

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 Mäusestämme.....	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	Farbung 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	Hämolysenaktivitätsbestimmung 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	Hamolytische 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