

5 ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund der schwerwiegenden Nebenwirkungen von herkömmlichen Zytostatika gewinnen immuntherapeutische Verfahren bei der Behandlung von Krebserkrankungen zunehmend an Bedeutung. Die Verwendung von Immunotoxinen stellt dabei ein vielversprechendes Konzept dar. Das antitumorale Potential dieser Verbindungen, die sich aus einem tumorspezifischen Antikörper, Antikörperfragment oder Liganden und einer hochaktiven, toxischen Domäne eines Proteintoxins zusammensetzen, wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dies sind beispielsweise die Selektivität des zielzellspezifischen Liganden, die cytotoxische Aktivität der katalytisch aktiven Domäne eines Proteintoxins, die Immunogenität, Toxizität und Stabilität des Gesamtkonstruktes und dessen Fähigkeit zur effektiven Tumorpenetration, die sich umgekehrt proportional zu seiner Größe verhält.

Bereits vorhandene Immunotoxine auf der Basis von Diphtheriatoxin oder *Pseudomonas* Exotoxin beinhalten sowohl die cytotoxische Domäne als auch die toxineigene Translokationsdomäne. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten molekulare Adapter entwickelt werden, die die toxineigene Translokationsdomäne ersetzen und zu einer effektiven sowie irreversiblen Aufnahme der reinen toxischen Domäne ins Cytosol der Zielzellen führen. Der Adapter besteht aus einem toxinunabhängigen Membrantransferpeptid (Trojanisches Peptid), das N-terminal von einer cytosolisch und C-terminal von einer endosomal spaltbaren Bindung flankiert wird.

Die zelluläre Aufnahme eines derartigen Immunoadaptertoxins kann man sich somit wie folgt vorstellen: Bedingt durch den tumorspezifischen Liganden erfolgt zunächst die Internalisierung des Gesamtkonstruktes mit anschließender Spaltung der endosomal spaltbaren Bindung. Dadurch wird das Trojanische Peptid aktiviert und vermittelt den Transfer der cytotoxischen Domäne ins Cytosol. Nach Spaltung der cytosolisch spaltbaren Bindung akkumuliert die cytotoxische Komponente, da sie durch die Freisetzung der Transfersequenz nicht mehr membrangängig ist. Angelangt an ihrem Wirkort, dem Cytosol, führt eine durch die toxische Domäne vermittelte Inhibition der Proteinbiosynthese schließlich zum Zelltod.

Als cytotoxisches Agens wurde Diphtheriatoxin verwendet, dessen enzymatisch aktive A-Kette sowohl mittels proteinchemischer als auch mittels rekombinanter Methoden erfolgreich

dargestellt werden konnte. Mit einem einfach und schnell durchführbaren, nichtradioaktiven Assay konnte für alle Diphtheriatoxinkonstrukte eine toxinvermittelte ADP-Ribosylierung von Elongationsfaktor II nachgewiesen werden, durch die *in vivo* die Proteinbiosynthese inhibiert wird. Dabei konnte erstmalig gezeigt werden, daß C-terminale Fusionsanteile mit einer Größe von bis zu 5 kDa ohne Einfluß auf die enzymatische Aktivität der A-Kette von Diphtheriatoxin bleiben.

Als tumorspezifisches Antigen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Transferrinrezeptor verwendet. Mit Hilfe eines neu entwickelten, nichtradioaktiven Assays zur Quantifizierung von Transferrinbindungsstellen konnten bekannte, mit Radioliganden ermittelte Rezeptordichten auf einer humanen Hepatokarzinomzelllinie und zwei weiteren Zelllinien bestätigt werden. Für ein aus zwölf Aminosäuren bestehendes, transferrinunabhängiges Peptid, welches im Rahmen dieser Arbeit den natürlichen, tumorspezifischen Liganden Tf ersetzen konnte, ließ sich in Verbindung mit verschiedenen Toxinkonstrukten erstmalig eine konzentrationsabhängige Transferrinrezeptorbindung in einem zellfreien System zeigen.

Aufgrund der Instabilität der proteinchemisch synthetisierten Adapterkonstrukte wurde eine rekombinante Darstellungsweise entwickelt, mit der Immunoadaptortoxine effizient und mit einheitlicher Zusammensetzung dargestellt werden konnten. Die einzelnen Bestandteile des Adapters konnten erfolgreich über gerichtete Klonierungsprozesse synthetisiert werden. Die cytosolisch spaltbare Sequenz wurde dabei durch die Erkennungsmotive von Caspase 1 und 3 und einem in Hefezellen spaltbaren Tripeptid repräsentiert. Die endosomal spaltbare Sequenz setzte sich aus den in *Pseudomonas* Exotoxin und Diphtheriatoxin enthaltenen Erkennungsmotiven für die Protease Furin zusammen. Als Membrantransfersequenz fanden drei verschiedene Trojanische Peptide Verwendung (Penetratin, MTS und TLM).

Mit Hilfe von rekombinanter, humaner Furinconvertase konnte die beabsichtigte Spaltung der im Adapter verwendeten, endosomal spaltbaren Sequenz durch Furin oder furinähnliche Enzyme aus Membranfraktionen der Hepatokarzinomzelllinie HepG2-Zellen nachgewiesen werden, wobei die cytosolisch spaltbare Sequenz wie gewünscht unverändert blieb. Mit einer Halbwertszeit im Zellkulturmedium von circa vier Stunden konnte die Stabilität der rekombinant hergestellten, endosomal spaltbaren Sequenz gegenüber einem zuvor getesteten chemischen Crosslinker erheblich verbessert werden. In MTS-basierten Adapterkonstrukten konnte außerdem gezeigt werden, daß ein C-terminal fusionierter Ligand mit einer Größe bis zu 25 kDa ohne Einfluß auf die Spaltung der endosomal spaltbaren Sequenz bleibt.

Nach der erfolgreichen Darstellung verschiedener, vollständiger Immunoadapterkonstrukte wurden diverse Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung der verwendeten Membrantransfersequenzen durchgeführt. Mittels eines auf der Umsetzung von Fluoresceindiacetat basierenden Cytotoxizitätsassays, mit dem im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Zelllinien literaturkonforme IC_{50} -Werte für Diphtheriatoxin ermittelt werden konnten, wurde die Funktionalität des gesamten Adapters und insbesondere der verwendeten Membrantransfersequenzen untersucht. Dabei verfügten vollständige Immunoadaptortoxine interessanterweise nicht über die von ihnen erwartete cytotoxische Aktivität. Dieses Ergebnis kann

einerseits auf eine relativ schwache Rezeptoraffinität des verwendeten Liganden oder auf die von Beginn an als sehr kritischer Parameter geltende Transferaktivität der verwendeten Trojanischen Peptide zurückgeführt werden. Für die Zukunft ist daher die Untersuchung des cytotoxischen Potentials weiterer Konstrukte mit anderen tumorspezifischen Liganden und den verwendeten Transfersequenzen von großem Interesse. Erste, vielversprechende Hinweise diesbezüglich erbrachte in der Zwischenzeit ein auf den Daten dieser Arbeit basierendes Immunoadaptertoxin mit epidermalemem Wachstumfaktor als tumorspezifischer Ligand. Es zeigte neben einer ausgeprägten Zielzellspezifität auch die erhoffte cytotoxische Aktivität. Ebenfalls sehr aussichtsreich erscheint die Verwendung solcher Transfersequenzen, die erst unter den in den Endosomen vorherrschenden Bedingungen aktiviert werden.

Das hier erstmalig vorgestellte Adapterkonzept zur Optimierung von Immunotoxinen gestattet unter Zuhilfenahme von toxinunabhängigen, universellen Membrantransfermechanismen eine Akkumulation völlig unterschiedlicher polarer Biomoleküle in diversen Zielzellen und bietet damit die Möglichkeit seiner Anwendung auch im Rahmen anderer *Drug-Targeting*-Konzepte. In der vorliegenden Arbeit gelang es mit Hilfe von verschiedenen Modellsystemen für die einzelnen Adapterkomponenten und deren Liganden, wertvolle Erkenntnisse und hoffnungsvolle Ansätze für zukünftige Entwicklungen im Bereich der Tumorthherapie zu gewinnen.