

4 DISKUSSION

4.1 Charakterisierung geeigneter Testsysteme

4.1.1 Geeignete Zelllinien mit tumorspezifischem Antigen

Mit circa 60–70 % findet man den größten Anteil an Eisenionen (resorbiert als Fe^{2+} , im Blut oxidiert zu Fe^{3+}) im menschlichen Organismus in Form von Hämoglobin in zirkulierenden Erythrocyten, wobei Eisenionen in dieser Form der Bindung von molekularem Sauerstoff dienen. Circa 20–30 % der Eisenionen werden in Form von Ferritin gespeichert, circa 10 % werden in Enzyme und andere Proteine wie z. B. Myoglobin und verschiedene Cytochrome eingebaut und nur etwa 0.1 % der Eisenionen zirkulieren gebunden an Transferrin im menschlichen Blut.¹⁵² Zur zellulären Eisenaufnahme bindet dessen Transportform (ferri-Tf) an Transferrinrezeptoren (TfR) und der Ligand-Rezeptor-Komplex wird daraufhin internalisiert. Durch die Änderung des pH-Wertes werden die Eisenionen in den Endosomen bei leicht saurem pH-Wert freigesetzt und der Tf-TfR-Komplex gelangt zurück an die Zelloberfläche. Dort dissoziiert eisenfreies apo-Tf bei pH 7.4 vom Rezeptor, der nachfolgend für eine erneute Aufnahme von Eisenionen zur Verfügung steht. Der gesamte Vorgang dauert nur wenige Minuten (circa 15 min bei HepG2-Zellen).¹³⁶

Da Eisenionen durch ihre Beteiligung am Enzym Ribonukleotidreduktase eine essentielle Bedeutung bei der DNA-Synthese besitzen, befinden sich Transferrinrezeptoren auf allen Zellen des menschlichen Organismus mit Ausnahme der Erythrocyten.¹⁵³ Deutlich erhöhte Expressionsraten findet man dabei vor allem auf Zellen der Leber (Eisenspeicherorgan) und auf solchen von schnell proliferierenden Geweben, also auf Zellen des hämatopoetischen Systems, der Plazenta und vor allem auch auf Tumorzellen.^{34,152} Das Auftreten von Transferrinrezeptoren ist somit nicht ausschließlich tumorspezifisch, doch ist trotzdem unter der Verwendung von TfR-spezifischen Vektormolekülen – im Gegensatz zu herkömmlichen Zytostatika – mit einer entscheidenden Verbesserung des Nebenwirkungsprofils zu rechnen. Deshalb stellen derartige Vektormoleküle einen hoffnungsvollen Ansatz für eine Vielzahl von immuntherapeutischen Verfahren, also auch für Immunotoxine dar.⁷² Das Wirk- sowie Nebenwirkungspotential der hier vorgestellten Immunoadaptortoxine wird jedoch außer durch die Tumorzellspezifität möglicherweise auch durch einen EPR-Effekt und / oder die ver-

änderten physiologischen Bedingungen im Zielgewebe beeinflusst. Denn wie in Abschnitt 1.3, Seite 3 bereits erläutert, gibt es im *Drug-Targeting* sehr vielfältige Konzepte, die sich nicht in jedem Falle voneinander trennen lassen.

Wegen der im folgenden aufgeführten Charakteristika sollte der TfR im Rahmen dieser Arbeit das Modellsystem für einen tumorspezifischen Rezeptor darstellen: Als Testsystem stand die humane Hepatokarzinomzelllinie HepG2 zur Verfügung, die durch zahlreiche Studien zu intrazellulären Transportprozessen des TfR funktionell sehr gut charakterisiert ist.^{114,154} Das ebenfalls vorhandene CHO-Zelllinienpaar, TRVb-wt- und TRVb-hTfR-Zellen, stellte ein sehr gutes Kontrollsystem zum Testen der Rezeptorselektivität dar, da bei ansonsten gleicher Beschaffenheit nur TRVb-hTfR-Zellen in der Lage sind, Liganden des Transferrinrezeptors zu binden.¹³⁷

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein nichtradioaktives Verfahren entwickelt, mit dem die TfR-Dichte auf verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden kann (siehe Abschnitt 3.1.2, Seite 60). Für HepG2-Zellen wurden auf diese Weise circa 3.5×10^4 TfR pro Zelle detektiert. Dieser Wert konnte durch Literaturdaten aus Radioligandstudien mit [¹²⁵I]Tf bestätigt werden.^{136,154,155} Gleiches gilt für den für TRVb-hTfR-Zellen ermittelten Wert von circa 3.0×10^4 Tf-Bindungsstellen pro Zelle.¹³⁷ In Bezug auf die Zahl der Tf-Bindungsstellen auf den humanen HepG2-Zellen liegt die TfR-Expressionsrate von den transfizierten TRVb-hTfR-Zellen in einem vergleichbaren Bereich, in Bezug auf andere tumorspezifische Antigene liegen die TfR-Dichten an den vorhandenen Zelllinien im mittleren Bereich.^{78,117}

Insgesamt gesehen erweist sich eine zu geringe Anzahl an tumorspezifischem Antigen auf der Zelloberfläche als Nachteil, da sie zum limitierenden Faktor für die zelluläre Aufnahme des Immunotoxins werden kann (siehe Abschnitt 1.6.3, Seite 12). Andererseits kann eine relativ niedrige Rezeptordichte auch von Vorteil sein, da durch sie eine homogene Konstruktverteilung im Tumor ermöglicht wird. Denn bei einer sehr hohen Rezeptordichte kann das Immunotoxin aufgrund der hohen Bindungskapazität bereits von Zellen an der Oberfläche des Tumors abgefangen und am tieferen Eindringen in das Gewebe gehindert werden.^{156,157}

Unter Abwägung dieser für die Auswahl eines Testsystems entscheidenden Faktoren sowie unter Berücksichtigung der relativ einfachen Austauschbarkeit der einzelnen Liganden in Immunoadaptortoxinen stellte der Transferrinrezeptor als tumorspezifisches Antigen ein ideales Modellsystem dar. Die vorhandenen Zelllinien ermöglichten außerdem sehr genaue Untersuchungen bezüglich einer TfR-vermittelten Aufnahme.

4.1.2 Bestimmung der cytotoxischen Aktivität

Wie bereits in Abschnitt 2.13.1, Seite 43 beschrieben, wird die cytotoxische Aktivität von Immunotoxinen sehr häufig durch den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren gemessen. Mit dem FDA-Assay konnte in der vorliegenden Arbeit ein einfaches und schnell durchführbares, nichtradioaktives Verfahren zur Bestimmung der Cytotoxizität etabliert werden. Es bietet zusätzlich den Vorteil, daß es im Vergleich zu anderen Assays nicht sehr kostenintensiv

ist. Der Detektionsbereich des FDA-Assays wurde mit dem eines käuflichen Proliferationstests verglichen, wobei in beiden Tests eine lineare Beziehung zwischen Zellzahl (0–25 000 Zellen) und detektiertem Fluoreszenzsignal gezeigt werden konnte (CyQuant, siehe Abschnitt 3.2.2, Seite 63). In der Literatur werden ähnliche Vergleiche mit weiteren Assays, insbesondere mit dem MTT-Test beschrieben (siehe auch Abschnitt 2.13.1, Seite 43).^{122,158,159}

An verschiedenen Zelllinien konnten mittels FDA-Assay IC_{50} -Werte für DT bestimmt werden, welche bei circa 10^{-10} M für HepG2- und bei circa 10^{-11} M für die beiden TRVb-Zelllinien liegen (siehe Abb. 3-14, Seite 74). Die geringfügigen Abweichungen gegenüber Abb. 3-46, Seite 116 können auf die Verwendung unterschiedlicher DT-Chargen zurückgeführt werden. Für die cytotoxische Aktivität spielt die DT-Rezeptordichte auf einzelnen Zelltypen eine entscheidende Rolle. Deshalb schwanken die in der Literatur für DT angegebenen IC_{50} -Werte sehr stark in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien (Vero-Zellen: circa 10^{-13} M, Rattenhepatocyten: circa 10^{-10} M).^{68,160} Die hier gemessenen Werte stellen eine wesentliche Ergänzung zu bisherigen Literaturangaben dar und untermauern die Gültigkeit der für DT bekannten, cytotoxisch wirkenden Konzentrationen.

In weiteren Experimenten konnte im Arbeitskreis im FDA-Assay gezeigt werden, daß der Überlebensindex von HepG2-Zellen bei einer Konzentration von 10^{-5} M nahezu Null ist. Wie die im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wiederholt beobachteten Restüberlebensraten von HepG2-Zellen bei einer DT-Konzentration von 10^{-9} und 10^{-7} M diesbezüglich zu deuten sind, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.1.3 Zellfreies Testsystem zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der toxischen Domänen

Zur Aktivitätsbestimmung von Proteintoxinen werden hauptsächlich Verfahren mit radioaktiven Komponenten genutzt. Dabei wird für bakterielle Proteintoxine häufig die ADP-Ribosylierung und damit Inaktivierung von EF II herangezogen.¹⁶¹ In den verwendeten Assays wird gereinigter EF II mit ^{14}C - oder ^{32}P -markiertem NAD^+ und Toxin inkubiert. Ein weiterer Assay macht sich die toxinbedingte Inhibition der Proteinsynthese in einem zellfreien Translationssystem zunutze,¹⁶² woraus ein umso geringerer Einbau markierter Aminosäuren in das synthetisierte Protein resultiert je aktiver das Toxin ist. Die gemessene Radioaktivität ist in beiden Fällen ein Maß für die enzymatische Aktivität.

Für beide Systeme gibt es inzwischen auch nichtradioaktive und damit für den Laborbetrieb unproblematischere Alternativen. Ein Testmodell verwendet Luciferase-DNA in einem *In-vitro*-Translationssystem.¹⁶³ Aufgrund der Translationsinhibition kann die Toxinaktivität anhand einer Abnahme der Biolumineszenz im anschließenden Luciferaseassay (Zusatz von Luciferin) bestimmt werden. Dieser Assay ist nicht nur für bakterielle, sondern auch für andere Toxine mit Einfluß auf die Proteinsynthese anwendbar, wie z. B. Ricin als Vertreter der RIPs.

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit ADP-ribosylierende Toxine im Vordergrund standen, wurde ein sehr einfach und mit geringem apparativen Aufwand durchführbarer ADP-Ribosylierungsassay etabliert, bei dem anstelle von radioaktiv markiertem NAD^+ biotinyliertes NAD^+ eingesetzt wird.¹²⁸ Obwohl dieser Assay normalerweise nur qualitative Aussagen bezüglich der enzymatischen Aktivität zuläßt, konnte für DT eine konzentrationsabhängige ADP-Ribosylierung im Immunoblot gezeigt werden. Zusätzlich gelang der Nachweis der katalytischen Aktivität von PE, während RTA erwartungsgemäß keine ADP-Ribosylierung zeigte (siehe Abb. 3-3, Seite 62). Da EF II mit einer wesentlich höheren Effizienz als andere Proteine ADP-ribosyliert wird,¹⁶⁴ weist dieses Testmodell eine ausreichende Selektivität für die verwendeten Toxine auf.

4.2 Proteinchemische Kopplungsprodukte

4.2.1 Darstellung chemisch gekoppelter Adaptertoxine

Vor einigen Jahren wurde die Entdeckung von sogenannten Trojanischen Peptiden sehr euphorisch begrüßt, da derartige Peptide eine nichtinvasive Einschleusung von funktionellen Fremdproteinen (oder Fremd-DNA) in kultivierte Zellen ermöglichen. Für das Trojanische Peptid Tat aus dem HI-Virus (siehe Tab. 1-3, Seite 20) konnte inzwischen auch an Mäusen, also *in vivo*, nachgewiesen werden, daß ein an Tat fusioniertes Fremdprotein (β -Galaktosidase) nach intraperitonealer Applikation in sämtliche Gewebe transportiert wird.¹⁶⁵ Aufgrund dieser Eigenschaft stellen Trojanische Peptide bei bestimmten Erbkrankheiten potentielle Werkzeuge für eine Enzymsubstitution oder einen Gentransfer dar. Mit der Entwicklung eines Adapters, der sich eines derartigen Peptides bedient und der einen einfachen Austausch seiner Liganden ermöglicht, sind in diesem Zusammenhang ein Reihe von zelltypspezifischen Applikationen denkbar.

Mit Penetratin stand zu Beginn dieser Arbeit eine der bekanntesten Substanzen dieser Reihe in Peptidform zur Verfügung. Über eine aktivierte Kopplungsgruppe in Form eines 2-Pyridyldisulfidrestes war es möglich, Proteine mit einem freien Cysteinrest durch eine Disulfidgruppe an diese Sequenz zu binden. Aufgrund des reduktiven Milieus im Zellinnenraum ist eine derartige kovalente Bindung im Cytosol spaltbar, was sie für das hier verfolgte Adapterkonzept interessant machte.

Für die Auswahl des zu verwendenden Toxins waren somit folgende Kriterien von besonderer Bedeutung: a) Die enzymatisch aktive Domäne mußte zur Größenreduktion und zur Beseitigung anderer als der cytotoxischen Eigenschaften ohne toxineigene Translokationssequenz darstellbar sein und b) zur Kopplung an die Transfersequenzen war das Vorhandensein eines Cysteinrestes erforderlich. Bei *Pseudomonas* Exotoxin kann durch proteinchemische Methoden die enzymatisch aktive Domäne nur inklusive eines Anteils der Translokationsdomäne abgetrennt werden (siehe Abschnitt 1.6.3, Seite 12). Zusätzlich zeigte sich die der Trypsinspaltung folgende Aufreinigung insofern als äußerst schwierig, als die Instabilität der

katalytischen Domäne bei höheren Temperaturen im Gegensatz zu Diphtheriatoxin eine Hitzedenaturierung der Zellbindungsdomäne von PE unmöglich macht.¹²⁷ Beide erforderlichen Kriterien werden jedoch von Diphtheriatoxin erfüllt. Unter Erhalt der enzymatischen Aktivität gelang die erfolgreiche Darstellung der A-Kette von DT nach einem Verfahren von Moskaug *et al.* (siehe Abb. 3-5, Seite 65).¹²⁹

Die Reaktion der A-Kette von DT mit aktiviertem Penetratin verlief nahezu vollständig. Bei der Kopplung der zusätzlich zur Verfügung stehenden MTS konnten dagegen trotz Optimierung der Versuchsbedingungen nur geringe Ausbeuten erzielt werden (siehe Abb. 3-10, Seite 71). Die durch einen sehr hohen Anteil hydrophober Aminosäuren verursachte schwere Löslichkeit dieses Peptids stellt vermutlich die Ursache für das schlechte Kopplungsverhalten dar. Durch Ausbildung von in Wasser unlöslichen Aggregaten und /oder Haftung der Transfersequenz an der Gefäßoberfläche wird dieser Reaktionspartner offensichtlich dem Gleichgewicht entzogen. Bei anderen, getesteten Proteinen zeigte allerdings auch Penetratin nicht immer ein Kopplungsverhalten, das mit dem an DTA vergleichbar war. Die Kopplung an PE verlief z. B. nur mit einer sehr geringen Ausbeute, so daß dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde (siehe Abschnitt 3.4.1, Seite 70). Als drittes Protein wurde GFP getestet, welches in der vorliegenden Arbeit für einige Versuche als Pseudotoxin mitgeführt wurde (Nachweis des Transfers, Lokalisation etc.). Diese Kopplung verlief mit mittleren Ausbeuten (siehe Abschnitt 3.4.2, Seite 70). Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, daß sowohl physikochemische Parameter (schlechte Löslichkeit, Aggregationsneigung) als auch sterische Aspekte (schlechte Zugänglichkeit der Cysteinreste) von entscheidender Bedeutung für eine potentielle Kopplung und deren Ausbeute sind.

Da DT im Rahmen dieser Arbeit nicht aus seinem Herkunftsorganismus gereinigt, sondern kommerziell erworben wurde, standen immer nur sehr kleine Mengen Toxin zur Verfügung. Das proteinchemische Verfahren zur Darstellung von DTA (siehe Abb. 3-5, Seite 65) ging aufgrund seiner Ausbeuten bereits mit einer deutlichen Reduktion an Ausgangsmaterial einher. So gelang bei molaren Ausbeuten im Bereich von 30–50 % die Darstellung von circa 200 µg DTA aus 1 mg DT. Die resultierende Menge an Kopplungsprodukt, insbesondere im Falle von DTA-MTS, war jedoch so gering, daß eine Reinigung, die stets mit weiteren Proteinverlusten einhergeht, nicht in Betracht gezogen wurde. Aufgrund der annähernd vollständigen Umsetzung von DTA mit Penetratin stand allerdings ein Endprodukt zur Verfügung, mit dem nachfolgend funktionelle Untersuchungen für die cytosolisch spaltbare Bindung durchgeführt werden konnten.

Da rekombinant hergestelltes GFP in ausreichender Menge zur Verfügung stand, konnte auch das Kopplungsprodukt GFP-PEN relativ einfach in größeren Mengen dargestellt werden. Deshalb wurde für dieses Konstrukt eine Reinigungsmethode entwickelt, mit der ungekoppeltes GFP effizient von gekoppeltem getrennt werden konnte (siehe Abb. 3-12, Seite 73). Die Disulfidbrücke in gereinigtem GFP-PEN zeigte jedoch unter Lagerung bei 4 °C eine ausgeprägte Instabilität. Durch Zusatz von einem 100fach molaren Überschuß an oxidiertem Glutathion und Lagerung bei –20 °C gelang es, diese Problematik erfolgreich zu lösen.

4.2.2 Funktionalität der chemisch gekoppelten Adapterkonstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sich die Disulfidgruppen von DTA-PEN mit Cytosolfractionen, hergestellt nach einem Verfahren von Dignam *et al.*,¹¹³ spalten lassen, was die generelle Eignung dieser funktionellen Gruppe für den Adapter klar verdeutlicht (siehe Abb. 3-13, Seite 73). Bei der Bestimmung der Transferaktivität von MTS und PEN mittels FDA-Assay zeigten beide Transferpeptidkonstrukte bemerkenswerterweise jedoch ein ähnliches Verhalten wie die A-Kette von DT (siehe Abb. 3-14, Seite 74). Bei DTA-PEN und DTA-MTS wurde anhand dieses Verhaltens vermutet, daß beide Transfersequenzen nicht in der Lage sind, DTA ins Cytosol zu leiten. Bei DTA konnte aufgrund von Literaturdaten mit dem hier beobachteten Effekt gerechnet werden, es verhielt sich also erwartungsgemäß.⁶⁸

Aufgrund der bereits beschriebenen Instabilität von GFP-PEN lag es nahe, daß auch die anderen disulfidgekoppelten Konstrukte, DTA-PEN und DTA-MTS, eine gewisse Instabilität aufweisen. Weitere Experimente bestätigten, daß die Disulfidgruppen von DTA-PEN tatsächlich während der Inkubation bei 37 °C gespalten werden. Offensichtlich entsteht im Zellkulturmedium bereits durch die Lyse von nur wenigen Einzelzellen ein so hohes reduktives Potential oder aber der Prozeß wird durch die Freisetzung von Disulfidisomerasen so sehr beschleunigt, daß es vermehrt zu einer Spaltung der Konstrukte kommt, wodurch ein Transfer von DTA *per se* verhindert wird. Durch Zusatz von oxidiertem Glutathion (in 10⁴fach molarem Überschuß) konnte zwar im Zellkulturüberstand die Spaltungsneigung von DTA-PEN deutlich reduziert werden, doch ließ sich ein solcher Stabilitätsgewinn in Anwesenheit von HepG2-Zellen nicht beobachten (siehe Abschnitt 3.4.3.3, Seite 75). Literaturangaben bezüglich anderer immunologischer Konzepte konnten jedoch mit diesen Versuchen bestätigt werden. Zur Stabilitätsverbesserung werden im Rahmen anderer Konzepte insbesondere solche Linker als vorteilhaft beschrieben, deren Verknüpfung beispielsweise in Form einer sterisch geschützten Disulfidgruppe oder einer – hier aufgrund unzureichender Spaltungsneigung im Cytosol nicht anwendbaren – Thioetherbindung realisiert ist.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

4.3 Rekombinante Darstellungsweise

Aufgrund der umfangreichen Erfahrungen durch die Experimente zur chemischen Kopplung wurde das Toxinfragment DTA auch für die weiteren Versuche, wie z. B. die Untersuchung der Transferaktivität der verwendeten Peptide, ausgewählt. Um einheitliche Addukte zu erhalten – das Ausmaß einer chemischen Kopplung ist oftmals nur schwer zu quantifizieren – wurden die entsprechenden Konstrukte rekombinant dargestellt. Diese Vorgehensweise war des weiteren aus Gründen höherer Konstruktausbeuten und besserer Reinigungsmöglichkeiten durch einen fusionierten *Tag* besonders gut für weitere Entwicklungen geeignet.

Um einen bei der Verfahrensoptimierung unbeabsichtigten Abbau der für die Überprüfung der Transferaktivität herzustellenden Konstrukte DTA und DTA-MTS zu verhindern, wurde

zunächst auf eine cytosolisch spaltbare Bindung verzichtet. Beide Konstrukte konnten in Form eines His-Patch-TRX-Fusionsproteins überexprimiert werden, für das eine Affinität zu zweiwertigen Metallionen beschrieben ist (siehe Abb. 3-17, Seite 79).¹³² Jedoch zeigte der Fusionsanteil in Verbindung mit DTA keine auffallend ausgeprägte Affinität zu Nickelionen (Ni^{2+}). Somit bot dieses Verfahren zwar einerseits den Vorteil einer hohen Expressionsrate, doch konnte es andererseits die Forderung nach einer effizienten Reinigung nicht erfüllen (siehe Abb. 3-18, Seite 80). Da es außerdem nicht möglich war, den TRX-Fusionsanteil ohne Proteolyse von DTA und DTA-MTS abzuspalten (siehe Abschnitt 3.5.4.3, Seite 81), blieb sein Einfluß auf die Transfertätigkeit der MTS ungeklärt.

Die Verteilung der beiden DTA-Konstrukte in Zellsolubilisaten und einzelnen Zellfraktionen zeigte keinen Unterschied zwischen dem DTA-Konstrukt mit oder ohne MTS (siehe Abb. 3-21, Seite 83). Da für Thioredoxin eine Lokalisation an den Verbindungsstellen der inneren und äußeren Membran von *E. coli* beschrieben wird,¹⁶⁹ könnte diese Eigenschaft bei den durchgeführten Experimenten möglicherweise dazu geführt haben, daß sich zwar beide Konstrukte an die Membran von HepG2-Zellen anlagern, daß aber ein vollständiger Transfer mit Hilfe der MTS verhindert wurde. Des weiteren ist für TRX selbst auch ein entgegengesetzter Transport aus der Zelle heraus beschrieben, dessen genauer Mechanismus jedoch unklar bleibt.¹⁷⁰

Die Experimente mit den dargestellten TRX-Fusionsproteinen ergaben daher zwar sehr aufschlußreiche, doch für die hier verfolgten Ziele nur unter Einschränkungen weiterführende Ergebnisse. Zur Vermeidung der problematischen Enterokinasespaltung wurden die folgenden Adaptortoxine entweder ohne *Tag* oder mit einem einfachen His-*Tag* kloniert, der keine Abspaltung erforderte. Da der Adapter zur Beibehaltung der natürlichen Domänenabfolge von Diphtheriatoxin C-terminal angeordnet wurde, wurde der *Tag* N-terminal fusioniert. Als Expressionssystem wurde das durch den T7-Promotor kontrollierte pET-System ausgewählt, welches für eine ganze Reihe ähnlicher Konstrukte ebenfalls Anwendung findet.^{60,131,171} Möglicherweise bedingt durch das klonierungsbedingte Fehlen des T7-Terminators sowie des löslichkeitsverbessernden TRX-Fusionsanteils waren die Expressionsraten der pET-Konstrukte verglichen mit denen der TRX-Fusionsproteine wesentlich geringer, doch gelang es problemlos, die für nachfolgende Experimente benötigten Mengen an Adaptortoxinen zu synthetisieren (siehe Abb. 3-31, Seite 95).

Da sich die speziell zur Testung des ESP ebenfalls im pET-System dargestellten GFP-Konstrukte (siehe Abschnitt 3.6.6, Seite 97) im Gegensatz zu den ligandfreien Adapterkonstrukten wiederum durch eine stärkere Expression auszeichneten, konnte gezeigt werden, daß das Fehlen des T7-Terminators nicht die wesentliche Ursache für die geringen Ausbeuten darstellte. Vielmehr scheint tatsächlich die Verwendung eines Fusionspartners, wie TRX oder auch GFP, in Bezug auf die Ausbeuten einer Expression vorteilhaft zu sein. Eine besonders exponierte Lage der Transfersequenzen in den Adaptermolekülen und ihre Membranaffinität tragen möglicherweise außerdem dazu bei, daß eine effektive Freisetzung der Konstrukte bei Bakterienlyse unter nicht denaturierenden Bedingungen verhindert wird.

Die Reinigung der Adapterkonstrukte über ihre *Tag*-bedingte Ni^{2+} -Affinität zeigte unter nativen Bedingungen, daß der N-terminal gelegene *Tag* – vermutlich aus sterischen Gründen – nur schlecht zugänglich ist und deshalb keine Bindung an Nickelionen (Ni^{2+}) erfolgt. Für den mit circa 12 kDa zwar wesentlich größeren His-Patch-Fusionsanteil könnten möglicherweise ähnliche Verhältnisse für die relativ schwache Bindung verantwortlich sein.¹⁷² Unter denaturierenden Bedingungen gelang es jedoch den *Tag* zu aktivieren, so daß für einige Immunoadaptortoxine eine Reinigung über ihre *Tag*-bedingte Metallionenaffinität durchführbar war. Auch wenn die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen oft unproblematischer ist,¹⁷³ sind unter Umständen denaturierende Bedingungen hier von Vorteil, da durch zelluläre Proteasen bedingte Abbauprozesse minimiert werden.¹⁷⁴

4.4 Funktionsanalysen

4.4.1 ADP-Ribosylierung mittels Diphtheriatoxin A-Kette

Da es sich bei DT um ein Toxin mit bakteriellem Ursprung handelt, welches daher keine seltenen Codons und allenfalls eine geringe Toxizität gegenüber Bakterien aufweist, war eine erfolgreiche rekombinante Expression von DTA unter Erhalt der enzymatischen Aktivität sehr wahrscheinlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch auch solche Konstrukte hergestellt, mit denen der Einfluß einer C-terminalen Fusion von mehr als 5 kDa großen Peptiden an DTA überprüft werden konnte. Bisher wurden ähnliche Konstrukte nur bezüglich ihrer Reassoziationsfähigkeit mit der B-Kette von DT untersucht,⁶⁸ so daß hier erstmals gezeigt werden konnte, daß solche Fusionsproteine auch eine mit DT vergleichbare enzymatische Aktivität aufweisen (siehe Abb. 3-34, Seite 100).

Die Bestimmung der ADP-Ribosylierungsaktivität zeigte, daß Konstrukte mit einem N-terminalen His-*Tag*, die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurden, nach einer Dialyse als Renaturierungsmaßnahme ebenfalls volle enzymatische Aktivität besitzen. Mit einem Konstrukt bestehend aus RTA und DTA konnte Vergleichbares bereits gezeigt werden, nämlich daß N-terminale Fusionen an DTA keinen Einfluß auf dessen enzymatische Aktivität haben.¹¹⁸ Die in diesem Zusammenhang beschriebene Sättigung der ADP-Ribosylierung von EF II gibt zusätzlich Hinweise darauf, warum im Rahmen dieser Arbeit neben EF II noch weitere Proteine ADP-ribosyliert wurden (siehe Abb. 3-3, Seite 62). Während die Sättigung auf eine limitierende Menge an vorhandenem NAD^+ zurückgeführt wurde,¹¹⁸ weist die ADP-Ribosylierung anderer Proteine auf eine Limitation von EF II hin. In beiden Fällen ist also das molare Verhältnis von isoliertem EF II zu NAD^+ ausschlaggebend. Leider konnte ein genauer Vergleich der eingesetzten molaren Verhältnisse nicht durchgeführt werden, da jeweils nur angereicherter und kein gereinigter EF II Verwendung fand.

Sehr beachtenswert war im Rahmen der Aktivitätsuntersuchungen die Tatsache, daß exprimiertes DTA (JK 16) im Gegensatz zu den Adaptortoxinen keine Bindung an Blaugel zeigte (siehe Abschnitt 3.6.5, Seite 96), jedoch enzymatisch voll aktiv war. Durch die strukturelle

Ähnlichkeit zu NAD^+ hätte die ausbleibende Bindung an Cibacron Blue eher das Gegenteil vermuten lassen. Da bei den bindenden Konstrukten neben DTA nur die spaltbaren Sequenzen im Adapter identisch sind, wird möglicherweise durch diese eine unspezifische Bindung an die Matrix und nicht an den Farbstoff Cibacron Blue bewirkt.

4.4.2 Charakterisierung des endosomal spaltbaren Peptids

Eine große Anzahl an Proproteinen müssen für ihre Aktivierung zunächst proteolytisch gespalten werden. Zu diesen gehören unter anderem einige Serumproteine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren und auch Proteintoxine. Bei vielen wird dazu eine Furinschnittstelle gespalten. Die Protease Furin ist eine Ca^{2+} -abhängige Serinprotease, die ihre katalytische Aktivität über einen breiten pH-Bereich beibehält. Sie ist ein ubiquitär exprimiertes Transmembranprotein und kommt sowohl in Assoziation mit dem Trans-Golgi-Netzwerk als auch mit der Plasmamembran und dem endosomalen System vor. Das allgemeine Konsensusmotiv für Furin lautet Arg-X-Lys/Arg-Arg, wobei auch Arg-X-Arg-X-X-Arg möglich ist.^{92,175}

Die Proteintoxine DT und PE enthalten jeweils in einer strukturell exponierten, proteasesensitiven Schleife ein Erkennungsmotiv, für dessen Spaltung furinähnliche Enzyme (Proproteinconvertasen) verantwortlich gemacht werden (siehe Abb. 1-6, Seite 18).⁶¹ Teile dieser Schleifen wurden bereits mehrfach dazu genutzt, spaltbare Linker in Vektorkonstrukte einzubringen. Im Falle eines rekombinant hergestellten Immunotoxins aus Restrictocin (Ribonuklease aus *Aspergillus restrictus*) und einem scF_v-anti-TfR-Fragment wurde durch Einführung eines Teils der spaltbaren Sequenz von PE abhängig von den getesteten Zelllinien eine 2–30fach höhere Cytotoxizität beobachtet.⁸⁷ Konstrukte bestehend aus der A-Kette von Ricin und Protein A (aus Staphylokokken) zeigten nach Einführung der Spaltsequenz von DT und Zugabe von zellspezifischen Antikörpern ebenfalls eine erhöhte cytotoxische Aktivität.⁸⁶

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gezielt nur die Konsensusmotive innerhalb der proteasesensitiven Bereiche von PE und DT ausgewählt und zum endosomal spaltbaren Peptid (ESP) zusammengefügt (siehe Abschnitt 7.2.1.2, Seite 148). Aus den Literaturdaten geht hervor, daß trotz Verwendung dieser beiden Sequenzen Furin nicht unbedingt alleine für eine Spaltung verantwortlich sein muß und daß diese auch außerhalb der Endosomen erfolgen kann.^{139,176} Möglicherweise dienen die zwei basischen Reste innerhalb des proteasesensitiven Bereiches von DT (AS 192–193: Arg-Arg) als Erkennungsmotiv für eine alternative Spaltungsreaktion durch verwandte Proproteinconvertasen wie beispielsweise PC6B.¹⁷⁷ Da vollständiges DT zusätzlich noch über ein weiteres Furinmotiv im Bereich der A-Kette (AS 170–173: Arg-Gly-Lys-Arg) verfügt, welches nicht zu seiner Aktivierung beiträgt noch während dieser gespalten wird, ist außerdem davon auszugehen, daß die Exposition der möglichen Spaltsequenz an der Oberfläche des Moleküls von entscheidender Bedeutung ist.

Das ESP wurde zu seiner Testung in einem Konstrukt kloniert, das DTA, den Adapter (mit CSP, MTS und ESP) und eGFP enthielt. Da die Protease Furin hohe Expressionsraten in sehr vielen Geweben zeigt und ihre cDNA ursprünglich aus denen in dieser Arbeit als humane

Testzelllinie verwendeten HepG2-Zellen isoliert wurde,¹⁷⁸ war ihre Anwesenheit in den verwendeten Membranfraktionen von HepG2-Zellen wahrscheinlich. Wie erwartet konnte deshalb sowohl mit rekombinantem, humanen Furin wie auch mit Membranfraktionen von HepG2-Zellen eine Spaltung des ESP bei pH 7.4 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3-35, Seite 101), die unter Zugabe eines kompetitiven Furinconvertaseinhibitors verhindert werden konnte. Allerdings ließ sich unter Inhibition bei dem Konstrukt JK 19 (ohne CSP) ein geringfügig größeres Fragment im Immunoblot detektieren, welches sich bei JK 18 (vollständiger Adapter) eventuell aufgrund der geringeren Intensitäten der Banden nicht nachweisen ließ. Unter nicht optimalen Bedingungen für Furin, hier die Anwesenheit des Inhibitors, wird das PE-Spaltungsmotiv möglicherweise bevorzugt gegenüber dem von DT geschnitten. Dies stände zwar im Gegensatz zu den oben beschriebenen Publikationen, die nur für DT eine alternative Spaltung des Furinmotives aufgrund der zwei aufeinanderfolgenden Argininreste beschreiben, doch konnte eine alternative Spaltung bei JK 18 unter Zugabe von Membranen ebenfalls bei pH 5.5 beobachtet werden, also dem pH-Optimum für PE.⁶¹

Da die alternative Spaltstelle anhand des Größenunterschiedes im Immunoblot nicht exakt definiert werden konnte, wäre zur genauen Klärung des Sachverhaltes einerseits eine N-terminale Sequenzierung der erhaltenen eGFP-Fragmente sinnvoll gewesen. Andererseits war die Sequenzierung gar nicht erforderlich, da die Spaltung des ESP an sich für seine Anwendung im Adapter als ausreichendes Kriterium gilt. Durch unterschiedliche Reaktionskinetiken unter Anwesenheit verschiedener Mengen Membranfraktion konnte zusätzlich demonstriert werden, daß es sich dabei um eine spezifische enzymatische Spaltungsreaktion handelt (siehe Abb. 3-36, Seite 102). Die durchgeführten Experimente lassen unter Beachtung von Literaturdaten außerdem auf eine potentiell endosomale Lokalisation der Spaltung schließen.⁶¹ Ebenfalls denkbar – auch unter Berücksichtigung der intrazellulären Wanderungsrouten von Furin über das Trans-Golgi-Netzwerk, die Zelloberfläche und das endosomale System – ist jedoch eine Spaltung im unmittelbaren Umfeld der Zielzelle. Diese Möglichkeit wird experimentell zum Teil dadurch bestätigt, daß die Stabilität des ESP im Zellkulturmedium auf eine Halbwertszeit von circa 4 h begrenzt ist (siehe Abb. 3-37, Seite 103).

4.4.3 Charakterisierung des cytosolisch spaltbaren Peptids

Die funktionelle Charakterisierung der rekombinant hergestellten, cytosolisch spaltbaren Sequenzen war nicht Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit. Durch verschiedenartig präparierte Cytosolfractionen konnte aber bereits an einem anderen Adapterkonstrukt mit Saporin als toxischer Komponente eine Spaltung des CSP beobachtet werden.¹⁾

4.4.4 Transferrinrezeptorbindung des TRBP

Wie bereits in Abschnitt 3.8, Seite 104 näher erläutert wurde, gibt es für die Verwendung eines anderen Rezeptorliganden anstelle des natürlichen Tf zur Herstellung vollständiger

¹⁾ siehe Publikationsverzeichnis Heisler, I. *et al.* A specific cytosolic cleavable peptide for improved trapping inside the cytosol. *Eur J Biochem* **268 S 1**, 178 (2001)

Immunoadaptortoxine eine Reihe von Gründen. Die Verwendung eines internalisierungsfähigen, TfR-bindenden Peptids stellt daher eine vielversprechende Alternative zu Tf dar.

Zunächst sollte das von Lee *et al.* für entsprechende GFP-Konstrukte beschriebene Bindungs- und Endocytoseverhalten des Transferrinrezeptor-Bindungspeptids (TRBP) nachvollzogen werden.¹⁵¹ Dazu wurden molekularbiologisch mehrere eGFP-Konstrukte hergestellt, deren verschiedene Komponenten entweder mit einem Adapter oder direkt verbunden waren (siehe Abschnitt 3.8.3, Seite 109). Die adapterbasierten eGFP-Konstrukte zeigten im Rahmen ihrer Aufreinigung eine ausgeprägte Instabilität, die auf eine Spaltung des ESP zurückzuführen war. Obwohl für die Expression der *OmpT*-defiziente *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet wurde, könnten homologe bakterielle Proteine wie beispielsweise *OmpP* für die Spaltung der beiden Arg-Reste im Furinmotiv von DT verantwortlich sein.¹⁷⁹ Dieses Verhalten veranschaulichte erneut die bereits mehrfach diskutierte Bedeutung einer geeigneten, räumlichen Ausrichtung bestimmter funktioneller Sequenzen. Offensichtlich liegen sowohl die Disulfidgruppen bei chemischer Kopplung als auch das ESP in rekombinant hergestellten GFP-Konstrukten räumlich so exponiert, daß für beide eine erhöhte Spaltungsneigung gegenüber anderen Konstrukten resultiert.

Unter Verwendung von eGFP und eGFP-TRBP wurden die funktionellen Tests somit analog zu Lee *et al.* durchgeführt, bei dem als Testsystem überwiegend ein CEF-Zelllinienpaar (Fibroblasten aus Hühnchenembryonen) verwendet wurde, das den hier verwendeten TRVb-Zellen sehr ähnlich ist. Die TfR-vermittelte Bindung und Endocytose von GFP-TRBP gegenüber GFP wurden bei Lee *et al.* durch verschiedene Immunfluoreszenzuntersuchungen gezeigt, wobei fluoreszenzmarkiertes Tf jeweils als Vergleich diente. An CEF-hTfR-Zellen wurde sowohl bei 4 °C (keine Endocytose) als auch bei 37 °C ein ähnliches Verteilungsmuster von GFP-TRBP und Tf beobachtet, welches in Kolokalisationsstudien (nur bei 37 °C) bestätigt wurde.¹⁵¹

Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzstudien mit eGFP und eGFP-TRBP konnten die beschriebenen Verteilungsmuster an HepG2-Zellen weder unter Methanolfixierung noch unter analoger Versuchsgestaltung zu Lee *et al.* reproduziert werden (siehe Abschnitt 3.8.4, Seite 110). Als Kontrolle für die Methodik wurde zusätzlich Tf eingesetzt. Aufgrund der beobachteten zellulären Verteilungsmuster erschien es jedoch sehr unwahrscheinlich, daß die Zellpräparation nach Lee *et al.* tatsächlich eine Permeabilisierung der Zellen bewirkt.

Das TfR-Bindungsverhalten von eGFP-TRBP wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich mittels eines ELISA überprüft (siehe Abschnitt 3.8.4, Seite 110). Dabei konnte bedingt durch das TRBP keine bessere TfR-Bindung als bei eGFP selbst beobachtet werden. Vermutlich werden durch eine aus sterischen Gründen geschützte Lage des Bindungspeptids die Anforderungen für eine Rezeptorbindung nicht erfüllt. Auch diese Daten stehen im Widerspruch zu den an CEF-hTfR-Zellen mit Radioliganden beschriebenen Dissoziationskonstanten von GFP und GFP-TRBP, die sich ungefähr um den Faktor 10^4 unterscheiden.¹⁵¹ Untersuchungen mit entsprechenden Konstrukten mit Adapter, der in diesem Fall als Abstandhalter weitere

Informationen bezüglich der Rezeptorbindung versprach, konnten aufgrund der hohen Instabilität dieser Konstrukte nicht durchgeführt werden.

Unter Berücksichtigung der bereits mehrfach diskutierten Bedeutung einer geeigneten räumlichen Orientierung verschiedener Sequenzen eines Moleküls zueinander wurden weitere TRBP-Konstrukte synthetisiert, um dessen Bindungseigenschaften auch in einem anderen molekularen Zusammenhang zu untersuchen. Mit verschiedenen DTA-Konstrukten zeigte sich, daß die TRBP-basierten Konstrukte gegenüber denen ohne TRBP eine stärkere TfR-Bindung aufweisen (siehe Abb. 3-44, Seite 113).

Da die cytotoxische A-Kette nicht für den Zellkontakt verantwortlich ist und die B-Kette nicht an TfR bindet (siehe Abschnitt 1.6.2, Seite 9), entsprach die fehlende Bindung von DT den Erwartungen. Während sich das Konstrukt JK 11 ebenfalls erwartungsgemäß verhielt, zeigte JK 15 welches sich nur durch eine andere Transfersequenz von JK 11 unterscheidet (TLM statt MTS), eine höhere Affinität zum TfR. Dieses Ergebnis ließ sich nach den vorliegenden Betrachtungen zunächst nur auf die TLM zurückführen. Das DTA-analoge Konstrukt JK 16 zeigte im Gegensatz zu DT ein unspezifisches Bindungsverhalten. In diesem Zusammenhang ist die fehlende Bindung von JK 16 an Blaugel erneut erwähnenswert (siehe Abschnitt 4.4.1, Seite 125), denn unter Umständen trägt in beiden Fällen die rekombinante Herstellung der adapterfreien A-Kette zu den veränderten Bindungseigenschaften bei. Allerdings können die strukturellen Veränderungen durch diese Art der Herstellung nicht sehr gravierend sein, da in beiden Fällen die enzymatische Aktivität unverändert erhalten bleibt. Im Zusammenhang mit der Blaugelbindung wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß allein die Adaptersequenzen für die Bindung an Blaugel oder andere Matrizes verantwortlich sind. Die Vermutung läßt sich hier jedoch nicht bestätigen, da entsprechende Konstrukte auf der einen Seite zwar unspezifisch (JK 15) auf der anderen Seite aber auch gar nicht binden (JK 11).

Von den TRBP-enthaltenden Konstrukten zeigte JK 22 eine starke Bindung, gefolgt von JK 21 und JK 23. Der Vergleich von JK 22 und JK 21 verdeutlicht, daß durch den Adapter, der vermutlich als Abstandhalter für eine bessere räumliche Exposition des TRBP sorgt, eine höhere Bindung resultiert. Die Ergebnisse von JK 23 zeigen jedoch deutlich, daß die in einem Abstandhalter verwendeten Sequenzen ebenfalls einen wesentlichen Beitrag zur Bindungsaffinität leisten. JK 22 und 23 unterscheiden sich nur in der Art der Membrantransfersequenz, wobei die MTS vor allem durch eine Anhäufung von unpolaren Aminosäuren gekennzeichnet ist, während die TLM fünf Aminosäuren mit polaren Seitenketten enthält (siehe Abschnitt 7.2.1.1, Seite 148). Unter Umständen stellt die MTS aufgrund der nicht vorhandenen Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen einen wesentlich besseren Abstandhalter dar als die TLM. Bei der TLM scheint sich der Effekt geradezu umzukehren, so daß die Struktur derart kompakt und stabilisiert ist, daß ohne Adapter (JK 21) eine bessere Bindung beobachtet werden kann als mit diesem.

Untersuchungen zur der Spaltbarkeit des ESP – die Spaltbarkeit wurde hier zellfrei mit einem MTS-basierten Adapter nachgewiesen – sind unter Berücksichtigung dieser Aspekte ebenfalls für die anderen Transferpeptide aufschlußreich. Entscheidender Parameter für die Zugäng-

lichkeit und Spaltung des ESP im Kontext mit der TLM dürfte sein, ob das CSP, das ESP oder beide zusammen in Wechselwirkung mit der Transfersequenz treten und schließlich zu einer engeren räumlichen Packung der Struktur beitragen.

Nach Lee *et al.* ist die TRBP-Bindungsstelle am Rezeptor nicht identisch mit der Tf-Bindungsstelle.¹⁵¹ Somit waren Kompetitionsstudien von TRBP-haltigen Konstrukten mit Tf im Rahmen dieser Arbeit nicht erforderlich. Die Bindung des TRBP an den TfR stellt einen relevanten Parameter für die angestrebte Verwendung in Immunotoxinen dar. Der sehr ähnliche Verlauf der Bindungskurven von TRBP-basierten und TRBP-freien Konstrukten im Bereich von 0–500 ng zeigt in diesem Zusammenhang, daß bei der Entwicklung des Adapters versucht werden sollte, eine sterische Konformation zu erzielen, die unabhängig von der Natur der Liganden diesem genügend Raum bietet, seine Bindungsaktivität voll zu entfalten.

4.4.5 Charakterisierung des Membrantransfers

Mit der Fertigstellung vollständiger Immunoadapterkonstrukte konnte schließlich die von Anfang an als kritischster Parameter geltende Transferaktivität der verwendeten Trojanischen Peptide untersucht werden. Für die Untersuchung der genauen Funktionsweise des Adapters in der Zellkultur sind sowohl die Geschwindigkeit als auch die Spezifität der ESP-Spaltung sehr wichtig, doch stellen sie kein entscheidendes Kriterium dar: Im dem Fall, daß das ESP nicht ausreichend schnell gespalten wird, wandert ein intaktes Immunoadapterkonstrukt an die Zelloberfläche zurück. In Bezug auf die Spezifität ist eine Spaltung, die nicht erst im Endosom sondern bereits an der Zelloberfläche stattfindet, schon eher kritisch. Die entstehenden Fragmente verfügen über einen universellen Zellaufnahmemechanismus und können somit unerwünschte Effekte verursachen. Jedoch ist zu beachten, daß die Untersuchungen zunächst nur an einer homogenen Zellpopulation durchgeführt werden sollten und daß eine Optimierung der spaltbaren Sequenzen auch noch zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen kann. Unter Beachtung der Literaturdaten könnte es ohnehin sein, daß ein Transfer direkt durch die Cytoplasmamembran nach Spaltung des ESP an der Zelloberfläche am wahrscheinlichsten ist, denn für keine der verwendeten Transfersequenzen wurde bislang eine Translokation durch die endosomale Membran beschrieben.

Potentiell kann der durch die verwendeten Trojanischen Peptide vermittelte Transfer auch in umgekehrter Richtung erfolgen. Deshalb wird die Akkumulation der Toxindomäne im Cytosol erst durch eine Spaltung des CSP erzielt. Im Falle von DTA kann dann bereits ein einziges, intrazellulär lokalisiertes Molekül aufgrund seiner hohen Aktivität eine Inhibition der Proteinbiosynthese und nachfolgend den Zelltod bewirken.⁴⁵ Somit sind wenige Moleküle DTA wesentlich besser mittels ihrer Cytotoxizität als mit immunologischen Verfahren detektierbar. Der mit den Immunoadaptertoxinen und entsprechenden Kontrollen durchgeführte FDA-Assay erbrachte sehr beachtenswerte Ergebnisse (siehe Abb. 3-46, Seite 116). DT zeigte als Positivkontrolle eine ausgeprägte cytotoxische Aktivität an HepG2-Zellen und an beiden TRVb-Zelllinien, die sich in einem Abfall der Überlebensindizes zeigte. Alle anderen, getesteten Konstrukte zeigten keinerlei Einfluß auf die Überlebensindizes.

Ausgehend von dem hier vorgestellten Modell zur zellulären Aufnahme von Immunoadapter-toxinen (siehe Abb. 1-8, Seite 23) können ganz verschiedene Faktoren für das Ausbleiben der cytotoxischen Wirkung verantwortlich sein:

1. Die TRBP-Bindung und Endocytose mittels TfR ist zu schwach. Nach Lee *et al.* liegen zwar GFP-TRBP-Konstrukte mit Tf in der Zelle kolokalisiert vor,¹⁵¹ doch konnten diese Ergebnisse unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In Verbindung mit DTA konnte zwar eine Affinität des TRBP für gereinigten TfR gezeigt werden, allerdings bleibt das Ausmaß der Spezifität dieser TfR-Bindung aufgrund der beschriebenen, unterschiedlichen Bindungsareale von TRBP und Tf am Rezeptor noch Gegenstand der Diskussion. Von Lee *et al.* wurde die TfR-Spezifität nur an zwei verschiedenen Zelllinien gezeigt (CEF-Zellen, siehe oben), die beide nicht humanen Ursprungs sind. Die Ergebnisse von Versuchen an humanen HeLa-Zellen wurden nicht dargestellt. Überhaupt fehlt bei den Versuchen von Lee *et al.* ein zellfreies Verfahren zum Nachweis einer starken und spezifischen Bindung wie beispielsweise ein ELISA oder eine Koimmunpräzipitation.
2. Bei einer nur schwach vorhandenen Bindung an den TfR kann in der Zellkultur zusätzlich das *Shedding* des Zielantigens (Abspaltung einer nicht membranständigen, löslichen Form) zu einem entscheidenden Einflußfaktor werden. Liegt zuviel lösliches Antigen im Medium vor, so besteht die Gefahr, daß das Immunoadapterkonstrukt abgefangen wird, bevor es die Zielzellen erreicht. Da sowohl im Kulturmedium von HepG2- wie auch in dem von TRVb-Zellen löslicher TfR nachgewiesen werden konnte,^{180,181} liegen auch hier potentielle Ursachen für den ausbleibenden cytotoxischen Effekt vor.
3. Die Spaltung des ESP ist zu langsam. Da für die Immunoadapterkonstrukte diesbezüglich keine Kinetik durchgeführt wurde, können hier nur die Untersuchungen zur Stabilität der Konstrukte nach 48stündiger Inkubation mit den Zellen herangezogen werden (siehe Abschnitt 3.8.5.2, Seite 114), bei denen eine ESP-Spaltung für die TRBP-haltigen Konstrukte gezeigt werden konnte. Der durch die Spaltung verursachte Größenunterschied war bei den TRBP-haltigen Konstrukten JK 22 und 23 bereits so gering, daß für die analogen TRBP-freien Konstrukte JK 11 und 15 keine Aussage bezüglich einer Spaltung möglich war. Allerdings ist auch hier eine Spaltung wahrscheinlich. Die Inhibition der Trojanischen Peptide könnte somit allenfalls noch auf die an ihrem C-Terminus von dem ESP verbliebenen Aminosäuren zurückzuführen sein. Doch ist dies eher unwahrscheinlich, da kleine, fusionierte *Tags* in der Regel auch ohne Einfluß bleiben.
4. DTA wird durch zelluläre Komponenten inaktiviert. Bei erfolgreicher Translokation ins Cytosol vermittelt die A-Kette von DT eine ADP-Ribosylierung am EF II, wodurch dieser irreversibel inhibiert wird. Zusätzlich wird in den Zellen die Apoptose durch bislang nicht geklärte Mechanismen eingeleitet.¹⁶⁴ Nach neueren Untersuchungen kann die Haupteffektorcaspase Caspase 3 jedoch auch DTA spalten und so inaktivieren. Als Schnittstelle wird die Aminosäure Asp-8 in DT angegeben, wobei das gesamte Motiv mit Asp-Val-Val-Asp (AS 4–8 von DT) dem Konsensusmotiv der Caspase 3 (Asp-Glu-Val-Asp) sehr ähnlich ist.¹⁶² Allerdings ist aufgrund der irreversiblen Hemmung von EF II und der hohen

Cytotoxizität von DT *in vivo* nicht davon auszugehen, daß der dargestellte Effekt schnell und effizient genug abläuft, um für die nicht detektierte Toxizität der hier verwendeten Konstrukte verantwortlich zu sein.

5. Der Transfer findet nicht statt oder das Konstrukt wird wieder aus der Zelle geschleust. Da der für die Trojanischen Peptide beschriebene, oftmals temperaturunabhängige Transfer keine Endocytose und keine Ligandenbindung voraussetzt, können Konstrukte, bei denen das ESP gespalten ist, auch ohne Ligand durch die Cytoplasmamembran in die Zellen gelangen. Bei ausbleibender Cytotoxizität ist somit ein nichterfolgter Transfer oder ein Transfer mit anschließendem Rücktransport in den Extrazellularraum denkbar. Mögliche Mechanismen dafür sind ein ebenso passiver Transport aus der Zelle hinaus wie in die Zelle hinein oder ein aktiver Exportmechanismus. Passive Mechanismen sind insofern unwahrscheinlich, da mit einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Intra- und Extrazellularraum zu rechnen ist. Durch die cytosolisch spaltbare Sequenz sollte die Verteilung sogar zugunsten einer Akkumulation im Cytosol verschoben sein. Als aktive Mechanismen kommen solche in Frage, die bereits in Verbindung mit multiresistenten Tumorzellen beschrieben worden sind (z. B. P170-Glykoprotein).^{182,183}

Insgesamt betrachtet sind die wahrscheinlich wichtigsten Faktoren, die für die ausgebliebene cytotoxische Aktivität der hergestellten Immunoadaptortoxine verantwortlich sind, sowohl die schwache TfR-Bindung von TRBP-Konstrukten in der Zellkultur als auch die von Trojanischen Peptiden vermittelte Translokation der A-Kette von DT ins Cytosol. Bestätigt wird diese Vermutung durch Ergebnisse von Falnes *et al.*,¹⁸⁴ nach denen die Transferpeptide Tat und VP 22 (siehe Tab. 1-3, Seite 20) nach N-terminaler genetischer Fusion mit DTA zwar eine Zellbindung zeigen, die vermutlich durch ihre basischen Zentren und deren Affinität zu Heparanen auf der Zelloberfläche bedingt ist, jedoch im Konzentrationsbereich von 10^{-13} – 10^{-10} M keinerlei cytotoxische Aktivität gegenüber Vero-Zellen aufweisen. Erst in Verbindung mit der B-Kette konnte für Tat-DT ein cytotoxischer Effekt vergleichbar dem von reinem DT gemessen werden (IC_{50} -Wert von circa 10^{-13} M), wobei die Aufnahme von Tat-DTA über den toxineigenen Aufnahmemechanismus erfolgte. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß eine Tat-vermittelte Aufnahme von DTA – falls sie überhaupt stattfindet – mindestens um den Faktor 10 000 schwächer ist als die über den toxineigenen Mechanismus.¹⁸⁴

N-terminal an DTA fusioniert bleiben die beiden Transferpeptide Tat und VP 22 also ohne Effekt auf dessen Translokation. Ein ähnliches Verhalten der in dieser Arbeit verwendeten Transferpeptide MTS und TLM könnte somit für den ausgebliebenen cytotoxischen Effekt der hergestellten Konstrukte verantwortlich sein, wobei die Peptide hier jedoch C-terminal fusioniert sind. Da im Rahmen dieser Arbeit mehrfach gezeigt werden konnte, daß derartige Fusionsanteile ohne Einfluß auf die ADP-Ribosylierungsaktivität von DTA bleiben, könnten Studien mit C-terminal fusioniertem Tat und VP 22 für das hier verfolgte Adapterkonzept sehr hilfreiche Anhaltspunkte darüber liefern, ob ein Einsatz dieser beiden Transfersequenzen sinnvoll ist.

4.5 Ausblick

Da in der vorliegenden Arbeit wiederholt gezeigt werden konnte, daß die enzymatisch aktive A-Kette von DT durch C-terminale Fusionsanteile nicht an ADP-Ribosylierungsaktivität verliert, stellt sie als rein katalytische, hochaktive Enzymdomäne ein ausgezeichnetes Modellsystem zur Testung der hergestellten molekularen Adapter dar. Trotzdem sollte in Betracht gezogen werden, daß – obwohl durch Verkleinerung des für die Aufnahme verantwortlichen Anteils mit einer verbesserten Tumorpenetration zu rechnen ist – eventuell andere Toxine noch intensiver von dem hier vorgestellten Adapterkonzept profitieren können. Der sehr effektive toxineigene Transfermechanismus von DT ist mit großer Wahrscheinlichkeit nur schwer durch ein anderes System zu verbessern, während bei z. B. ribosomeninaktivierenden Toxinen mit *Single-chain*-Struktur (Saporin, Dianthin), die über keinen eigenen Aufnahme-mechanismus verfügen, der Adapter einen wesentlichen Beitrag zu ihrer zellulären Aufnahme leisten könnte. Für solche Toxine und auch für sehr polare, niedermolekulare Zytostatika und Oligonukleotide, die nicht in der Lage sind, passiv durch die Zellmembran zu diffundieren, stellen die entwickelten Adapter ein vielversprechendes neues Konzept dar.

Ein ebenfalls wichtiger Schritt zur Optimierung der vorliegenden Immunoadapterkonstrukte dürfte die Verwendung anderer tumorspezifischer Liganden sein. Hier bieten sich kleine tumorspezifische Liganden wie beispielsweise Interleukin 2 oder der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) an, deren Verwendung jedoch eine Änderung des zellulären Testsystems erfordert. Im Falle einer weiteren Verwendung von Transferrinrezeptor als tumorspezifisches Antigen stellt neben Transferrin selbst auch HFE eine Alternative dar. Es handelt sich dabei um ein Genprodukt, das mit dem Auftreten der Hämochromatose in Verbindung gebracht wird.¹⁸⁵ Durch seine Bindung an den TfR vermindert es dessen Bindungsaffinität für eisenbeladenes Transferrin. Für die Rezeptorbindung von HFE wird dessen $\alpha 1 / \alpha 2$ -Domäne verantwortlich gemacht.¹⁸⁶ Sie ist strukturell gut von den übrigen Domänen abzugrenzen¹⁸⁷ und erscheint daher mit einer Größe von circa 20 kDa für eine Anwendung als tumorspezifischer Ligand in Immunoadapterkonstrukten sehr geeignet.

Erste Untersuchungen mit nach diesen Vorgaben optimierten Adapterkonstrukten wurden bereits durchgeführt und lieferten sehr vielversprechende Ergebnisse. So konnte mit einem Konstrukt bestehend aus Saporin, einem TLM-basierten Adapter und EGF eine starke, zellspezifische Toxizität nachgewiesen werden.¹⁾

Neben der Testung verschiedener Toxine und Liganden ist schließlich auch der Austausch der verwendeten Transferpeptide sinnvoll. Da der postulierte Aufnahmemechanismus für Immunoadapterkonstrukte zunächst eine Endocytose beinhaltet, gilt insbesondere die Verwendung von Peptiden mit endosomalem Wirkort als erfolgversprechend. Diese Sequenzen werden erst durch die pH-Wertänderung in den Endosomen mittels Konformationsänderung und Aus-

¹⁾ siehe Publikationsverzeichnis Heisler, I. *et al.* A cleavable adapter to reduce non-specific cytotoxicity of recombinant immunotoxins. *Int J Cancer* (eingereicht)

bildung einer amphiphilen, helikalen Struktur aktiviert und führen durch Porenbildung in der endosomalen Membran zu einer Aufnahme ins Cytosol. Sie sind im Gegensatz zu den nicht pH-sensitiven Sequenzen, die sich vor allem durch basische Zentren auszeichnen, meist durch das Vorhandensein von sauren Aminosäuren gekennzeichnet. Untersuchungen bezüglich einer Anwendbarkeit solcher Peptide für verschiedene *Targeting*-Systeme gehen unter anderem von den Peptiden HA 2 (aus dem Hämagglutinin des *Influenza-Virus*)¹⁸⁸ und KFT 25 (aus dem Protein G des vesikulären *Stomatitis-Virus*)¹⁸⁹ aus, weiterhin finden synthetische Modellpeptide (z. B. GALA)¹⁹⁰ Verwendung.