



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Die Rolle von lysosomalen Peptidasen in Hypophysenadenomen

verfasst von | submitted by

Kübra Özbolat BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik

Mitbetreut von | Co-Supervisor:

Dr. Mohammed Aufy

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, um einen aufrichtigen Dank an all die Personen auszusprechen, die mich während meines gesamten Studiums und der Masterarbeit unterstützt haben. Dieser Erfolg wäre ohne ihre wertvollen Beiträge, Ermutigungen und Ratschläge nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Christian Studenik und meinem Mitbetreuer Dr. Mohammed Aufy, die mich durch ihre fachliche Kompetenz, konstruktiven Feedbacks und hilfreichen Anleitungen unterstützt haben. Ein großer Dank gilt auch Dr. med. vet. Mohamed Kotob und Ahmed Hussein, B.Sc. M.Sc. PhD, die mir während meiner Laborarbeit mit Rat und Tat geholfen haben.

Mein Dank gilt auch meinen Studienkollegen und Freunden, die stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und mich mit ihren eigenen Erfahrungen bereichert haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich in all den Jahren meines Studiums stets unterstützt hat. Ein großes Dankeschön gilt meiner lieben Mutter, die stets an mich geglaubt hat und bedingungslos hinter mir steht. Mama, alles, was ich bin oder was ich hoffe jemals zu werden, verdanke ich dir. Du bist meine größte Inspiration und ich bin dankbar, dich an meiner Seite zu wissen. Auch meinem Vater möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen. Durch seine harte Arbeit und Hingabe hat er mich großgezogen und mir die Möglichkeit gegeben, meine Ziele zu verfolgen.

Abschließend möchte ich mich auch bei meinen geliebten Großeltern von ganzem Herzen bedanken. Ich bin unendlich dankbar für alles, was sie für unsere Familie geleistet haben. Sie haben den mutigen Schritt gewagt, in ein fremdes Land zu ziehen, dessen Kultur und Sprache ihnen vollkommen fremd waren. Dank ihnen habe ich heute die Möglichkeit, in Wohlstand zu leben und eine akademische Ausbildung zu genießen. Sie haben mir eine bessere Zukunft ermöglicht und mir Privilegien verschafft, die sie selbst nicht hatten. Ich werde stets daran denken, was ihr für uns getan habt. Danke Oma und Opa.

Kurzfassung

Krebs ist einer der häufigsten Todesursachen weltweit. Aufgrund dieser Tatsache hat sich in den letzten Jahrzehnten das Interesse an der Erforschung von Behandlungsmöglichkeiten für Krebserkrankungen deutlich erhöht. Im Zuge dieser Masterarbeit wurde der Frage nachgegangen, ob und wie die Entstehung von Hypophysenadenomen und die Expression von Cathepsinen in Verbindung stehen. Das Hauptziel dieser Arbeit besteht darin, die Aktivität und Expression verschiedener Proteine in den Gewebeproben zu analysieren, die als potenzielle Zielmoleküle für die klinische Tumorthherapie bereits erforscht werden.

Die Methodik umfasst die Untersuchung von Hypophysenproben aus Mäusen, die zuvor unterschiedlichen Behandlungen unterzogen wurden. Hierzu wurden gesunde und krebskranke Gewebeproben ohne vorherige Behandlung als Kontrollgruppen verwendet. Insgesamt wurden sechs verschiedene Gruppen analysiert.

Für die Experimente wurde die Technik des Western Blot angewendet. Die Proteine wurden aus den Gewebeproben extrahiert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und schließlich auf eine Membran übertragen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern für die Proteinquantifizierung. Zusätzlich wurden die Gewebe immunhistochemisch untersucht, indem Gewebeschnitte hergestellt, mit Antikörpern inkubiert, gefärbt und mikroskopisch analysiert wurden.

Die Ergebnisse zeigen eine differenzierte Proteinexpression in den verschieden behandelten Gewebeproben. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, in die Pathogenese dieser Erkrankung zu vertiefen und potenziell therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Abstract

Cancer is one of the most common causes of death worldwide. Due to this fact, interest in researching treatment options for cancer has increased significantly in recent decades. During this master's thesis, the question was investigated whether and how the development of pituitary adenomas and the expression of cathepsins are related. The main goal of this work is to analyse the activity and expression of various proteins in the tissue samples that are already being researched as potential target molecules for clinical tumour therapy.

The methodology includes the examination of pituitary samples from mice that had previously undergone different treatments. For this purpose, healthy and cancerous tissue samples without prior treatment were used as control groups. A total of six different groups were analysed.

The Western blot technique was used for the experiments. The proteins were extracted from the tissue samples, separated by gel electrophoresis and finally transferred to a membrane. This was followed by incubation with primary and secondary antibodies for protein quantification. In addition, the tissues were examined immunohistochemically by preparing tissue sections, incubating them with antibodies, staining them and analysing them microscopically.

The results show differentiated protein expression in the differently treated tissue samples. The findings help to gain a deeper understanding of the pathogenesis of this disease and to develop potentially therapeutic approaches.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE HYPOPHYSE	1
1.2	KREBSENTSTEHUNG	2
1.3	HYPOPHYSENADENOME	2
1.4	CATHEPSINE	4
1.5	ZIELMOLEKÜLE DER TUMORTHERAPIE UND -FORSCHUNG	5
1.5.1	VEGF	6
1.5.2	EGFR & TGF- α	6
1.5.3	P53, BAX & BCL-2	7
1.5.4	Caspase 7	8
1.5.5	PARP	9
1.5.6	PI3K	10
1.6	ZIELSETZUNG	10
1.7	METHODIK DER ARBEIT	11
2	MATERIALIEN	12
2.1	WESTERN BLOT	12
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien	12
2.1.2	Antikörper	13
2.1.3	Lösungen und Puffer	14
2.1.4	Geräte und Programme	15
2.2	IMMUNHISTOCHEMIE	16
2.2.1	Reagenzien und Chemikalien	16
2.2.2	Antikörper	16
2.2.3	Lösungen und Puffer	16
2.2.4	Geräte und Programme	17
3	METHODEN	18
3.1	VERSUCHSTIERE UND ORGANENTNAHME	18
3.2	WESTERN BLOT	21
3.2.1	Proteingewinnung	22
3.2.2	Konzentrationsbestimmung und Probenvorbereitung	23
3.2.3	Gelherstellung	26
3.2.4	Gelelektrophorese	27
3.2.5	Transfer auf eine Membran	29
3.2.6	Inkubation	31
3.2.7	Immundetektion	32

3.3	IMMUNHISTOCHEMIE	33
4	ERGEBNISSE.....	37
4.1	PROTEINEXPRESSION	37
4.1.1	VEGF	38
4.1.2	Phospho-EGFR.....	39
4.1.3	TGF- α	40
4.1.4	P53.....	41
4.1.5	BAX	42
4.1.6	BCL-2.....	43
4.1.7	Caspase 7.....	44
4.1.8	PI3K-p110.....	45
4.1.9	GAPDH	46
4.2	IMMUNHISTOCHEMIE	47
5	DISKUSSION.....	51
6	LITERATURVERZEICHNIS	53
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	58
8	TABELLENVERZEICHNIS.....	60
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	61

1 Einleitung

1.1 Die Hypophyse

Es gibt zwei Hauptsysteme, die die Körperfunktionen steuern. Das erste davon ist das Nervensystem, das vom Gehirn und dem Rückenmark ausgeht und sich im ganzen Körper verteilt. Das zweite ist das Hormonsystem oder endokrine System, das die Körperfunktionen durch Zirkulation im Blut steuert. Diese beiden Systeme arbeiten zusammen. Hormone sind chemische Substanzen, die von Drüsen im Körper abgesondert werden. Im menschlichen Gehirn spielen zwei Drüsen eine entscheidende Rolle, die Hypophyse (Hirnanhangdrüse, engl. *pituitary gland*) und die Zirbeldrüse (engl. *pineal gland*).

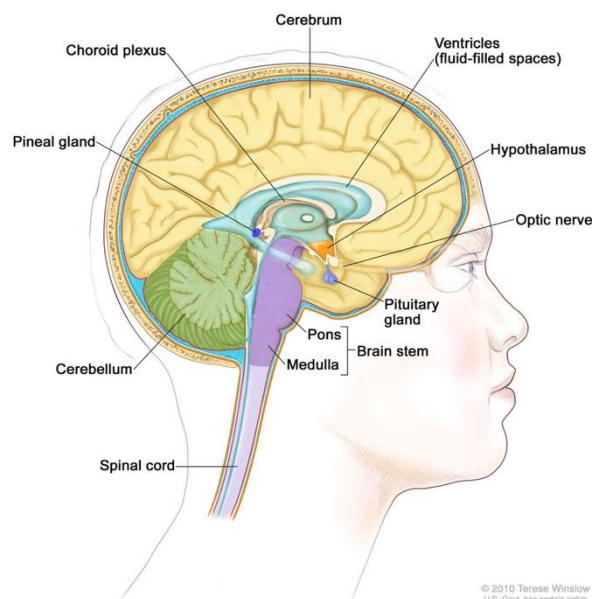


Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Gehirns (Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration, no date)

Beim Menschen wird die Hypophyse anatomisch unterteilt in den Hypophysenvorderlappen, der Adenohypophyse, und den Hypophysenhinterlappen, der Neurohypophyse. Die Hirnanhangdrüse ist ein komplexes Organ, das aus adenohypophysären Hormon-sezernierenden neuroendokrinen Zellen, Gliazellen der Neurohypophyse (Pituizyten), axonalen Verlängerungen hypothalamischer Neuronen und Stromazellen, zu denen Nerven, Blutgefäße, Hirnhäute, Knochen und andere Bindegewebelemente gehören, besteht. (Asa *et al.*, 2022)

Die bedeutendsten Hormone der Adenohypophyse und ihre wesentlichen Funktionen lassen sich wie folgt zusammenfassen. Das Adrenokortikotrope Hormon (ACTH) regt die Produktion von Steroiden in der Nebenniere an und fördert die Freisetzung von Gluko- und Mineralokortikoiden. Das Schilddrüsenstimulierende Hormon (TSH) wirkt auf die TSH-Rezeptoren der Schilddrüse und sorgt für die Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen. Zu den hypophysären Gonadotropinen zählen LH (Luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikelstimulierendes Hormon). LH stimuliert in den Keimdrüsen beider Geschlechter die Testosteronproduktion. FSH fördert die Reifung von Follikeln im Eierstock und die Samenzellen bildenden Sertoli-Zellen beim Mann. Das menschliche Wachstumshormon (GH) beeinflusst das Wachstum über IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*). Prolaktin steuert die Milchproduktion, unterstützt die Funktion des Corpus luteum und fördert die Mutter-Kind-Beziehungen. (Kleine and Rossmanith, 2021)

Die Hormone der Neurohypophyse bildet das Oxytocin und Vasopressin, die im Gegensatz zu den oben genannten Hormonen anderweitig synthetisiert werden. Oxytocin spielt eine entscheidende Rolle bei der Geburt, indem es die Beckenmuskulatur erschlaffen lässt und den Geburtsprozess einleitet. Vasopressin hingegen steuert vor allem den Wasserhaushalt des Körpers, wobei osmotische Reize, den Hauptauslöser für seine Freisetzung darstellen. (Arrowsmith and Wray, 2014)

1.2 Krebsentstehung

Die Karzinogenese, die Entstehung von Krebs, ist ein mehrstufiger Prozess. Es bedarf eine Reihe von Ereignissen, die in einer einzigen Zelle auftritt. Dieser komplexe Vorgang lässt sich in drei Stufen gliedern. Den ersten Schritt bildet die Initiation, bei dem es zu einer dauerhaften Veränderung im genetischen Material einer Körperzelle kommt. Während der Promotion dehnt sich die mutierte Zelle aus. Im Verlauf der Progression findet die maligne Transformation in eine Krebszelle statt. (Valluru, Dasari and Wudayagiri, 2014)

1.3 Hypophysenadenome

Ein Tumor ist eine Anhäufung von Zellen, die sich unkontrolliert vermehren und nicht absterben. Dies führt dazu, dass sich strukturlose Zellmassen zwecklos in der normalen Körperfunktion entstehen. Diese Zellen werden als gutartig oder bösartig

klassifiziert. Während gutartige Tumoren an ihrem ursprünglichen Entstehungsort bleiben und kein invasives Wachstum aufzeigen, dringen bösartige Tumoren in benachbarte Strukturen ein und weiten sich über den Blutkreislauf oder das Lymphsystem in entfernte Organe aus. (Marrero-Rodríguez *et al.*, 2023)

Fast 15% aller Tumore des zentralen Nervensystems bilden Tumore der Hypophyse. Obwohl diese Tumore in der Regel gutartig sind, können sie aufgrund von gestörter Hormonausschüttung oder Druckausübung auf wichtige Strukturen im Körper eine Menge an Symptomen verursachen. (Mouchtouris *et al.*, 2022) Adenome entwickeln sich vorwiegend im Hypophysenvorderlappen, der Adenohypophyse. (Strojník, Lah and Zidanik, 2005) Die genauen molekularen Ursachen sind nur teilweise verstanden. (Tatsi and Stratakis, 2019)

Eine Klassifikation der Hypophysentumore erfolgt anhand ihres Funktionsstatus und Ursprungsort. Sie werden eingeteilt in hormonsekretierende und hormoninaktive Adenome. (Prencipe *et al.*, 2023) Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) teilt Hypophysentumore streng in Vorderlappentumore (Adenohypophysentumore) und Hinterlappentumore (Neurohypophysentumore). Zu den Tumoren des Vorderlappens gehören unter anderem gut differenzierte adenohypophysäre Tumore, die heute als hypophysäre neuroendokrine Tumore (früher bekannt als Hypophysenadenome) klassifiziert werden. Die Hinterlappentumore bilden die Familie der Pituizytentumore. (Asa *et al.*, 2022)

Hormon-aktive Adenome der Adenohypophyse werden als Ursache des Morbus Cushing erforscht. Das sogenannte Hormonüberschusssyndrom wird durch übermäßige Sekretion von ACTH aus dem Adenom verursacht. Es folgt eine abnormale Freisetzung von Glucocorticoiden aus den Nebennieren, was zum typischen Erscheinungsbild führt, das durch Gewichtszunahme, Fettleibigkeit, Hautveränderungen und gestörter Fortpflanzungsfunktion gekennzeichnet ist. (Reincke *et al.*, 2015)

Laut Statistik Austria war Krebs im Jahr 2022 die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Aus diesem Grund hat sich in den letzten Jahren die Erforschung onkologischer Behandlungsmöglichkeiten verstärkt. Bisher wurden aggressive Hypophysentumore und -karzinome mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren und Angiogenesehemmern behandelt. Diese Medikamente zeigen eine gewisse

Wirksamkeit, die jedoch nicht konstant ist. Zudem können unerwünschte Ereignisse auftreten. Immun-Checkpoint-Inhibitoren blockieren, wie ihr Name schon sagt, Immun-Checkpoints, wodurch sie die antitumorale Immunantwort in Gang setzen und verstärken. Sie blockieren entweder CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) – wie Ipilimumab – oder PD-1 (*programmed cell death protein 1*) – wie Nivolumab und Pembrolizumab. Angiogenesehemmer sind Arzneistoffe gegen Gefäßneubildung (Angiogenese). Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen den VEGF (*vascular endothelial growth factor*) gerichtet ist. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib und Apatinib binden an den VEGF-Rezeptor und hemmen dadurch die Angiogenese. (Ilie *et al.*, 2023)

Es gilt hervorzuheben, dass Hypophysenadenome durch eine Hypersekretion von Hormonen oder Masseneffekte charakterisiert sein können. Infolgedessen sind eine frühzeitige Diagnosestellung und die Einleitung einer effektiven Behandlung von entscheidender Bedeutung. Die onkologischen Behandlungen für Hypophysenadenome umfassen verschiedene Ansätze wie Neurochirurgie, medikamentöse Therapien und Strahlentherapie. Üblicherweise stellt die primäre Intervention eine Operation durch das Keilbein dar. Die Ziele der chirurgischen Maßnahmen besteht darin, die Tumorgöße zu verkleinern, den Druck des Tumors auf das benachbarte Gewebe zu reduzieren und eine bessere Ansprechbarkeit auf medikamentöse Therapien zu ermöglichen. Die medikamentöse Therapie kommt für diejenigen Patienten infrage, die durch eine Operation nicht geheilt werden konnten. Die Strahlentherapie wird hingegen bei Patienten angewendet, bei denen nach chirurgischen Eingriffen und medikamentöser Behandlung keine ausreichende Reduktion der Tumorgöße und der Hormonspiegel erzielt werden konnte. (Molitch, 2017)

1.4 Cathepsine

Der enzymatische Abbau von Proteinen, bekannt als Proteolyse, durch Peptidasen, auch Proteasen genannt, spielt eine wichtige Rolle beim Fortschreiten von Krebs. Dies manifestiert sich durch verschiedene Phänomene wie das unkontrollierte Wachstum von Tumoren, ihre Ausbreitung in umliegendes Gewebe, die Bildung von Metastasen und die Förderung der Angiogenese. Fehlerhafte Mechanismen der Proteolyse sind

häufig mit der Entwicklung zu bösartigem Krebs verbunden. Dies hat das Interesse der Forschung auf die Cathepsine gelenkt. (Khaket, Kwon and Kang, 2019)

Die Bezeichnung „Cathepsin“ leitet sich vom griechischen Wort „kathepsin“ ab, was verdauen bedeutet. Cathepsine sind eine Familie von proteolytischen Enzymen, die in allen Organismen vorkommen, einschließlich des Menschen. Diese Enzyme spielen eine entscheidende Rolle im Proteinabbau und sind daher essenziell für die Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse. Die Cathepsine werden anhand der Schlüsselaminosäure in ihrem aktiven Zentrum in drei Hauptgruppen unterteilt, der Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen. Beim Menschen sind insgesamt 15 verschiedene Cathepsine bekannt. (Nakanishi, 2020)

Die Cathepsine sind hauptsächlich in den Lysosomen lokalisiert, den zellulären Organellen, die für den Abbau und die Verdauung von Fremdstoffen und körpereigenen Stoffe zuständig sind. Die Cathepsine entfalten ihre Funktion unter sauren Bedingungen. Trotz ihrer primären Funktion im Proteinabbau wurden Cathepsine auch in anderen Zellkompartimenten wie dem Zytoplasma und dem Zellkern nachgewiesen, wo sie verschiedene zelluläre Prozesse wie die Immunantwort und die Signaltransduktion beeinflussen. (Patel *et al.*, 2018)

Eine Fehlregulation der Expression und der Aktivität von Cathepsinen stört die zelluläre Homöostase und ist daher mit einer Vielzahl von Krankheiten verbunden, darunter Krebs sowie neurodegenerative und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Daher bieten Cathepsine ein interessantes Forschungsgebiet mit großem Potential für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen. (De Pasquale, Moles and Pavone, 2020)

1.5 Zielmoleküle der Tumorthherapie und -forschung

Krebs ist eine Krankheit mit einer molekularen Grundlage, bei der Protoonkogene eine Schlüsselrolle spielen. Diese Gene fungieren als erste regulatorische Faktoren im Prozess der Krebsentstehung, indem sie Signale übertragen und als Wachstumsfaktoren wirken. Mutationen dieser Gene, die als Onkogene bezeichnet werden, führen zur Bildung von Krebszellen. Die Aktivierung von Protoonkogenen erfolgt durch chromosomale Translokation, Punktmutationen und Genamplifikation. Man geht davon aus, dass ein Tumor von einer einzigen Zelle entsteht. Zudem besteht

ein enger Zusammenhang zwischen der Tumorentwicklung und der Hemmung der Apoptose. Dies verstärkt die Proliferation und somit die Überlebensfähigkeit der Zelle. Die Expression von angiogenen Faktoren können eine entscheidende Rolle bei der Tumorentwicklung spielen. Tumorsuppressorgene unterdrücken die unkontrollierte Teilung von Tumorzellen und tragen zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Zellentwicklung bei. Zusammengefasst entstehen Neoplasien durch eine Zunahme genetischer Variationen in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturgenen. (Kontomanolis *et al.*, 2020)

1.5.1 VEGF

Die Ausbildung neuer Blutgefäße, der sogenannten **Angiogenese**, spielt eine entscheidende Rolle beim expansiven Wachstum und der Metastasierung von Tumoren. Wenn Tumore einen bestimmten Durchmesser überschreiten, werden sie hypoxischer, was ihr weiteres Wachstum beeinträchtigt. Die Angiogenese kann jedoch dazu führen, dass kleine Tumore schnell expandieren.

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist eines der primären Moleküle, die mit der Angiogenese in Verbindung gebracht werden. Durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf Endothelzellen, den VEGF-Rezeptoren, fördert sie die Bildung neuer Blutgefäße.

VEGF ist auch in pathologischen Prozessen von Bedeutung, insbesondere der Tumorentwicklung, wo es verstärkt exprimiert sein kann und somit die Angiogenese fördert. Die Hemmung von VEGF hat sich daher als wirksame Strategie in der Krebstherapie erwiesen. (Patel *et al.*, 2023)

In der Tumorthherapie kommen bereits monoklonale Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren als Angiogenesehemmer zum Einsatz. Bevacizumab und Ramucirumab gehören zu den eingesetzten Antikörpern. Zu den Tyrosinkinase-Inhibitoren zählen unter anderem Sunitib, Axitinib und Pazopanib. (Ferrara and Adamis, 2016)

1.5.2 EGFR & TGF- α

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen und spielt eine wesentliche Rolle in der Physiologie von

Epithelzellen. Bisher wurden sieben Liganden des EGFR beschrieben, einer davon ist TGF- α (transforming growth factor alpha). (Sigismund, Avanzato and Lanzetti, 2018)

Darüber hinaus sind **Wachstumsfaktoren** bei der neoplastischen Transformation von Bedeutung. Insbesondere die Signalkaskade von TGF- α und EGFR ist ausschlaggebend für die Entwicklung und Progression von Epithelkarzinomen beim Menschen. Eine Überexpression von TGF- α und EGFR wurde in den meisten Karzinomen beobachtet und deutet in der Regel auf eine ungünstige Prognose hin. Die Hemmung ihrer Signalwege wird daher als wichtiges Ziel für die Tumorthherapie erforscht. (Ciardiello *et al.*, 2006)

Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib werden in der antineoplastischen Therapie angewendet, um die Kinasefunktion des EGFR-Rezeptors zu hemmen. (Thai *et al.*, 2021) Die monoklonalen Antikörper Cetuximab, Panitumumab und Necitumumab sind gegen den EGFR gerichtet und bereits als Medikament auf den Markt gekommen. (Cai *et al.*, 2020)

1.5.3 P53, BAX & BCL-2

Die **Apoptose**, eine Form des programmierten Zelltods, ist ein wichtiger Prozess im Körper. Sie reguliert die physiologische Entwicklung und Funktion. Der Zelltod spielt eine äußerst wichtige Rolle bei der Regulierung der Tumorbildung und beeinflusst auch die Wirksamkeit von Behandlungen. Durch die Eliminierung von beschädigten oder entarteten Zellen trägt die Apoptose wesentlich zum Schutz vor Krebsentstehung und -progression bei.

Die Apoptose wird durch verschiedene Tumorsuppressorgene beeinflusst, darunter das P53-Protein. Nach einer DNA-Schädigung werden in den Zellen bestimmte Reaktionen ausgelöst, indem Proteine der P53- und BCL-2-Familie aktiviert werden. Diese Reaktionen dienen dazu, die Gesundheit der Zellen zu erhalten und ihre Funktionsfähigkeit zu bewahren. Die Aktivierung von P53 kann entweder zur DNA-Reparatur oder zur Einleitung der Apoptose führen. Zusätzlich reguliert P53 die Apoptose durch die Modulation von Genen der BCL-2-Familie.

Die Proteine der BCL-2-Familie besteht aus pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern, wie BAX (*Bcl-2 associated X protein*) und BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*). Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran im

Rahmen der Apoptose. Außerdem regulieren sie die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien.

Das anti-apoptotische Protein BCL-2 ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Es fördert das Zellüberleben, hemmt die Wirkung pro-apoptotischer Proteine und somit den Zelltod.

Im Gegensatz dazu reguliert das pro-apoptotische Protein BAX den Zelltod, indem es die Mitochondrien zerstört. Seine Expression wird durch das Tumorsuppressorgen P53 gesteuert. BAX verstärkt die Öffnung des mitochondrialen spannungsabhängigen Anionenkanals. Infolgedessen kommt es zum Verlust des Membranpotentials und Freisetzung von Cytochrom c. (Ramadan *et al.*, 2019)

Als BCL-2-Hemmer kommt unter anderem Venetoclax in der antineoplastischen Therapie zum Einsatz. (Guerra, DiNardo and Konopleva, 2019)

1.5.4 Caspase 7

Die Apoptose wird durch die Proteine der BCL-2-Familie und der Caspase-Familie reguliert. Die Caspase-Kaskade ist für den Zelltod nach der Freisetzung von Cytochrom C verantwortlich. Die genauen Funktionen der Caspasen-9, -7 und -3 (*Cysteine-dependent aspartate-specific protease*) innerhalb der Apoptose sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Die intrinsische („von innen her“) Apoptose ist eine Form des kontrollierten Zelltods, der hauptsächlich um die Mitochondrien stattfindet. Die **intrinsische Apoptose** wird durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren oder intrazellulären Stress ausgelöst. Die extrinsische („von außen her“) Apoptose hingegen wird über Todesrezeptoren auf der Zellmembran in die Wege geleitet.

Die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins BAX bewirkt die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und die Freisetzung des Cytochrom c ins Zytosol. Cytochrom c bildet durch die Bindung an Apaf-1(*apoptotic protease activating factor 1*) das sogenannte Apoptosom. Dies führt in der Folge zur Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase-9, welches wiederum die Effektorcaspasen Caspase-7 und -3 spaltet und aktiviert. Die Effektorcaspasen leiten die Abbauphase der Apoptose ein,

gekennzeichnet durch DNA-Fragmentierung, Zellschrumpfung und Aufplatzen der Membran.

Daten haben gezeigt, dass Caspase-3 und -7 eine bedeutende Rolle bei der Spaltung von Proteinen während der intrinsischen Apoptose spielen. Die verschiedenen Aufgaben der einzelnen Caspasen in diesem komplexen Prozess sind jedoch noch nicht vollständig geklärt, daher bedarf es noch weiterer Forschung. (Brentnall *et al.*, 2013)

1.5.5 PARP

Poly-ADP-Ribose-Polymerasen (PARP) sind eine Gruppe von Proteinen, die in verschiedenen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Darunter zählen die **DNA-Reparatur**, die Erhaltung der genomischen Stabilität und die Regulation des Zelltods. Insbesondere sind die Reparaturmechanismen im Rahmen der Basen-Exzision und der Einzelstrangbrüche von PARP abhängig. Unter den verschiedenen PARP-Familien sind PARP-1 und PARP-2 für das Überleben von Zellen unerlässlich. Diese Proteine nutzen NAD⁺ (Nicotinamidadenindiknukleotid) als Substrat, um die PARylierung (Poly-ADP-ribosylierung) zu katalysieren und Nicotinamid freizusetzen. Die PARylierung ist eine posttranslationale Modifikation und reguliert die Konformation, Stabilität und Aktivität bestimmter Zielproteine.

Beschädigte Zellen werden durch die homologe Rekombination repariert. Im Gegensatz dazu führt die Hemmung von PARP-1 zum Tod von Krebszellen, da wichtige Proteine für die homologe Rekombination fehlen. PARP-Inhibitoren hemmen die Aktivität von Ribosomen, die für das Wachstum von Krebszellen erforderlich sind. Dadurch kann die Progression von Tumoren verlangsamt bzw. verhindert werden. (Moon *et al.*, 2023)

Niraparib, Olaparib und Rucaparib zählen zu den PARP-Inhibitoren, die behördlich zugelassen und auf den Markt gebracht wurden. Sie werden bei antineoplastischen Behandlungen eingesetzt, um die Effizienz der Chemo- und Strahlentherapie zu steigern. (Rose *et al.*, 2020)

1.5.6 PI3K

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) sind eine Gruppe von Enzymen, die **Signale** innerhalb von Zellen übertragen, indem sie sekundäre Botenstoffe produzieren. Sie phosphorylieren Inositollipide an der dritten Position des Inositolrings. Dadurch werden Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, die verschiedene zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Stoffwechsel, Überleben und Proliferation steuern. PI3Ks der Klasse I werden durch Tyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert. (Tzenaki and Papakonstanti, 2013) Ihre aktivierte Form führt zur Phosphorylierung von PIP2 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat). Dieser Prozess wird durch die Phosphatase PTEN rückgängig gemacht. (Noorolyai *et al.*, 2019)

Die Klasse IA wird nach der katalytischen Untereinheit p110 in drei Isoformen eingeteilt und besteht aus p110 α , p110 β und p110 δ . Die Isoformen werden von unterschiedlichen Genen kodiert, wobei Mutationen im p110 α -Gen in verschiedenen Krebsarten häufig zu finden waren. (Tzenaki and Papakonstanti, 2013)

PI3Ks spielen eine wichtige Rolle als Koordinatoren der intrazellulären Signalübertragung als Antwort auf extrazelluläre Stimuli. Die Überaktivierung des PI3K-Signalwegs ist ein häufiges Ereignis bei Krebserkrankungen. Onkologische Forschungen befassen sich mit den Mechanismen hinter den Veränderungen des PI3K-Signalwegs. (Noorolyai *et al.*, 2019)

Es wurden verschiedene PI3K-Inhibitoren entwickelt und auf ihre potenzielle klinische Anwendung hin untersucht. Unter denjenigen, die sich derzeit in Entwicklung befinden oder bereits für die Krebsbehandlung zugelassen sind, sind Buparlisib, Taselisib, Copanlisib, Alpelisib, Serabelisib, Gedatolisib und Samotolisib zu nennen. (Drullinsky and Hurvitz, 2020)

1.6 Zielsetzung

Bisher existiert nur begrenztes Wissen über einen potenziellen Zusammenhang zwischen der Entstehung eines Hypophysenadenoms und einer erhöhten Expression von Cathepsinen in diesem Gewebe. Diese Arbeit zielt darauf ab, diese Fragestellung zu untersuchen, indem Versuche an unterschiedlich behandelten Hypophysenadenomen durchgeführt, analysiert und ausgewertet wurden. Gesunde

und krebskranke Gewebeproben ohne Behandlung dienten dabei als Kontrolle. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Aktivität und Expression verschiedener Proteine in den Gewebeproben zu analysieren, die als mögliche Zielmoleküle für die klinische Therapie der Adenome nutzbar gemacht werden könnten.

1.7 Methodik der Arbeit

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden Gewebeproben von Hypophysenadenomen bei Mäusen untersucht, die verschiedenen Behandlungen unterzogen wurden. Als Negativkontrolle diente gesundes Hypophysengewebe. Die Positivkontrolle bildete unbehandeltes Gewebe vom Hypophysenadenom. Insgesamt standen somit sechs verschiedene Gruppe zur Verfügung.

Tabelle 1: Übersicht der Proben

	<i>Abkürzung</i>	<i>Krebs</i>	<i>Behandlung</i>
<i>Gruppe 1</i> <i>(Negativkontrolle)</i>	C	-	-
<i>Gruppe 2</i> <i>(Positivkontrolle)</i>	PC	+	-
<i>Gruppe 3</i>	T1	+	Cathepsin-L-Hemmer
<i>Gruppe 4</i>	T2	+	Cathepsin-B-Hemmer
<i>Gruppe 5</i>	T3	+	Metalloprotease-Hemmer
<i>Gruppe 6</i>	T4	+	Cathepsin-D-Hemmer

Zu Beginn wurden die Proteine aus den jeweiligen Gewebeproben mittels Ultraschall extrahiert, durch Gelelektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und schließlich auf eine Membran übertragen. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem primären und sekundären Antikörper, um eine quantitative Bewertung der Proteine durchführen zu können. Auf diese Weise konnte die unterschiedliche Proteinexpression mittels *Western Blotting* nachgewiesen werden.

Abschließend erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung der Gewebe. Zu diesem Zweck wurden Mikrotomschnitte hergestellt, die in einem mehrstufigen Verfahren gewaschen, mit Antikörpern inkubiert und schließlich gefärbt wurden. Zum Schluss wurden diese Präparate mikroskopisch analysiert.

2 Materialien

In diesem Kapitel sind die wesentlichen Materialien zur Durchführung der Versuche aufgelistet. Die Reagenzien und Chemikalien sind mit Herstellerfirma und Land angegeben. Anschließend sind die verwendeten primären und sekundären Antikörper mit genauerer Bezeichnung, der biologischen Quelle, der jeweiligen Verdünnung und der Herstellerfirma inklusive Land aufgezählt. Im Anschluss daran wurde die detaillierte Zusammensetzung der benötigten Lösungen und Puffer erfasst. Den Abschluss bildet eine Auflistung der genutzten Geräte und Programme zur Analyse und Auswertung der Ergebnisse.

2.1 Western Blot

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2: Liste der benötigten Reagenzien und Chemikalien

30% Acrylamid	Sigma-Aldrich, Österreich
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Österreich
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Österreich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Bio-Rad, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Österreich
Clarity Western ECL-Substrate	Bio-Rad, Österreich
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Österreich
Glycerol	Sigma-Aldrich, Österreich
Glycin	Sigma-Aldrich, Österreich
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Österreich
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Österreich
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Österreich
Methanol	Carl-Roth, Österreich
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Österreich
Natriumchlorid	VWR-Chemicals, Österreich
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Österreich
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Österreich
PVDF-Membran	Amersham TM Hybond TM , Deutschland

SDS	Biomol, Deutschland
TEMED	Bio-Rad, Österreich
Tris	Roche Diagnostic, Deutschland
Tris Base (Trizma)	Sigma-Aldrich, Österreich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Österreich
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, Österreich

2.1.2 Antikörper

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper

		Source	Verdünnung	Firma
Primäre Antikörper	VEGF	Goat	1:2000	R&D Systems
	Phospho-EGFR	Rabbit	1:1000	Invitrogen
	TGF- α	Goat	1:2000	R&D Systems
	p53	Mouse	1:5000	Abcam
	PI3 Kinase p110	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology
	Caspase 7	Rabbit	1:1000	Cell Signaling Technology
	BAX	Rabbit	1:667	R&D Systems
	Bcl-2	Mouse	1:5000	R&D Systems
Sekundäre Antikörper	Anti-Rabbit IgG	Goat	1:3000	Cell Signaling Technology
	Anti-Mouse IgG	Horse	1:3000	Cell Signaling Technology
	Anti-Goat IgG	Rabbit	1:1000	Sigma-Aldrich
	Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Goat	1:300	Abcam
	Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	Donkey	1:300	Abcam

2.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Liste der hergestellten Lösungen und Puffer

10% APS	100 mg APS Ad 1 ml dH ₂ O
Blockierlösung	1,5 g BSA 100 µl NaN ₃ Ad 50 ml PBS
Lösung für den primären Antikörper	1,5 g BSA 0,01 g NaN ₃ Ad 50 ml PBS → den primären Antikörper entsprechend seiner Verdünnung hinzufügen
Lösung für den sekundären Antikörper	0,25 g BSA Ad 50 ml PBS → den sekundären Antikörper entsprechend seiner Verdünnung hinzufügen
1x PBS	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,24 g KH ₂ PO ₄ Ad 1000 ml dH ₂ O
10x Running Buffer → vor Verwendung 1:10 Verdünnung mit dH ₂ O	30,3 g Tris 144,2 g Glycin 10 g SDS Ad 1000 ml dH ₂ O
4x Sample Buffer	5 ml Glycerol 0,4 g SDS 1,25 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8) 2,5 ml 1% Bromphenolblau 1 ml β-Mercaptoethanol Ad 10 ml dH ₂ O

2x Sample Buffer	900 µl 4x Sample Buffer 100 µl β-Mercaptoethanol Ad 2 ml dH ₂ O
10x TBS → 1x TBS: 1:10 Verdünnung mit dH ₂ O	24,0 g Tris 88,0 g NaCl Ad 1000 ml dH ₂ O
1x TBST	100 ml 10x TBS 900 ml dH ₂ O 1 ml Tween 20
10x Transfer Buffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 1,0 g SDS 500 ml dH ₂ O 200 ml MeOH
1x Transfer Buffer	100 ml 10x Transfer Buffer 200 ml MeOH Ad 1000 ml dH ₂ O
10% Triton X 100	5 ml Triton X 100 45 ml dH ₂ O

2.1.4 Geräte und Programme

Tabelle 5: Geräte und Programme zur Analyse und Auswertung

Centrifuge 5415R Eppendorf
ChemiDoc MP Imaging System Bio-Rad
Laborschüttler Edmund Bühler GmbH
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell Bio-Rad
PowerPac Basic Power Supply Bio-Rad
Schüttelinkubator GFL
TECAN infinite M200 Pro Platten-Reader mit i-control Software
Thermomixer 5436 Eppendorf
Tischzentrifuge AL-Labortechnik
Trans-Blot Turbo Transfer System Bio-Rad
Ultraschallprozessor Bandelin Sonopuls UW 70 mit Controller GM 70 HD

Vortex Genie 2 Bender & Hobein AG
ImageJ
GraphPad PRISM
Microsoft Excel

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 6: Liste der benötigten Reagenzien und Chemikalien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl-Roth, Österreich
DAB Substrate Powder	Thermo Fisher Scientific, Österreich
DPX-Mountant	Sigma-Aldrich, Österreich
Tris	Roche Diagnostic, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Österreich
Xylol	Sigma-Aldrich, Österreich

2.2.2 Antikörper

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Antikörper

		Source	Verdünnung	Firma
<i>Primärer Antikörper</i>	Phospho-EGFR (Tyr1068) Polyclonal Antibody	Rabbit	1:240	Invitrogen
<i>Sekundärer Antikörper</i>	Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Goat	1:300	Cell Signaling Technology

2.2.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 8: Liste der hergestellten Lösungen und Puffer

10% BSA-Lösung	1g BSA 10 ml PBS
10% Triton X 100-Lösung	5 ml Triton X 100 45 ml dH ₂ O

Blockierlösung	600 µl 10% BSA-Lösung 150 µl Normal Donkey Serum 30 µl 10% Triton X 100-Lösung 2220 µl PBS
Pufferlösung für den primären Antikörper	12 µl 10% BSA-Lösung 12 µl Normal Donkey Serum 12 µl 10% Triton X 100-Lösung 1164 µl PBS 2,4 µl NaN ₃ → den primären Antikörper entsprechend seiner Verdünnung hinzufügen
Pufferlösung für den sekundären Antikörper	240 µl 10% BSA-Lösung 960 µl PBS → den sekundären Antikörper entsprechend seiner Verdünnung hinzufügen
Working solution	0,5 mg DAB 0,5 ml 0,02% H ₂ O ₂ 0,5 ml 50 mM Tris pH 7,2

2.2.4 Geräte und Programme

Tabelle 9: Geräte und Programme zur Analyse und Auswertung

Rotationsmikrotom SLEE VWR International GmbH
Ultraschallbad Starsonic 35
Olympus BX51 Fluoreszenzmikroskop
X-Cite Fluoreszenz-Lampenbeleuchtungen
Olympus cellSens Dimension Bildanalysesoftware

3 Methoden

Dieses Kapitel bietet eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten Methoden, um den Versuchsaufbau möglichst genau rekonstruieren zu können.

3.1 Versuchstiere und Organentnahme

Die Tiere wurden für die Versuchsreihe sorgfältig ausgewählt, wobei erwachsene weibliche Albino-Mäuse mit einem Gewicht zwischen 25 und 30 g aus der Tierkolonie des National Research Centre in Ägypten bezogen wurden. Vor Beginn der Experimente wurden den Mäusen eine Woche lang freier Zugang zu Futter und Wasser gewährt, um sie zu akklimatisieren. Die Betreuung der Tiere erfolgte gemäß den Standardkriterien der Institution für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren, die von der Ethikkommission der Fakultät für Naturwissenschaften der Al-Azhar-Universität festgelegt wurde.

Die Entstehung von Hypophysenkrebs wurde durch subkutane Injektionen von Östradiol (5 mg/kg) bei den Mäusen induziert.

Nach der Akklimatisierung und Krebsinduktion wurden sowohl gesunde als auch krebserkrankte Tiere nach dem Zufallsprinzip in Gruppen mit jeweils zehn Mäusen eingeteilt. Die Tiere aus der Gruppe 1 wurden während des gesamten Zeitraums mit einer Standarddiät gefüttert und mit Wasser versorgt. Die Gruppe 2 bestand aus Tieren mit Östradiol-induziertem Hypophysenkrebs. Sie wurden keiner Behandlung unterzogen und dienten als Positivkontrolle. Die Gruppen 3 bis 6 umfassten die Mäuse mit Östradiol-induziertem Hypophysenkrebs, die dreimal pro Woche mit der subkutanen Verabreichung von Inhibitoren in einer Dosis von 5 mg/kg behandelt wurden.

Am Ende des Versuchszeitraums wurden von allen Mäusen Gewebeproben entnommen, die danach verschiedenen Untersuchungen unterzogen wurden.

Für die **Organentnahme** wurden folgende Materialien benötigt:

- Dissektionstablett
- Kleine Dissektionsschere
- Pinzette mit einer feinen Spitze

- Steriles PBS
- Sterile Petrischale
- Eiskalter isotonischer Puffer
- Anästhesielösung
- Mäuse (nach ethischen Richtlinien eingeschläfert)

Zur Entnahme der tierischen Hypophysen wurden zuerst die nötigen Vorbereitungen getroffen. Das Dissektionstablett wurde an einem sauberen und sterilen Arbeitsplatz platziert. Die Anästhesielösung wurde gemäß der empfohlenen Konzentration vorbereitet. Es wurden zuletzt alle benötigten Instrumente und Lösungen sterilisiert, um eine mögliche Kontamination zu verhindern. Zur Betäubung wurde den Mäusen 40 bis 50 mg/kg Pentobarbital intraperitoneal verabreicht. Anschließend wurde das Fehlen von Reflexreaktionen überprüft, um die Anästhesie zu bestätigen. Die Maus wurde danach auf dem Dissektionstablett in der Rückenlage positioniert und die Gliedmaße mit Nadeln oder Klebeband befestigt, um die ventrale Seite freizulegen. Für die Schädelsektion wurde mit einer kleinen Dissektionsschere ein Mittellinienschnitt entlang der ventralen Seite des Halses gemacht, der vom Unterkiefer bis zur Brust reicht. Die Haut und das darunter liegende Bindegewebe wurden vorsichtig abgezogen, um darunter liegende Struktur freizulegen. Als Nächstes erfolgte die präzise Freilegung des Schädels. Dazu wurde die Luftröhre mit einer feinen Pinzette in Richtung des Kopfes gezogen und so der Halsbereich freigelegt. Anschließend wurden die Halsmuskeln mit einer Schere durchgeschnitten, um die Schädelbasis freizulegen. Für die Schädelöffnung wurden Weichgewebe um die Schädelbasis mit einer Pinzette und einer Schere mit feiner Spitze seziert. Es wurde eine kleine Öffnung auf der Rückseite des Schädels erstellt, indem man das Schädelknochen durchschneidet. Im Anschluss wurde das Gehirn mit einer Pinzette vorsichtig angehoben, um eine minimale Beschädigung der umliegenden Strukturen sicherzustellen. Das Gehirn wurde dann vollständig vom Schädel entfernt und in eine sterile Petrischale mit eiskaltem isotonischem Puffer gelegt. Im Nachhinein wurde die Hypophyse lokalisiert und identifiziert. Die Hypophyse der Maus ist eine erbsengroße Struktur an der Basis des Gehirns.

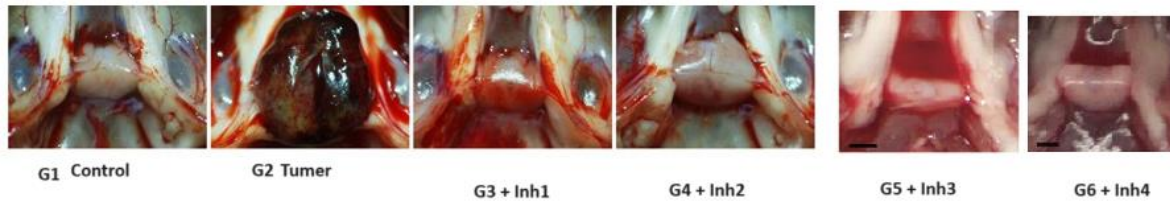


Abbildung 2: Hypophysen der jeweiligen Gruppen (Quelle: Arbeitsgruppe ao. Univ.-Prof. Studenik)

Die Hypophyse wurde mit größter Vorsicht seziiert und vom umgebenden Gewebe isoliert. Für die Probengewinnung wurde die Hypophyse der Maus schließlich mit einer feinen Pinzette von der Basis des Gehirns angehoben und in ein vorbeschriftetes Röhrchen mit sterilem PBS gelegt. Für die weiteren Analysen wurden die Hypophysenproben auf Eis gelagert. Die biologischen Abfälle wurden gemäß den institutionellen Richtlinien und Protokollen entsorgt. Zum Schluss wurden alle Instrumente und der Arbeitsplatz für die Dissektion gereinigt und sterilisiert, um eine Kontamination bei nachfolgenden Dissektionen zu verhindern.

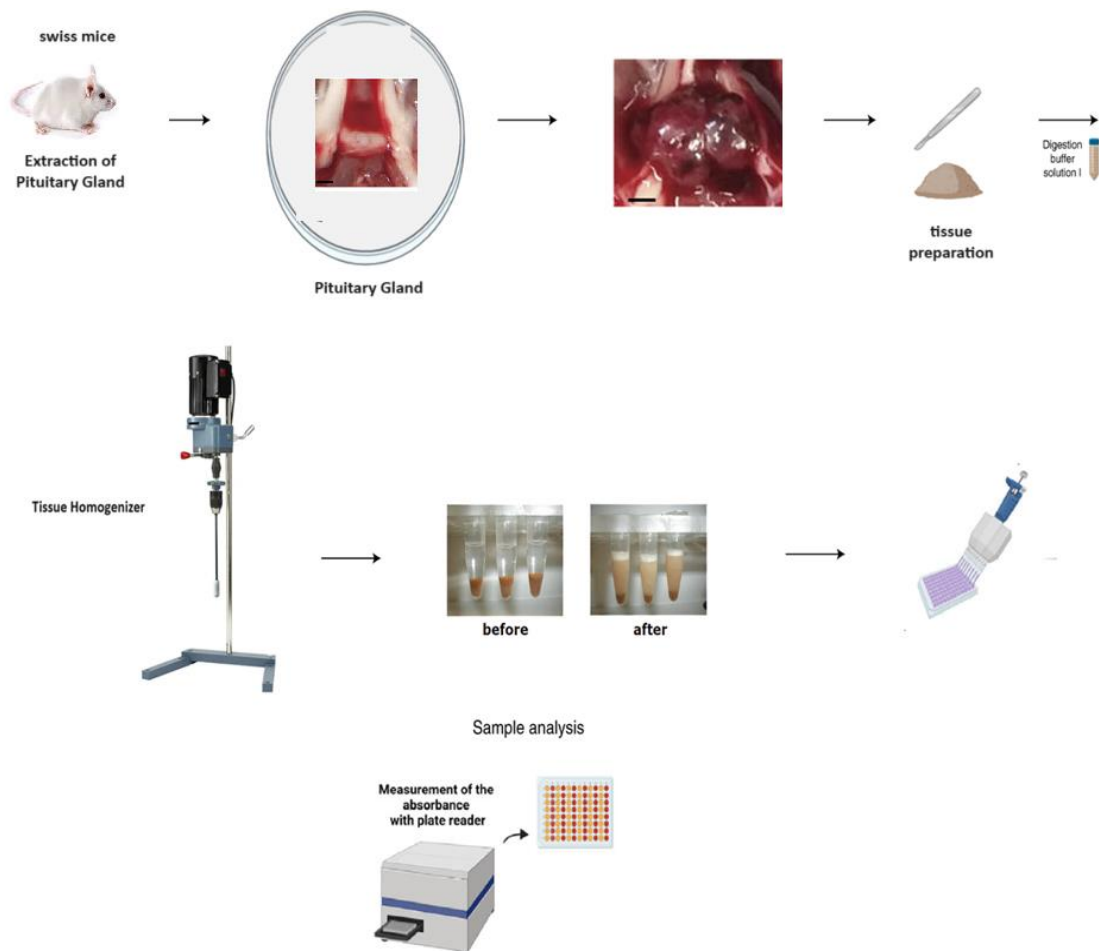


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Probengewinnung vom Versuchstier bis hin zur Messung der Proteinkonzentration (Quelle: Arbeitsgruppe ao. Univ.-Prof. Studenik)

3.2 Western Blot

Der Western Blot, auch Immunoblot genannt, stellt eine etablierte Methode dar, um Proteine nachzuweisen und quantitative Informationen über das Zielprotein in biologischen Proben zu erlangen. Diese Technik wird weitläufig in der Proteinanalyse eingesetzt. Es handelt sich dabei um einen komplexen Prozess, der verschiedene Schritte umfasst:

1. Die Vorbereitung der Proben durch Proteinextraktion und die Bestimmung der Proteinkonzentration
2. Die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels Elektrophorese auf SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE, engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
3. Die Übertragung der Proteine auf eine PVDF-Membran, der Trägermembran (engl. *Blotting*)

4. Die Blockierung nicht spezifischer Proteinbindungen auf der Membran
5. Die Detektion der Zielproteine mittels spezifischer primärer Antikörper
6. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern, die mit markierten Chemolumineszenz-Molekülen konjugiert sind
7. Die Erfassung des Signals der Antigen-Antikörper-Bindung

Die Ergebnisse können durch Ungenauigkeit im Prozess stark beeinflusst werden, daher wird hier höchste Präzision während dem Arbeiten erfordert. Es ist außerdem von entscheidender Bedeutung, jeden Schritt des Western Blot zu standardisieren, um eine hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. (Mishra, Tiwari and Gomes, 2017)

3.2.1 Proteingewinnung

Die Proteinextraktion ist ein entscheidender Schritt beim Western Blot und legt den Grundstein für zuverlässige Ergebnisse. In dieser Phase wird das komplexe Gewebe in eine homogene Lösung umgewandelt, um die Analyse der Proteine zu ermöglichen. Die folgende Methode beschreibt einen präzisen Ansatz zur Probenvorbereitung für die Extraktion von Proteinen aus kleinen Gewebestücken von Mäusehypophysen in Eppendorf Reaktionsgefäßen, im Folgenden als „*Eppis*“ bezeichnet.

Zunächst wurden die Gewebestücke in 150 µl 0.2M Natriumacetatpuffer pH 5,5 suspendiert. Durch die Zugabe des Puffers wurde das Gewebe in eine für die Extraktion geeignete Umgebung gebracht. Anschließend wurde die Ultraschallsonde zum Homogenisieren eingesetzt. Dieser Prozess zielt darauf ab, das Gewebe zu zerstören und die Proteine zu erhalten. Die Proben wurden für vier Sekunden in der Sonde gelassen und dann für mindestens 30 Sekunden in der Eisbox abgekühlt. Dieser Zyklus wurde wiederholt, bis eine homogene Lösung erreicht wurde.

Nach der Homogenisierung wurde 1,5 µl frisch hergestellte 10% Triton X 100-Lösung entnommen und in die Proben zugegeben. Durch anschließendes Vortexen wurde eine effektive Durchmischung erreicht. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, gefolgt von einer Ruhephase auf Eis für etwa 30 Minuten.

Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 13.000 Umdrehungen pro Minute für zehn Minuten bei 4°C. Dies führt zur Trennung der Bestandteile, wobei sich der Fettüberstand, die Flüssigkeit und der Satz in Eppis ablagern. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Flüssigkeit in ein neues Eppli übergeführt.

Besondere Sorgfalt ist hierbei geboten, um sicherzustellen, dass nur die Natriumacetat-Flüssigkeit mit den Zielproteinen entnommen wird und die Eppis korrekt beschriftet sind, um Verwechslungen zu vermeiden.

Abschließend werden die Eppis mit den extrahierten Proben im Tiefkühlschrank eingefroren, um eine geeignete Lagerung bis zur weiteren Analyse zu ermöglichen.



Abbildung 4: Proben in Eisbox mit Anblick auf die Ultraschallsonde (Quelle: Autor)

3.2.2 Konzentrationsbestimmung und Probenvorbereitung

Die Konzentrationsbestimmung ist von entscheidender Bedeutung für die präzise Quantifizierung von Proteinen in Proben. Durch die sorgfältige Vorbereitung von Standards und Proben sowie die Verwendung moderner Analysetechniken wie dem Platten-Reader und der Datenanalyse in Excel wird eine zuverlässige Bestimmung der Proteinkonzentration ermöglicht.

Zunächst wurden Standards und Proben in der Eisbox gelagert, um ihre Stabilität zu gewährleisten. Jeweils zwei Replikate wurden aufgetragen, wobei acht verschiedene Konzentrationen von Standards (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 µg/ml) verwendet wurden, um später anhand einer Eichgerade die Proteinkonzentration zu ermitteln. Die Befüllung der 96 Well Platte erfolgte mit jeweils 200 µl pro Well, wobei eine eigens hergestellte BCA-Lösung genutzt wurde.

Die Herstellung der BCA-Lösung erforderte die sorgfältige Mischung von Reagenz A und B. Es wurden insgesamt 12 ml BCA-Lösung aus 11,76 ml Reagenz A und 240 µl Reagenz B erhalten. Für die Standards wurden jeweils 190 µl BCA-Lösung in jedes Well übergeführt, gefolgt von 10 µl Standard. Für die Proben wurden 190 µl BCA-Lösung, 5 µl destilliertes Wasser und 5 µl Probe hinzugefügt. Nach dem Befüllen der Platte erfolgte die Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C für 30 Minuten, um die notwendigen Außenbedingungen für diverse Wachstumsprozesse zu schaffen.



Abbildung 5: Konzentrationsbestimmung mit 96 Well Platte (Quelle: Autor)

Anschließend wurde die 96 Well Platte im Platten-Reader zur Konzentrationsbestimmung vorgelegt, wobei eine Wellenlänge von 563 nm eingestellt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Excel ausgewertet, hierbei wurde der Mittelwert der Replikate berechnet. Basierend auf den Standards wurde eine Eichgerade erstellt, anhand dessen wurde die Proteinkonzentration der Proben in µg/ml ermittelt.

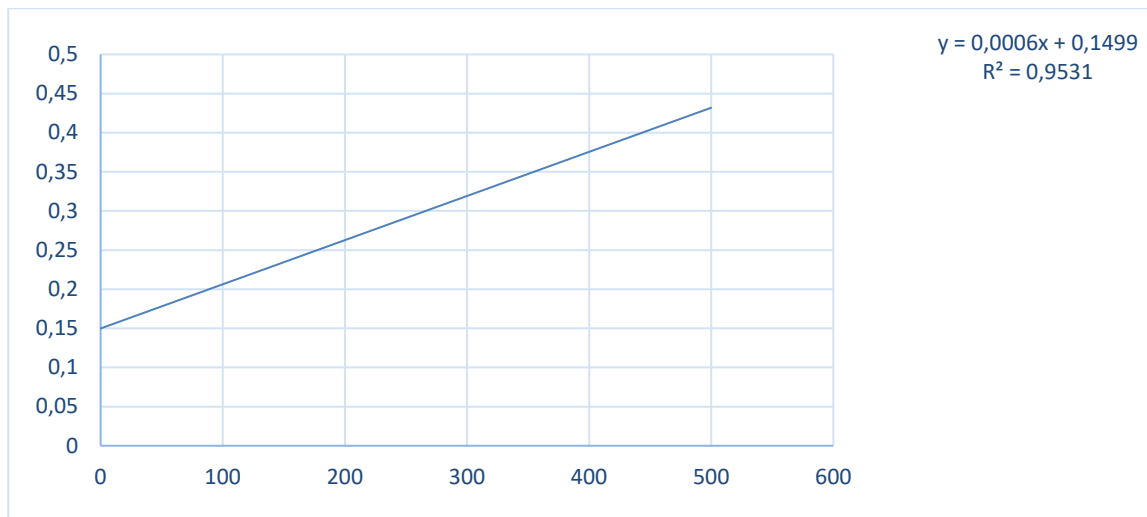


Abbildung 6: Kalibriergerade des Standards (Quelle: Autor)

Des Weiteren wurde eine Probenverdünnung durchgeführt, um die Konzentrationen auf ein einheitliches Niveau zu bringen. Dies erfolgte durch Zugabe von 10 µl *Sample Buffer*, Probe und destilliertem Wasser entsprechend der Ausgangskonzentrationen der Proben. Es werden insgesamt 40 µl pro Probe hergestellt. Hierbei wurde die Probe mit der niedrigsten Proteinkonzentration hergenommen und alle anderen Konzentrationen angepasst, also verdünnt. Das *Sample Buffer* dient zur Vorbereitung und Beladung von Proteinproben auf ein Gel.

Tabelle 10: Probenverdünnung

	<i>Probe</i>	<i>+dH₂O</i>	<i>+Sample Buffer</i>	<i>Füllvolumen gesamt</i>
<i>C</i>	22,55 µl	7,45 µl	10 µl	= 40µl
<i>PC</i>	9,46 µl	20,54 µl	10 µl	= 40µl
<i>T1</i>	12,91 µl	17,09 µl	10 µl	= 40µl
<i>T2</i>	25,75 µl	4,25 µl	10 µl	= 40µl
<i>T3</i>	20,29 µl	9,71 µl	10 µl	= 40µl
<i>T4</i>	30	0	10 µl	= 40µl

Nach einer kurzen Zentrifugation der Proben in der Tischzentrifuge und der Denaturierung der Proteine im Thermomixer bei 95°C für fünf Minuten wurden die Proben zur Weiterverarbeitung auf Eis gelegt oder im Gefrierschrank gelagert.

3.2.3 Gelherstellung

Die Herstellung eines geeigneten Gels für die folgende Elektrophorese ist ein essenzieller Schritt im Westen Blot. Dieser Vorgang erfordert präzise Handhabung und besondere Vorsicht aufgrund der Verwendung von Acrylamid, einer Substanz mit potenziell kanzerogenen Eigenschaften. Im Rahmen der Experimente wurde ein sogenanntes kleines Gel mit einem 10 Well Kamm hergestellt, um Proteine aufzutrennen.

Die Gelkassette wurde zum Gelgießen zusammengebaut, gefolgt von einer Dichteprobe mit Wasser, um Undichtigkeit zu erkennen. Danach wurde restliches Wasser mit einem geeigneten Filterpapier entfernt, um die Apparatur zu trocknen. Anschließend wurde das Gel hergestellt, wobei besonders Augenmerk auf den Schutz durch Handschuhe gelegt wird, um den Kontakt mit Acrylamid zu verhindern.

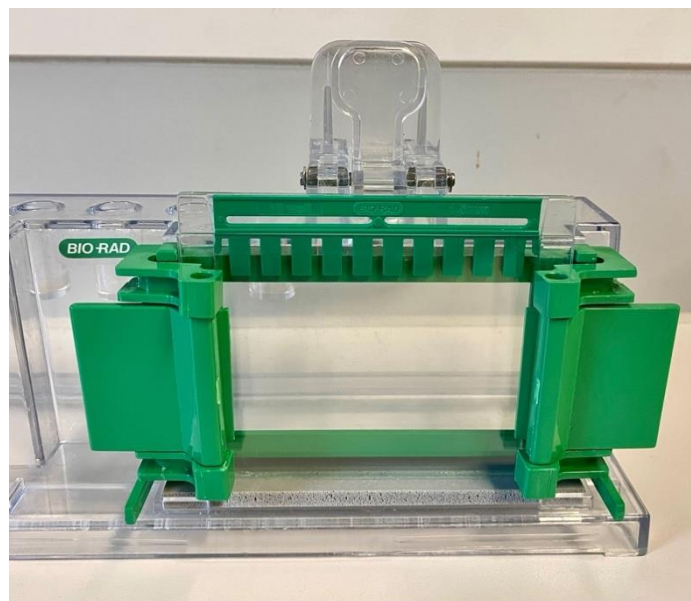


Abbildung 7: Gelkassette mit 10 Well Kamm (Quelle: Autor)

Das Gel besteht aus zwei Schichten, dem Trenngel und dem Sammelgel. Das Trenngel ist für die eigentliche Auftrennung der Proteine verantwortlich. Im schwächer konzentrierten Sammelgel befinden sich die Taschen, die durch den Kamm geformt werden und worin die verdünnten Proben aufgetragen werden. Als erstes wurde das Trenngel in einem sauberen Becherglas zubereitet, kurz geschwenkt und in die Apparatur bis zur unteren Linie vom grünen Balken gegossen. Das Gel wurde mit Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern und eine gerade Polymerisationslinie zu erhalten. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde das

Isopropanol ausgeleert und Flüssigkeitsreste mit Filterpapier vorsichtig entfernt. Danach wurde die Lösung für das Sammelgel vorbereitet und zügig auf das Trenngel gegossen. Der passende Kamm für die Probenfächer wurde in das Gel eingesetzt. Hierbei sollte mit einer Schutzbrille gearbeitet werden, um das Spritzen der Flüssigkeit in die Augen oder auf die Haut zu verhindern.

Tabelle 11: Zusammensetzung des 12% Trenngels

3,2 ml	dH ₂ O
4 ml	Acrylamid 30%
2,6 ml	1.5M Tris pH 8,8
0,1 ml	10% SDS
0,1 ml	10% APS
10 µl	TEMED

Tabelle 12: Zusammensetzung des 4% Sammelgels

2,24 ml	dH ₂ O
0,5 ml	Acrylamid 30%
0,945 ml	1.5M Tris pH 6,8
37,5 µl	10% SDS
37,5 µl	10% APS
3,75 µl	TEMED

Nach einer Aushärtezeit von einer Stunde wurde das hergestellte Gel, eingewickelt in feuchte Küchenrolle, im Kühlschrank aufbewahrt. Auf diese Weise ist das Gel bis zu einer Woche lang haltbar.

3.2.4 Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) stellt eine grundlegende und gängige Technik in der biochemischen Analyse dar, um hochauflösende Trennungen komplexer Proteinmischungen zu erzielen. Die SDS-PAGE beginnt mit der Denaturierung der Proteine durch Zugabe des anionischen Detergens SDS, das sich an die Proteine bindet und ihnen eine konstante negative Ladung verleiht. Anschließend erfolgt die Elektrophorese der denaturierten Proteine

durch eine poröse Acrylamid-Gelmatrix mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Durch die Elektrophorese werden die Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. (Nowakowski, Wobig and Petering, 2014)

Für diesen Zweck wurden zwei verschiedene Pufferlösungen verwendet, das *Running Buffer* und das *Transfer Buffer*. Das *Running Buffer* lässt die Proteine durch das Gel wandern. Das *Transfer Buffer* überträgt die Proteine auf die Membran beim Blotting, um eine weitere Analyse durchzuführen.

Nachdem das Gel ausreichend ausgehärtet und nach Möglichkeit über Nacht im Kühlschrank gelagert wurde, wurde der Kamm vorsichtig vom Gel entfernt. Die Taschen wurden mit Wasser gespült, um eventuelle Luftblasen zu entfernen.

Im Anschluss wurde die Elektrophorese-Apparatur aufgebaut. Dazu wurde das Gel in die Kassette eingebracht, dieses wiederum in den Elektrophorese-Tank gestellt. Sowohl die Innen- als auch die Außenkammer wurden mit *Running Buffer* befüllt. Bei Bedarf wurden die Taschen mit einer Nadel gerichtet. Jeweils 35 µl Probe wurden pro Tasche aufgetragen, wobei 5 µl Marker (*PageRuler*) zur Größenbestimmung nur einmal ganz links in die erste Tasche aufgetragen wurde.

Die Wanne wurde mit dem Deckel verschlossen, danach die Kabel korrekt angesteckt (rot auf rot und schwarz auf schwarz). Die elektrische Spannung wurde schrittweise erhöht, beginnend mit 50 Volt für eine halbe Stunde, gefolgt von 100 Volt für eine weitere halbe Stunde und schließlich 150 Volt, bis die Proteine ganz aufgetrennt wurden.

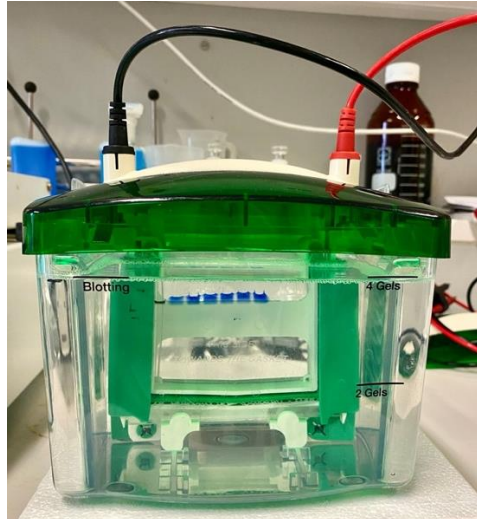


Abbildung 8: Gelelektrophorese (Quelle: Autor)

Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde die Apparatur abgebaut, wobei die Kabel abgesteckt und der Deckel abgenommen wurde. Der *Running Buffer* wurde ausgeleert.

3.2.5 Transfer auf eine Membran

Nach der Elektrophorese folgt in der Proteinanalytik der entscheidende Schritt der Proteinübertragung auf eine Membran. Dabei werden die zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine vom Acrylamidgel auf eine poröse Membran wie PVDF übertragen. Dies wird vor allem bei einer Wiederverwendung der Membran bevorzugt, beispielsweise für weitere Versuche mit verschiedenen Antikörpern.

Es gibt laut Literatur verschiedene Methoden, um Proteine von einem Gel auf eine Membran zu übertragen, wobei das *Elektroblotting* als besonders effiziente Technik angesehen wird.

Beim *Elektroblotting* wird ein elektrisches Feld verwendet, das senkrecht zur Oberfläche des Gels ausgerichtet ist, um die geladenen Proteine vom Gel auf die Membran zu bewegen. Dabei wird die Membran gegenüber der Anode und das Acrylamidgel gegenüber der Katode platziert. Das Gel und die Membran sind in einer sogenannten *Sandwich*-Form angeordnet, wobei außerhalb Filterpapiere zum Schutz verwendet werden. Mögliche Blasenbildung zwischen Gel und Membran sollte verhindert werden, da dies die Qualität der Bilder negativ beeinflussen würde.

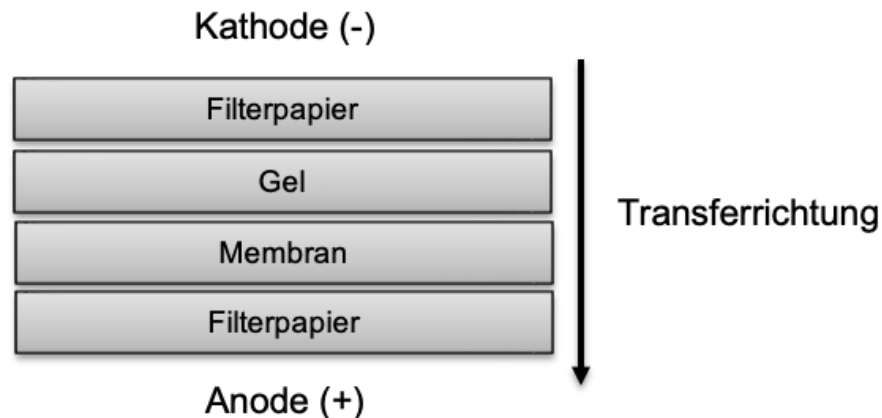


Abbildung 9: Blotting-Sandwich (Quelle: Autor)

Die einzelnen Bestandteile des *Transfer Buffers* haben spezielle Funktionen. Tris hält den pH-Wert des Puffers konstant. SDS erhöht die Effizienz des Proteintransfers. Methanol verhindert das Anschwellen des Gels während der Übertragung und verbessert die Proteinbindung an die Membran. Glycin hilft das Anschwellen des Gels zu verhindern. (Sule, Rivera and Gomes, 2023)

Im Rahmen der durchgeführten Versuche wurde das sogenannte *Semidry-Blotting*-Verfahren angewendet, eine Variante des *Elektroblotting*. Hierbei wurden auf beiden Seiten des Sandwichs mit einem *Transfer Buffer* getränktes Filterpapier verwendet.

Direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Blotting durchgeführt, um die Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran zu übertragen. Hierfür wurden zunächst drei geeignete Behälter vorbereitet, von denen zwei mit *Transfer Buffer* gefüllt wurden. Die Filter wurden zurechtgeschnitten und in einem der Behälter gelegt. Das Gel wurde in den anderen Behälter überführt. Die PVDF-Membran wurde passend zurechtgeschnitten und nur für eine Minute in Methanol aktiviert. Während diesem Vorgang sollte die Membran nicht mit bloßen Händen berührt werden, sondern vorsichtig mit einer Laborpinzette bewegt werden.

Für das Blotting wurde das Trans-Blot Turbo Transfer System verwendet. Es besteht aus zwei Läden, der Lade A und B. Eine Lade wurde ausgewählt und der Deckel aufgemacht. Es wurde ein *Blotting-Sandwich* aus Filter, Membran, Gel und einem weiteren Filter zusammengestellt, um die Proteine vom Gel auf die Membran zu übertragen. Einmal positioniert, wird das Gel auf der Membran nicht mehr bewegt. Etwaige Luftblasen wurden mit einem Walzer entfernt und überschüssige Flüssigkeit

mit einer Küchenrolle vom Rand abgesaugt. Der Deckel der Lade wurde aufgesetzt und zugesperrt, in das Gerät eingeführt und insgesamt 40 Minuten laufen gelassen.

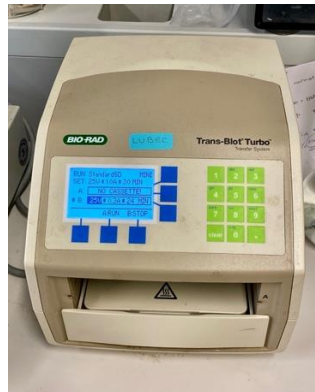


Abbildung 10: Blotting in Lade B (Quelle: Autor)

Nachdem das Blotting abgeschlossen war, wurde die Membran direkt in eine frisch hergestellte Blockierlösung gegeben und auf den Laborschüttler gestellt. Dadurch werden unbesetzte Bindungsstellen auf der Membran blockiert.

3.2.6 Inkubation

Die Inkubation mit primären und anschließend sekundären Antikörpern ist ein wichtiger Schritt, der es ermöglicht, spezifische Proteine auf der PVDF-Membran nachzuweisen. Der primäre Antikörper ist gegen das Zielantigen, einem Protein, gerichtet. Der sekundäre Antikörper erkennt spezifisch die konstante Region des primären Antikörpers, bindet daran und ermöglicht dessen Nachweis durch die Kopplung an einem Enzym. Die Detektion erfolgt schließlich durch ein Lichtsignal.

Zunächst wurde eine Pufferlösung für den primären Antikörper hergestellt, die Bovines Serumalbumin als Nährmedium, PBS als Puffer und Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Die Membran wurde mit der Antikörperlösung übergossen und 90 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler inkubiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Lösung zu gewährleisten.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper folgten Waschschrte, um überschüssige und ungebundene Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde dreimal mit TBST für jeweils fünf Minuten gewaschen.

Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem passenden sekundären Antikörper, der spezifisch an den primären Antikörper bindet. Auch hier wurde die Membran für 90 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden erneut die gleichen Waschschrirte durchgeführt, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran kann hinterher bis zu einer Stunde in TBS aufbewahrt werden.

Die sorgfältige Durchführung dieser Inkubations- und Waschschrirte ist von entscheidender Bedeutung für die Genauigkeit der Protein-Analyse. Durch die spezifische Bindung der Antikörper an die Zielproteine wird eine präzise Detektion ermöglicht, die wesentlich für die Interpretation der Ergebnisse ist.

3.2.7 Immundetektion

Die Bildgebung von Western Blot ist der letzte Schritt in der Proteinanalytik. Es ermöglicht die Zielproteine nachzuweisen und zu quantifizieren.

Der sekundäre Antikörper, der spezifisch an den primären Antikörper gebunden ist, ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert. Luminol hingegen ist ein chemolumineszentes Substrat des Enzyms. Das Reporterenzym katalysiert in Gegenwart von Peroxid die Oxidation von Luminol, wodurch Licht erzeugt wird. Die Chemolumineszenz kann schließlich gemessen werden. Die Banden der Zielproteine werden sichtbar gemacht, was eine Bildaufnahme im ChemiDoc ermöglicht.

Zu diesem Zweck wurde eine ECL-Lösung hergestellt. Es wurde insgesamt 2 ml pro Membran hergestellt, bestehend aus 1 ml *Clarity Western Peroxide Solution* und der gleichen Menge *Clarity Western Luminol/Enhancer Solution*. Das Röhrchen der Lösung wurde sofort mit einer Alufolie umhüllt.

Die ECL-Lösung wurde zuerst senkrecht und dann waagrecht zügig auf die Membran getropft. Die Membran wurde für zwei Minuten unter Lichtschutz inkubiert, um die Chemolumineszenz-Reaktion anzuregen. Die Membran wurde dann in die Mitte des ChemiDoc positioniert und schließlich ein Bild gemacht, um die Banden zu erfassen.

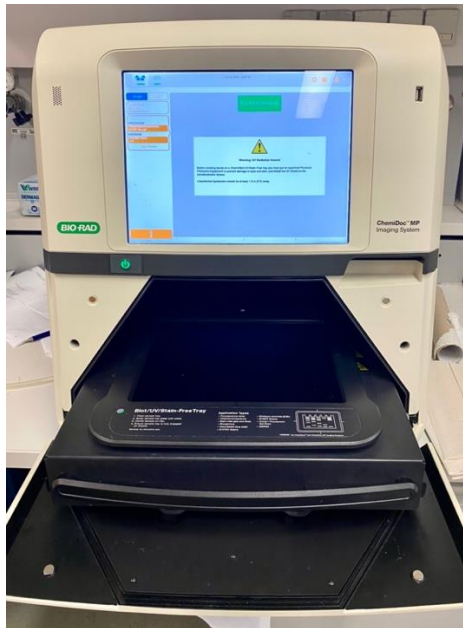


Abbildung 11: ChemiDoc mit offener Lade (Quelle: Autor)

Nach der Bildgebung wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen und in Blockierlösung auf den Schüttler platziert. So wurde die Membran für weitere Analysen vorbereitet.

3.3 Immunhistochemie

Immunhistochemie ist eine Technik in der Histologie, einem Bereich der klinischen Diagnostik und Forschung, die sich mit der Untersuchung von Gewebeproben befasst. Das Hauptziel der Immunhistochemie ist die Lokalisierung und Identifizierung von spezifischen Antigenen in Gewebeproben mithilfe von Antikörpern. (Magaki *et al.*, 2019)

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), eine Tyrosinkinase, spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellwachstums, der -differenzierung und der Überlebenssignale. In vielen Krebsarten ist die Expression von EGFR erhöht, was zu einer gesteigerten Zellproliferation und Tumorprogression führen kann. Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Tumorentwicklung hat EGFR große Aufmerksamkeit als potenzielles therapeutisches Ziel erhalten. Medikamente, die EGFR hemmen, wie zum Beispiel Tyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonale Antikörper, werden in der Krebstherapie eingesetzt, um die Signalkaskade zu blockieren, die das Wachstum von Krebszellen stimuliert. (Sabbah, Hajjo and Sweidan, 2020)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Immunhistochemie genutzt, um den EGFR in den Gewebeproben zu visualisieren und seine Bedeutung auf die zugrunde liegenden biologischen Prozesse zu diskutieren.

Nach der Fixierung in Formalin, um die Zellstruktur zu erhalten und die Katalyse zu stoppen, erfolgte die Einbettung in Paraffin, um dünne Schnitte herzustellen. Dieser Prozess wurde mithilfe von Biopsiekassetten durchgeführt, um die Gewebeproben zu präparieren.

Die Gewebeschnitte wurden im Gefrierschrank gekühlt und anschließend mit einem Mikrotom präpariert, wobei eine Dicke von 5 µm erreicht wurde. Die weiteren Schritte beinhalteten die Überführung in ein Ultraschallbad bei 40 Grad Celsius, die Positionierung auf haftungsbehandelten Objektträgern (Adhäsion auf mikroskopischen Objektträgern: positiv geladene Oberfläche) und das Trocknen der frisch geschnittenen Paraffinschnitte über Nacht.



Abbildung 12: Ultraschallbad und Mikrotom (Quelle: Autor)

Um das Paraffin zu schmelzen, platziert man die Objektträger für eine halbe Stunde im Inkubationsschrank bei einer Temperatur von 50 Grad Celsius. Nach der Entparaffinierung mittels Xylol 1 und 2 für jeweils 30 Minuten folgte die Rehydratation in absteigenden Ethanol-Konzentrationen (100%, 90%, 80%, 70%) und abschließend in destilliertem Wasser. Ein Waschschrift in PBS komplettierte diesen Vorgang.

Die nachfolgenden Schritte beinhalten das Einkreisen des Gewebes mit dem *Super PAP Pen Liquid Blocker*, um einen wasserabweisenden Kreis auf einen Objektträger

um die Probe zu zeichnen und die Lösung über dem Gewebe zu halten. Eine Inkubation in 1% Wasserstoffperoxid-Lösung erfolgte, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurde eine Blockierlösung hergestellt und für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Im Kühlraum erfolgte über einen Zeitraum von 48 Stunden die Inkubation mit dem primären Antikörper, der spezifisch an das Zielantigen bindet. Nach mehrmaligem Waschen der Schnitte, um überschüssige Antikörperreste und unspezifischen Bindungen zu entfernen, wurde der sekundäre Antikörper, der an den primären Antikörper bindet, für zwei Stunden bei Raumtemperatur aufgetragen.



Abbildung 13: Proben in "wet chamber" (Quelle: Autor)

Die Signalentwicklung erfolgte durch Auftragen einer so genannten „*working solution*“ unter dem Mikroskop, gefolgt von einer Beobachtungszeit von ein bis drei Minuten. Die Farbreaktion wurde gestoppt, indem die Schnitte in Wasser eingetaucht wurden. Die „*working solution*“ dient dazu, das sichtbare Signal zu erzeugen.

Die Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*, Reporterenzym zur Signalverstärkung) katalysiert die Reaktion von DAB mit Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Tris. DAB oxidiert und wird zu einem braunen Farbstoff. Dieses Produkt färbt die Zielstrukturen, die zuvor mit einem Enzym-gekoppelten Antikörper markiert wurden.

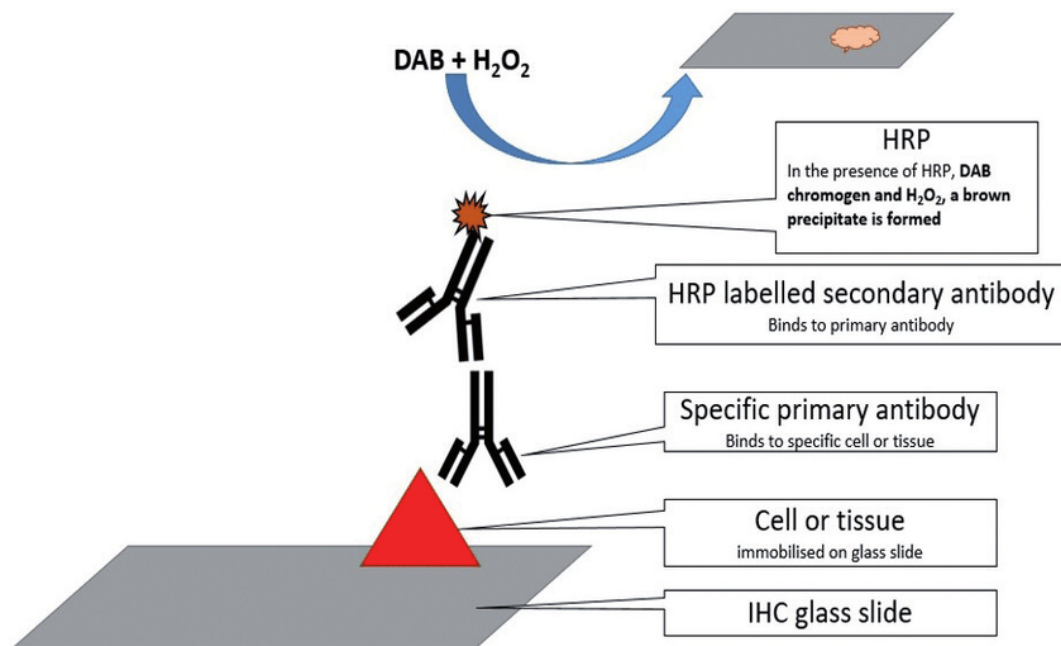


Abbildung 14: Das Prinzip der Immunhistochemie (Ella-Tongwiis et al., 2021)

Durch die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin wird eine zart-blaue Färbung erreicht. Nach der Dehydratation in Ethanol und Xylol erfolgte das „Covering“ durch Tropfen eines „*mounting mediums*“ und das Versiegeln der Schnitte mit einem Deckglas. Über Nacht wurden die Proben waagrecht getrocknet, bevor die Visualisierung der Zielproteine im Gewebe unter dem Mikroskop durchgeführt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Proteinexpression

Im Zuge dieser Masterarbeit wurde die Expression spezifischer Proteine im gesunden Hypophysengewebe (C = Kontrolle), im unbehandelten Hypophysenadenom (PC = Positivkontrolle) sowie in Hypophysenadenomen, die mit verschiedenen Inhibitoren behandelt wurden, untersucht. Die behandelten Gruppen umfassten Cathepsin-L-Hemmer (L), Cathepsin-B-Hemmer (B), Cathepsin-D-Hemmer (D) und Metalloprotease-Hemmer (Metallo).

Ladekontrollen (*loading control*) wurden mit dem Antikörper GAPDH durchgeführt. Der Western Blot erfordert eine Ladekontrolle, um eine gleichmäßige Beladung zu überprüfen und mögliche Ladefehler zu korrigieren. Hierbei werden die Daten auf ein Referenzprotein, sogenanntes "*Housekeeping-Protein*", als interne Referenz normalisiert. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ist eines der häufig verwendeten "*Housekeeping-Proteine*". Die Durchführung von Ladekontrollen ist für die Interpretation von Western Blots von besonderer Bedeutung. Hierbei sollten die Signale der Ladekontrollen zwischen den verschiedenen Gruppen nicht variieren. (Vigelsø *et al.*, 2015; Moritz, 2017)

Die Datenanalyse erfolgte mittels *GraphPad Prism*. Es wurde eine *Ordinary one-way ANOVA* mit *multiple comparisons* durchgeführt. Dieses statistische Analyseverfahren eignet sich für den Vergleich von drei oder mehr Gruppen, die durch einen Faktor definiert sind. Die Expression der vier behandelten Gruppen und der Negativkontrolle wurde mit der Expression der Positivkontrolle verglichen.

Tabelle 13: Statistische Signifikanz

<i>Symbol</i>	<i>Bedeutung</i>
ns	$p > 0.05$
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$
***	$p \leq 0.001$
****	$p \leq 0.0001$

4.1.1 VEGF

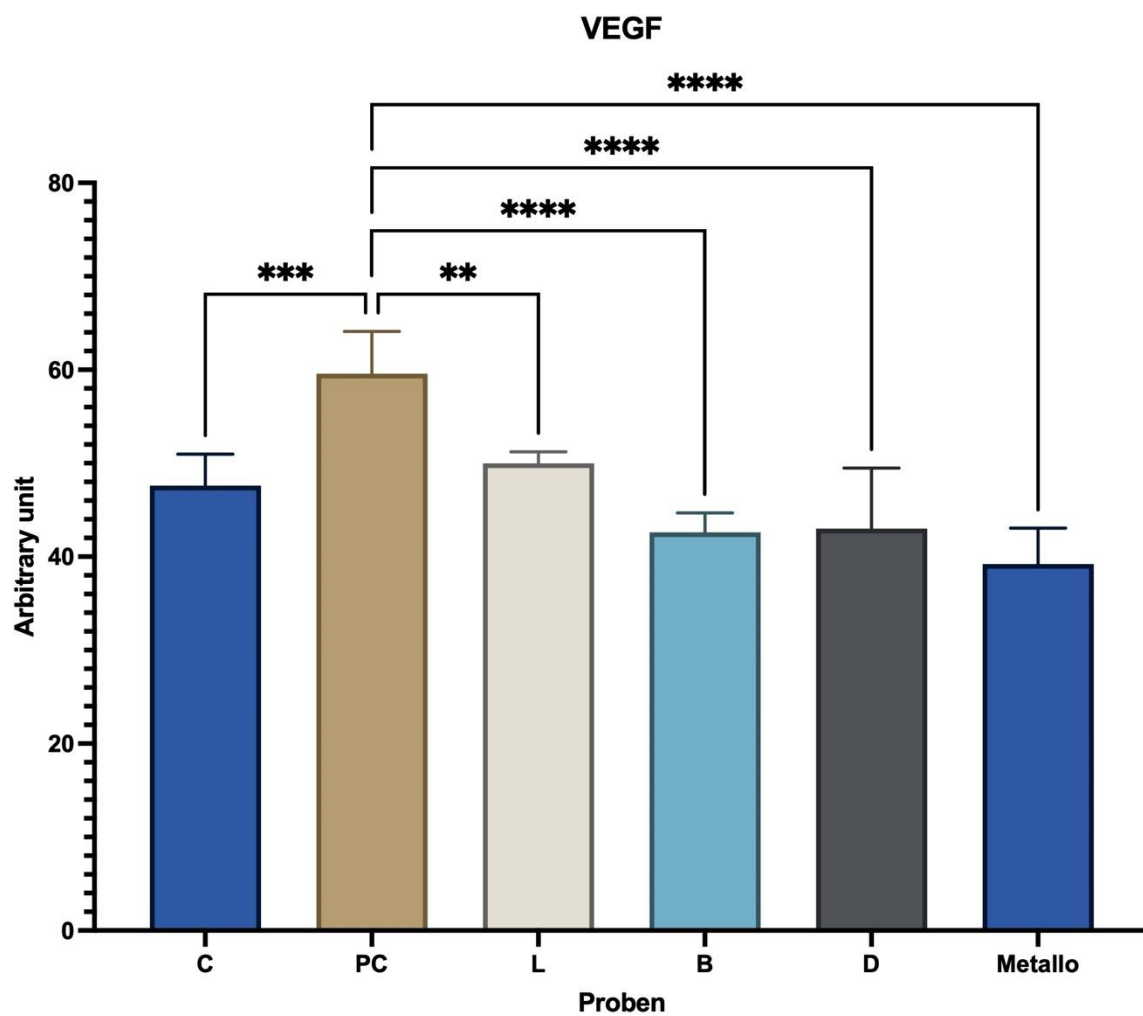
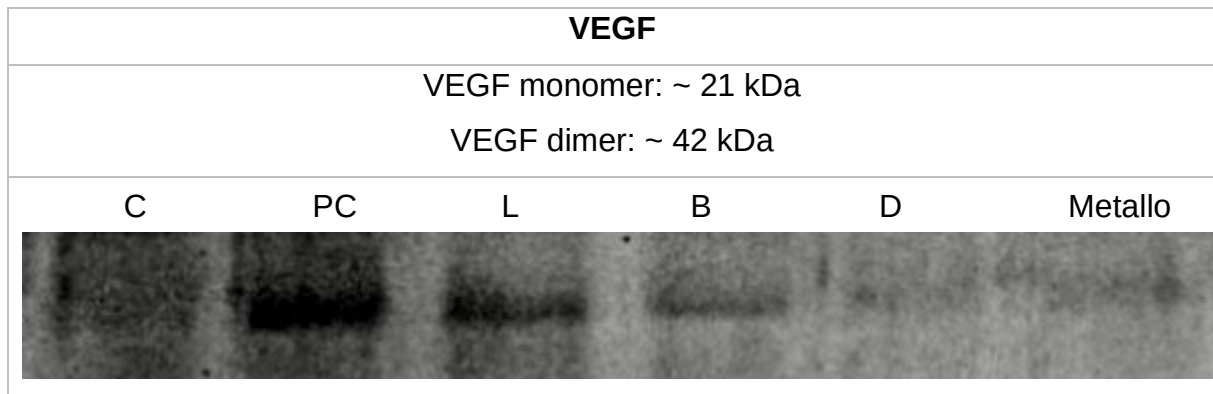


Abbildung 15: Expression von VEGF (Quelle: Autor)

4.1.2 Phospho-EGFR

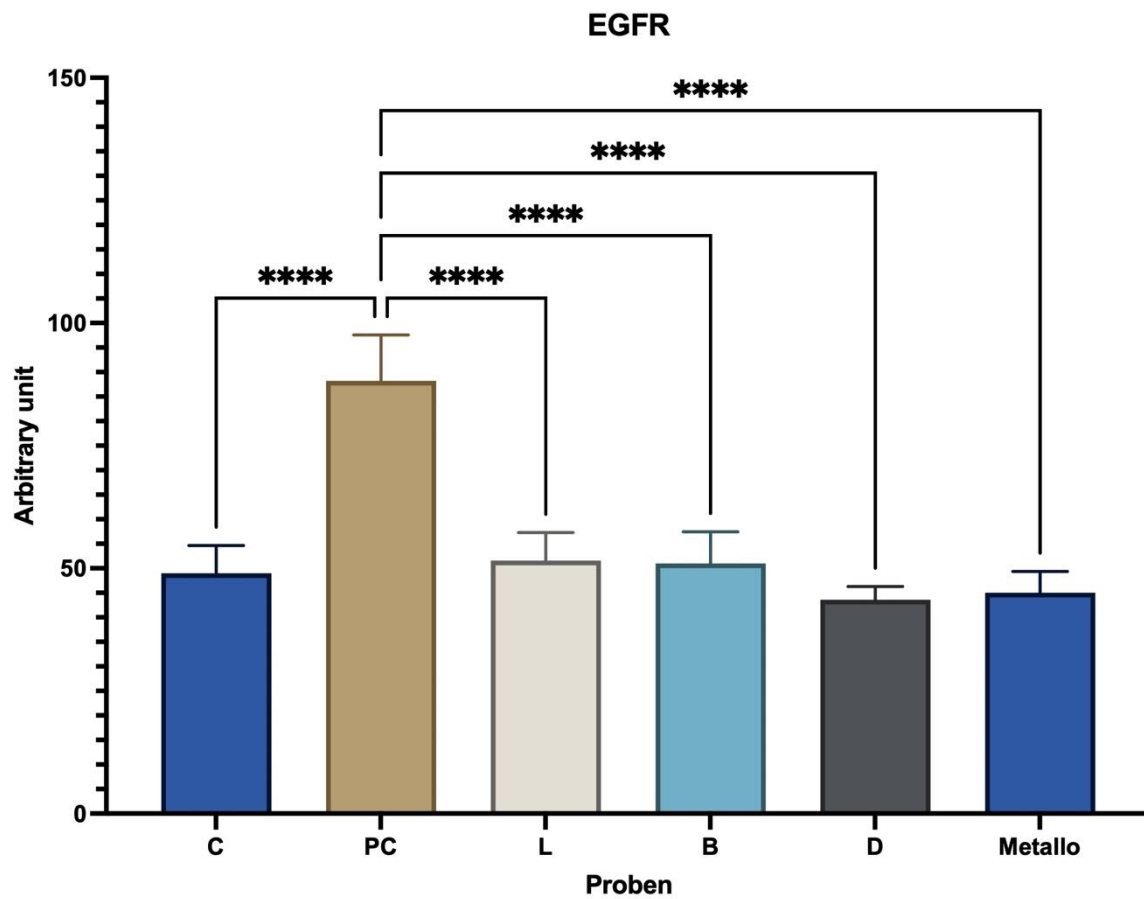
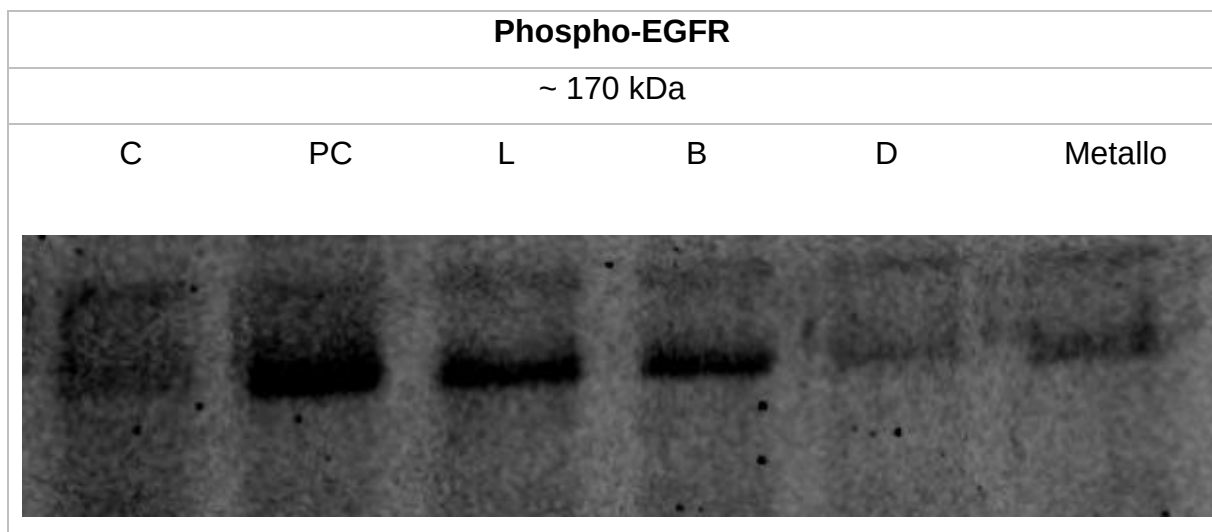


Abbildung 16: Expression von EGFR (Quelle: Autor)

4.1.3 TGF- α

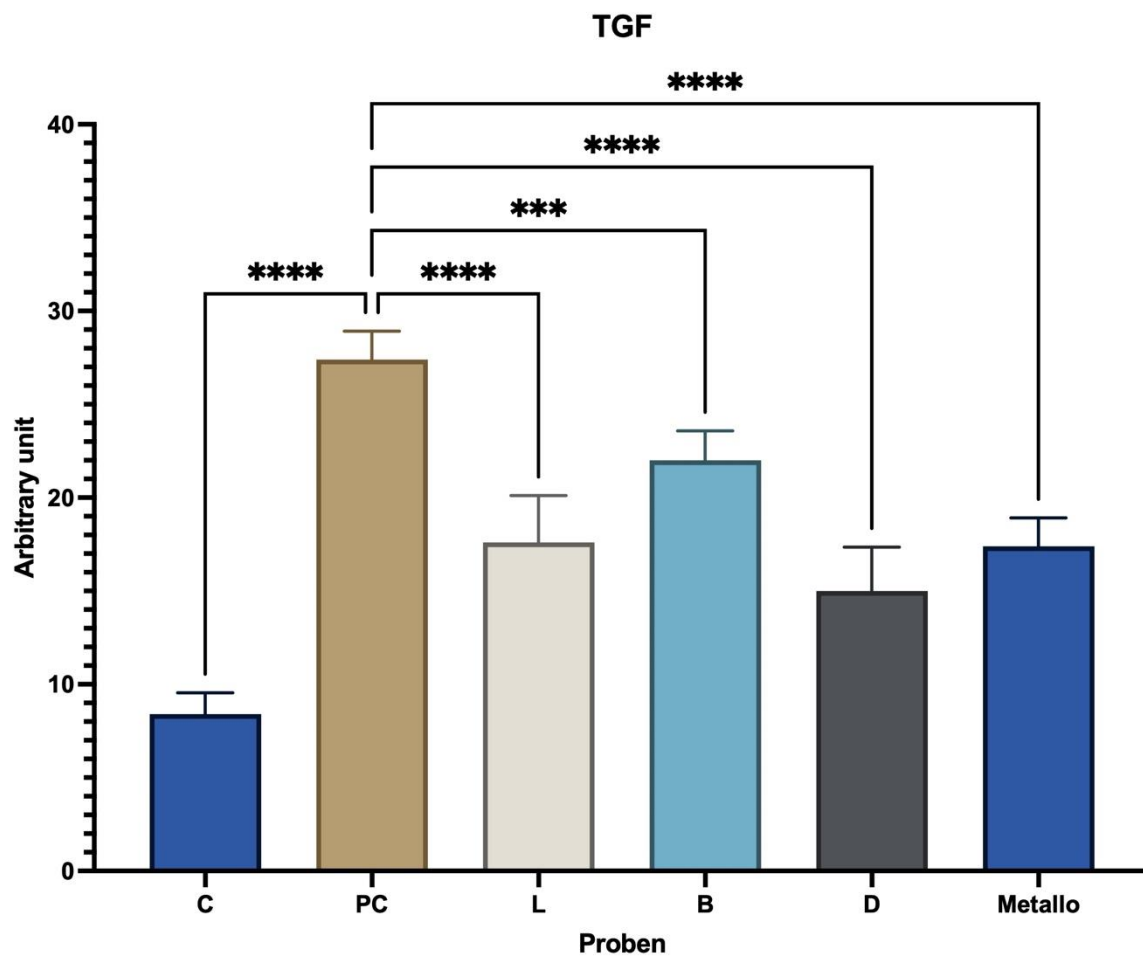
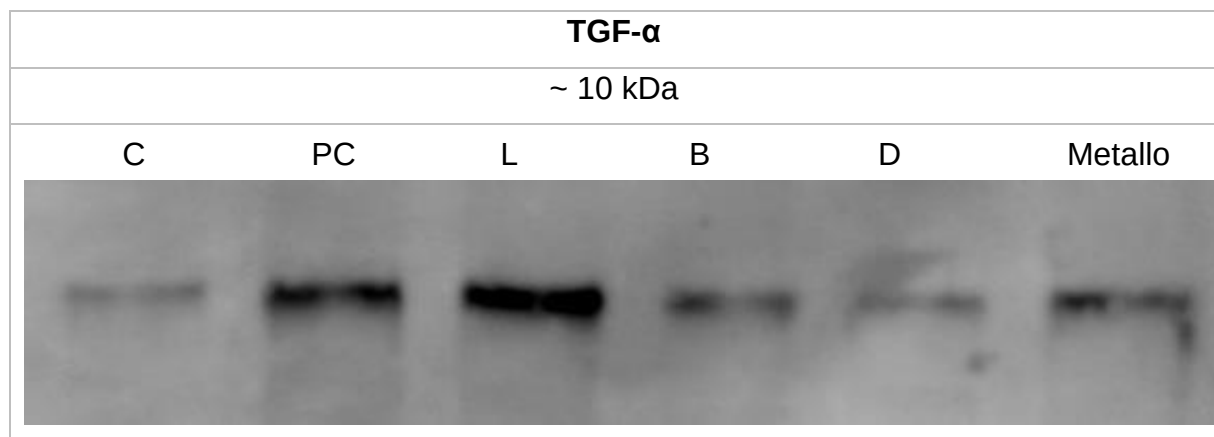


Abbildung 17: Expression von TGF- α (Quelle: Autor)

4.1.4 P53

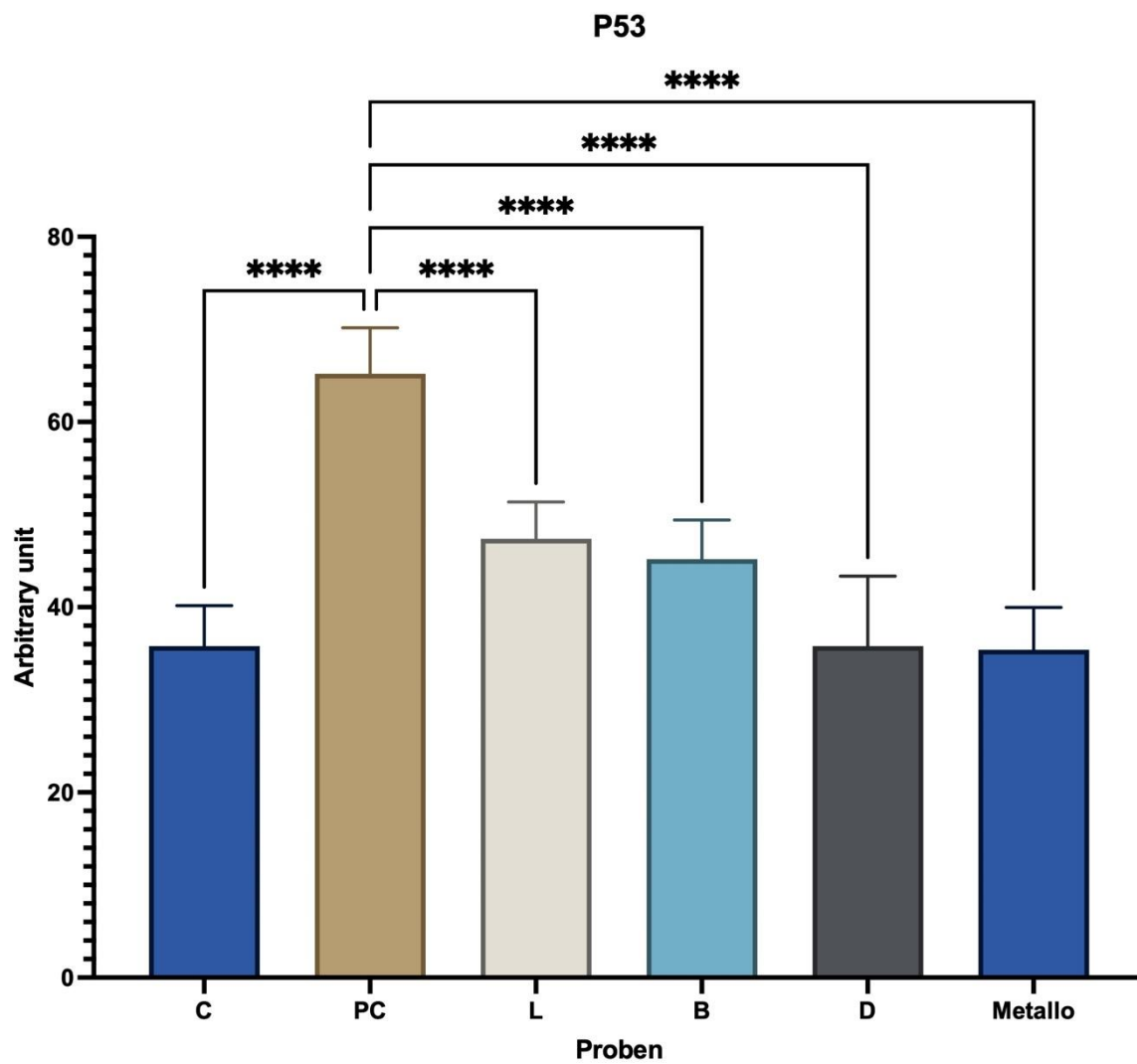
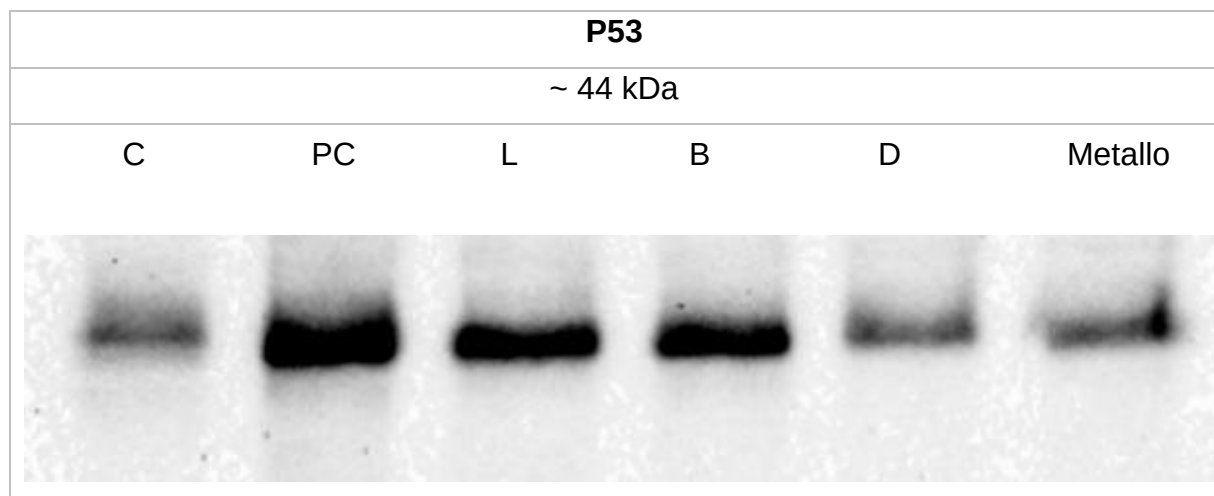


Abbildung 18: Expression von P53 (Quelle: Autor)

4.1.5 BAX

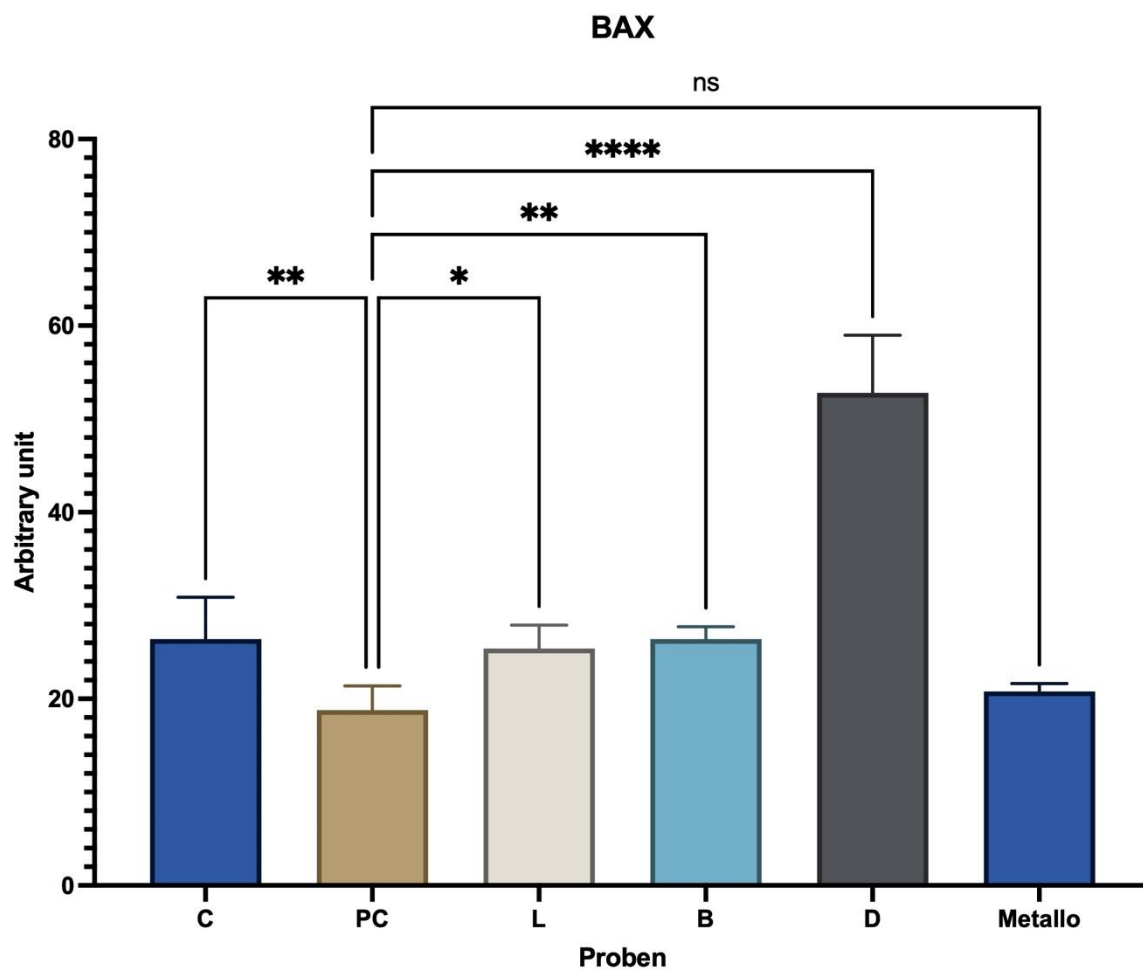
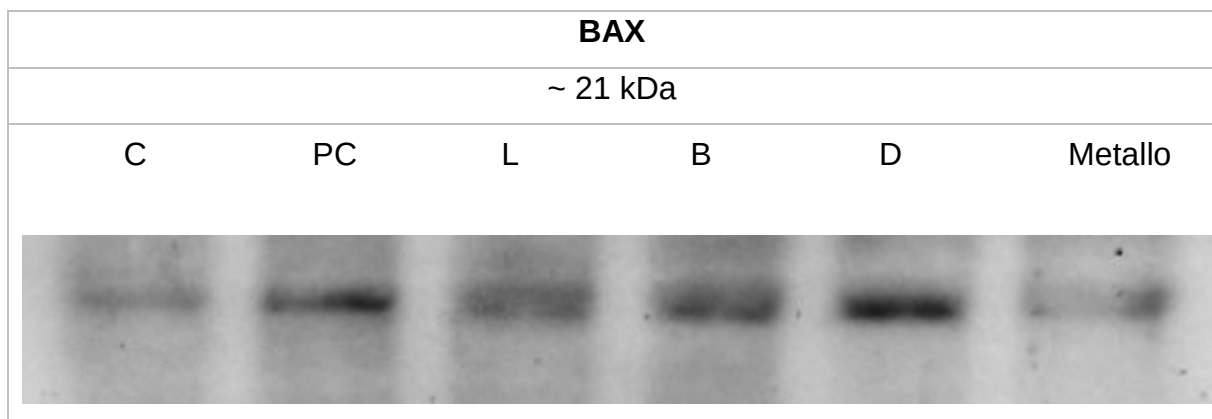


Abbildung 19: Expression von BAX (Quelle: Autor)

4.1.6 BCL-2

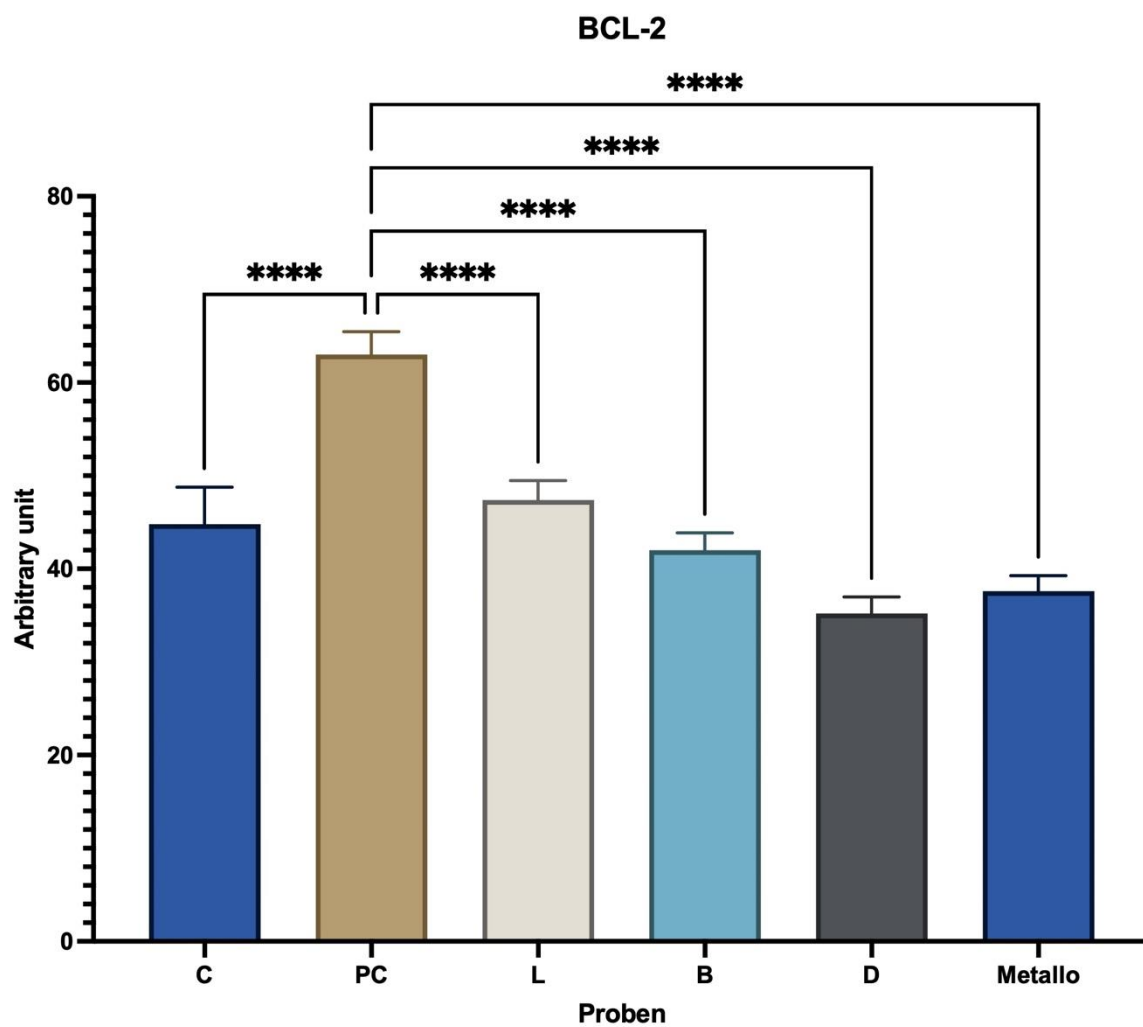
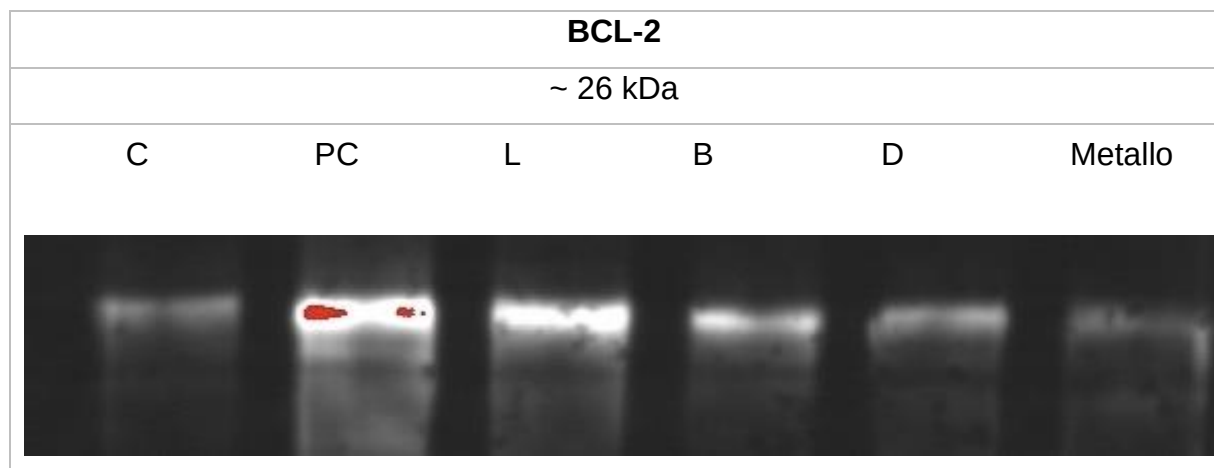


Abbildung 20: Expression von BCL-2 (Quelle: Autor)

4.1.7 Caspase 7

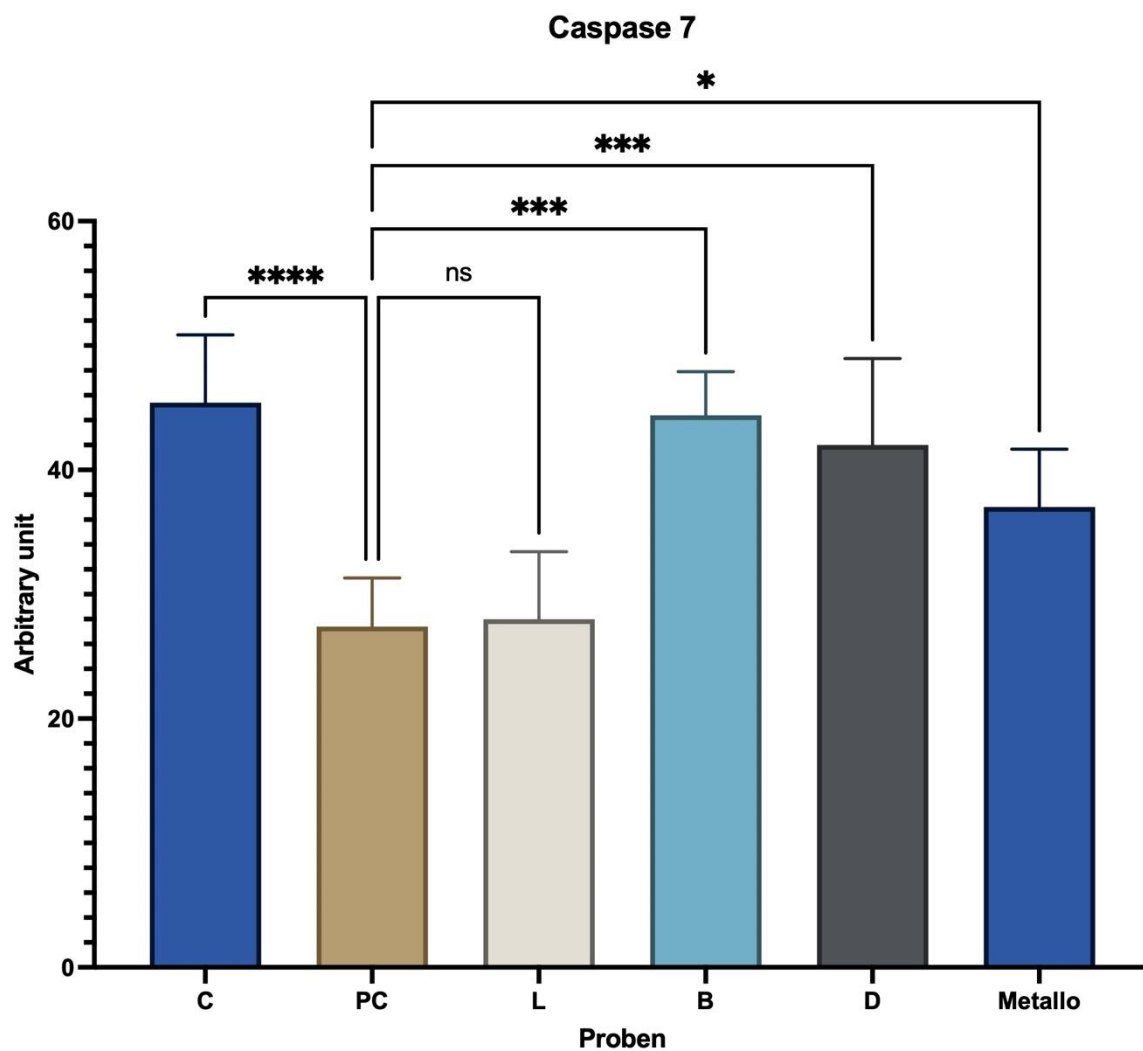
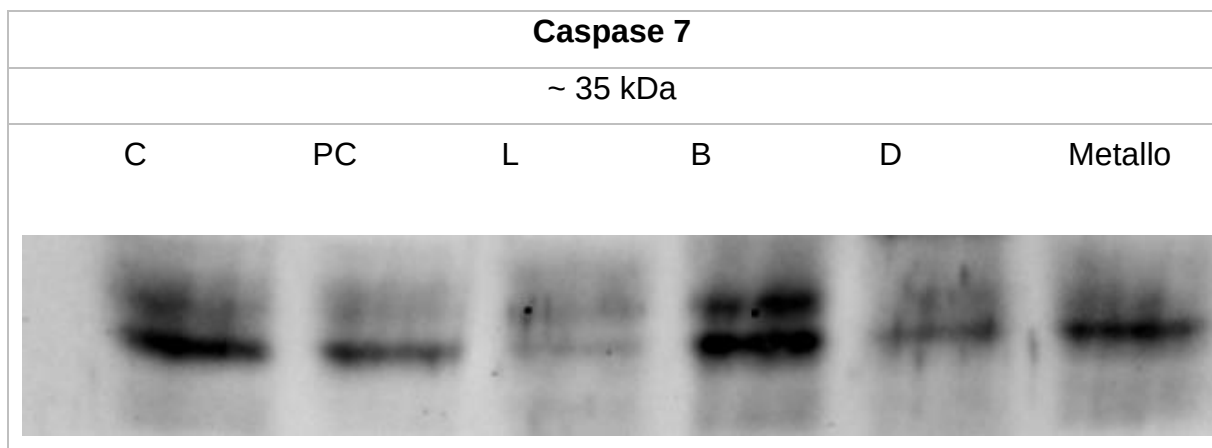


Abbildung 21: Expression von Caspase 7 (Quelle: Autor)

4.1.8 PI3K-p110

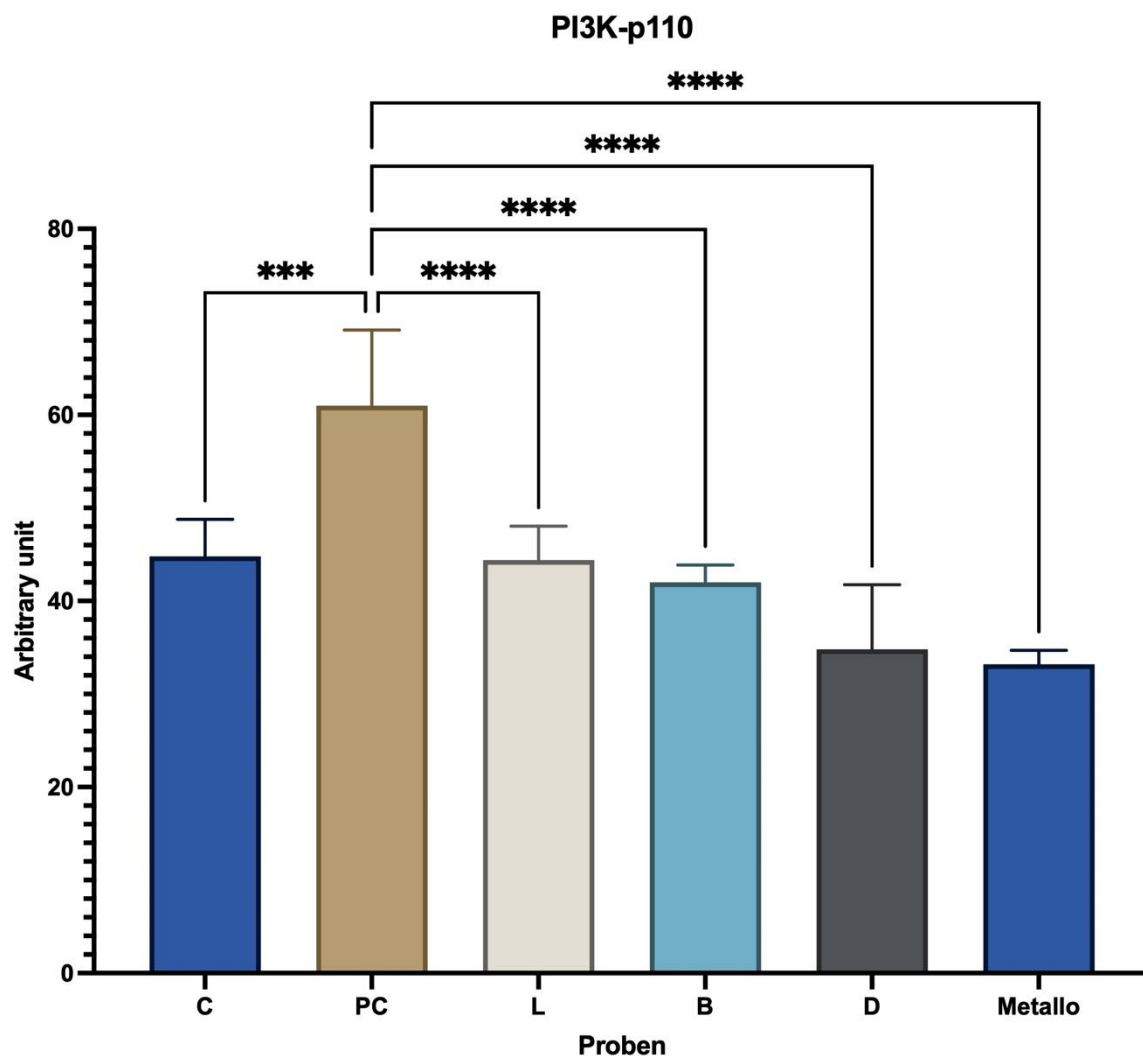
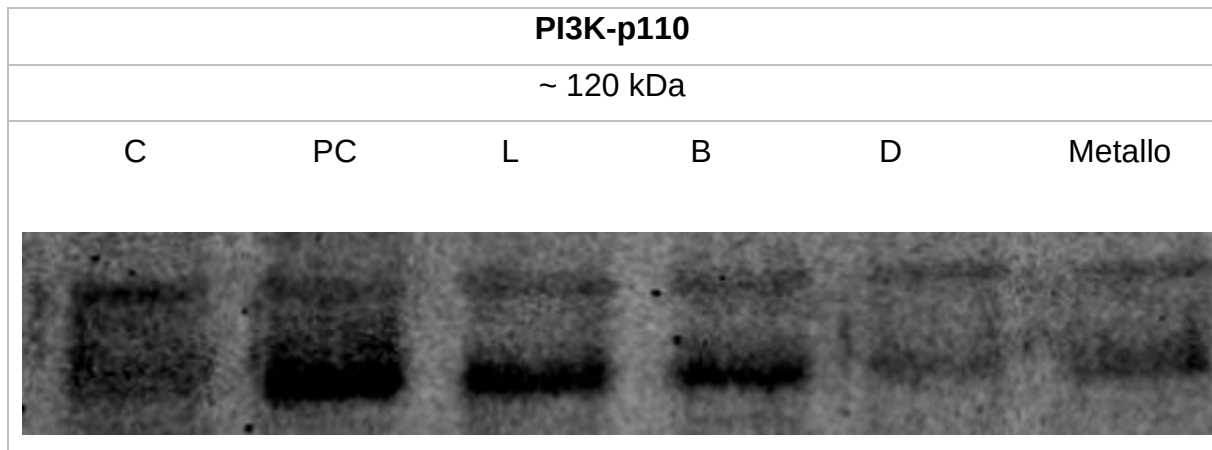


Abbildung 22: Expression PI3K-p110 (Quelle: Autor)

4.1.9 GAPDH

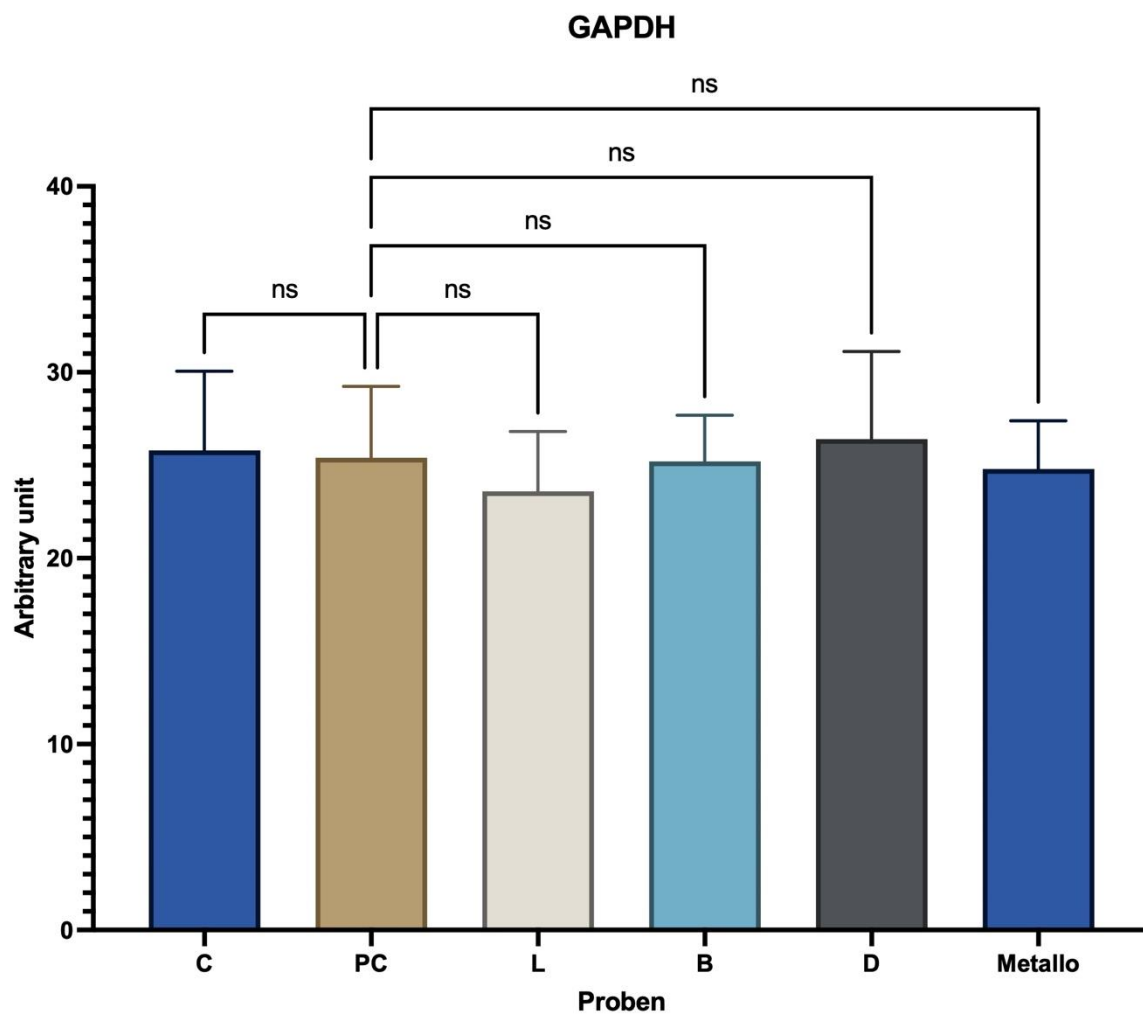
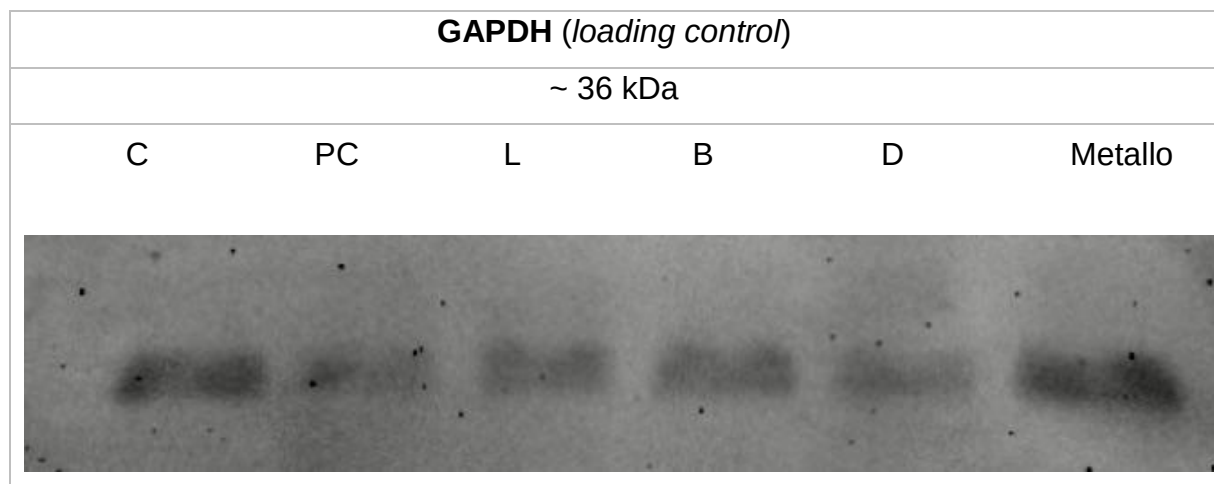


Abbildung 23: Expression von GAPDH (Quelle: Autor)

4.2 Immunhistochemie

Im Rahmen dieser immunhistochemischen Methode wurde in der Gruppe 1, der Negativkontrollgruppe ohne Krebs, ein schwaches Signal beobachtet, während in Gruppe 2, der Positivkontrollgruppe mit Krebs und ohne Behandlung, ein starkes Signal festgestellt. Diese Beobachtung bestätigt die Überexpression von EGFR in Tumorgewebe.

Weiters wurde die Analyse durchgeführt, um die Effekte verschiedener Cathepsin- und Metalloprotease-Hemmern auf die Tumorphiliferation zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Gruppen 3 und 4 moderate Signale aufwiesen, was auf eine gewisse Hemmung der Tumoraktivität hindeutet. Interessanterweise wiesen Gruppe 5 und 6 schwächere Signale auf, was auf eine deutlich verringerte Tumorlast und eine reduzierte Expression von EGFR hinweist. Dies deutet möglicherweise auf eine erfolgreiche Inhibition der Tumorzellproliferation hin. Diese Befunde lassen vermuten, dass die Behandlungen in Gruppe 5 und 6 potenziell wirksamer sein könnten als die in den Gruppen 3 und 4 verwendeten Hemmer.

Dies legt nahe, dass die Behandlung mit Cathepsin- und Metalloprotease-Hemmern effektiv zur Hemmung der Tumorphiliferation beitragen könnte. Darüber hinaus ist EGFR als therapeutisches Ziel äußerst vielversprechend. Es laufen Studien zur Ermittlung des Nutzens der zielgerichteten EGFR-Therapie für die Krebstherapie. (HAWES *et al.*, 2009)

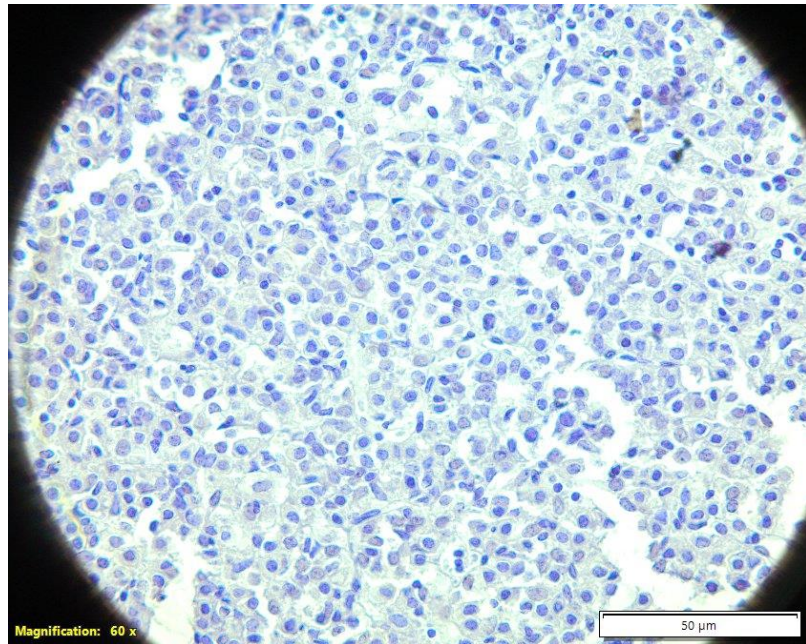


Abbildung 24: Gruppe 1, Negativkontrolle (Quelle: Autor)

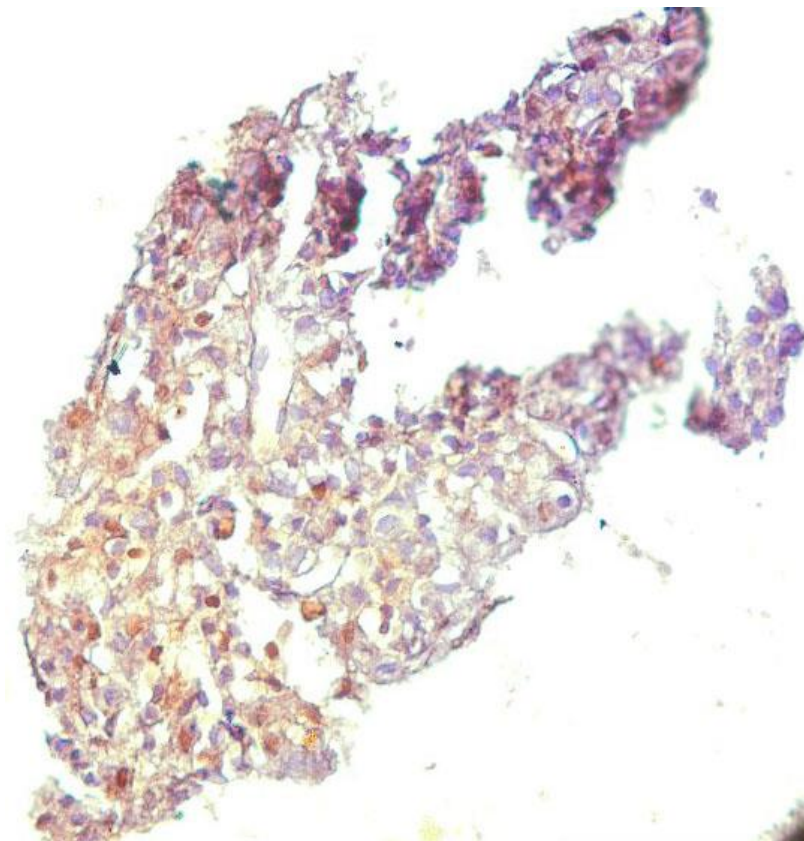


Abbildung 25: Gruppe 2, Positivkontrolle (Quelle: Autor)

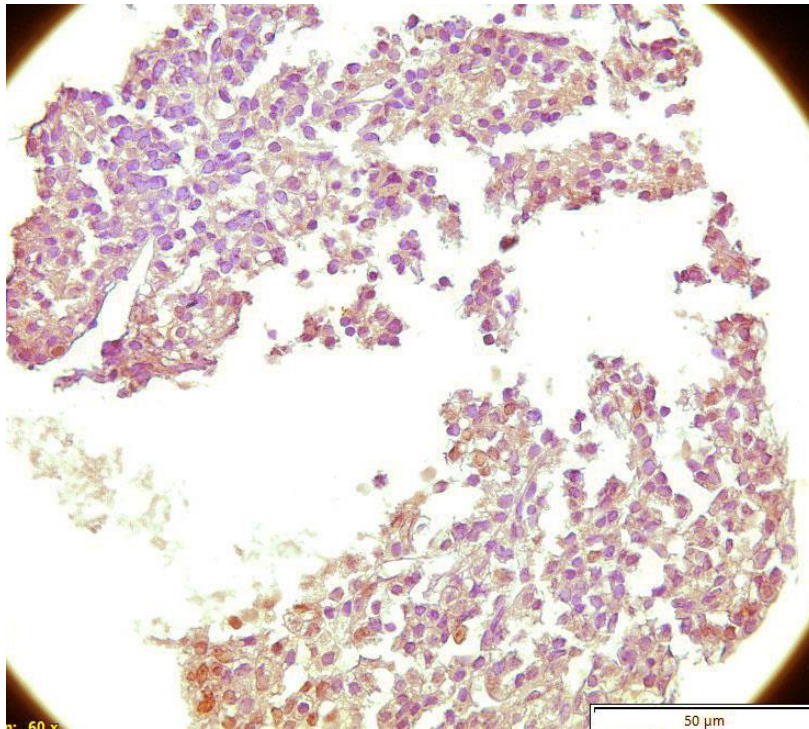


Abbildung 26: Gruppe 3, Behandlung mit Cathepsin-L-Hemmer (Quelle: Autor)

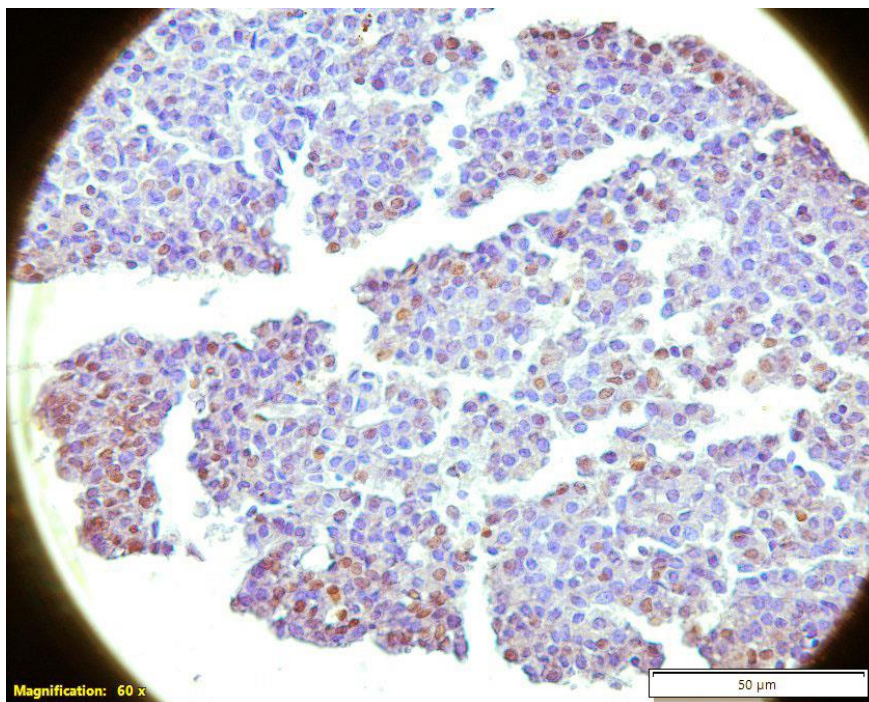


Abbildung 27: Gruppe 4, Behandlung mit Cathepsin-B-Hemmer (Quelle: Autor)

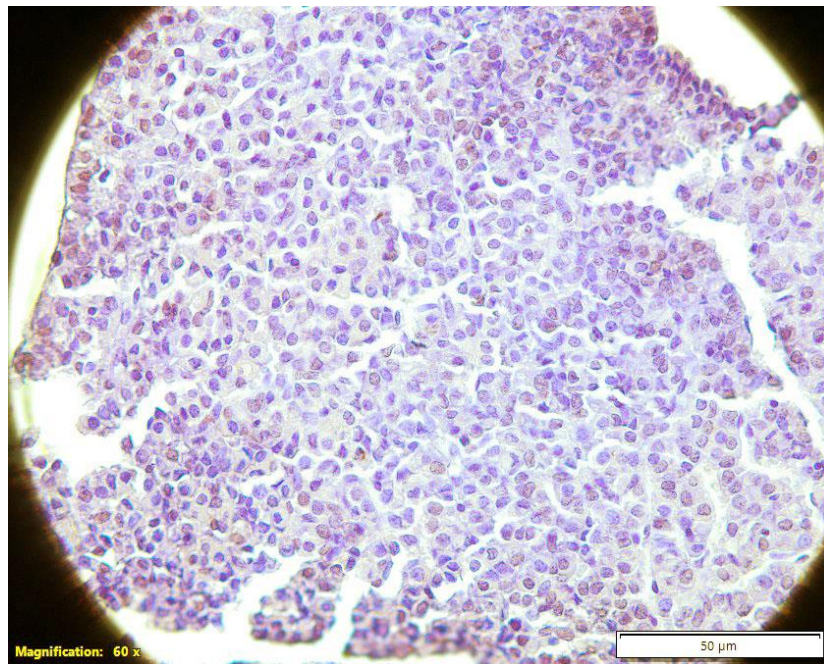


Abbildung 28: Gruppe 5, Behandlung mit Metalloprotease-Hemmer (Quelle: Autor)

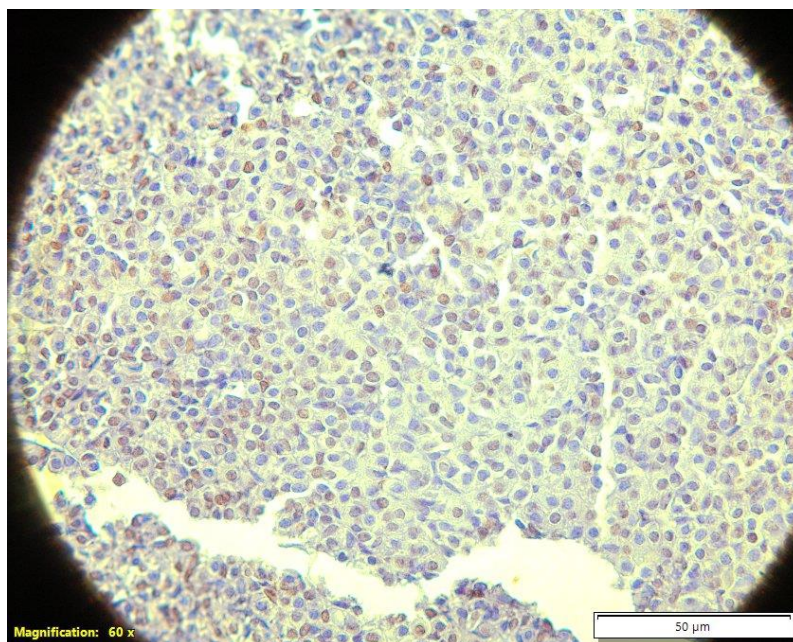


Abbildung 29: Gruppe 6, Behandlung mit Cathepsin-D-Hemmer (Quelle: Autor)

5 Diskussion

Die Masterarbeit hatte das Ziel, die Effekte verschiedener Cathepsin- und Metalloprotease-Hemmern auf die Aktivität verschiedener Proteine im Hypophysengewebe und in Hypophysenadenomen zu untersuchen. Denn die Forschung konzentriert sich auf neue Behandlungsmethoden für Krebs.

Die Arbeit konzentriert sich darauf, experimentell zu ermitteln, wie stark diese Proteine in unterschiedlichen behandelten Hypophysenadenomen exprimiert werden, ob sie also je nach ihren Mechanismen hochreguliert oder in ihrer Expression unterdrückt sind.

Dazu wurde die Methode des Western Blot angewendet. Die Versuche wurden mit sechs Gruppen durchgeführt. Die Gruppen bildeten eine Positivkontrolle (unbehandelten Gruppe mit Krebs), eine Negativkontrolle und vier Behandlungsgruppen, die mit verschiedenen Inhibitoren therapiert wurden. Hierbei wurden alle Gruppen statistisch mit der Positivkontrolle verglichen und anschließend interpretiert.

VEGF, der für die Angiogenese, Tumorwachstum und Metastasierung wichtig ist, zeigte in der Positivkontrolle eine erhöhte Expression, während er in den B-, D- und Metallogruppen erniedrigt war.

Der Wachstumsfaktor und -rezeptor, EGFR und TGF-alpha, spielen eine Rolle bei der Entwicklung und Progression von Krebs. Sie hatten in der Positivkontrolle ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression, waren jedoch in allen anderen Gruppen erniedrigt.

P53, ein Tumorsuppressor, zeigte in der Positivkontrolle eine signifikant erhöhte Expression, während er in allen anderen Gruppen erniedrigt war, was die Effektivität der Inhibitoren in der Auslösung der Apoptose unterstreicht.

BCL-2, ein anti-apoptotisches Protein, war in der Tumorgruppe signifikant erhöht, während seine Expression in allen anderen Gruppen erniedrigt war.

Das pro-apoptotische Protein BAX, das die Tumorgenese unterdrückt und die Apoptose stimuliert, zeigte in der D-Gruppe eine signifikant erhöhte Expression, was auf eine beschleunigte Apoptose hinweist. In der Positivkontrolle war die Expression niedriger als in der Negativkontrolle.

Caspase 7, eine Effektorcaspase, die die Apoptose steuert, war in der Positivkontrolle und der L-Gruppe stark erniedrigt. Dies deutet darauf hin, dass die Apoptose unterdrückt wird. In der Negativkontrolle, den B- und D-Gruppen war die Expression erhöht, während bei der Metallo-Gruppe kein Unterschied festgestellt wurde.

Das Protein PI3K-p110 ist bei Krebs überaktiviert, so steigt die Zellproliferation und die Apoptose wird unterdrückt. Es zeigte in der Positivkontrolle eine erhöhte Expression, während es in allen anderen Gruppen erniedrigt war.

Abschließend wurde eine Immunhistochemie mit EGFR durchgeführt, um die Ergebnisse des Western Blot zu fundieren. Dabei zeigte das gesunde Gewebe ein schwaches Signal, während in der unbehandelten Krebsgruppe ein starkes Signal zu beobachten war, was auf eine Überexpression des EGFR im Hypophysenadenom deutet. Die Metallo- und D-Gruppe wiesen eine reduzierte EGFR-Expression auf. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse des Western Blot und zeigen eine erfolgreiche Hemmung des Tumorwachstums durch die Inhibitoren.

Im Zuge dieser Arbeit konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Behandlung von Hypophysenadenomen mit Cathepsin-Inhibitoren die Expression bestimmter Proteine hoch- oder herunterreguliert. Dies stellt einen wichtigen Ansatz für die Forschung und Entwicklung neuer Arzneistoffe zur Behandlung des Hypophysenadenoms dar.

6 Literaturverzeichnis

Arrowsmith, S. and Wray, S. (2014) 'Oxytocin: its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium', *Journal of Neuroendocrinology*, 26(6), pp. 356–369. Available at: <https://doi.org/10.1111/jne.12154>.

Asa, S.L. et al. (2022) 'Overview of the 2022 WHO Classification of Pituitary Tumors', *Endocrine Pathology*, 33(1), pp. 6–26. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09703-7>.

Brentnall, M. et al. (2013) 'Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis', *BMC cell biology*, 14, p. 32. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>.

Cai, W.-Q. et al. (2020) 'The Latest Battles Between EGFR Monoclonal Antibodies and Resistant Tumor Cells', *Frontiers in Oncology*, 10, p. 1249. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01249>.

Ciardiello, F. et al. (2006) 'Interaction between the epidermal growth factor receptor (EGFR) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways: a rational approach for multi-target anticancer therapy', *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 17 Suppl 7, pp. vii109-114. Available at: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl962>.

De Pasquale, V., Moles, A. and Pavone, L.M. (2020) 'Cathepsins in the Pathophysiology of Mucopolysaccharidoses: New Perspectives for Therapy', *Cells*, 9(4), p. 979. Available at: <https://doi.org/10.3390/cells9040979>.

Drullinsky, P.R. and Hurvitz, S.A. (2020) 'Mechanistic basis for PI3K inhibitor antitumor activity and adverse reactions in advanced breast cancer', *Breast Cancer Research and Treatment*, 181(2), pp. 233–248. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05618-1>.

Ella-Tongwiis, P. et al. (2021) 'Optimisation and validation of immunohistochemistry

protocols for cancer research', *Histology and Histopathology*, 36(4), pp. 415–424. Available at: <https://doi.org/10.14670/HH-18-317>.

Ferrara, N. and Adamis, A.P. (2016) 'Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy', *Nature Reviews. Drug Discovery*, 15(6), pp. 385–403. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.17>.

Guerra, V.A., DiNardo, C. and Konopleva, M. (2019) 'Venetoclax-based therapies for acute myeloid leukemia', *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 32(2), pp. 145–153. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.beha.2019.05.008>.

HAWES, D. *et al.* (2009) 'Immunohistochemistry', *Modern Surgical Pathology*, pp. 48–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3966-2.00016-3>.

Ilie, M.-D. *et al.* (2023) 'Therapeutic targeting of the pituitary tumor microenvironment', *Pharmacology & Therapeutics*, 250, p. 108506. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108506>.

Khaket, T.P., Kwon, T.K. and Kang, S.C. (2019) 'Cathepsins: Potent regulators in carcinogenesis', *Pharmacology & Therapeutics*, 198, pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.02.003>.

Kleine, B. and Rossmannith, W. (2021) *Hormone und Hormonsystem - Lehrbuch der Endokrinologie*. Berlin, Heidelberg: Springer. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58502-3>.

Kontomanolis, E.N. *et al.* (2020) 'Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review', *Anticancer Research*, 40(11), pp. 6009–6015. Available at: <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>.

Magaki, S. *et al.* (2019) 'An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, pp. 289–298. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25.

Marrero-Rodríguez, D. *et al.* (2023) 'The hallmarks of cancer... in pituitary tumors?',

Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders, 24(2), pp. 177–190. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11154-022-09777-y>.

Mishra, M., Tiwari, S. and Gomes, A.V. (2017) 'Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques', *Expert review of proteomics*, 14(11), pp. 1037–1053. Available at: <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>.

Molitch, M.E. (2017) 'Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review', *JAMA*, 317(5), pp. 516–524. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2016.19699>.

Moon, J. *et al.* (2023) 'DNA Damage and Its Role in Cancer Therapeutics', *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), p. 4741. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms24054741>.

Moritz, C.P. (2017) 'Tubulin or Not Tubulin: Heading Toward Total Protein Staining as Loading Control in Western Blots', *Proteomics*, 17(20). Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.201600189>.

Mouchtouris, N. *et al.* (2022) 'A review of multiomics platforms in pituitary adenoma pathogenesis', *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 27(3), p. 77. Available at: <https://doi.org/10.31083/j.fbl2703077>.

Nakanishi, H. (2020) 'Cathepsin regulation on microglial function', *Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, 1868(9), p. 140465. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140465>.

Noorolyai, S. *et al.* (2019) 'The relation between PI3K/AKT signalling pathway and cancer', *Gene*, 698, pp. 120–128. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.076>.

Nowakowski, A.B., Wobig, W.J. and Petering, D.H. (2014) 'Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions', *Metallomics : integrated biometal science*, 6(5), pp. 1068–1078. Available at: <https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>.

Patel, S. *et al.* (2018) 'Cathepsins: Proteases that are vital for survival but can also be fatal', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, pp. 526–532. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.148>.

Patel, S.A. *et al.* (2023) 'Molecular Mechanisms and Future Implications of VEGF/VEGFR in Cancer Therapy', *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 29(1), pp. 30–39. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-22-1366>.

Prencipe, N. *et al.* (2023) 'Isolated anterior pituitary dysfunction in adulthood', *Frontiers in Endocrinology*, 14, p. 1100007. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1100007>.

Ramadan, M.A. *et al.* (2019) 'Expression of P53, BAX, and BCL-2 in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma cells after tea tree oil treatment in vitro', *Cytotechnology*, 71(1), pp. 461–473. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0287-4>.

Reincke, M. *et al.* (2015) 'Mutations in the deubiquitinase gene USP8 cause Cushing's disease', *Nature Genetics*, 47(1), pp. 31–38. Available at: <https://doi.org/10.1038/ng.3166>.

Rose, M. *et al.* (2020) 'PARP Inhibitors: Clinical Relevance, Mechanisms of Action and Tumor Resistance', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, p. 564601. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.564601>.

Sabbah, D.A., Hajjo, R. and Sweidan, K. (2020) 'Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20(10), pp. 815–834. Available at: <https://doi.org/10.2174/1568026620666200303123102>.

Sigismund, S., Avanzato, D. and Lanzetti, L. (2018) 'Emerging functions of the EGFR in cancer', *Molecular Oncology*, 12(1), pp. 3–20. Available at: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>.

Strojnink, T., Lah, T.T. and Zidanik, B. (2005) 'Immunohistochemical staining of cathepsins B, L and stefin A in human hypophysis and pituitary adenomas', *Anticancer Research*, 25(1B), pp. 587–594.

Sule, R., Rivera, G. and Gomes, A. (2023) 'Western blotting (immunoblotting): history, theory, uses, protocol and problems', *BioTechniques*, 75. Available at: <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>.

Tatsi, C. and Stratakis, C.A. (2019) 'The Genetics of Pituitary Adenomas', *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), p. 30. Available at: <https://doi.org/10.3390/jcm9010030>.
Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration (no date) *Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration*. Available at: <https://www.teresewinslow.com> (Accessed: 16 April 2024).

Thai, A.A. et al. (2021) 'Lung cancer', *Lancet (London, England)*, 398(10299), pp. 535–554. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3).

Tzenaki, N. and Papakonstanti, E.A. (2013) 'p110 δ PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer', *Frontiers in Oncology*, 3, p. 40. Available at: <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00040>.

Valluru, L., Dasari, S. and Wudayagiri, R. (2014) 'Role of free radicals and antioxidants in gynecological cancers: current status and future prospects', *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 3, p. 15. Available at: <https://doi.org/10.5455/oams.201113.rv.011>.

Vigelsø, A. et al. (2015) 'GAPDH and β -actin protein decreases with aging, making Stain-Free technology a superior loading control in Western blotting of human skeletal muscle', *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 118(3), pp. 386–394. Available at: <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00840.2014>.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Anatomie des menschlichen Gehirns (<i>Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration</i> , no date).....	1
Abbildung 2: Hypophysen der jeweiligen Gruppen (Quelle: Arbeitsgruppe ao. Univ.-Prof. Studienik).....	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Probengewinnung vom Versuchstier bis hin zur Messung der Proteinkonzentration (Quelle: Arbeitsgruppe ao. Univ.-Prof. Studienik)	21
Abbildung 4: Proben in Eisbox mit Anblick auf die Ultraschallsonde (Quelle: Autor)	23
Abbildung 5: Konzentrationsbestimmung mit 96 Well Platte (Quelle: Autor)	24
Abbildung 6: Kalibriergerade des Standards (Quelle: Autor)	25
Abbildung 7: Gelkassette mit 10 Well Kamm (Quelle: Autor).....	26
Abbildung 8: Gelelektrophorese (Quelle: Autor)	29
Abbildung 9: Blotting-Sandwich (Quelle: Autor).....	30
Abbildung 10: Blotting in Lade B (Quelle: Autor)	31
Abbildung 11: ChemiDoc mit offener Lade (Quelle: Autor)	33
Abbildung 12: Ultraschallbad und Mikrotom (Quelle: Autor)	34
Abbildung 13: Proben in "wet chamber" (Quelle: Autor)	35
Abbildung 14: Das Prinzip der Immunhistochemie (Ella-Tongwiis <i>et al.</i> , 2021).....	36
Abbildung 15: Expression von VEGF (Quelle: Autor)	38
Abbildung 16: Expression von EGFR (Quelle: Autor)	39
Abbildung 17: Expression von TGF- α (Quelle: Autor).....	40
Abbildung 18: Expression von P53 (Quelle: Autor).....	41
Abbildung 19: Expression von BAX (Quelle: Autor).....	42
Abbildung 20: Expression von BCL-2 (Quelle: Autor).....	43
Abbildung 21: Expression von Caspase 7 (Quelle: Autor).....	44
Abbildung 22: Expression PI3K-p110 (Quelle: Autor).....	45
Abbildung 23: Expression von GAPDH (Quelle: Autor)	46
Abbildung 24: Gruppe 1, Negativkontrolle (Quelle: Autor).....	48
Abbildung 25: Gruppe 2, Positivkontrolle (Quelle: Autor)	48
Abbildung 26: Gruppe 3, Behandlung mit Cathepsin-L-Hemmer (Quelle: Autor)	49
Abbildung 27: Gruppe 4, Behandlung mit Cathepsin-B-Hemmer (Quelle: Autor)	49
Abbildung 28: Gruppe 5, Behandlung mit Metalloprotease-Hemmer (Quelle: Autor)	50

Abbildung 29: Gruppe 6, Behandlung mit Cathepsin-D-Hemmer (Quelle: Autor)50

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Proben	11
Tabelle 2: Liste der benötigten Reagenzien und Chemikalien.....	12
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper	13
Tabelle 4: Liste der hergestellten Lösungen und Puffer	14
Tabelle 5: Geräte und Programme zur Analyse und Auswertung	15
Tabelle 6: Liste der benötigten Reagenzien und Chemikalien.....	16
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Antikörper	16
Tabelle 8: Liste der hergestellten Lösungen und Puffer	16
Tabelle 9: Geräte und Programme zur Analyse und Auswertung	17
Tabelle 10: Probenverdünnung	25
Tabelle 11: Zusammensetzung des 12% Trenngels.....	27
Tabelle 12: Zusammensetzung des 4% Sammelgels.....	27
Tabelle 13: Statistische Signifikanz	37

9 Abkürzungsverzeichnis

APS	<i>Ammoniumpersulfat</i>
BCA	<i>Bicinchoninsäure</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidin</i>
dH ₂ O	<i>destilliertes Wasser</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGFR	<i>epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor</i>
H ₂ O ₂	<i>Wasserstoffperoxid</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
KH ₂ PO ₄	<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>
MeOH	<i>Methanol</i>
Na ₂ HPO ₄	<i>Dinatriumhydrogenphosphat</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaN ₃	<i>Natriumazid</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylendiamin</i>
Tris	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>