationen von SE betragen 0,000001–10 nM, die Konzentration von GS16 betrug 2 µg/ml.

3.4.2 Eigentoxizität der Saponine GS16/SO1861/SA1641 im xCelligence-Reader

Alle für die Tiere verwendeten Saponine wurden auf ihre *in vitro* Eigentoxizität hin zusätzlich mittels Echtzeit-Zellimpedanz gemessen. Die nachfolgenden Messungen wurden an einem xCelligence-Reader (Roche) durchgeführt (s. 2.6.5). Die Zellimpedanz korreliert hierbei mit der Zellaktivität. Für dieses Experiment wurden 5000 TSA-Zellen/Well ausgesät. Als Kontrolle wurde Kulturmedium allein eingesetzt. Nach 24 h und dem Erreichen einer Impedanz > 1 zeigt sich in Abbildung 20 ein Einschnitt bei allen Kurven, da zu diesem Zeitpunkt die Messung unterbrochen wurde, um den Zellen die Saponine hinzuzufügen. Nach weiteren 48 h wurde das Experiment beendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Saponine je nach Konzentration eine unterschiedliche Zytotoxizität zeigen. Vergleicht man die Toxizität der Saponine, insbesondere bei einer Konzentration von 10 µg/ml wird deutlich, dass GS16 die stärkste Toxizität aufweist.

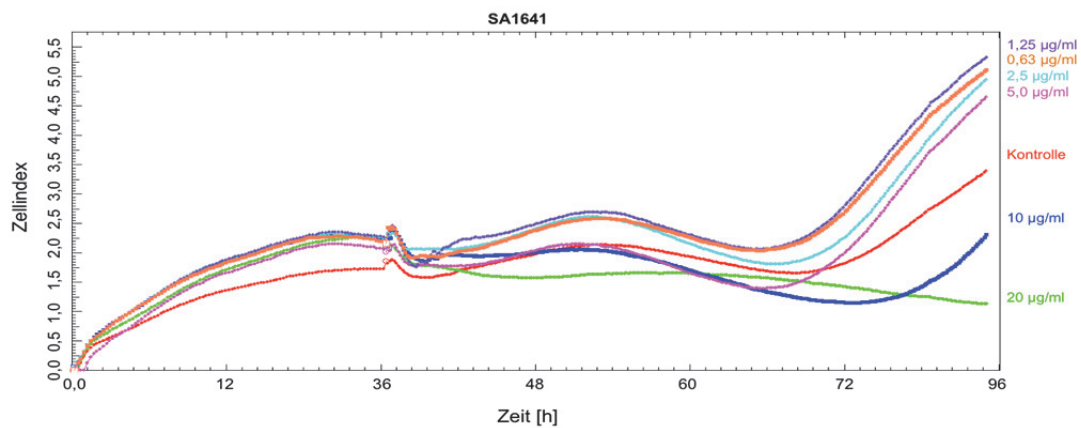
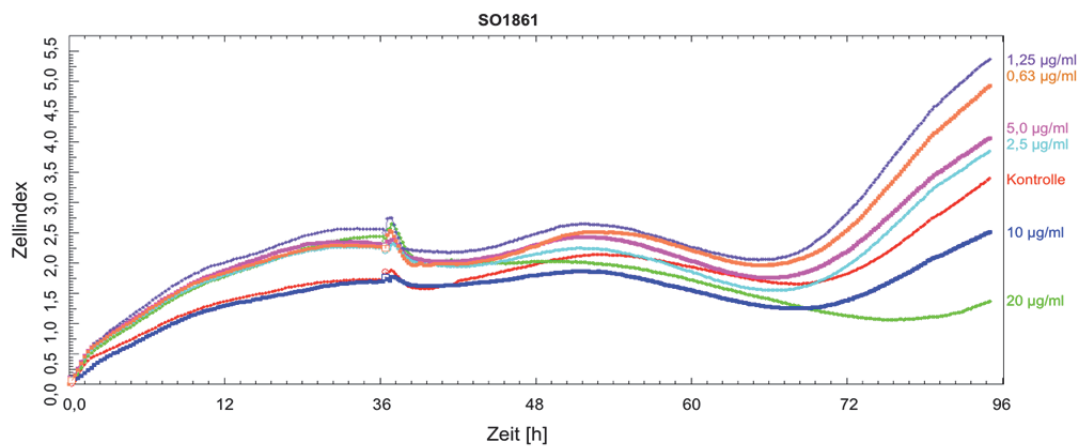
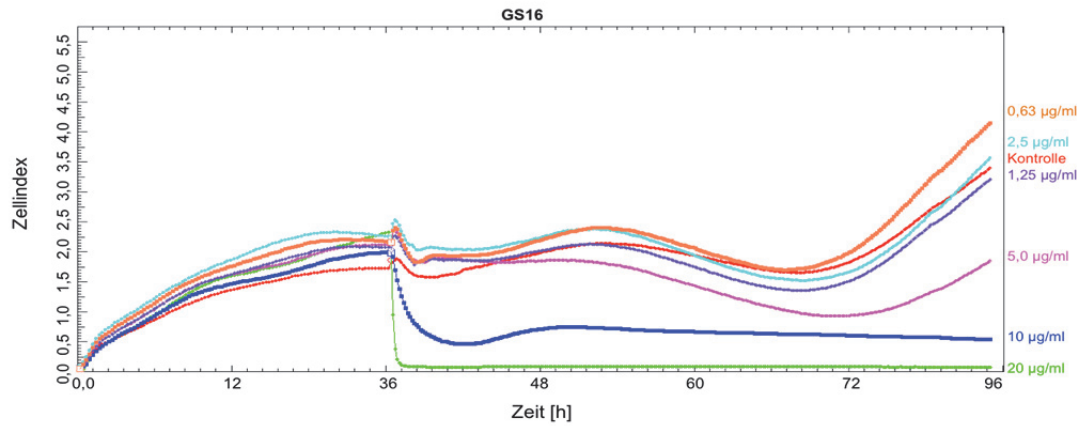


Abbildung 19: Vergleich der Eigentoxizität der Saponine mittels Echtzeit-Impedanzmessung. Es wurden jeweils 5000 TSA-EGFR Zellen/Well in einer 96- E-Platte Cardio 96 ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 h wurden die Saponine in den Konzentrationen von 20, 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,63 µg/ml hinzu pipettiert. Die Kontrollzellen wurden mit Kulturmedium inkubiert. Alle Komponenten wurden in jeweils zwei Reaktionskammern gemessen und daraus der Durchschnittswert dargestellt.

3.4.3 Ergebnisse der Untersuchung von DE in Kombination mit den Saponinen GS16, SO1861, und SA1641 an HER14 und NIH3T3-Zellen

In diesem Experiment sollte die Spezifität der Kombinationstherapie untersucht und bestätigt werden. Hierfür wurden zwei Zelllinien mit einander verglichen, die ein unterschiedlich hohes Level an EGF-Rezeptoren aufweisen. HER14-Zellen haben laut Literatur eine hohe Expression des EGF-Rezeptors wohingegen NIH3T3-Zellen den Rezeptor nicht exprimieren. Die Zelllinien wurden erneut mittels Echtzeit-Impedanzmessung getestet. Für dieses Experiment wurden die Saponine GS16, SO1861 und SA1641 zusammen mit DE untersucht. Die DE-Konzentration lag bei allen in Abbildung 21 dargestellten Kurven bei 1 nM mit Ausnahme der Toxizitätskontrolle von DE (100 nM) und den Kontrollzellen, die nur mit Kulturmedium behandelt wurden. Die verwendete Konzentration der Saponine hat sich in vorangegangenen Studien als nicht eigentoxisch bewährt [92]. In Abbildung 21 wird klar, dass alle Zellen, die eine hohe EGF-Rezeptordichte aufweisen und der Kombinationstherapie für die Dauer des Versuchs (90 h) ausgesetzt waren, gestorben sind. Im Gegensatz dazu ist kaum eine Reaktion der Zellen festzustellen, die eine geringe EGF-Rezeptordichte haben. Dadurch wird deutlich, dass die Kombinationstherapie bestehend aus DE und unterschiedlichen Saponinen stark rezeptorspezifisch ist. Da viele Tumoren EGFR überexprimieren gibt dieser Versuch darüber hinaus einen wichtigen Hinweis darauf, dass die Kombinationstherapie auch *in vivo* wirksam sein wird.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass eine Behandlung mit DE allein sogar bei einer sehr hohen Konzentration von 100 nM nach Ablauf des Versuchs immer noch zu einer Impedanz >1 führt. Im Vergleich zur Kurve der Kontrollzellen lässt sich folglich eine schwache Toxizität feststellen. Deutlich wird jedoch auch, dass nur der synergistische Effekt zusammen mit Saponin zur Apoptose der Zellen führt und dass dieser Effekt schon bei einer Konzentration von 1 nM DE ausgelöst wird.

Basierend auf den Ergebnissen bei denen SA1641 eine schwächere toxische Wirkung auf die Zielzellen gezeigt hat (Abbildung 20 und 22), wurde die Konzentration dieses Saponins von 2 µg/ml auf 5 µg/ml erhöht.

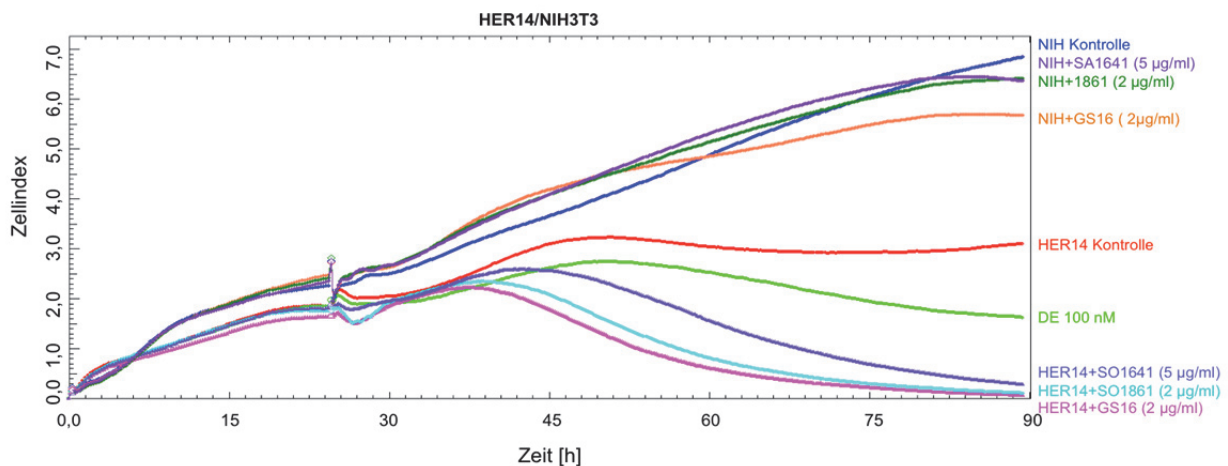


Abbildung 20: Impedanz-basierte Messung in Echtzeit zum Nachweis der Rezeptorspezifität der Kombinationstherapie aus DE und verschiedenen Saponinen. Jeweils 4000 HER14/NIH3T3 Zellen/Well wurden für dieses Experiment in einer 96-Well E-Platte Cardio 96 ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von ca. 19 h wurde DE in der Konzentration von 1 nM in Kombination SA1641 (5 µg/ml), GS16 und SO1861 (2 µg/ml) hinzugegeben. Die Kontrollzellen (HER14) wurden mit Kulturmedium oder DE allein bei einer Konzentration von 100 nM inkubiert. Alle Komponenten wurden in jeweils zwei Reaktionskammern gemessen und daraus der Durchschnittswert dargestellt.

3.4.4 Ergebnisse der Untersuchung von DE in Kombination mit den Saponinen GS16, SO1861 und SA1641 an TSA-EGFR Zellen

Für dieses Experiment wurden TSA-EGFR-Zellen mit den Saponinen allein und zusammen DE inkubiert. Dieses Experiment wurde ebenfalls mittels Echtzeit-Impedanzmessung im xCelligence-Reader (s. 2.6.5) durchgeführt. In Abbildung 22 wird das Ausmaß der Effektivität der Kombinationstherapie in einer Zelllinie dargestellt, die *in vivo* tatsächlich zum Einsatz gekommen ist. Hierzu wurden 5000 TSA-EGFR-Zellen ausgesät. Die Kontrollzellen wurden ausschließlich mit Kulturmedium behandelt. Die Abbildung macht deutlich, dass GS16+DE und SO1861+DE die effektivsten Kombinationstherapien sind. Bei einer sehr geringen Konzentration von 1,25 µg/ml GS16 und SO1861 in Kombination mit DE ist der Kurvenabfall, welcher mit dem Zelltod gleichzusetzen ist, besonders deutlich sichtbar. Ohne die Zugabe von DE lässt sich bei allen drei Saponinen in dieser Konzentration keine Toxizität erkennen. In der Grafik von SA1641+DE wird die bereits erwähnte schwächere Effektivität dieses Saponins bei niedrigen Konzentrationen gemeinsam mit DE erkennbar. Es lässt sich zwar ein Abfall der

roten und pinken Kurven (Kombination von SA1641 mit DE) im Vergleich zur hellgrünen Kurve (Saponin allein) erkennen, ein zelltoxischer Effekt der beiden kombinierten Komponenten lässt sich aber bei dieser Saponinkonzentration nicht nachweisen.

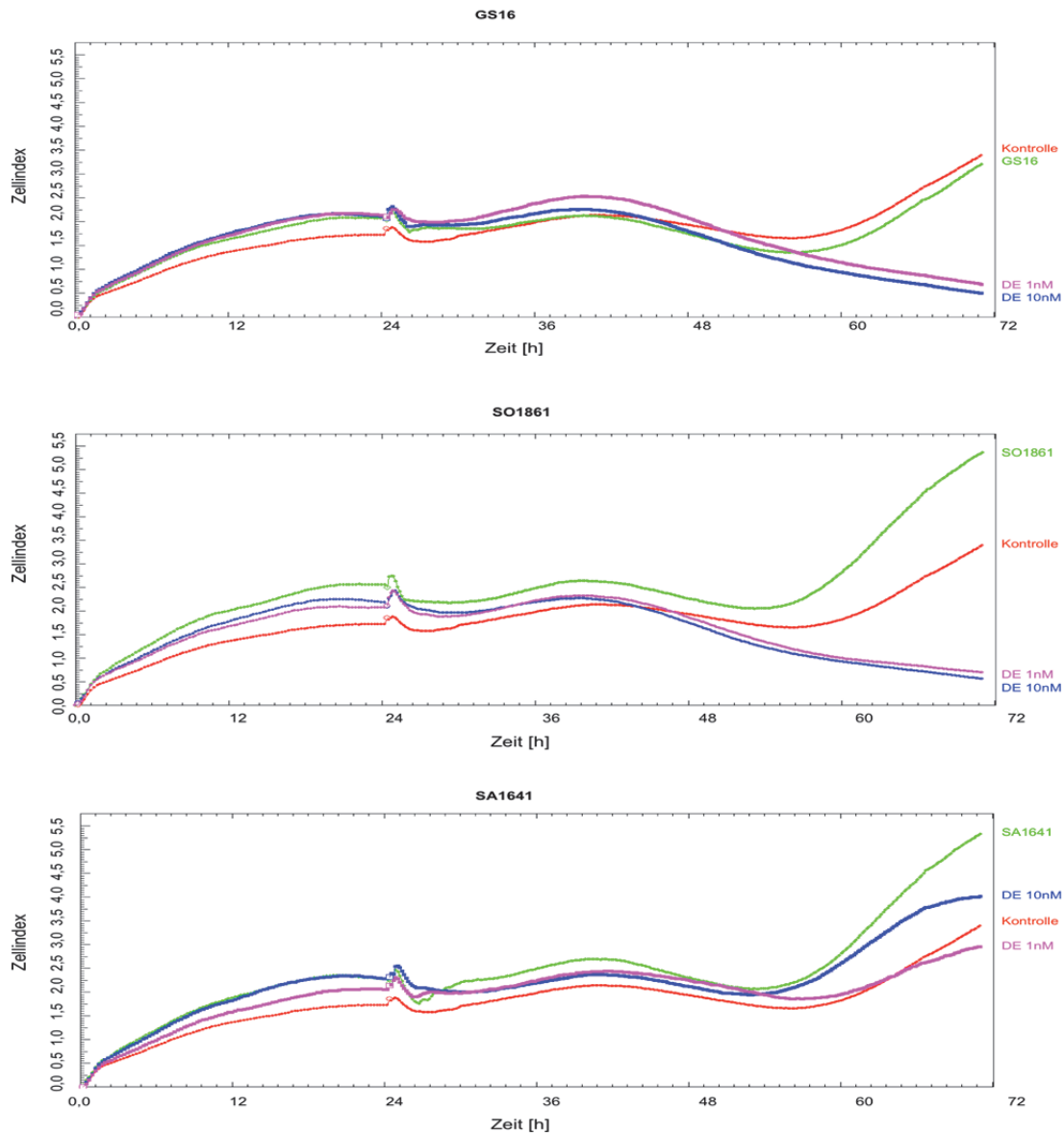


Abbildung 21: Vergleich der Toxizität unterschiedlicher Saponine (GS16, SO1861 und SA1641) mit und ohne der Zugabe DE mittels Echtzeit-Impedanzmessung. Es wurden jeweils 5000 TSA-EGFR-Zellen/Well in einer 96-Well E-Platte Cardio 96 ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 h wurden die Saponine GS16, SO1861 und SA1641 in einer Konzentration von 1,25 $\mu\text{g/ml}$ hinzugegeben. Zu einigen Reaktionskammern wurde zusätzlich DE in den Konzentrationen 10 und 1 nM hinzugegeben. Die Kontrollzellen wurden mit Kulturmedium allein inkubiert. Alle Komponenten wurden in jeweils zwei Reaktionskammern gemessen und daraus der Durchschnittswert dargestellt.

3.4.5 DE + SO1861 mit HCT116-Zellen

Wie bereits die vorhergehenden Versuche, wurde auch dieses Experiment mittels des Echtzeit-Impedanzmessgerätes durchgeführt. In diesem Experiment lag der Fokus darauf, die Komponenten in einer humanen Zelllinie zu testen, die später in Nacktmäusen für ein Xenotransplantat genutzt werden sollten. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie aus SO1861 zusammen mit DE auch mit humanen HCT116 Zellen funktioniert. Hierzu wurden 8000 Zellen in jedes der getesteten Reaktionskammern ausgesät und nach ca. 24 h die unterschiedlichen Komponenten hinzugegeben. Im Ergebnis lässt sich erkennen, dass DE allein die Apoptoserate der Zellen nicht steigert. Im Falle der Zugabe der zielgerichteten Toxine zusammen mit dem effektsteigernden SO1861 sieht man deutlich einen Abfall der betreffenden Kurven (pink und blau). Dieser Abfall ist mit einer Apoptose der Zielzellen gleichzustellen. Der Erfolg dieses Experimentes ließ die Annahme zu, dass die Kombinationstherapie auch in Nacktmäusen, denen HCT116-Zellen injiziert wurden, erfolgreich sein würde.

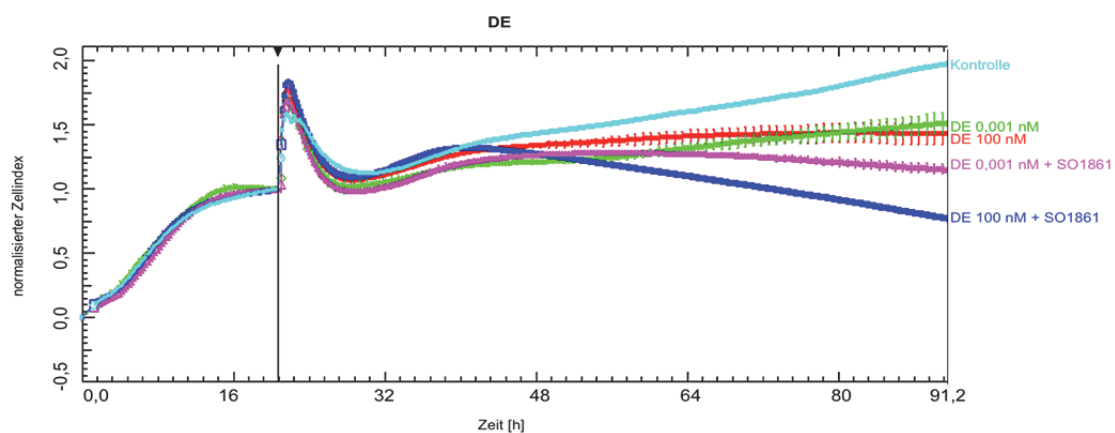


Abbildung 22: Impedanz-basierte Messung in Echtzeit zum Nachweis der Effektivität der Kombinationstherapie von DE und SO1861 in HCT116 Kolonkarzinomzellen. Es wurden 8000 Zellen ausgesät. Nach ca. 24 h wurden die Komponenten DE in den Konzentrationen 0,001nM und 100 nM in Kombination mit und ohne Zugabe von SO1861 (2 µg/ml) hinzugefügt. Die Kontrollzellen wurden ausschließlich mit Kulturmedium behandelt. Alle Komponenten wurden in jeweils zwei Reaktionskammern gemessen und daraus der Durchschnittswert dargestellt.

3.4.6 DE/SE + SO1861 mit MDA-MB231-Zellen

Wie schon im obig dargestellten Versuch sollte die Effektivität der zielgerichteten Kombinationstherapie an MDA-MB231-Zellen untersucht werden, da diese Zelllinie ebenfalls für ein disseminiertes Tumormodell in Nacktmäusen ausgewählt wurde. In den Diagrammen wurde ebenfalls der Unterschied in der Effektivität zwischen SE und DE bei verschiedenen Konzentrationen dargestellt. In der Grafik, in der SE in Kombination mit SO1861 abgebildet ist, ist ein deutlicher Konzentrationsabhängiger Effekt sichtbar. Die höchste Konzentration an SE hatte gleichzeitig auch den höchsten apoptotischen Effekt auf die HCT116 Zellen. Darüber hinaus wurde der deutlich geringere toxische Effekt von SE ohne das Saponin sichtbar. Bei den ersten beiden eingesetzten Konzentrationen von SE allein befand sich die Zellimpedanz sogar auf dem Level der Kontrollzellen, die nur mit Kulturmedium behandelt wurden.

Der Aufbau des Versuches mit DE entsprach exakt dem Versuchsaufbau, mit dem SE untersucht wurde. In der Grafik, in welcher DE abgebildet ist, zeigten sich die obig genannten konzentrationsabhängigen Effekte ebenso, wenn auch in verstärkter Form. Besonders in der Vergleichsgrafik von DE und SE konnte der stärkere toxische Effekt von DE klar sichtbar gemacht werden. Sowohl die Kurven, welche die Eigentoxizität, als auch die durch das Saponin verstärkte Toxizität darstellen, liegen bei DE deutlich unterhalb dieser Kurven von SE. Es kann deswegen davon ausgegangen werden, dass die toxische Aktivität von DE über jener von SE liegt. Dies würde auch mit den Ergebnissen aus den Adenin-Release Assays (s. 2.5.9) übereinstimmen. Einen weiteren interessanten Aspekt zeigt in der Vergleichsgrafik dargestellte Kurve vom SO1861 allein (dunkelblau). Die Zellen, die nur mit SO1861 allein behandelt wurden, bewegen sich fast auf dem Impedanzlevel der Kontrollzellen. Eine Eigentoxizität von SO1861 bei dieser Konzentration kann somit ausgeschlossen werden. Was für diesen Versuch sollte, noch erwähnt werden, dass aufgrund des späteren Erreichens einer aussagefähigen Impedanz der Kontrollzellen die Komponenten erst nach ca. 76 h hinzugegeben wurden. Nach der erfolgreichen Durchführung dieses Experimentes konnte auch *in vivo* davon ausgegangen werden, dass eine erfolgreiche Therapie eines disseminierten Tumormodells wahrscheinlich sein würde.

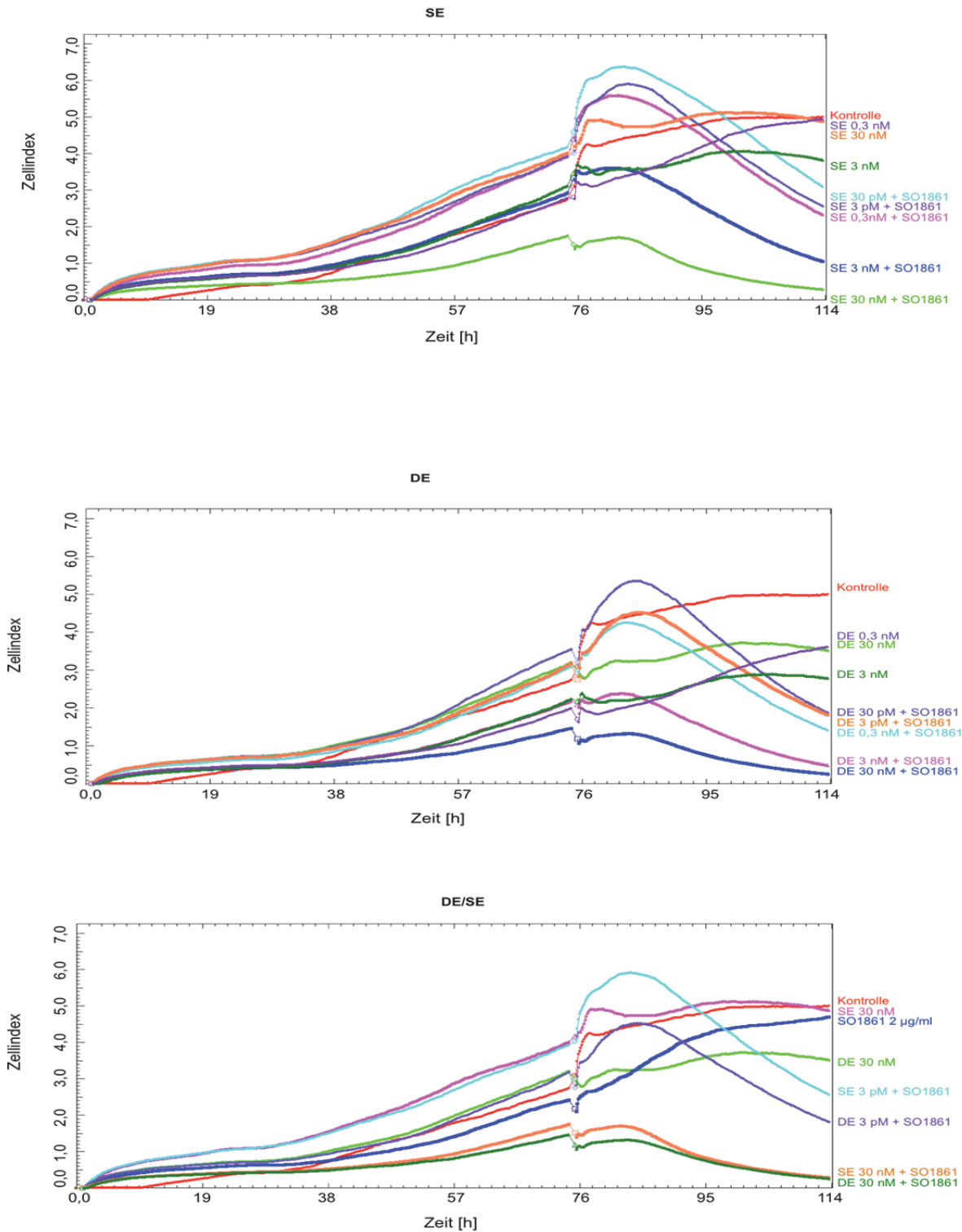


Abbildung 23: Vergleich der Eigentoxizität von DE und SE allein und der Effektivität der Kombinationstherapie von DE und SE gemeinsam mit SO1861. Es wurden 6000 MDA-MB231-Zellen in jedes *Well* in einer 96-*Well* E-Platte Cardio 96 ausgesät. Nach einer Wartezeit von 76 h wurden DE und SE allein in den Konzentrationen 3 pM bis 30 nM zugegeben. In einige Reaktionskammern wurde zusätzlich SO1861 in einer Konzentration von 2 µg/ml hinzupipettiert. Die Kotrollzellen erhielten Kulturmedium. Das Experiment wurde nach 114 h beendet.

3.5 *In-vivo*-Ergebnisse

Um die nötige Sicherheit bei der Verwendung der Saponine am Tier für weitere Versuche gewährleisten zu können, wurden sie auf ihre akute Toxizität *in vivo* getestet. Die Studie der akuten Toxizität umfasst die schädigenden Wirkungen, die innerhalb eines Zeitraums (14 Tage) nach Verabreichung einer Einzeldosis einer Substanz auftreten. Die akuten toxischen Wirkungen wie Organ- oder Systemtoxizität der Saponine konnten in den durchgeführten Versuchen anhand der Beurteilung des Körpergewichts und des Milzgewichts erhoben werden. Auch die hämolytischen Eigenschaften der Saponine wurden mittels Blutaussstrich begutachtet.

3.5.1 Akute Toxizität nach Injektion mit GS16, SO1861 und 1641 in Balb/c-Mäusen

Für die Prüfung der akuten Toxizität der für diese Arbeit verwendeten Saponine GS16, SO1641 und SO1861 wurde für jeden Versuch das gleiche Schema verwendet (s. 2.8.1). Exemplarisch wurde die Studie der akuten Toxizität von GS16 dargestellt. Hierbei wurde deutlich, dass keine der vier getesteten Dosen, die für die Therapie verwendet wurden (15 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml und 100 µg/ml), einen Einfluss, weder auf das Körpergewicht (s. Abbildung 25) oder das Gewicht der Milz (s. Abbildung 26) hatte, wie es durch einen erhöhten Abwehrstatus des Immunsystems zu erwarten gewesen wäre. Die kontinuierliche Gewichtszunahme, die in der Abbildung sichtbar ist, lässt sich auf das natürliche Älterwerden der Tiere zurückführen.

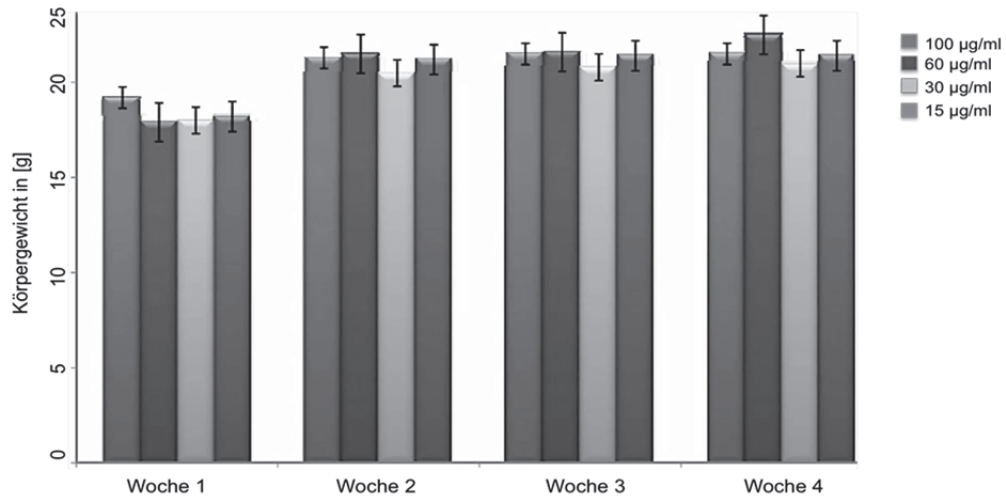


Abbildung 24: Einfluss der akuten Toxizität von GS16 auf das Körpergewicht von Balb/c-Mäusen. Die Tiere wurden in Gruppen von drei Tieren zusammengefasst. Den Tieren wurde in jeder Gruppe eine unterschiedliche Konzentration des Saponins GS16 als Einzeldosis in die Nackenfalte injiziert. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 100, 60, 30 und 15 µg/ml (für jede Woche in dieser Reihenfolge von rechts nach links dargestellt). Das Körpergewicht der Tiere wurde jeweils dreifach gemessen und der Mittelwert mit Standardabweichung im Diagramm dargestellt. Der Vergleich der Dosen innerhalb einer Woche war nicht signifikant ($p \geq 0,5$). Der Vergleich des Körpergewichts der Tiere von Woche 1 mit dem Körpergewicht der Wochen 2, 3 und 4 war nicht signifikant ($p \geq 0,5$).

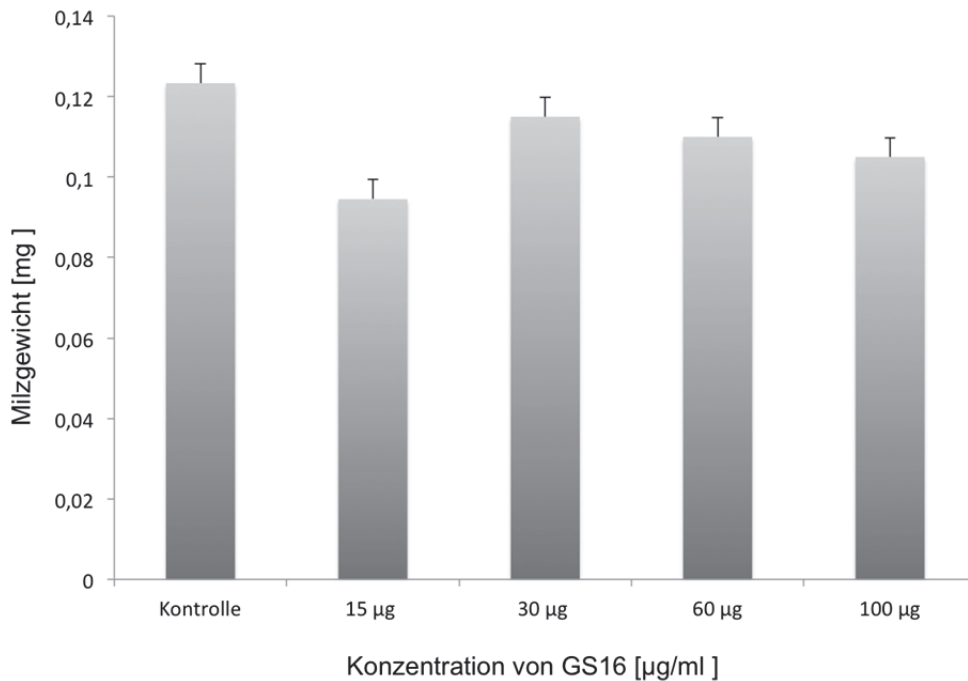


Abbildung 25: Einfluss der Eigentoxizität von GS16 auf das Gewicht der Milz von Balb/c-Mäusen. Jeweils drei Tieren wurden unterschiedliche Konzentrationen von GS16 (100, 60, 30 und 15 µg/ml) in die Nackenfalte injiziert. Nach Euthanasie der Tiere wurde das Gewicht der Milzen dreifach gemessen und der Mittelwert mit Standardabweichung graphisch abgebildet. Der Vergleich der Milzgewichte nach Behandlung mit den unterschiedlichen Dosen (15–100µg/ml GS16) war nicht signifikant ($p \geq 0,5$).

3.5.2 Blutausstrich nach Toxizitätstest mit GS16

Um die Verträglichkeit der Saponine zu kontrollieren, wurden die Blutproben der Versuchstiere jeweils 3 Tage nach Injektion mikroskopisch auf Hinweise für eine Hämolyse untersucht. Dazu wurden Blutausstriche angefertigt (s. 2.7.2) und unter einem Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung im Ölimmersionsmikroskop begutachtet. Exemplarisch soll in Abbildung 27 verdeutlicht werden, dass keine Anzeichen einer Hämolyse im Blutausstrich erkennbar waren. In Abbildung 27 wurde der Blutausstrich eines Tieres ausgewählt, welches mit einer Dosis von 30 µg/ml GS16 behandelt wurde. Diese Konzentration wurde für die Therapie der syngeneten Mausmodelle sowie der Xenotransplantatmodelle verwendet. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass auch bei höheren Saponinkonzentrationen (100 und 60 µg/ml) keine Anzeichen für eine Hämolyse sichtbar waren.

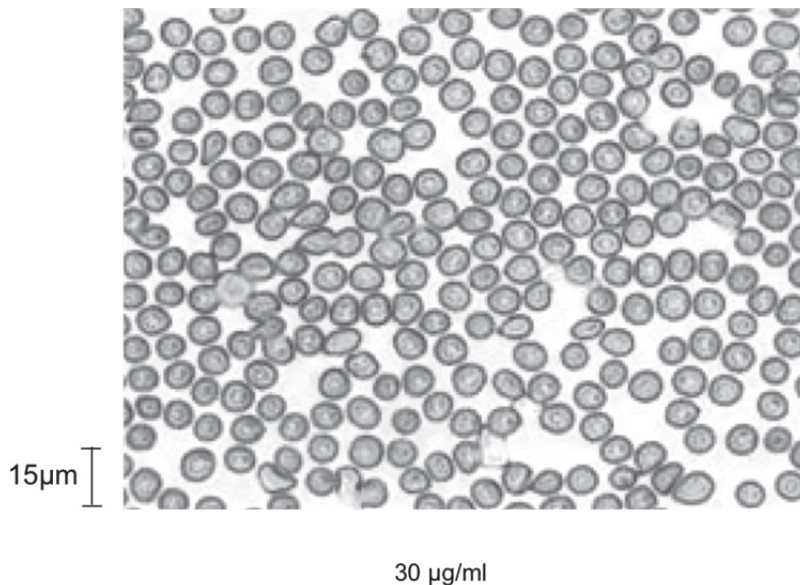


Abbildung 26: Blutausschlag eines Tieres nach Injektion mit GS16 (30 μg/ml). Die Zellen wurden nach Färbung mit HE bei 100facher Vergrößerung mit Immersionsöl betrachtet. Der Bildausschnitt zeigt exemplarisch die Konstitution der Erythrozyten nach Saponinbehandlung.

3.5.3 Chirurgische Tumorexzision zur Etablierung eines Metastasen-Modells in Balb/c-Mäusen

Durch die chirurgische Entfernung von Tumoren können Metastasen entstehen. Diese Tatsache sollte für die Etablierung eines Metastasen-Modells zunutze gemacht werden, da die hierfür verwendeten Zellen laut Literatur die Eigenschaft aufweisen zu metastasieren [93]. Nach der Exzision der Tumoren wurde ein Abschwemmen von Tumorzellen erwartet, die dann zur Bildung von Metastasen besonders in der Lunge hätte führen sollen.

Für die Etablierung des Metastasen-Modells wurden Balb/c-Mäusen $1,25 \times 10^5$ TSA-EGFR Zellen in die rechte Flanke injiziert. Nach Erreichen einer Tumorgöße von ca. 9 mm wurden die Tumoren unter Narkose chirurgisch entfernt und die Wunden verschlossen (s. 2.8.4 und 2.8.5). Laut Versuchsplanung sollte nach erfolgreicher Exzision der Tumoren und positiv verlaufendem Wundverschluss mit einer Therapie der erwarteten Metastasen begonnen werden. Ziel war es, möglichst zeitnah mit der Therapie zu beginnen, da schon einzelne, nach der Exzision der Tumoren abgeschwemmte Krebszellen erfasst und durch die Therapie eliminiert werden sollten. Die Wundheilung verlief bei einem Teil der Tiere (3/8) sehr schnell und ohne Rückbildung eines Tochtertumors an der Stelle, wo der

Primärtumor entnommen wurde. Eines der Tiere verstarb unmittelbar nach dem Eingriff. Bei 4/8 Tieren trat im Verlauf der Wundheilung ein Rezidivtumor an der Stelle des Primärtumors auf. Diese Rezidivtumoren zeigten ein extrem gesteigertes Wachstum, sodass letztendlich bei keinem der Tiere mit der Therapie begonnen werden konnte. Als Fazit lässt sich sagen, dass sich die Tumorexzision nicht zur Etablierung eines Metastasenmodells eignet, denn sowohl die Größe des Eingriffs als auch das aggressive Wachstum der Rezidivtumoren beeinflussen den Versuchsverlauf zu negativ.

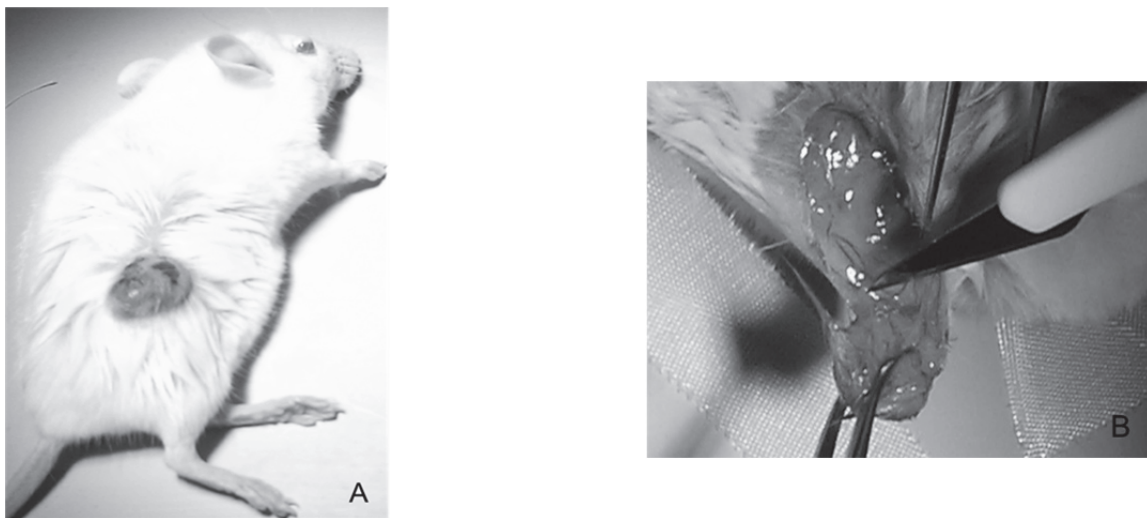


Abbildung 27: (A) Freilegen des Operationsfeldes und (B) Exzision des TSA-Zell-Tumors zur Induktion von Metastasen. Der chirurgische Eingriff wurde bei 8 Tieren unter Rompun (Xylazinum 20 mg/ml) und 0,2 ml Ketanest 25 s (Esketaminhydrochlorid, 25mg/ml) ad 1 ml NaCl 0,9 % durchgeführt. Nach dem Eingriff wurde die Wunde durch U-Hefte verschlossen.

3.5.4 Untersuchung von SE + GS16 als Therapie eines soliden TSA-EGFR-Zell-Tumors in einem syngenem Modell in Balb/c-Mäusen

In diesem Versuch sollte die einfache Verabreichung der Kombinationstherapie sowie der synergistische Effekt der bereits *in vitro* erfassten zielgerichteten, antitumoralen Substanzen SE und GS16 *in vivo* in einem soliden Tumormodell getestet werden. Bevor mit den *in-vivo*-Versuchen begonnen wurde, wurde die Eigentoxizität von GS16 untersucht (s. 2.8.1, Abbildung 25 und 26) so zwei verschiedene nicht toxische Dosen für die Kombinationstherapie ausgewählt.

Hierzu wurden wie unter 2.8.3 beschrieben Balb/c-Mäuse im Alter von 6–8 Wochen $1,25 \times 10^5$ TSA-EGFR Zellen in die rechte Flanke injiziert. Nach Auftreten eines palpablen Tumors wurde mit der Therapie aus GS16 und dem zielgerichteten SE begonnen. Nach einer Therapiedauer von 28 Tagen wurden die Tiere getötet. In Abbildung 29 wird die Tumorgöße nach Abschluss der zielgerichteten Tumorthherapie gezeigt. In dem Versuch konnte eindrücklich dargelegt werden, dass der synergistische, antitumorale Effekt der Kombinationstherapie *in vivo* sehr erfolgreich ist. Eine Tumorreduktion auf eine nicht mehr messbare Größe mit beiden getesteten GS16/SE Konzentrationen nach 8 verabreichten Dosen und dem Ausbleiben von unerwünschten Nebenwirkungen verdeutlicht wie effektiv die eingesetzte Therapie ist.

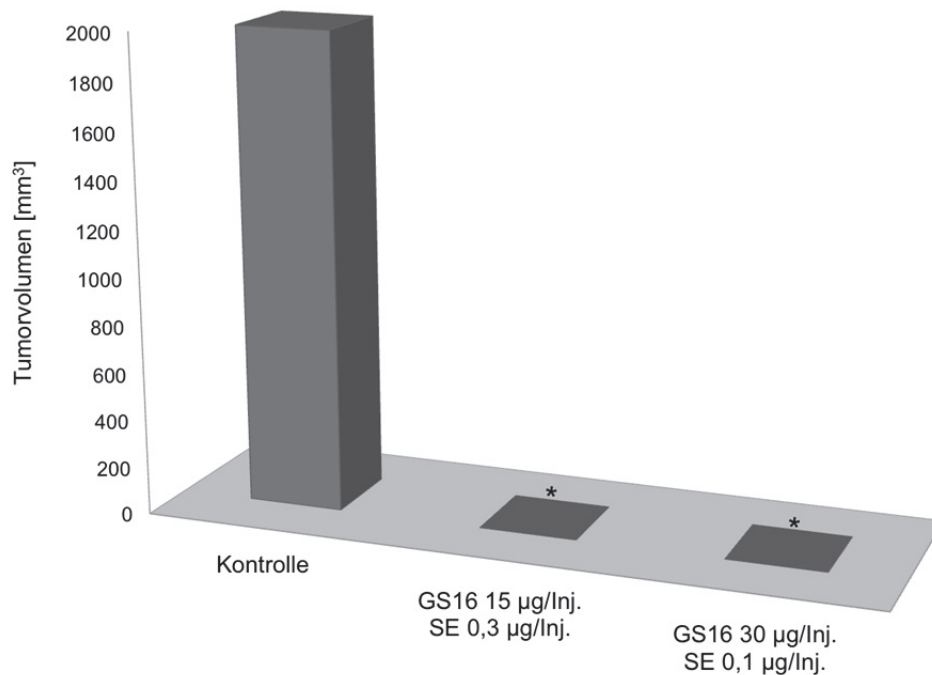


Abbildung 28: Das Diagramm zeigt die das Volumen der Tumoren in den unterschiedlichen Gruppen von jeweils 3 Balb/c-Mäusen nach Therapieende. Das Diagramm wurde dreidimensional dargestellt, da bei den Null-Werten der Therapiegruppen eine zweidimensionale Abbildung eine unzureichende Darstellung gewesen wäre. Die Tumoren der Kontrollgruppe sind über den Zeitraum der Therapie (28 Tage, 8 Dosen) auf ca. 9 mm Länge angewachsen. In den Therapiegruppen wurden die Tiere mit zwei verschiedenen Kombinationstherapien behandelt. Eine der Gruppen erhielt 15 µg/Injektion GS16 in Kombination mit 0,3 µg/Injektion SE, die andere 30 µg/Injektion GS16 in Kombination mit 0,1 µg/Injektion SE. In beiden Therapiegruppen ist das Tumorzusammensetzung auf Null zurückgegangen, wohingegen das Volumen der Kontrolltumoren ca. 2000 mm³ betrug. Die Größe der Tumoren wurde jeweils 3fach in zwei Dimensionen gemessen, das Volumen nach der Formel $(\pi/6) \times (\text{Länge} \times \text{Breite})$ berechnet und der Mittelwert abgebildet. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 100 µl 0,9% NaCl anstelle der Therapie.* $p \leq 0,05$

3.5.5 SE + SA1641 als Therapie eines TSA-EGFR-Zell-Tumors in einem syngenem Modell in Balb/c-Mäusen

Diesem Versuch lag der gleiche Aufbau wie unter 3.5.4 zugrunde. Die Unterschiede in diesem Versuch waren die Therapiedauer (15 Tage anstelle von 28 Tagen) und die Tatsache, dass nur eine Konzentration von 30 µg/Injektion SA1641 in Kombination mit

0,1 µg/Injektion SE für die Therapie der Tumoren verwendet wurde. Auch in diesem Versuch sollte der synergistische Effekt der gemeinsamen Therapie bestehend aus einem Saponin (SA1641) und dem zielgerichteten Toxin (SE) nachgewiesen werden. Es wurden drei Tiere pro Gruppe zusammengefasst. Nach dem Auftreten von palpablen Tumoren wurde mit der Therapie aus SA1641 (30 µg/Injektion) und SE (0.1 µg/Injektion) begonnen. SA1641 wurde in die Nackenfalte injiziert. 30 min später wurde SE in die unmittelbare Umgebung des Tumors gespritzt. Insgesamt wurden 4 Therapien verabreicht, bevor das Volumen der Kontrollgruppe an Tag 15 die erlaubte Höchstgröße (10 mm in einer Dimension) erreicht hatte und das Experiment gestoppt wurde. Die Tumoren der Therapiegruppe waren zu diesem Zeitpunkt palpabel jedoch nicht mehr mit einer digitalen Schublehre messbar. Wie bereits im Versuch mit GS16 und SE konnte gezeigt werden, wie effektiv die Therapie zur Tumorreduktion einsetzbar ist.

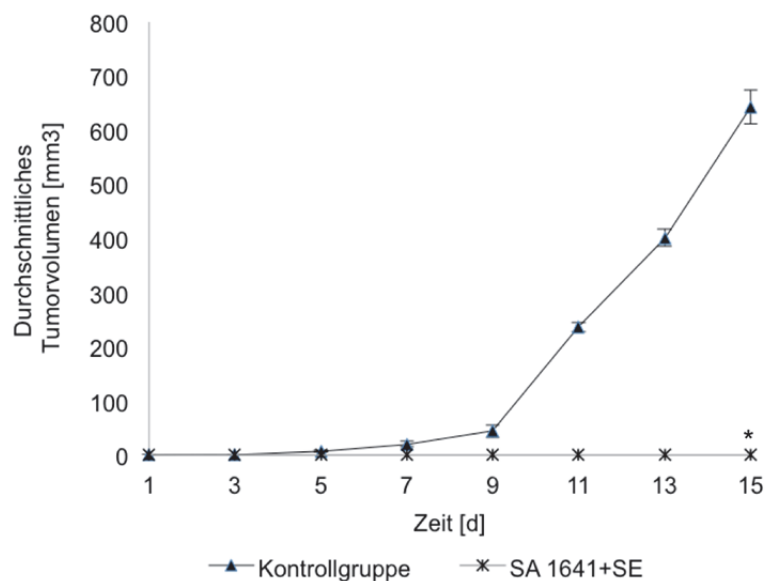


Abbildung 29: In dieser Abbildung wird das Tumolvolumen von TSA-EGFR-Zell-Tumoren in Balb/c-Mäusen der Kontroll- und Therapiegruppe gezeigt. Den Tieren wurde über eine Dauer von 14 Tagen insgesamt $4 \times 30 \mu\text{g/Injektion}$ SA1641 zusammen mit $0.1 \mu\text{g/Injektion}$ SE injiziert. Die Größe der Tumoren wurde jeweils 3fach in zwei Dimensionen gemessen, das Volumen nach der Formel $(\pi/6) \times (\text{Länge} \times \text{Breite})$ berechnet und der Mittelwert graphisch dargestellt. Den Kontrolltieren wurde anstelle der Therapie $100 \mu\text{l}$ 0,9% NaCl injiziert. $*p \leq 0,05$

3.5.6 Untersuchung von DE + SO1861 als Therapie eines soliden HCT116-Zell-Tumors in einem Xenotransplantatmodell in Nacktmäusen

Grundsätzlich wurde für diesen Versuch ein ähnliches Injektionsschema verwendet wie bereits bei den Versuchen unter 3.5.4 und 3.5.5. In diesem Versuch hat sich jedoch sowohl die Maus-Rasse, das Alter der Tiere, das eingesetzte Toxin als auch die Zelllinie verändert. Um feststellen zu können, ob unsere Therapie für den Einsatz am Menschen geeignet sein könnte, wurden Nacktmäuse (nu/nu) ausgewählt, da diese kein Immunsystem besitzen und man somit humane Krebszellen (HCT116) statt transfizierter Mauszellen (TSA-EGFR) verwenden konnte. Somit kommt dieses Modell eine Stufe näher an eine klinische Patientenstudie heran. Darüber hinaus wurde aufgrund von besseren Stabilitätsstudien und einer höheren Expressionsrate DE statt SE eingesetzt. Da diese Erkenntnisse erst im Laufe dieser Arbeit gewonnen wurden, konnte DE in früheren Versuchen noch nicht eingesetzt werden. Im folgenden Versuch wurde erst nach 16 Tagen *post* Zellinjektion mit einer Therapie bestehend aus SO1861 (30 µg/Injektion) und DE (0,35 µg/Injektion) in 16–18 Wochen alten Tieren begonnen. Erst zu diesem Zeitpunkt war ein Tumor palpabel. Da in diesem Versuch bereits nach 5 Therapien ein so drastischer Tumorrückgang sichtbar war, wurde der Versuch zu diesem Zeitpunkt beendet (Abb. 31).

Wie aus Abbildung 32 ersichtlich ist, konnten auch histologisch nach Beendigung der Therapie keine tumorös entarteten Zellen an der Inokulationsstelle der Tumorzellen detektiert werden.

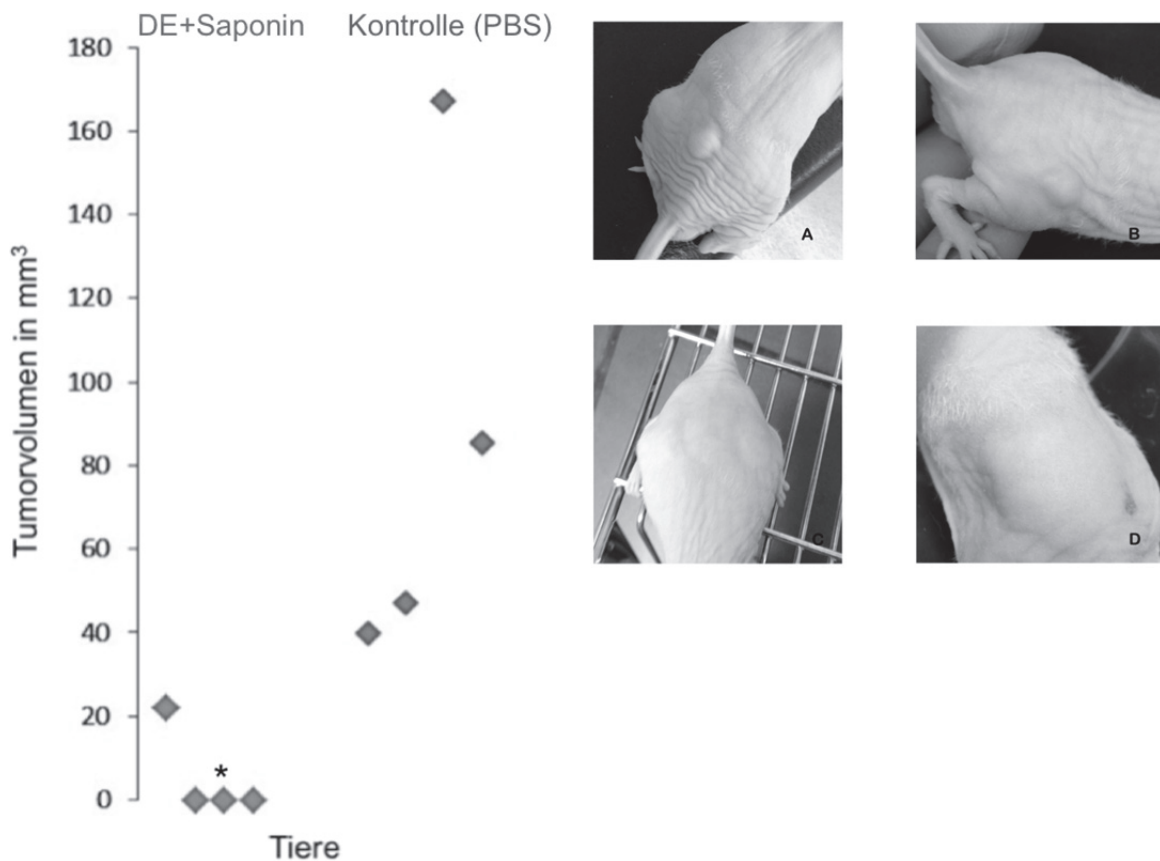


Abbildung 30: In dieser Abbildung sind die Tumorgrößen der HCT116-Zell-Tumoren nach Ende der Therapie in Diagrammform dargestellt. In diesem Versuch wurde den Tieren (n=4) eine Anzahl von 2×10^6 HCT116 Zellen injiziert. Nach 16 Tagen, als Tumoren palpabel waren, wurde mit der Therapie begonnen. Es wurden 5 Therapien im Abstand von 4 Tagen durchgeführt. Nach Abschluss der Therapie wurden die Länge und Breite der Tumoren jeweils 3fach gemessen und das Volumen nach der Formel $(\pi/6) \times (\text{Länge} \times \text{Breite})$ berechnet. Der Mittelwert wurde graphisch dargestellt. Die Kontrolltiere bekamen 200 μl NaCl/Therapieeinheit injiziert. Die Tumorregression beträgt 96,2 % * $p \leq 0,05$. Die Fotos zeigen jeweils zwei Tiere aus der Kontrollgruppe (A und B) und aus der Therapiegruppe (C und D).

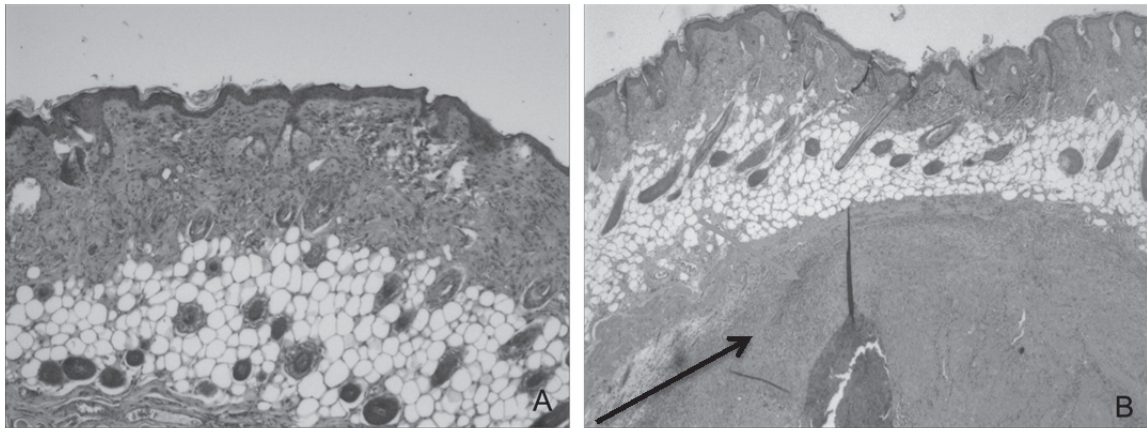


Abbildung 31: (A) Exemplarische, histologische Abbildung der Inokulationsstelle nach Ende der Therapie. Zellstrukturen (*Epidermis*, *Dermis* und *Subkutis*) wurden mittels HE-Färbung sichtbar gemacht. (B) Mit schwarzem Pfeil gekennzeichnet, subkutaner Tumor eines Kontrolltieres ohne Therapie.

3.5.7 Ergebnisse der PET Untersuchung von soliden HCT116-Zell-Tumoren in Nacktmäusen

Neben dem histologischen Nachweis von einzelnen Tumorzellen stellt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eine sehr gute Alternative dar, um die erhöhte Aufnahme von Glukose durch tumorös entartete Zellen im Verbund abzubilden. Somit kann man sowohl die Größe eines Tumors genau feststellen, als auch Aussagen über die Glukoseaufnahme des Gewebes und der damit einhergehenden Malignität tätigen. In diesem Versuch wurde diese Technik mit der Computertomographie kombiniert. Somit können Lokalisation und Aufnahmeverhalten der Tumoren gleichzeitig betrachtet werden.

Für diesen Versuch wurde das Glukose-Analogon 2-Fluor-2-desoxy-D-glucose (^{18}FDG) benutzt. In vorherigen Experimenten wurde die optimale Zeitspanne von der Verabreichung des ^{18}FDG bis zum PET-Scan bei 20 Minuten p. i. [94] festgelegt. Abbildung 33 zeigt eine typisch erhöhte Aufnahme von ^{18}FDG in den Regionen von Blase, Niere, Leber und Herz. Der rote Pfeil signalisiert die Region des Tumors der im CT bereits lokalisiert wurde und mit der Lokalisation des Tumors im PET-Bild übereinstimmt. Die Aufnahme von ^{18}FDG durch den Tumor mit einer Größe von 4–8mm in einer Dimension bei einer Gerätesensibilität von 4,4 mm ist verhältnismäßig hoch.

Abbildung 34 zeigt ein Tier, welches mit DE und SO1861 an den Tagen 16, 19, 22, 25 und 28 behandelt wurde (s. 3.5.6). Vergleicht man dieses Tier mit dem nicht behandelten Tier, welches an ähnlicher Stelle HCT116-Zellen injiziert bekommen hatte, aber keine ^{18}F FDG-Aufnahme erkennen lässt, bestätigt sich die Annahme, dass der Tumor komplett nekrotisiert ist oder eine Größe geringer als 2 mm hat, was in diesem Gerät nicht mehr zu detektieren gewesen wäre.

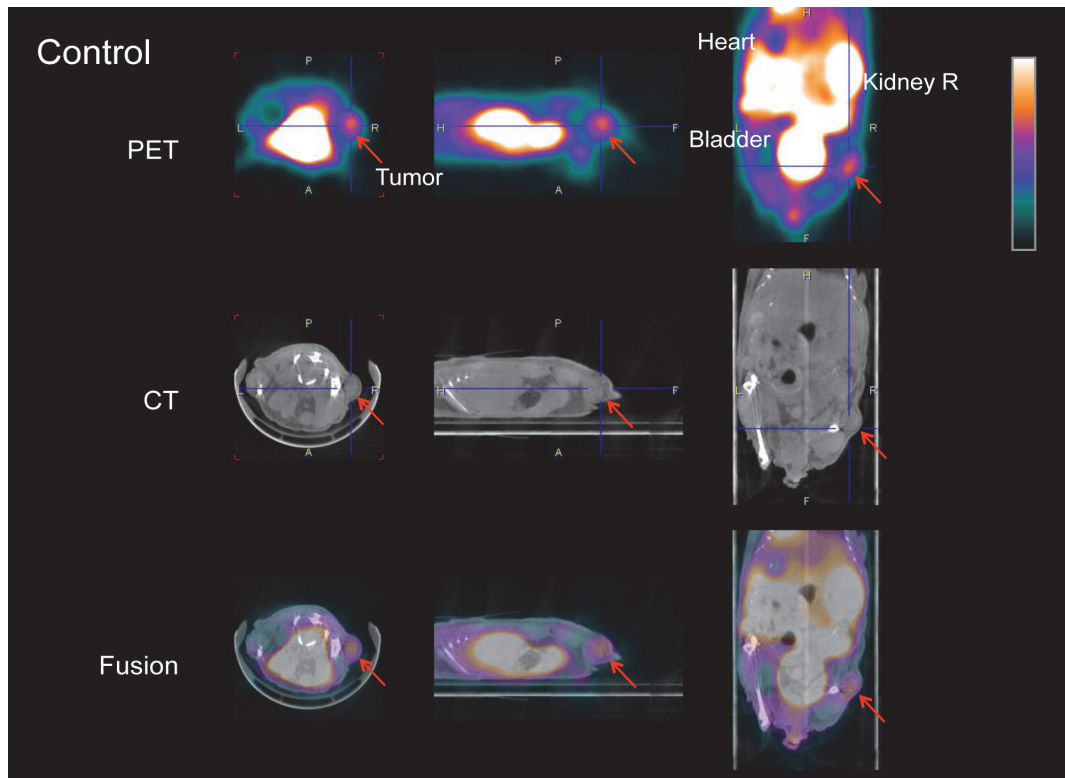


Abbildung 32: Transaxiale, sagittale und coronale Abbildungen von ^{18}F FDG-PET, CT, und fusionierten Bildern. Die roten Pfeile zeigen die Lokalisation der Tumoren mit deutlicher ^{18}F FDG Aufnahme. Die Bilder wurden 20 min nach Injektion von 37 MBq ^{18}F FDG in die Schwanzvene aufgenommen.

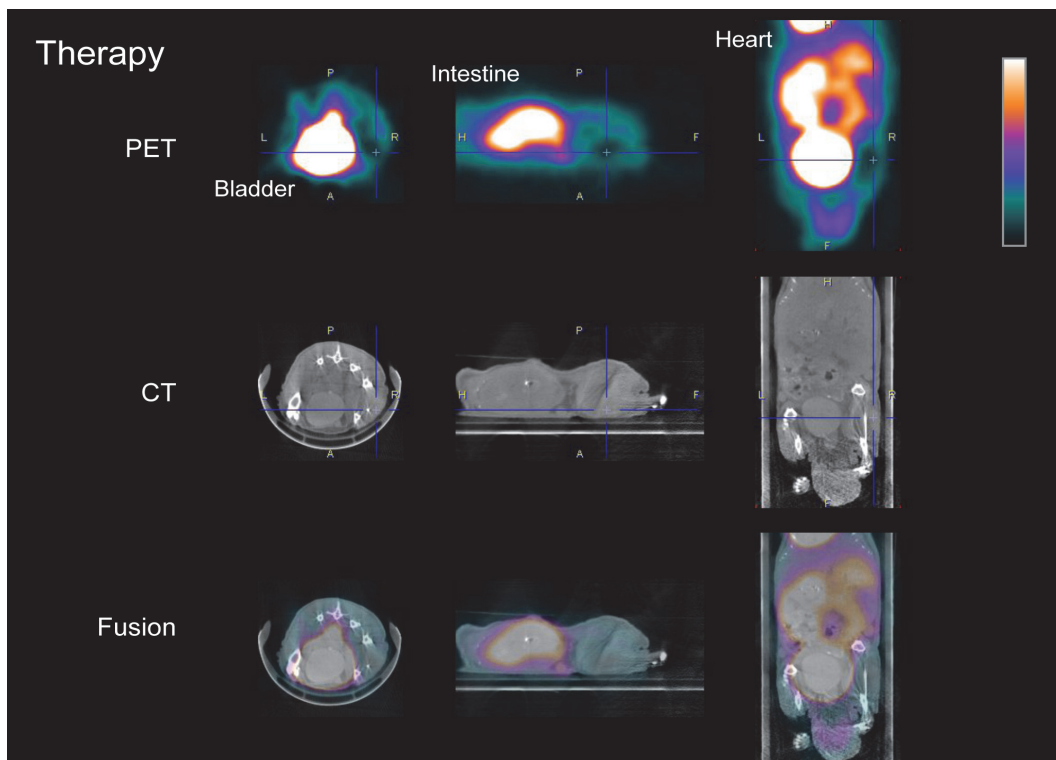


Abbildung 33: Transaxiale, sagittale und coronale Abbildungen von ^{18}F FDG PET, CT, und fusionierten Bildern von Tieren, die für 15 Tage mit der Kombinationstherapie aus DE und SO1861 behandelt wurden. Es ist keine Aufnahme von ^{18}F FDG in das Tumorgewebe festzustellen. Die Bilder wurden 20 min nach Injektion von 37 MBq ^{18}F FDG in die Schwanzvene aufgenommen.

3.5.8 Entwicklung eines disseminierten Tumormodells mit MDAMB Zellen in Nacktmäusen

In allen bisher beschriebenen Experimenten hat sich gezeigt, dass die eingesetzte Kombinationstherapie zielgerichtet Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zum Zelltod zwingt. Gesundes Gewebe wurde durch die eingesetzte Therapie nicht negativ beeinflusst. Unter 3.5.3 wurde bereits versucht, ein disseminiertes Tumormodell zu entwickeln. Da die dort angewendete Methode nicht erfolgreich war, wurde in diesem Versuch erneut angestrebt, ein disseminiertes Tumormodell zu entwickeln. Es sollte so aufgebaut sein, dass es einer klinischen Studie besonders nahe kommt indem es die Streuung von Tumorzellen *post operationem* abbildet. Um dieses Modell umzusetzen wurden 4 weiblichen nu/nu Mäusen 2×10^6 MDA/MB Zellen in die Schwanzvene injiziert.

Den Kontrolltieren (n=4) wurde NaCl (0,9%) i.v. injiziert. Nach einer Wartezeit von 140 Tagen waren solide Tumoren an der Injektionsstelle der Tumorzellen sichtbar (s. Abbildung 35). Dies wurde gleichzeitig also Indikator für die Etablierung von Metastasen gewertet, da die Tiere keine sonstigen Beeinträchtigungen wie z. B. Gewichtsverlust oder Verhaltensänderung zeigten. Die Tiere wurden nach Auftreten der Tumoren getötet, die Organe entnommen und histologisch untersucht. In der Literatur ist beschrieben [95], dass MDAMB231 Zellen besonders in das Lungengewebe metastasieren. In Abbildung 36 ist eine Lungenmetastase eines Tieres exemplarisch dargestellt. Bei 3 / 4 der Tiere traten diese Metastasen auf. Die Abbildung zeigt eine HE-Färbung eines Querschnitts durch die Lunge des Tieres mit etablierten Lungenmetastasen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass MDAMB231 Zellen durch i.v. Injektion erfolgreich für die Etablierung eines Metastasenmodells in Nacktmäusen eingesetzt wurden. Dies erweitert das Anwendungsgebiet der Kombinationstherapie aus DE/SE + Saponin für die Behandlung von disseminierten Tumoren.

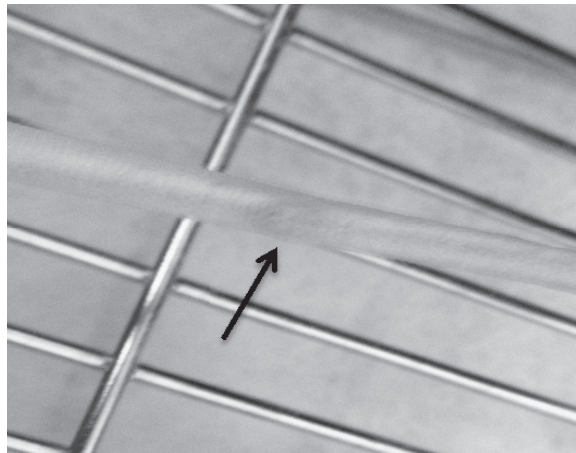


Abbildung 34: Tumor an der Injektionsstelle der Schwanzvene einer weiblichen Nacktmaus, verdeutlicht mit einem schwarzen Pfeil. Der Tumor trat 140 Tage nach der Injektion von 2×10^6 Zellen auf und hatte eine Größe von 3–4 mm.

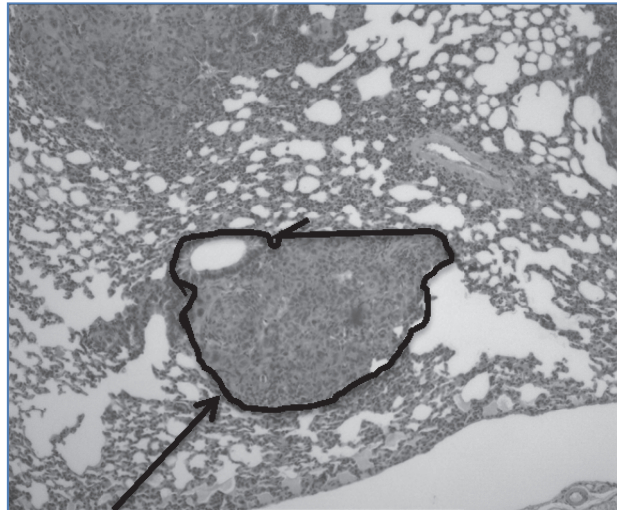


Abbildung 35: Histologische Abbildung einer durch MDA-MB231 Zellen induzierte Lungenmetastase. Die Lungenmetastase, die durch den schwarzen Pfeil und die Umrandung markiert wurde, wurde 140 Tage nach der intravenösen Injektion der Zellen festgestellt. Das Lungengewebe wurde mittels HE-Färbung eingefärbt.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Stabilität und der enzymatischen Aktivität von SE und DE

Aufgrund der in dieser Arbeit unter 3.1 dargestellten Ergebnisse, bedarf es einer vergleichenden Diskussion der Expression zwischen den beiden zielgerichteten Toxinen DE und SE.

Trotz der gleichen Art und Weise der Expression von DE und SE wurde eine signifikant höhere Menge an DE exprimiert [96]. Hinzu kommt, dass Dianthin der Literatur zufolge eine geringere Immunogenität als Saporin [97] hat, obwohl die beiden Fusionsproteine eine Ähnlichkeit von 92% im Bezug auf ihre Aminosäuren-Sequenz aufweisen [43].

Gibt es die Absicht, eine Substanz nach einer gewissen Zeit der Lagerung und unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen zu nutzen, ist es ratsam, diese Eigenschaften im Vorfeld etwaiger *in-vitro*- oder *in-vivo*-Experimente genauer zu untersuchen.

Durch die für diese Arbeit ausgewerteten Versuche (s. 3.1.1) wurde angenommen, dass DE eine relative, höhere Stabilität aufweist. Gleiche Mengen von SE und DE wurden hierfür jeweils für eine halbe Stunde einer Temperatur von 24°C ausgesetzt und anschließend die Stabilität in einem SDS-Gel miteinander verglichen. Bei einer Exposition der beiden Proteine bei 24°C wurde bei SE ein deutlich höherer Zerfall sichtbar (3.1.1). Betrachtet man, wie sich SE im SDS-Gel darstellt, könnte man annehmen, dass der Verlust von SE durch Aggregation aufgrund von thermaler Instabilität stattgefunden hat [96].

Bisher wurden zur Detektion der enzymatischen Aktivität von Ribosomen inaktivierenden Proteinen (wie DE und SE) hauptsächlich Methoden verwendet die man entweder indirekten oder direkten Testsystemen zuordnen kann. Bei den direkten Testsystemen unterscheidet man solche, die eine Auswirkung auf die Translationsaktivität im Reticulozytenextrakt [98, 99] oder solche, die die aminkatalysierte Hydrolyse von RNA nach Deadenylierung [99, 100] detektieren. Die direkten Testsysteme messen die Freisetzung von radioaktiv markiertem Adenin aus einem radioaktiven DNA-Substrat [101] oder die Menge von fluoreszenzmarkiertem Adenin in der HPLC [102].

Nach der Auswertung der durchgeführten Versuche konnte festgestellt werden, dass DE eine höhere, spezifische enzymatische Aktivität besitzt (s. Abbildung 9).

Aufgrund der Tatsache, dass die N-Glykosidase-Aktivität der RIP's nicht nur auf die 28S-rRNA der Ribosomen beschränkt ist, kann hier die Freisetzung von Adenin aus anderen RNA- und DNA-Substraten als direktes Maß für die Aktivität der RIP's herangezogen werden [42].

An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, dass die reine Proteinmengenangabe niemals eine absolute Auskunft darüber geben kann, wie groß die Menge an aktivem Protein tatsächlich ist, da auch kleine Mengen richtig gefalteten Proteins besser wirken können, als große Mengen falsch gefalteten Proteins. Es sollte ebenfalls erwähnt werden, dass auch andere Substanzen bei einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren und demzufolge diese Substanzen auch photometrisch (s. 2.5.9) hätten detektiert werden können. Dies hätte dann wiederum zu einer falsch-positiven Bewertung der Enzymaktivität geführt. Allerdings kann man dieser Aussage entgegen halten, dass es letztendlich darauf ankommt, ob die Konzentrationen der anderen Substanzen sich während der Durchführung der Messungen verändern, oder nicht. Dies war für das vorliegende Experiment nicht anzunehmen, sodass die Absorptionsänderung höchstwahrscheinlich ausschließlich auf die Änderung der Adeninkonzentration zurückzuführen ist. Diese genannten Beobachtungen haben dazu geführt, DE für die späteren Xenograft-Versuche zu nutzen, obwohl bereits syngene Balb/c-Tumormodelle mit SE erfolgreiche etabliert wurden [103]. Die für diese Arbeiten durchgeführten Experimente konnten demonstrieren, dass die Veränderung der Absorption während der Messungen nur von der Menge des freigesetzten Adenins abhängt. Allerdings kann man davon ausgehen, dass aufgrund der ungewollt mitgemessenen Substanzen ein konstant höherer Hintergrund-Wert gemessen wurde, was zu einer Abnahme der Sensitivität des Assays geführt haben könnte. Dieser Sensitivitätsverlust wäre dann von der Relation zwischen Signalveränderung und Hintergrundwert abhängig. Aus diesem Grund wurden diese photometrischen Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit mit einem Nanodrop-Gerät erhalten wurden, mit den Ergebnissen einer HPLC-Analyse verglichen (Ergebnisse nicht gezeigt; persönliche Mitteilung von Hendrik Fuchs)¹. Daraus geht hervor, dass die Nanodrop-Methode zwar weniger sensitiv ist, aber die Aktivität über einer Schwellenkonzentration in linearer Weise abbilden kann. Um folglich

¹ Zur Verfügung gestellte, unveröffentlichte Daten „Quantitation of Saporin- and Ricin-mediated Adenine Release“, Fuchs *et al.*

die Aktivität von einem aufgereinigten Protein wie Dianthin oder Saporin zu bemessen, ist die Sensitivität dieser Methode ausreichend und weniger zeitaufwändig.

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Methoden zum Vergleich von SE und DE wurden in Anlehnung an die Experimente zur Temperaturstabilität der beiden Toxine Zirkulardichroismus-Untersuchungen nach Lagerung bei Raumtemperatur und Lagerung unter gekühlten Bedingungen durchgeführt (0). In den Ergebnissen dieser Experimente wird deutlich, dass sich die Struktur der beiden untersuchten Proteine DE und SE nur im Fall von DE verändert. Es handelt sich hierbei um eine geringgradige Verschiebung der Kurve bei der Messung des Proteins unmittelbar nach dem Auftauen. Durch die Ergebnisse dieses Experiments lässt sich demnach die unter 4.1 diskutierte Instabilität von SE nicht erklären. Auch bei der anschließenden Messung der Schmelzkurven lagen die Wendepunkte der beiden Graphen bei sehr ähnlichen Temperaturen (0). Um, und dies gilt für beide der hier dargestellten Methoden, eine gesicherte Aussage über die Stabilität der Toxine zu treffen, müsste einerseits mit absoluten Proteinkonzentrationen gearbeitet werden, welche schwer zu ermitteln sind [96], andererseits ist ersichtlich, dass nur eine Methode allein zur Beurteilung der Toxinstabilität von SE und DE nicht ausreichend sein kann.

Die Methode der Zirkulardichroismus-Spektroskopie wurde in dieser Arbeit ebenfalls dafür genutzt, um festzustellen, ob sich die Konformation der beiden Toxine SE und DE nach Zugabe eines amphiphilen Saponins ändert (Abbildung 12). Bevor das Saponin zugegeben wurde, stellten sich beide Toxine in einer β -Faltblattstruktur dar. Nach der Zugabe des Saponins bei neutralem pH-Wert erscheint es so, als ob sich die Konformation der Toxine in beiden Fällen zu einer β -Helixstruktur geändert habe. Aufgrund der Ergebnisse könnte man davon ausgehen, dass die Eigenschaften der Saponine, nämlich die Oberflächenspannung herabzusetzen, gleichzeitig diese Konformationsänderung bewirken [61]. Diese Tatsache liefert eine wesentliche neue Erkenntnis, nämlich dass Saponine eventuell in der Lage sind, die Gestalt der β -Faltblattstruktur durch eine Interaktion mit den Toxinen zu verändern und eventuell genau durch diesen Mechanismus die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesene, effektsteigernde Wirkung auf SE und DE zu verursachen. Um die Interaktion zwischen Saponin und SE/DE besser verstehen zu können, sollten weitere CD-Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt werden. Ein entscheidender Grund für die Durchführung dieser Experimente ist die Tatsache, dass der Verstärkungseffekt der Saponine in saurem pH-Milieu stattfindet (s. Abbildung 6). Ein weiterer Grund, warum diese Messungen von großem Interesse wären, ist die Tatsache,

dass die Interaktion von Saponin und Toxin *in vivo* tumorassoziiert stattfinden sollten. Die vorherrschenden pH-Werte in Tumorgewebe sind jedoch niedriger [104] als in normalem Gewebe. Aus diesem Grund könnte eine solche Untersuchung gute Hinweise auf die Interaktion von Saponin und Toxin und die strukturellen Veränderungen des Toxins während der Interaktion geben.

4.2 Charakterisierung der Saponine

Bevor die Saponine für weitere Untersuchungen, insbesondere in *in-vivo*-Experimenten genutzt werden konnten, wurden sie mittels ESI-TOF MS auf ihre Reinheit hin überprüft [80, 103]. Sowohl für die *in-vivo*-Experimente, jedoch insbesondere bei der Anwendung der Saponine im Tier, ist die größtmögliche Reinheit der verwendeten Stoffe von besonderer Wichtigkeit, da unerwünschte Nebenwirkungen aufgrund von verunreinigtem Material die Ergebnisse der Studien verfälschen könnten. Die für diese Arbeit verwendeten Saponine (SO1861 und SA1641) haben laut Literatur eine Reinheit von über 80 %. Dies stellt für pflanzliche Saponine einen enorm hohen Reinheitsgrad dar. Diese Annahme wurde durch Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie gestützt [62, 105].

Eine weitere Untersuchung, die vor dem Einsatz der Saponine *in vivo* durchgeführt wurde, ist die Evaluierung der hämolytischen Aktivität der Saponine in dieser Arbeit. Es wird deutlich, dass SO1861 die geringste hämolytische Aktivität hat. Gleichzeitig zeigt sich, dass die hämolytische Aktivität der Saponine durch die gleichzeitige Inkubation mit DE nicht negativ beeinflusst wird. In Kombination mit den Aussagen der Aktivitätsstudien wonach SO1861 eine sehr gute Wirksamkeit zeigt, könnte dieses Saponin als eines der sichersten Kandidaten für weiterführende Experimente sowohl *in vitro* als auch *in vivo* angesehen werden.

4.3 Untersuchung der EGFR-Expression

Um eine erfolgreiche Tumorthherapie zu etablieren, ist es notwendig einen geeigneten Zielzellrezeptor auszuwählen. Im Fall dieser Arbeit handelte es sich um EGFR, ein 170 kDa großes Glykoprotein, welches zu einer Unterfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört [106]. Da viele Tumorentitäten EGFR überexprimieren [107], ist es sinnvoll, eine zielgerichtete Tumorthherapie auf diese Rezeptoren hin auszurichten. Wegen der bereits

lange bekannten Eigenschaften von EGFR [108] sind mittlerweile über zehn Substanzen Teil von fortgeschritten klinischen Studien, die EGFR als Zielzellrezeptor einsetzen, um verschiedenste Krebsarten zu behandeln [109-112]. Um die Rezeptoren sowohl auf der Oberfläche als auch intrazellulär nach Lyse der Zielzellen nachzuweisen, wurde eine Westernblot-Analyse (2.6.6) durchgeführt. Im Ergebnis dieser Analyse lässt sich erkennen, dass EGFR in allen von mir verwendeten, humanen, nicht transfizierten Ziellinien überexprimiert wird. Weitere Experimente wurden durchgeführt, um die Spezifität der zielgerichteten Tumorthherapie auf EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen zu untersuchen. Der synergistische Effekt von DE in Kombination mit dem Saponin SO1861 in NIH-Zellen, welche keine EGF-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aufweisen, konnte erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden.

Nach der Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten wurden die Tumore der Tiere, die keine Therapie erhalten hatten, entnommen und auf die Expression von EGFR auf der Oberfläche ihrer Zellen überprüft. Die immunhistochemische Färbung der Zellen zeigt eine deutliche Überexpression von EGFR auf den Tumorzellen. Der Nachweis von EGFR auf den Zellen der resizierten Tumoren verdeutlicht noch einmal, dass die Injektion der Zellen in die Tiere und auch das Wachstum der Tumoren die Rezeptorexpression nicht negativ beeinflusst haben, was eine erfolgreiche, zielgerichtete Therapie überhaupt erst ermöglichte.

4.4 Bestimmung der Zytotoxizität

4.4.1 Endpunktmessungen

Bevor zytotoxische Substanzen *in vivo* getestet werden, muss eine *in-vitro*-Evaluierung der eingesetzten Komponenten durchgeführt werden. Im Zuge der Evaluierung dieser Komponenten wurden unterschiedliche Techniken angewandt. Zunächst wurden Endpunkt-Assays durchgeführt, um die Toxizität der Toxin/Saponin-Kombination anhand der Zellen zu untersuchen, die später für die Etablierung eines syngeneten Tumor-Modells genutzt werden sollten. Diese Methode lieferte aussagekräftige Informationen darüber, ob die Toxizität des Toxins SE durch die Zugabe des Saponins SA1641 massiv gesteigert werden konnte. Problematisch bei den Versuchen mit Endpunkt-Assays ist jedoch, dass sie keine Informationen darüber geben, ob und was nach Beendigung, also nach Zugabe des

MTT noch hätte dokumentiert werden können. Darüber hinaus kann keine direkte Aussage darüber getroffen werden, was sich in jeder einzelnen Reaktionskammer zu jeder Zeit während des gesamten Versuchs, also bezüglich der Kinetik des Versuchs abgespielt hat.

4.4.2 Echtzeitmessungen

4.4.2.1 Eigentoxizität der Saponine

Um weitere Informationen über die Zellzytotoxizität der unterschiedlichen Toxine und Saponine zu erlangen, bestand die Möglichkeit, im späteren Verlauf der Versuche dieser Arbeit mit einem Echtzeit-Zellimpedanz-Messgerät arbeiten zu können (2.6.5).

Zunächst wurde so die Eigentoxizität der Saponine untersucht. Es stellte sich heraus, dass im direkten Vergleich GS16 und SO1861 eine höhere Eigentoxizität aufweisen als SA1641. Der Literatur folgend könnte man annehmen, dass die höhere Toxizität von SO1861 und GS16 auf die höhere membranpermeabilisierende Wirkung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an Position 16 ihres Grundgerüsts zurückzuführen ist [113, 114]. Dieser Umstand wurde für Saponine der Oleanan-Gruppe beschrieben [113]. Da allerdings die Struktur von GS16 nicht bekannt ist, bleibt dies eine Vermutung und nur der höhere toxische Effekt von SO1861 könnte so erklärt werden.

4.4.2.2 Zytotoxizität bei kombinierter *in-vitro*-Anwendung von Saponinen und Tumortoxinen

Häufig zeigt sich eine starke Diskrepanz zwischen erfolgreichen Therapieresultaten präklinischer Tumormodelle und enttäuschenden Ergebnissen daraufhin durchgeführter klinischer Studien. Um jedoch zufriedenstellende Ergebnisse in Xenotransplantat-Modellen, also Modellen mit humanen Zellen, zu generieren, ist es von großem Vorteil, vor diesen Studien wesentlich kostengünstigere, syngene Mausmodelle zu etablieren. Aus diesem Grund wurden Echtzeit-Impedanzmessungen mit transfizierten Mauszelllinien durchgeführt (Abbildung 22). Im Ergebnis dieser Experimente konnte einerseits eine Aussage über die unterschiedliche Toxizität der Saponine getroffen werden, andererseits wird klar, dass die Wirksamkeit der Kombinationstherapie erst durch die Anwesenheit der Saponine sichtbar wird.

Ein möglicher Kritikpunkt dieser Experimente könnte sein, dass keine Kurve die Toxizität der Toxine alleine darstellt. Jedoch konnte diese Frage nach der Eigentoxizität der Toxine, durch bereits von Gilibert-Oriol *et al.* publizierte Versuche eindeutig beantwortet werden [43].

In der Zielsetzung dieser Arbeit lag deshalb ein besonderer Fokus darauf, humane Zelllinien für ihre spätere Etablierung in Xenotransplantat-Modellen besser beurteilen zu können. In allen von mir durchgeführten Experimenten mit humanen Zelllinien (HCT116 und MD-AMB231) konnte der synergistische Effekt von DE und SE und dem Saponin SO1861 mittels Echtzeit-Messung über mehrere Tage beobachtet werden. Es sei an dieser Stelle vorweggenommen, dass auch die *in-vivo*-Experimente einen erfolgreichen Verlauf nahmen, was die Kombinationstherapie mit Aussicht auf eine klinische Anwendung besonders interessant machen könnte.

Im Hinblick auf spätere klinische Perspektiven der von mir angewendeten zielgerichteten Tumortherapie ist es darüber hinaus wichtig, die Dynamik der Impedanzveränderungen durch die Therapie *in vitro* besser zu verstehen. Basierend auf diesen Ergebnissen, also der Analyse des Zellverhaltens im xCelligence-Assay, wäre es zukünftig einfacher, beispielsweise rekultivierte Tumorzellen, die direkt vom zu behandelnden Patienten stammen, auf die Wirksamkeit der Therapie hin *in vitro* zu testen, um den Erfolg der geplanten Therapie vorab auf Erfolgswahrscheinlichkeit zu prüfen.

4.5 *Ex-vivo*-Ergebnisse

Da in der Literatur beschrieben ist, dass Saponine hämolytische Effekte haben [115], wurde den Tieren, welchen innerhalb der Toxizitätsstudien die Saponine injiziert wurden, Blut entnommen und auf hämolytische Veränderungen hin untersucht. Die individuelle Betrachtung der Blutausstriche zeigte keine Veränderung der Erythrozyten, die auf eine hämolytische Dosierung der Saponine hinweisen würde. Diese Ergebnisse lassen erneut Rückschlüsse darauf zu, dass die in diesen Dosen angewandte Kombinationstherapie kein anämisches Risiko für die Tiere darstellt.

4.6 *In-vivo*-Ergebnisse

Wie bereits erwähnt lag der Hauptfokus dieser Arbeit darin, ein Tumormodell zu entwickeln, das so gut wie möglich die Gegebenheiten des humanen Organismus widerspiegelt.

Cetuximab und Panintumumab sind monoklonale Antikörper, welche spezifisch EGFR auf der Oberfläche von Tumorzellen attackieren. Ca. 40 % aller Krebsarten haben jedoch Mutationen auf dem *KRAS*- oder *BRAF*-Gen und machen somit diese beiden Medikamente obsolet [116]. EGFR-Expression ist ein kritischer Faktor, wenn es um das Wachstum von Tumorzellen geht. Mehr und mehr werden jedoch Resistenzen gegen Medikamente, die spezifisch diesen Rezeptor ansteuern, ausgebildet [30, 117].

Bezüglich der dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente, muss natürlich erwähnt werden, dass eine so hohe Rezeptorexpression wie in den angewandten Modellen nur selten in natürlichem Tumorgewebe zu finden wäre. Deswegen treten zytotoxische Wirkungen bei den bisher gängigen Therapien nicht nur in Krebszellen auf, sondern ebenfalls in gesundem Gewebe [96]. Um die antitumoralen Effekte zu verstärken und die systemische Toxizität zu verringern, wurden die einzelnen Therapiedosen der hier durchgeführten Tierexperimente in der Nähe der subkutanen Tumoren injiziert.

4.6.1 Tumorthherapie mit GS16 und SA1641 am syngenem Mausmodell

Wie in den bisher beschriebenen *In-vitro*-Versuchen deutlich wurde, wies GS16 die höchste Toxizität auf. Für die Experimente am Tier wurde dieses Toxin als erstes in einem syngenem Mausmodell getestet. Obwohl für die Tierexperimente keine toxischen Konzentrationen verwendet wurden, war es sinnvoll, die Testung des am meisten toxischen Saponins an den Anfang der für diese Arbeit durchgeführten Tierversuche zu setzen. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die im weiteren Verlauf eingesetzten, strukturverwandten Saponine keine überraschenden, unerwünschten Wirkungen zeigen würden. Im Fall des *in vivo* zuerst getesteten GS16 konnte weder eine Abnahme des Gewichtes noch eine Zunahme des Milzgewichtes (Anzeichen einer Immunreaktion) festgestellt werden. Im Anschluss an die Toxizitätsstudien wurde ein *in-vivo*-Tumormodell mit transfizierten Mauszellen etabliert, in welchem die Kombinationstherapie aus GS16 und SE getestet wurde. Der tumorreduzierende Effekt der Therapie war in diesem Modell besonders gut sichtbar. Über die Zeit des Versuchs war eine Tumorreduktion von 100% zu verzeichnen. Für den Test des zweiten Saponins (SA1641) in einem syngenem Mausmodell mit dem gleichen experimentellen Aufbau konnten ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden. Aufgrund der bereits dokumentierten geringeren Toxizität dieses Saponins wurde für diesen Versuch nur eine höhere Dosisvariante dieses Saponins eingesetzt.

4.6.2 Tumorthherapie am Xenotransplantat-Modell mit SO1861

Für dieses Experiment wurde der gleiche Versuchsaufbau wie für die beiden bereits beschriebenen Tierexperimente verwendet mit dem einzigen, jedoch entscheidenden Unterschied, dass hierbei humane Kolonkarzinomzellen verwendet wurden. Diese wurden CD1 nu/nu Mäusen subkutan in die Flanke injiziert. In diesem Experiment konnte eine erfolgreiche Tumorreduktion um durchschnittlich 90% erreicht werden. Zusätzlich zu der normalen pathologischen Auswertung des Versuchs wurden die Tumore in diesem Fall mittels PET (2.9.2) am lebenden Tier detektiert.

Für zukünftige Experimente ist diese Methode eine gute Möglichkeit, die Entwicklung der Tumore am lebenden Tier zu visualisieren. Besonders für disseminierte Tumormodelle kommt diese Art der Tumorstadiumskontrolle in Betracht, solange die Sensibilität des PET-Gerätes dafür ausreichend ist. Die hier abgebildeten Versuche mittels PET belegen

die generelle Funktionalität der ^{18}F FDG-Detektion, um die induzierten Tumoren zu verifizieren.

Durch den Umstand, dass Xenotransplantatmodelle für die Voreinschätzung von zielgerichteten Tumormedikamenten gut etabliert sind, könnte der Erfolg der hier dargestellten Therapie eine gute Möglichkeit sein, um andere Kolonkarzinommodelle erfolgreich zu entwickeln [118, 119]. Durch die Wahl vergleichsweise alter Tiere sollte die funktionsweise der Therapie an entsprechend älteren Menschen nachempfunden werden [120]. Da Kolonkarzinome vornehmlich ab dem 50. Lebensjahr auftreten, gewinnt die Therapie angesichts des demographischen Wandels an Relevanz [121, 122].

Auch wenn die Übertragung der *in-vitro*-Ergebnisse auf ein *in-vivo*-Modell einen großen Fortschritt darstellt und die Effektivität der Kombinationstherapie untermauert, wäre es zukünftig sinnvoll, eine weitere Art der Injektion, beispielsweise intraperitoneal oder intravenös zu evaluieren. Für eine eventuelle klinische Etablierung der Kombinationstherapie ist eine lokale Injektion in Tumornähe eher nicht praktikabel.

Ein weiteres Desiderat, das für alle hier betrachteten Tierexperimente gilt, wäre eine längere Laufzeit der tierexperimentellen Studien. Um über die Rezidiv-Eigenschaften der Tumore und somit über die Verlässlichkeit der Therapie eine Aussage treffen zu können, wären solche Experimente sehr wichtig. Allerdings bestand für die bisher durchgeführten Versuche die Schwierigkeit, dass die Tumoren der Kontrollgruppen ein zu großes Volumen erreichten, um die Versuche ohne tierschutzrechtliche Bedenken weiterführen zu können. Für alle dargestellten Tumormodell-Experimente ließe sich die Frage stellen, warum die Tiere nicht als Kontrolle mit den jeweiligen Toxinen allein behandelt wurden, um festzustellen, ob nicht auch auf diese Weise ein tumorreduzierender Effekt erzielt werden könnte. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass eine Konzentration von $5\mu\text{g}/\text{Injektion}/\text{Tier}$ nötig wäre um diesen Effekt zu erzielen. Diese Dosis wiederum wäre mit erheblichen unerwünschten Nebenwirkungen verbunden [123, 124] und demnach tierschutzrechtlich nicht vertretbar gewesen.

4.6.3 Disseminierte Tumormodelle

Zur Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten mit der Kombinationstherapie wurde in dieser Arbeit versucht, ein disseminiertes Tumormodell, wie bereits ins der Literatur beschrieben, zu etablieren [93]. Zunächst wurde versucht, mittels Tumorresektion ein Metastasenmodell zu entwickeln. Jedoch bildeten die Tiere nach der Operation in den

meisten Fällen sehr schnell Rezidivtumoren von großen Volumina aus, sodass bis zu einer eventuellen Metastasierung nicht mehr gewartet werden konnte ohne die erlaubte Maximalgröße der Tumoren von 1 cm zu überschreiten.

Eine weitere Möglichkeit, um ein disseminiertes Tumormodell zu entwickeln, wurde mittels intravenöser Zellinjektion getestet (s. 3.5.8.). Dazu wurden humane Brustkrebszellen in weibliche Nacktmäuse injiziert. Grundsätzlich war die Etablierung dieses Modells erfolgreich, wie sich an dem histologischen Bild einer Lungenmetastase auf Abbildung 36 erkennen lässt. Allerdings betrug die Wartezeit nach Injektion der Zellen bis zum Nachweis der Metastasen ca. 140 Tage. Darüber hinaus entwickelten sich solide Tumoren im Bereich der Injektionsstelle.

Es wurde versucht, eine kontinuierliche Metastasen-Überwachung im PET durchzuführen. Die Auflösung des Gerätes war für die Größe der Metastasen jedoch zu gering. Auch andere Methoden wie z. B. die Fluoreszenzmarkierung der Toxine zum Sichtbarmachen der kleinen, sehr tiefliegenden Metastasen wären in diesem Fall nicht erfolgversprechend gewesen.

Das Auftreten der Tumoren an der Injektionsstelle der Tumorzellen wurde schließlich als Anhaltspunkt gewertet, dass auch histologisch Metastasen nachzuweisen sein könnten. Nachdem dies auch bestätigt werden konnte, kann die Methode zur Etablierung eines disseminierten Tumormodells zukünftig genutzt werden, da davon ausgegangen werden kann, dass sich die Tumorzellen grundsätzlich im gewünschten Zielgewebe in Form von Metastasen ausbreiten.

Man könnte rückwirkend in Betracht ziehen, dass eine Injektion der Mammakarzinomzellen in das Fettpolster der Brustdrüse der weiblichen Mäuse eine schnellere Metastasierung herbeiführen hätte können [125].

4.7 Ausblick

Die Entwicklung neuer Krebsmedikamente ist nach wie vor von großer Bedeutung und es besteht eine wachsende Nachfrage nach einer Weiterentwicklung bereits bestehender anti-tumoraler Wirkstoffkombinationen [126]. Als eine Art Plattformtechnologie wäre es möglich z. B. Dianthin an eine Vielzahl von monoklonalen Antikörpern oder andere *Targets* zu koppeln [32]. Mit Saponin als effektverstärkender Substanz wäre diesbezüglich ein breiterer therapeutischer Erfolg erreichbar. Es wurden bereits Arbeiten von Gilbert-

Oriol *et al.* durchgeführt, bei denen die effektverstärkende Eigenschaft des Saponins in Kombination mit Dianthin gekoppelt an Trastuzumab und Cetuximab *in vitro* erfolgversprechende Ergebnisse gezeigt hat [32]. Saponine sind darüber hinaus in der Lage solide Lipid-Nanopartikel zu formen [127]. Es wäre demnach denkbar, ein Ein-Komponenten-System zu entwickeln bei dem eine gleichzeitige Freisetzung von verstärkender Substanz und Proteintoxin in der Zelle stattfindet. Das Toxin wäre in diesem Fall im Nanopartikel des Saponins eingekapselt. Aufgrund der geringen Größe des Nanopartikels würde dieser in das Innere der Tumorzelle gelangen und dort seine Wirkung entfalten. Als weiterer Aspekt für die Zukunft könnte die Interaktion zwischen Saponin und den Ribosomen inaktivierenden Proteinen (SE und DE) weitergehend untersucht werden. Es wurde in dieser Arbeit bereits angesprochen, dass es augenscheinlich zu einer Konformationsänderung der Proteintoxine in Anwesenheit der Saponine kommen könnte. Es wäre beispielsweise wünschenswert, diese Änderung in der Faltung der Proteintoxine mit der Methode der dynamischen Lichtstreuung zu untersuchen. Bei dieser Methode wird das Streulicht eines Lasers an einer gelösten oder suspendierten Probe analysiert. Ändert sich tatsächlich die Konformation des Proteintoxins durch die Zugabe des Saponins wäre dieser Prozess mit dieser Methode verifizierbar [128]. Im Hinblick auf die Tierexperimente wäre es von hohem Informationsgehalt, wenn Kinetikstudien durchgeführt würden. Bisher ist lediglich bekannt, dass Saponine innerhalb von 30 min über die Niere ausgeschieden werden [129]. Für ein besseres Verständnis der Verstoffwechslung wäre zunächst eine frühe Pharmakokinetikstudie mit Charakterisierung der wichtigsten Basis-Parameter im Plasma oder in *dried blood spots* (DBS) und eine erste Evaluierung der Bioverfügbarkeit sinnvoll. Im Rahmen einer vollständigen Kinetikstudie müsste dann die Tierzahl erhöht werden und die absolute sowie relative Bioverfügbarkeit überprüft werden. Es wäre darüber hinaus nötig die *First-Pass* Effekte (bei geringer Bioverfügbarkeit), die Absorption der Toxine durch verschiedene Gewebe und die Ausscheidungswege zu überprüfen. In diesem Zusammenhang würde die Auswertung von Urinsammelproben mittels HPLC Informationen darüber preisgeben, in welcher Form Saponine nach Metabolisierung durch den Organismus ausgeschieden werden. Auch die Verwendung von osmotischen Pumpen [130] könnte für die Saponinapplikation von Vorteil sein. Diese würden eine kontinuierliche Freisetzung der Saponine bewirken. Der eventuell zu raschen Ausscheidung könnte man durch den konstanten Wirkspiegel somit entgegenwirken. Weitergehende noch detailliertere histologische und immunhistologische Untersuchungen stünden ebenfalls noch aus.

Zusammenfassung

Seit mehreren Jahren spielen bei der Behandlung von Krebserkrankungen neue Medikamente eine wachsende Rolle. Dabei handelt es sich um Toxine, die zielgerichtet gegen Merkmale, die ausschließlich verstärkt bei Tumorzellen vorkommen, wirken. Zwar schädigt auch die klassische Chemotherapie Tumoren stärker als gesundes Gewebe, jedoch treten oft schwerwiegende Nebenwirkungen auf. Bei den tumorspezifischen Merkmalen, an die die neuen Substanzen binden, handelt es sich insbesondere um den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor. Die verstärkte Expression dieser Rezeptoren auf Tumorzellen führt dazu, dass sich die Zellen unkontrolliert vermehren. Bindet aber ein Toxin gezielt an die Rezeptoren und veranlasst die Apoptose der Krebszelle, kann das Tumorwachstum unterbunden werden. Fusioniert man die Ribosomen inaktivierenden Proteine (RIP's) Dianthin und Saporin mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) entstehen die zielgerichteten Toxine SE und DE. Die Freisetzung der internalisierten RIP's ins Cytosol (*Endosomal Escape*) kann durch die gleichzeitige Anwesenheit von triterpenoiden Saponinen (SO1861, GS16 und SA1641) unterstützt werden. Dadurch lässt sich eine Toxizitätssteigerung bei gleichzeitiger Dosisreduzierung des RIP's erreichen.

Zunächst wurde für diese Forschungsarbeit eine nähere Charakterisierung von DE und SE durchgeführt. Die Ausbeute der beiden RIP's nach identischer Expression erwies sich bei DE deutlich als höher als bei SE (0,375 mg/ml im Vergleich zu 0,15–0,225 mg/ml). Darüber hinaus zeigte sich DE bei einer Exposition von 30 min bei 24°C deutlich stabiler. Der Vergleich der enzymatischen Aktivität von DE und SE ergab eine höhere N-Glykosidase Aktivität von DE gegenüber SE (115,7 zu 79,9 pmol Adenin/pmol Toxin/h). Untersuchungen der beiden RIP's im Zirkulardichroismus-Spektrometer bestätigten die bereits bekannte, große Homologie der beiden Toxine, denn die Graphen dieser Untersuchungsmethode wiesen auch nach Zugabe von Saponin (SO1861) in gleichmolarer Konzentration (11,3 nM) enorme Ähnlichkeit auf. Die Untersuchung der Schmelzpunkte beider RIP's zeigte einen Unterschied von nur 1°C. Im Rahmen der späteren Anwendung unterschiedlicher Ziellinien am Tier wurde auch die Expression des humanen EGF-Rezeptors (EGFR) auf der Oberfläche der Tumorzelllinien überprüft, welche für die Tierexperimente vorgesehen waren. Alle verwendeten Zelllinien zeigten im Westernblot EGFR-positive Banden. Auch nach Anwendung der Ziellinien am Tier konnte eine immunhistochemische Färbung des Tumorgewebes weiterhin das Vorhandensein von

EGFR durch massive Braunfärbung nachweisen. Auf die Charakterisierung der RIP'S und den Nachweis von EGFR auf den Zielzellen folgte die genauere Analyse der Saponine. Die Untersuchung der prozentualen hämolytischen Aktivität ergab, dass alle drei ausgewählten Saponine (SO1861, GS16 und SA1641) bis zu einer Konzentration von 15,65 µg/ml, die deutlich oberhalb der Konzentration liegt, die für den Einsatz am Tier angewendet wurde, nicht hämolytisch wirkten. Auch in den mit DE kombinierten Untersuchungen zeigte sich keine Zunahme der hämolytischen Aktivität. Hervorzuheben ist, dass das Saponin SO1861 im Vergleich die am wenigsten toxischen Eigenschaften aufwies. Diese Beobachtung konnte auch bei den *in-vitro*-Untersuchungen mittels impedanzbasierter Echtzeit-Messungen (xCelligence-Gerät) bestätigt werden. Weitere *in-vitro*-Experimente wurden durchgeführt, bei denen die toxische Wirkung der RIP's in Kombination mit der effektsteigernden Wirkung der Saponine ebenfalls durch impedanzbasierte Echtzeit-Messungen und den Einsatz eines Endpunkt-Zytotoxizitätsassays (MTT) getestet wurde. Im MTT-Assay lag die IC₅₀ der Zellen die mit SE allein behandelt wurden bei einer Konzentration von 10 nM, bei SE in Kombination mit Saponin (GS16) hingegen bei 0,0001 nM. Bei den Echtzeit-Messungen zeigte sich, neben ähnlich stark ausgeprägter Effektivität der Kombination aus RIP's und Saponinen, darüber hinaus eine hohe Rezeptorspezifität. Die kombinierte Applikation von DE und SE mit unterschiedlichen Reinsaponinen wurde ferner *in vivo* in syngenischen Mausmodellen untersucht. Nach Injektion der Tumorzellen (z. B. $1,25 \times 10^5$ TSA-EGFR Zellen) und erfolgter Therapie (z. B. 15 µg/Injektion GS16 in Kombination mit 0,3 µg/Injektion SE, 30 µg/Injektion GS16 in Kombination mit 0,1 µg/Injektion von SE, insgesamt 28 Tage, 8 Dosen) konnte ein massiver Tumorrückgang über 95 % ($p < 0.05$) bei den behandelten Tieren nachgewiesen werden. Erstmals wurde ein ähnlich konzipiertes Experiment erfolgreich an Nacktmäusen mit humanen Kolonkarzinomzellen (2×10^6 Zellen, HCT116) durchgeführt. Die Tumorregression betrug hierbei für die therapierten Tiere 96 % ($p < 0.05$). Nach Abschluss der Therapien wurden die entnommenen Organe histologisch begutachtet, um den Zustand der eventuell durch Nebenwirkungen beeinträchtigten Organe zu erfassen und den Erfolg der Kombinationstherapie zu untermauern. Bei den unbehandelten Tieren im disseminierten Tumormodell konnten in 75% der Fälle neben dem Primärtumor auch Lungenmetastasen nachgewiesen werden.

Die Resultate dieser Arbeit können als eine gute Basis für die Weiterentwicklung bestehender Kolonkarzinomtherapien dienen und den Grundstein für präklinische Studien mit dieser Art der zielgerichteten, saponingestützten Tumorbehandlung setzen.

Summary

Combination therapy with anti-tumor-toxins and pure saponins in mouse tumor models

Since several years new strategies in the field of cancer therapies are getting more and more important. Especially targeted toxins are able to eliminate tumor cells by receptor specific binding. The classical chemotherapy is also more harmful for tumor tissues than for normal cells but still causes many severe side effects. The new therapeutic toxins are binding to tumor specific surface molecules such as the epidermal growth factor receptor (EGFR), which is highly overexpressed on a number of tumors. The binding subsequently leads to apoptosis of the tumor cells and inhibits the tumor growth. When ribosome-inactivating proteins (RIP's) such as Dianthin or Saporin get merged with the epidermal growth factor, the fusion proteins DE and SE are formed. The release of the internalized RIP's can be enhanced by the presence of triterpenoid saponins (SO1861, GS16 and SA1641). Therefore the efficacy of the toxic effect can be increased while the dose can be reduced.

The first step of this work was to closer characterize DE ad SE. The yield of both RIP's after identical expression was impressively higher in the case of DE compared to SE (0,375 mg/ml compared to 0,15–0,225 mg/ml). In addition DE showed a greater stability after exposure for 30 min at 24°C. Comparison of the enzymatic activity demonstrated a higher N-Glycosidase activity of DE towards SE (115,7 towards 79,9 pmol Adenin/pmol toxin/h).

The investigations of both RIP's in a circular dichroism spectrometer approved the already known, high homology of both toxins. Both graphs were extremely similar even after adding an equal molar concentration (11,3 nM) of SO1861. The screening of the melting points of both RIP's showed a difference of only 1°C. In order to use different cell lines in animals, the expression of EGFR was examined and EGFR-positive bands were detected in Western Blot analysis. Furthermore, after injecting the cell lines into the animals, the immunohistochemical staining revealed a brown color, which indicates the presence of the receptor.

After characterization of DE and SE and the proof of EGFR expression by the targeted cell lines a more exact analysis of the saponins was conducted. The examination of the

hemolytic activity of the three tested saponins revealed that no hemolytic activity appears up to a concentration of 15,65 µg/ml. This concentration was far below the one, which was planned to be used for the animal experiments. The application of DE did not affect the hemolytic experiments negatively.

It should be emphasized that SO1861 in comparison to the other saponins had shown the lowest toxicity.

This observation was confirmed in the *in vitro* examinations with a real-time impedance-based device (xCelligence reader). Further *in vitro* experiments have been performed, in which the toxic effect of the RIP's was tested together with the effect enhancing qualities of the saponins. This was not only conducted with the xCelligence reader but also with an endpoint cytotoxicity assay (MTT). In case of the MTT assay the IC₅₀ of the cells that were treated only with SE was at a concentration of 10 nM whereas in combination with GS16 the concentration was 0,0001 nM. These strong enhancing effects of the saponins were also ascertained in the xCelligence reader and high receptor specificity was visible.

The combined application of DE and SE was further investigated *in vivo* in syngeneic mouse models. After the injection of the tumor cells ($1,25 \times 10^5$ TSA-EGFR cells) and the therapy (15 µg/injection GS16 in combination with 0,3 µg/injection SE or 30 µg/injection GS16 in combination with 0,1 µg/injection SE, in total 28 days, 8 doses) a regression of over 99 % ($p < 0.05$) was determined in the treated animals. For the first time a similar tumor model was successfully established and treated in athymic nude mice bearing a tumor of human colon carcinoma cells (2×10^6 cells, HCT116). In this case the regression of the tumor was 96 % ($p < 0.05$) for the treated animals. After finishing the therapies histological parameters were obtained in order to gather the side effects in the different organs. In case of the untreated animals of the disseminated tumor model lung metastasis was found in 75% of the cases apart from the primary tumor.

The results of this work can be regarded as a strong basis for further developments of already existing colon cancer therapies and serve as a foundation stone for preclinical studies with this kind of targeted, saponin-enhanced tumor treatments.

5 Literaturverzeichnis

1. Hippocrates, *Hippocratic Corpus [Excerpts]*. Academic Medicine, 2013. **88**(1): p. 80-80.
2. Kroeber, L., *[Galenos (Galen) and galenica]*. Pharmazie, 1952. **7**(3): p. 173-7.
3. Ghosh, S.K., *Evolution of illustrations in anatomy: A study from the classical period in Europe to modern times*. Anat Sci Educ, 2014.
4. McKenna, M., *William Harvey, 1. That incomparable invention of Dr. Harvey's*. Can J Surg, 1987. **30**(2): p. 139-41.
5. Guerrini, A., *The ethics of animal experimentation in seventeenth-century England*. J Hist Ideas, 1989. **50**(3): p. 391-407.
6. Streba, C.T., et al., *Of Mice and Ethics*. Current Health Sciences Journal, 2012. **38**(1).
7. Greiner, D.T., *Entwicklung eines Tumormodells zur in vivo Untersuchung neuartiger Substanzen (Naturstoffe) auf antineoplastische Eigenschaften unter Einsparung von Versuchstieren*, in *Klinik für Tumorbiologie, Freiburg im Breisgau*. 2004, Justus-Liebig Universität Gießen: Fachbereich Veterinärmedizin. p. 220.
8. Newell, D.R., et al., *Evaluation of rodent-only toxicology for early clinical trials with novel cancer therapeutics*. British Journal of Cancer, 1999. **81**(5): p. 760-768.
9. Gorelik, E., et al., *Microencapsulated tumor assay: new short-term assay for in vivo evaluation of the effects of anticancer drugs on human tumor cell lines*. Cancer Res, 1987. **47**(21): p. 5739-47.
10. Bibby, M.C., *Making the most of rodent tumour systems in cancer drug discovery*. Br J Cancer, 1999. **79**(11-12): p. 1633-40.
11. Staquet, M.J., et al., *Clinical predictivity of transplantable tumor systems in the selection of new drugs for solid tumors: rationale for a three-stage strategy*. Cancer Treat Rep, 1983. **67**(9): p. 753-65.
12. Fergusson, R.J., J. Carmichael, and J.F. Smyth, *Human-Tumor Xenografts Growing in Immunodeficient Mice - a Useful Model for Assessing Chemotherapeutic-Agents in Bronchial-Carcinoma*. Thorax, 1986. **41**(5): p. 376-380.
13. Sych, F., M. Habs, and D. Schmahl, *Chemotherapy Studies in Autochthonous Rat Tumors Intestinal Cancer*. Zeitschrift Fur Krebsforschung Und Klinische Onkologie, 1978. **92**(1): p. 105-117.
14. Giuliani, F.C., et al., *Chemotherapy of human colorectal tumor xenografts in athymic mice with clinically active drugs: 5-fluorouracil and 1-3-bis-(-2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). Comparison with doxorubicin derivatives: 4'-deoxydoxorubicin and 4'-O-methyl-doxorubicin*. Int J Cancer, 1981. **27**(1): p. 5-13.
15. Hill, B.T., et al., *Superior in vivo experimental antitumour activity of vinflunine, relative to vinorelbine, in a panel of human tumour xenografts*. Eur J Cancer, 1999. **35**(3): p. 512-20.
16. Amundadottir, L.T., G. Merlino, and R.B. Dickson, *Transgenic mouse models of breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1996. **39**(1): p. 119-35.
17. Lipkin, M., *New rodent models for studies of chemopreventive agents*. J Cell Biochem Suppl, 1997. **28-29**: p. 144-7.

18. Reinke, V., et al., *Overproduction of MDM2 in vivo disrupts S phase independent of E2F1*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(3): p. 147-54.
19. Rovigatti, U., et al., *Transgenic mice as research tools in neurocarcinogenesis*. J Neurovirol, 1998. **4**(2): p. 159-74.
20. Pantelouris, E.M., *Absence of thymus in a mouse mutant*. Nature, 1968. **217**(5126): p. 370-1.
21. Cheers, C., J. Sprent, and J.F. Miller, *Interaction of thymus lymphocytes with histoincompatible cells. IV. Mixed lymphocyte reactions of activated thymus lymphocytes*. Cell Immunol, 1974. **10**(1): p. 57-67.
22. Povlsen, C.O. and J. Rygaard, *Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant Nude. A study of nine consecutive transplantations*. Acta Pathol Microbiol Scand A, 1971. **79**(2): p. 159-69.
23. Plata, F. and B. Sordat, *Murine sarcoma virus (MSV)-induced tumors in mice. I. Distribution of MSV-immune cytolytic T lymphocytes in vivo*. Int J Cancer, 1977. **19**(2): p. 205-11.
24. Giovanella, B.C., et al., *Development of invasive tumors in the "nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells*. J Natl Cancer Inst, 1972. **48**(5): p. 1531-3.
25. Thorpe, P.E., et al., *Toxicity of diphtheria toxin for lymphoblastoid cells is increased by conjugation to antilymphocytic globulin*. Nature, 1978. **271**(5647): p. 752-5.
26. Green, M.R., *Targeting targeted therapy*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(21): p. 2191-2193.
27. Huys, J., *Cytostatic-associated vomiting effectively inhibited by domperidone (R 33 812)*. Cancer Chemother Pharmacol, 1978. **1**(4): p. 215-8.
28. Morrow, G.R., et al., *Fatigue associated with cancer and its treatment*. Supportive Care in Cancer, 2002. **10**(5): p. 389-398.
29. Antolin, S., et al., *Adjuvant Treatment Used with Trastuzumab in Breast Cancer with <= 1.5 Cm Tumor Size Patients*. Breast, 2013. **22**: p. S25-S25.
30. Fiszman, G.L. and M.A. Jasniz, *Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer*. Int J Breast Cancer, 2011. **2011**: p. 352182.
31. Frankel, A.E., B.L. Powell, and M.B. Lilly, *Diphtheria toxin conjugate therapy of cancer* Cancer Chemother Biol Response Modif. , 2002. **20**: p. 310-313.
32. Gilabert-Oriol, R., et al., *Modified Trastuzumab and Cetuximab Mediate Efficient Toxin Delivery While Retaining Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity in Target Cells*. Molecular Pharmaceutics, 2013. **10**(11): p. 4347-4357.
33. Weng, A., et al., *The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins*. Molecular Oncology, 2012. **In Press**.
34. Woo, J.H., et al., *Pharmacology of anti-CD3 diphtheria immunotoxin in CD3 positive T-cell lymphoma trials*. Methods Mol Biol, 2010. **651**: p. 157-75.
35. 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.
36. Sarnovsky, R., 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.

37. Stirpe, F., et al., *Dianthins, Ribosome-Damaging Proteins with Anti-Viral Properties from Dianthus-Caryophyllus L (Carnation)*. Biochemical Journal, 1981. **195**(2): p. 399-405.
38. Risberg, K., *Immunotoxins in targeted therapy of cancer - a study in malignant melanoma cells*. Vol. 931. 2010, Norway: University of Oslo. 69.
39. Duzkale, H., 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.
40. French, R.R., et al., *Response of B-cell lymphoma to a combination of bispecific antibodies and saporin*. Leuk Res, 1996. **20**(7): p. 607-17.
41. Falini, B., et al., *Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin*. Lancet, 1992. **339**(8803): p. 1195-6.
42. Heisler, I., et al., *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.
43. Gilabert-Oriol, R., et al., *Small structural differences of targeted anti-tumor toxins result in strong variation of protein expression*. Protein Expr Purif, 2013. **91**(1): p. 54-60.
44. Bolognesi, A., et al., *Ribosome-Inactivating Proteins (Rna N-Glycosidases) from the Seeds of Saponaria-Ocymoides and Vaccaria-Pyramidata*. European Journal of Biochemistry, 1995. **228**(3): p. 935-940.
45. Stirpe, F., et al., *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)*. Biochemical Journal, 1983. **216**(3): p. 617-625.
46. Vandebussche, F., et al., *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.
47. Ferreras, J.M., et al., *Distribution and Properties of Major Ribosome-Inactivating Proteins (28-S Ribosomal-Rna N-Glycosidases) of the Plant Saponaria-Officinalis L (Caryophyllaceae)*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1216**(1): p. 31-42.
48. Benatti, L., et al., *Nucleotide-Sequence of Cdna Coding for Saporin-6, a Type-1 Ribosome-Inactivating Protein from Saponaria-Officinalis*. European Journal of Biochemistry, 1989. **183**(2): p. 465-470.
49. 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.
50. Bachran, C., et al., *Chimeric toxins inhibit growth of primary oral squamous cell carcinoma cells*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(2): p. 237-42.
51. Cimini, A., et al., *Distinct cellular responses induced by saporin and a transferrin-saporin conjugate in two different human glioblastoma cell lines*. J Cell Physiol, 2012. **227**(3): p. 939-51.
52. Flavell, D.J., et al., *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.
53. Flavell, D.J., *Saporin immunotoxins*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **234**: p. 57-61.
54. Kreitman, R.J., *Immunotoxins for targeted cancer therapy*. AAPS J, 2006. **8**(3): p. E532-51.

55. Frankel, A.E., R.J. Kreitman, and E.A. Sausville, *Targeted toxins*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(2): p. 326-34.
56. Frankel, A.E. and J.H. Woo, *Bispecific immunotoxins*. Leuk Res, 2009. **33**(9): p. 1173-4.
57. Varkouhi, A.K., et al., *Endosomal escape pathways for delivery of biologicals*. J Control Release, 2011. **151**(3): p. 220-8.
58. Ippoliti, R., et al., *The effect of monensin and chloroquine on the endocytosis and toxicity of chimeric toxins*. Cellular and Molecular Life Sciences, 1998. **54**(8): p. 866-875.
59. Abes, R., et al., *Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides*. J Pept Sci, 2008. **14**(4): p. 455-60.
60. Hostettmann, K.M., A., in *Chemistry and Pharmacology Natural Products – Saponins*. 1995, Cambridge University Press Cambridge. p. 1-77, 564.
61. Augustin, J.M., et al., *Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins*. Phytochemistry, 2011. **72**(6): p. 435-57.
62. Thakur, M., et al., *Electrophoretic isolation of saponin fractions from Saponinum album and their evaluation in synergistically enhancing the receptor-specific cytotoxicity of targeted toxins*. Electrophoresis, 2011. **32**(21): p. 3085-9.
63. Sparg, S.G., M.E. Light, and J. van Staden, *Biological activities and distribution of plant saponins*. J Ethnopharmacol, 2004. **94**(2-3): p. 219-43.
64. Weng, A., *Untersuchungen zur Wirkung von Saponinen als Verstärker der Penetration von Proteinen im Zellmodell*, in *Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*. 2009, Freie Universität Berlin. p. VI, 127 S.
65. Barr, I.G. and G.F. Mitchell, *ISCOMs (immunostimulating complexes): The first decade*. Immunology and Cell Biology, 1996. **74**(1): p. 8-25.
66. Fuchs, H., et al., *Saponins as Tool for Improved Targeted Tumor Therapies*. Current Drug Targets, 2009. **10**(2): p. 140-151.
67. Barr, I.G., A. Sjolander, and J.C. Cox, *ISCOMs and other saponin based adjuvants*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998. **32**(3): p. 247-271.
68. Gaidi, G., et al., *Saponins-mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxicity in human colon cancer cells*. Planta Med, 2002. **68**(1): p. 70-2.
69. Cho, S.Y., et al., *Enhancement of paracellular transport of heparin disaccharide across Caco-2 cell monolayers*. Archives of Pharmacal Research, 2002. **25**(1): p. 86-92.
70. Chao, A.C., et al., *Enhancement of intestinal model compound transport by DS-1, a modified Quillaja saponin*. J Pharm Sci, 1998. **87**(11): p. 1395-9.
71. Sasaki, M., H. Hashimoto, and S. Yachiku, [*Studies on enhancement of drug absorption through the bladder mucosa*]. Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi, 1994. **85**(9): p. 1353-62.
72. Gee, J.M., et al., *Effect of saponin on the transmucosal passage of beta-lactoglobulin across the proximal small intestine of normal and beta-lactoglobulin-sensitized rats*. Toxicology, 1997. **117**(2-3): p. 219-228.
73. Francis, G., et al., *The biological action of saponins in animal systems: a review*. Br J Nutr, 2002. **88**(6): p. 587-605.
74. Thakur, M., et al., *Real time monitoring of the cell viability during treatment with tumor-targeted toxins and saponins using impedance measurement*. Biosensors and Bioelectronics, 2012(0).

75. Bachran, D., et al., *The Endocytic Uptake Pathways of Targeted Toxins Are Influenced by Synergistically Acting Gypsophila Saponins*. *Molecular Pharmaceutics*, 2011. **8**(6): p. 2262-2272.
76. Vago, R., 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.
77. Weng, A., et al., *Soapwort saponins trigger clathrin-mediated endocytosis of saporin, a type I ribosome-inactivating protein*. *Chem Biol Interact*, 2008. **176**(2-3): p. 204-211.
78. Weng, A., et al., *Enhancement of saporin cytotoxicity by Gypsophila saponins-More than stimulation of endocytosis*. *Chem Biol Interact*, 2009. **181**(3): p. 424-429.
79. Weng, A., C. Gorick, and M.F. Melzig, *Enhancement of Toxicity of Saporin-Based Toxins by Gypsophila Saponins-Kinetic of the Saponin*. *Experimental Biology and Medicine*, 2009. **234**(8): p. 961-966.
80. Weng, A., et al., *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. 1421-1422.
81. Gilibert-Oriol, R., et al., *Reporter assay for endo/lysosomal escape of toxin-based therapeutics*. *Toxins (Basel)*, 2014. **6**(5): p. 1644-66.
82. Thakur, M., et al. *Dual therapeutic approach enhances tumor targeted toxins: in vivo assessment in syngenic model*. in *Bioanalytical Congress 2013*. Berlin.
83. Bachran, C., 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.
84. Stirpe, F., et al., *Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from Dianthus caryophyllus L. (carnation)*. *Biochem J*, 1981. **195**(2): p. 399-405.
85. Strocchi, P., L. Barbieri, and F. Stirpe, *Immunological Properties of Ribosome-Inactivating Proteins and a Saporin Immunotoxin*. *Journal of Immunological Methods*, 1992. **155**(1): p. 57-63.
86. Weng, A., et al., *A convenient method for saponin isolation in tumour therapy*. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2010. **878**(7-8): p. 713-718.
87. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
88. Bachran, C., et al., *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.
89. Cavallo, F., et al., *Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12*. *Cancer Res*, 1999. **59**(2): p. 414-21.
90. Thakur, M., et al., *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*, 2013. **7**(3): p. 475-483.
91. Bachran, D., 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*, 2010. **127**(6): p. 1453-61.
92. Thakur, M., et al., *Real time monitoring of the cell viability during treatment with tumor-targeted toxins and saponins using impedance measurement*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012. **35**(1): p. 503-506.

93. Lee, Y.J., et al., *Demethylwedelolactone derivatives inhibit invasive growth in vitro and lung metastasis of MDA-MB-231 breast cancer cells in nude mice*. Eur J Med Chem, 2012. **56**: p. 361-7.
94. Yoshioka, T., et al., *Accumulation of 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose in human cancers heterotransplanted in nude mice: comparison between histology and glycolytic status*. J Nucl Med, 1994. **35**(1): p. 97-103.
95. Iorns, E., et al., *A new mouse model for the study of human breast cancer metastasis*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47995.
96. von Mallinckrodt, B., et al., *Dianthin-EGF is an effective tumor targeted toxin in combination with saponins in a xenograft model for colon carcinoma*. Future Oncology, 2014: p. 24.
97. Strocchi, P., L. Barbieri, and F. Stirpe, *Immunological properties of ribosome-inactivating proteins and a saporin immunotoxin*. J Immunol Methods, 1992. **155**(1): p. 57-63.
98. Olsnes, S., et al., *Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chains*. Eur J Biochem, 1975. **60**(1): p. 281-8.
99. May, M.J., et al., *Ribosome Inactivation by Ricin-a Chain - a Sensitive Method to Assess the Activity of Wild-Type and Mutant Polypeptides*. Embo Journal, 1989. **8**(1): p. 301-308.
100. Endo, Y. and K. Tsurugi, *Mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes*. Nucleic Acids Symp Ser, 1986(17): p. 187-90.
101. Brigotti, M., et al., *A rapid and sensitive method to measure the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(18): p. 4306-4307.
102. Zamboni, M., et al., *High-Pressure-Liquid-Chromatographic and Fluorimetric Methods for the Determination of Adenine Released from Ribosomes by Ricin and Gelonin*. Biochemical Journal, 1989. **259**(3): p. 639-643.
103. Weng, A., et al., *Saponins modulate the intracellular trafficking of protein toxins*. Journal of Controlled Release, 2012. **164**(1): p. 74-86.
104. Gerweck, L.E. and K. Seetharaman, *Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer*. Cancer Research, 1996. **56**(6): p. 1194-1198.
105. Weng, A., et al., *The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins*. Molecular Oncology, 2012. **6**(3): p. 323-332.
106. Nyati, M.K., et al., *Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 876-85.
107. Dutta, P.R. and A. Maly, *Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy*. Cancer Letters, 2007. **254**(2): p. 165-177.
108. Ciardello, F. and G. Tortora, *EGFR Antagonists in Cancer Treatment (vol 358, pg 1160, 2008)*. New England Journal of Medicine, 2009. **360**(15): p. 1579-1579.
109. Normanno, N., et al., *Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment*. Endocr Relat Cancer, 2003. **10**(1): p. 1-21.
110. Ciardiello, F. and G. Tortora, *A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor*. Clinical Cancer Research, 2001. **7**(10): p. 2958-2970.
111. Grunwald, V. and M. Hidalgo, *Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(12): p. 851-67.

112. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(14): p. 2787-99.
113. Gilibert-Oriol, R., et al., *Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins*. Bioorg Med Chem, 2013. **21**(8): p. 2387-2395.
114. Voutquenne-Nazabadioko, L., et al., *Acylated triterpenoid saponins from roots of Gypsophila trichotoma*. Planta Med, 2012. **78**(11): p. 1210-1210.
115. Kamstrup, S., et al., *Preparation and characterisation of quillaja saponin with less heterogeneity than Quil-A*. Vaccine, 2000. **18**(21): p. 2244-2249.
116. Shi, C.J. and K. Washington, *Molecular Testing in Colorectal Cancer Diagnosis of Lynch Syndrome and Personalized Cancer Medicine*. American Journal of Clinical Pathology, 2012. **137**(6): p. 847-859.
117. Barnea, I., et al., *Targeting EGFR-positive cancer cells with cetuximab-ZZ-PE38: Results of in vitro and in vivo studies*. Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck, 2013. **35**(8): p. 1171-1177.
118. Kerbel, R.S., *Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans - Better than commonly perceived - But they can be improved*. Cancer Biol Ther, 2003. **2**(4): p. S134-S139.
119. Kelland, L.R., *Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development*. Eur J Cancer, 2004. **40**(6): p. 827-36.
120. Finlay, B.L. and R.B. Darlington, *Linked Regularities in the Development and Evolution of Mammalian Brains*. Science, 1995. **268**(5217): p. 1578-1584.
121. Papatriantafyllou, M., *IMMUNOTHERAPY Cancer immunotherapy for the elderly*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(11).
122. Shellnut, J.K., et al., *Evaluating the Age Distribution of Patients With Colorectal Cancer: Are the United States Preventative Services Task Force Guidelines for Colorectal Cancer Screening Appropriate?* Diseases of the Colon & Rectum, 2010. **53**(1): p. 5-8.
123. Bachran, C., et al., *Inhibition of Tumor Growth by Targeted Toxins in Mice is Dramatically Improved by Saponinum Album in a Synergistic Way*. Journal of Immunotherapy, 2009. **32**(7): p. 713-725.
124. Fuchs, H., et al., *A cleavable molecular adapter reduces side effects and concomitantly enhances efficacy in tumor treatment by targeted toxins in mice*. Journal of Controlled Release, 2007. **117**(3): p. 342-350.
125. Marsden, C.G., et al., *"A novel in vivo model for the study of human breast cancer metastasis using primary breast tumor-initiating cells from patient biopsies"*. BMC Cancer, 2012. **12**.
126. Nahas, G., et al., *Is reduction of tumor burden sufficient for the 21st century?* Cancer Lett, 2014.
127. Hu, K., et al., *Nanoparticulate Quillaja saponin induces apoptosis in human leukemia cell lines with a high therapeutic index*. Int J Nanomedicine, 2010. **5**: p. 51-62.
128. McHugh, C.A., et al., *Improved stability of a protein vaccine through elimination of a partially unfolded state*. Protein Science, 2004. **13**(10): p. 2736-2743.
129. Bachran, C., et al., *The distribution of saponins in vivo affects their synergy with chimeric toxins against tumours expressing human epidermal growth factor receptors in mice*. British Journal of Pharmacology, 2010. **159**(2): p. 345-352.
130. Yoon, H., et al., *Antitumor Activity of a Novel Antisense Oligonucleotide Against Akt1*. Journal of Cellular Biochemistry, 2009. **108**(4): p. 832-838.

6 Publikationsliste

Wissenschaftliche Artikel in *Peer Reviewed Journals*

- [1] R. Gilabert-Oriol*, A. Weng, **B. von Mallinckrodt***, A. Stöshel, M. F. Melzig, H. Fuchs, M. Thakur
Electrophoretic mobility as a tool to separate immune adjuvant saponins from *Quillaja saponaria* Molina, *International journal of pharmaceutics*, Volume 487, Issues 1–2, 20 June 2015, Pages 39–48
- [2] **B. von Mallinckrodt**, M. Thakur, A. Weng, R. Gilabert-Oriol, H. Dürkop, W. Brenner, M. Lukas, N. Beindorff, M. F. Melzig, H. Fuchs. Dianthin-EGF is an effective tumor targeted toxin in combination with saponins in a xenograft model for colon carcinoma, *Future Oncol.* (2014) 10(14), 2161–2175
- [3] R. Gilabert-Oriol, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, C. Bhargava, B. Wiesner, J. Eichhorst, M. F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng. Reporter assay for endo/lysosomal escape of toxin-based therapeutics. *Toxins* (2014) 6: 1644-1666.
- [4] R. Gilabert-Oriol, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, T. Hug, B. Wiesner, J. Eichhorst, M. F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng. Modified trastuzumab and cetuximab mediate efficient toxin delivery while retaining antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in target cells. *Molecular Pharmaceutics* (2013).
- [5] M. Thakur, A. Weng, A. Pieper, K. Mergel, **B. von Mallinckrodt**, R. Gilabert-Oriol, C. Görick, B. Wiesner, J. Eichhorst, M. F. Melzig, H. Fuchs. Macromolecular interactions of triterpenoids and targeted toxins: Role of saponins charge. *International Journal of Biological Macromolecules* (2013) 61C: 285-294.
- [6] R. Gilabert-Oriol, M. Thakur, C. Weise, J. Dervedde, **B. von Mallinckrodt**, H. Fuchs, A. Weng. Small structural differences of targeted anti-tumor toxins result in strong variation of protein expression. *Protein Expression and Purification* (2013) 91(1): 54-60.
- [7] R. Gilabert-Oriol, K. Mergel, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, M. F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng. Real-time analysis of membrane permeabilizing effects of oleanane saponins Original Research Article. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2013) 21(8): 2387-95.

- [8] M. Thakur, K. Mergel, A. Weng, **B. von Mallinckrodt**, R. Gilabert-Oriol, H. Dürkop, M. F. 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* (2013) 7(3): 475-83.
- [9] A. Weng, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, F. Beceren-Braun, R. Gilabert-Oriol, B. Wiesner, J. Eichhorst, S. Böttger, M. F. Melzig, H. Fuchs. Saponins modulate the intracellular trafficking of protein toxins. *Journal of Controlled Release* (2012) 164(1)74-86.

Review-Artikel

- [1] R. Gilabert-Oriol, A. Weng, **B. von Mallinckrodt**, M. F. Melzig, H. Fuchs, M. Thakur. Immunotoxins constructed with ribosome-inactivating proteins and their enhancers: a lethal cocktail with tumor specific efficacy. *Current Pharmaceutical Design*, Band 20, 6584-6643, (2014).

Berichte in peer reviewed journals

- [1] M. Thakur, A. Weng, R. Gilabert-Oriol, **B. von Mallinckrodt**, H. Fuchs, M. F. Melzig. Electromigration pattern of Saponaria saponins determine their synergistic toxicity enhancement ability of Saporin based targeted immunotoxins in vitro and in vivo. 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA). Münster, Deutschland: September 1 – 5, 2013 (Presentation). *Planta Medica* 2013; 79 - SL32.
- [2] M. Thakur, A. Weng, K. Mergel, **B. von Mallinckrodt**, R. Gilabert-Oriol, M. F. Melzig, H. Fuchs. Electrophoretically mobile Saponaria Officinalis saponin as a highly synergistic enhancer of tumor specific toxicity for saporin-EGF: in vitro and in vivo evaluation. *Natural Anticancer Drugs*. Olomouc, Czech Republic: June 30 – July 4, 2012 (Poster). *Biomedical Papers of the Faculty of Medicine and Dentistry of Palacký University*. Volume 156, Supplement 1, 2012.

Präsentationen auf akademischen Konferenzen

- [1] M. Thakur, A. Weng, **B. von Mallinckrodt**, R. Gilabert-Oriol, M. F. Melzig, H. Fuchs. Saponin-protein interactions role in endosomal transport and drug delivery. 17th Annual National Convention and International Symposium on Frontiers in Herbal Cosmetics and Nutraceuticals. Indian Society of Pharmacognosy. Dehradun, India: Februar 23 – 24, 2013.

- [2] M. Thakur, K. Mergel, A. Weng, A. Pieper, **B. von Mallinckrodt**, R. Gilabert-Oriol, M. F. 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. 3rd TARGETED TUMOR THERAPIES. Berlin, Deutschland: March 21 – 23, 2012.

Poster akademischer Konferenzen

- [1] **B. von Mallinckrodt**, M. Thakur, R. Gilabert-Oriol, A. Weng, M. F. Melzig, H. Fuchs; Dianthin-EGF: a leading candidate for a combination therapy with saponins in the field of colon carcinoma, International Congress on targeted anticancer therapies, Paris, Frankreich: 2-4 März, 2015
- [2] **B. von Mallinckrodt**, M. Thakur, R. Gilabert-Oriol, A. Weng, M. F. Melzig, H. Fuchs; Synergism of Dianthin-EGF with Triterpenes; Target Efficacy in a Xenograft Cancer Model, International Conference on From Omics to novel therapies in cancer, Berlin, Deutschland: Mai 23 – 24 , 2014
- [3] R. Gilabert-Oriol, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, C. Bhargava, B. Wiesner, J. Eichhorst, M. F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng; Monitoring of the endo/lysosomal escape of targeted toxin-based therapeutics: development of a reporter assay. International Conference on From Omics to novel therapies in cancer, Berlin, Deutschland: Mai 23 – 24, 2014
- [4] **B. von Mallinckrodt**, M. Thakur, R. Gilabert-Oriol, A. Weng, M. F. Melzig, H. Fuchs; Establishment of a xenograft model for colon carcinoma and testing of a combinatorial therapeutic approach using targeted toxins, 13th European Symposium on Controlled Drug Delivery, Egmond aan Zee, Niederlande: April 16 – 18, 2014
- [5] R. Gilabert-Oriol, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, T. Hug, B. Wiesner, J. Eichhorst, M. F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng; Bio-betters for Herceptin® and Erbitux®, a new combinatorial approach with structurally specific triterpenoidal saponins in targeted tumor therapy. 13th European Symposium on Controlled Drug Delivery. Egmond aan Zee, Niederlande: April 16 –18, 2014.
- [6] R. Gilabert-Oriol, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, T. Hug, B. Wiesner, J. Eichhorst, M. F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng; Combinatorial approach to drastically enhance the monoclonal antibody efficacy in targeted tumor therapy. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Boston, MA, USA: Oktober 19 – 23, 2013.

- [7] R. Gilabert-Oriol, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, T. Hug, B. Wiesner, J. Eichhorst, M. F. Melzig, H. Fuchs, A. Weng; Modified Herceptin® and Erbitux® mediate an enhanced toxin delivery and retain antibody-dependent cellular cytotoxicity. International Bioanalytical Congress. Berlin, Deutschland: September 11 – 12, 2013.
- [8] M. Thakur, A. Weng, **B. von Mallinckrodt**, R. Gilabert-Oriol, M. F. Melzig, H. Fuchs; Dual therapeutic approach enhances the efficacy of tumor targeted toxins: in vivo assessment in syngeneic and xenograft models. International Bioanalytical Congress. Berlin, Deutschland: September 11 – 12, 2013.
- [9] R. Gilabert-Oriol, K. Mergel, A. Weng, M. Thakur, **B. von Mallinckrodt**, M. F. Melzig, H. Fuchs; Endo/Lysosomal translocation of saporin: characteristics of saponins as innovative tools for enhancement of targeted toxin-based tumor therapies. Emerging Concepts in Cancer. Berlin, Deutschland: Juni 15 – 16, 2012.
- [10] M. Thakur, K. Mergel, A. Weng, **B. von Mallinckrodt**, R. Gilabert-Oriol, H. Dürkop, M. F. Melzig, H. Fuchs; Synergistic enhancement of tumor targeted toxin Sap3-EGF using purified saponin from Saponaria roots: toxicity and anti-tumor efficacy evaluation in a syngeneic mouse model. Emerging Concepts in Cancer. Berlin, Deutschland: Juni 15 – 16, 2012.
- [11] R. Gilabert-Oriol, A. Weng, M. Thakur, K. Mergel, **B. von Mallinckrodt**, D. Bachran, M. F. Melzig, H. Fuchs; Saporin-HRP Endo/Lysosomal Escape Enhancement in Isolated Organelles. 8th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology. 3rd Targeted Tumor Therapies. Berlin, Deutschland: März 21 – 23, 2012.

7 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei dem engsten Kreis meiner Arbeitsgruppe bedanken. Insbesondere hervorheben möchte ich hier Prof. Dr. Hendrik Fuchs, Dr. Mayank Thakur, Dr. Alexander Weng und Dr. Roger Gilabert-Oriol. Sie alle sind mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und sind niemals müde geworden auch die abwegigsten Fragen meinerseits zu beantworten. Der Teamgeist und die unbürokratische Arbeitsweise mit allen von Euch hat diese Arbeit erst möglich gemacht. Sollte ich unser Institut jemals verlassen, werde ich Euch alle sehr vermissen!

Darüber hinaus möchte ich mich besonders für die intensive Zusammenarbeit mit Prof. Horst Dürkop bedanken. Ohne ihn wären die histopathologischen Auswertungen dieser Arbeit nicht machbar gewesen.

Ein weiterer Dank gilt selbstverständlich allen weiteren Kollegen des Instituts für Laboratoriumsmedizin, klinische Chemie und Pathobiochemie, sowie den externen Mitarbeitern, Praktikanten, Master-, Diplom- und Bachelorstudenten. Sämtliche Anliegen wurden hier immer hilfsbereit aufgenommen und konnten oft erst auf diese Weise gemeinsam gelöst werden.

Ich danke ebenfalls den Kollegen des SAIC der Charité für ihre Zusammenarbeit und Prof. Dr. Ralf Einspanier, der meine Arbeit extern betreut hat.

Ein riesiger Dank gilt an dieser Stelle meiner Familie. Danke für Eure Unterstützung, die vielen Gespräche und Ermunterungen und dafür, dass ihr mir immer Zuversicht gegeben habt, diese Arbeit erfolgreich beenden zu können.

Danke Christoph, dass du mich immer ertragen, unterstützt und an mich geglaubt hast. Diese Arbeit ist Dir gewidmet.

8 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 29.09.2014

Benedicta von Mallinckrodt