

4 Diskussion

4.1 Festphasenassay zum Nachweis von ADP-Ribosylierungsaktivität

Präklinische Untersuchungen für neue tumortheraeutische Medikamente sind von besonderer Relevanz, da nur ein geringer Teil der Wirkstoffe tatsächlich geeignete Eigenschaften für weitere Analysen aufweist. Dabei ist die enzymatische Aktivität von Proteintoxinen ein wichtiges Charakteristikum, das bereits zu Beginn der Untersuchungen bestimmt werden sollte. Für N-Glycosidasen wie SAP oder Ricin ist in der Literatur ein quantifizierbarer Adenin-Freisetzungssassay beschrieben, der auch für chimäre Toxine anwendbar ist [84]. Dadurch kann die Qualität chimärer Toxine bereits in einem frühen Stadium kontrolliert werden. Für die ADP-ribosylierenden Proteintoxine DT und *Pseudomonas* Exotoxin ist bislang ein *In-vitro*-Assay zur Analyse der Übertragung von ADP-Ribose aus NAD^+ auf EF2 beschrieben, bei dem durch die Verwendung von biotinyliertem NAD^+ die erfolgte Modifikation immunologisch in einem Westernblot nachgewiesen wird [232]. Andere Nachweissysteme verwenden auch radioaktiv markiertes NAD^+ für den Nachweis der ADP-Ribosylierung im Westernblot [146]. Das Problem bei der Westernblot basierten Methode ist jedoch, dass die Effektivität der ADP-Ribosylierung anhand der Bandenintensität nur semiquantitativ abgeschätzt werden kann. Daher war eines der Ziele die Optimierung dieses Nachweises der Enzymaktivität in einem colorimetrischen Festphasensystem, um eine Quantifizierung der Reaktion zu ermöglichen. Das Prinzip des Nachweises konnte beibehalten werden, da die immunologische Detektion sich auch für den angestrebten colorimetrischen Festphasenassay eignet. Die Voraussetzung reinen EF2 zur Immobilisierung im Festphasensystem vorliegen haben zu müssen, konnte durch Verwendung von $^{\text{H}6}\text{EF2}$ erreicht werden. Der prinzipielle Nachweis der ADP-Ribosylierung wurde zuerst mit einer Nachweisgrenze von etwa 20 ng/ml DT geführt (Abb. 3.3). Nach Optimierung des Assays durch den Zusatz von BSA wurde dann schließlich auch die angestrebte Nachweisgrenze von 1 ng/ml DT erreicht (Abb. 3.5). Ohne das BSA lagert sich das NAD^+ möglicherweise auch unspezifisch an EF2 an und ruft Signale hervor, obwohl keine ADP-Ribosylierung erfolgt ist. Durch den Zusatz von GTP, das direkt an EF2 bindet [43], wurden die Signale der Proben mit und ohne DT verringert. Möglicherweise hat die Bindung von GTP an EF2 daher auch einen inhibitorischen Einfluss auf die ADP-Ribosylierbarkeit von EF2 durch DT. Die unspezifische Bindung von NAD^+ wurde zwar herabgesetzt, jedoch war vielleicht auch die Wechselwirkung zwischen DT und EF2 gestört. Durch die Optimierung mit BSA wurde ein äußerst

sensitiver Assay zur Detektion von DT- und *Pseudomonas* Exotoxinaktivität entwickelt. Dieser Assay ist daher sehr gut geeignet, verschiedene Deletionsmutanten von DT in Bezug auf ihre ADP-Ribosylierungsaktivität zu charakterisieren. Frühere Analysen zur Verwendung von Deletionsmutationen zeigten bereits für die katalytische Domäne von DT interessante Ergebnisse. Die Untersuchung verschiedener am N-Terminus verkürzter DT-Varianten belegte die essentielle Rolle der ersten fünf Aminosäuren für die Wirksamkeit. Durch Deletion wurde die Cytotoxizität inhibiert, obwohl die ADP-Ribosylierungseigenschaften erhalten blieben [28]. Bestimmte Mutationen der ersten beiden Aminosäuren waren überraschenderweise sogar in der Lage, die Aktivität der resultierenden DT-Mutanten zu steigern. Damit bieten sich viele Möglichkeiten, um in dem hier vorgestellten colorimetrischen Festphasenassay gezielte Mutationen zu charakterisieren und möglicherweise die katalytische Domäne genauer eingrenzen zu können. Ein ebenfalls im Festphasensystem durchgeführter Assay von Prentice *et al.* dient jedoch nicht dem sensitiven Nachweis der ADP-Ribosylierung durch Toxine, sondern nur zur Untersuchung der Bindung von *Pseudomonas* Exotoxin im Komplex mit NAD^+ an immobilisierten EF2 [160]. Im Gegensatz dazu bietet der Aufbau des ADP-Ribosylierungsassays auch die Möglichkeit, die ADP-Ribosylierung durch andere Toxine wie Pertussistoxin zu quantifizieren. Voraussetzung dafür ist die Aufreinigung des jeweiligen Substrates und seine Kopplung an die Festphase. Im Falle von Pertussistoxin wären dies GTP bindende Proteine. Die ADP-Ribosylierung kann mit dem biotinyliertem NAD^+ immunologisch wie hier beschrieben nachgewiesen werden.

Weitere Möglichkeiten zur Erhöhung der Sensitivität des etablierten Assays bieten sich an und wurden teilweise auch bereits untersucht. Durch Kopplung von EF2 spezifischen Antikörpern anstelle des EF2, könnte mehr EF2 immobilisiert werden und durch Erkennung geeigneter Epitope im EF2 der durch die Toxine ADP-ribosylierte Teil von EF2 optimal exponiert werden. Analysen mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper waren jedoch erfolglos, da der Antikörper den nativen EF2 nicht bindet (Daten nicht gezeigt). Ein geeigneter Antikörper zur Bindung von nativem EF2 war bisher nicht verfügbar. Da $^{\text{H}6}\text{EF2}$ verwendet wird, wurden auch mit Ni-NTA beschichtete Module für den colorimetrischen Festphasenassay verwendet, die jedoch auch nicht die erhofften Ergebnisse lieferten (Daten nicht gezeigt). Um eine weitere Steigerung der Sensitivität zu erhalten, könnten auch nur Teile von EF2 immobilisiert werden, die jedoch ADP-ribosylierbar sein müssen [44, 145]. Weiterhin könnten auch kurze, als Substrat geeignete synthetische Peptide aus EF2 verwendet werden, die dann möglicherweise immer noch ADP-ribosyliert werden. Durch die geringere Größe der Teile von EF2 oder der Peptide könnte wesentlich mehr ADP-ribosylierbares Substrat eingesetzt werden und damit die Sensitivität gesteigert werden. Voraussetzung für die ADP-Ribosylierung ist jedoch immer das modifizierte Histidin, die Aminosäure Diphthamid [40]. Für EF2-Fragmente, die durch

proteolytischen Verdau gewonnen wurden, stellt die Notwendigkeit der Anwesenheit eines Diphthamids kein Problem dar, da dies in diesem Fall durch natürliche Synthese hergestellt wird. Für die synthetischen Peptide müsste jedoch zuerst die Aminosäure Diphthamid zugänglich sein, damit eine ADP-Ribosylierung der Peptide erfolgen kann. Neben der Anwendung für die Aktivitätsanalyse von chimären Toxinen bietet sich dieser Assay natürlich auch für die Detektion von DT zu diagnostischen Zwecken an. Da Diphtherie auch heute trotz Möglichkeiten zur Impfung gerade in Osteuropa noch häufig auftritt, wäre ein hochsensitiver und schnell durchführbarer Assay geeignet, die Detektion von aktivem DT zu erleichtern. Bisherige Assays beruhen üblicherweise auf der PCR basierten Detektion der Gene von *C. diphtheriae* [48] oder der immunologischen Detektion von DT [49]. Für den Nachweis von DT müssen jedoch über mehrere Tage Kulturen aus Patientenproben anwachsen, damit genug Toxin für die Detektion vorliegt. Jedoch tragen nicht alle Stämme die DNA für DT und nicht alle Stämme exprimieren aktives DT [47]. Nur bei einer Expression von aktivem DT besteht jedoch akute Lebensgefahr und es muss sofort mit einem Antitoxin gegen DT behandelt werden. Um aktives DT zu erkennen, könnte der hier entwickelte sensitive Festphasenassay eingesetzt werden. Der einzige Nachweis von aktivem DT bestand in der Injektion von möglicherweise DT haltigen Patientenproben in Meerschweinchen, wurde jedoch in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts durch die oben genannten Methoden ersetzt, die jedoch nicht aktives DT nachweisen [2]. Als schnelle, einfache und hochsensitive Methode kann der optimierte Festphasenassay zur Detektion von aktivem DT eingesetzt werden und bietet durch seine Flexibilität eine Vielzahl von Anwendungen.

4.2 Chimäre Toxine gegen Interleukin-2 Rezeptor

Eine erhöhte Expression des IL2R bei Lymphomen und Leukämien begründet das Interesse an IL2R als Ziel von antitumoralen Wirkstoffen. Daher war eines der Ziele der Doktorarbeit die Entwicklung und Charakterisierung neuer chimärer Toxine, die an IL2R binden. Die drei chimären Toxine mit IL2(35), IL2 und dem *single chain Fv*-Fragment RFT5 wurden erfolgreich kloniert und exprimiert (Abb. 3.7). Bei den Untersuchungen zur *In-vitro*-Aktivität von DTA konnte für alle drei Konstrukte erfolgreich die enzymatische Aktivität von DT nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Bei der Charakterisierung der Cytotoxizität von IL2R exprimierenden Zellen wurde jedoch für keines der chimären Toxine eine cytotoxische Wirkung festgestellt (Abb. 3.9). Um dieses Problem weiter zu analysieren, wurde die Bindung der chimären Toxine an die Zellen im FACS detektiert (Abb. 3.10). Offensichtlich waren die chimären Toxine jedoch nicht in der Lage, an die Zellen wesentlich stärker zu binden als eine Kontrolle ohne Ligand. Mit diesem Ergebnis kann auch die mangelnde Cytotoxizität erklärt werden, da die Konstrukte ohne erfolgte Bindung an den IL2R nicht von den Zellen aufgenommen werden können. Die

mangelhafte Bindung muss jedoch aus strukturellen Behinderungen der Proteine erwachsen, da in der Literatur für die Liganden eine Bindung an IL2R beschrieben wurde [46, 52, 231]. Für IL2 und RFT5 sind sogar chimäre Toxine beschrieben, die erfolgreich IL2R exprimierende Zellen töten konnten. IL2 ist Teil des bereits zugelassenen Medikamentes Ontak [200], bei dem IL2 sogar wie hier mit DT verknüpft ist. Jedoch wurde in Ontak auch die Translokationsdomäne von DT verwendet, während hier ausschließlich die katalytische A-Kette in Kombination mit einem MTP eingesetzt wurde. Das *single chain Fv*-Fragment RFT5 gegen die α -Untereinheit von IL2R wurde ebenfalls bereits erfolgreich als Teil eines Immunotoxins veröffentlicht [12]. Jedoch wurde in dieser Veröffentlichung die katalytische Domäne und die Translokationsdomäne von *Pseudomonas* Exotoxin eingesetzt. Die IL2(35)-Sequenz stellt eine Kombination aus zwei veröffentlichten Sequenzen dar. Von Eckenberg *et al.* wurde beschrieben, dass die ersten 30 Aminosäuren von IL2 für die Bindung von IL2 an die β -Untereinheit des IL2R verantwortlich sind [46]. Der IL2R kann in zwei Formen als funktionaler Rezeptor mit unterschiedlichen Affinitäten vorliegen. Als hochaffiner Komplex aus allen drei Untereinheiten oder als Komplex mit intermediärer Affinität aus den β - und γ -Untereinheiten [66]. Eine weitere Veröffentlichung von Zav'yalov *et al.* belegte die Relevanz der Aminosäuren 27–35 von IL2 für die Bindung mit dem Komplex aus β - und γ -Untereinheit [231]. Die Kombination der beiden Sequenzen zu IL2(35) mit den ersten 35 Aminosäuren von IL2 erschien sinnvoll, um eine geeignete Bindung an IL2R zu erhalten. Durch einen Vergleich mit dem vollständigen IL2 sollte eine Abschätzung erfolgen, ob die Verkleinerung des Liganden noch eine ausreichende Bindung des chimären Toxins ermöglicht und eine Verwendung als gerichtete Bindungsstruktur rechtfertigt. Da jedoch keines der chimären Toxine in der Lage war, wesentlich stärker an die Zellen zu binden als die Kontrolle und dadurch auch kein cytotoxischer Effekt hervorgerufen werden konnte, ist zu vermuten, dass durch die Kombination mit DTA und dem Adapter die Bindung an IL2R verhindert wurde. Dabei muss die Aufnahme der chimären Toxine nicht sehr effektiv sein, da bereits wenige Toxinmoleküle in einer Zelle ausreichen, um die Proteinbiosynthese vollständig zu inhibieren und die Zelle zu töten [227]. Die verwendeten L540Cy-Zellen können kein Problem für die geringe Bindung und Aufnahme dargestellt haben. Sie wurden in der Literatur als T-Zelllymphomzelllinie beschrieben [101], die auch in Untersuchungen mit Immunotoxinen aus RFT5 und *Pseudomonas* Exotoxin erfolgreich eingesetzt wurde [11]. Cytotoxizitätsassays mit den L540Cy-Zellen und Immunotoxinen mit RFT5 bestätigten den erwarteten Erfolg durch starke Bindung und daraus resultierender hoher Cytotoxizität (Daten nicht gezeigt). Demnach wird wahrscheinlich durch eine bestimmte Konformation von DTA die Bindung der hier verwendeten Liganden an ihren Rezeptor verhindert. Ein Indiz für ein mögliches Behindern der korrekten Ausbildung der Ligandenstruktur durch DTA bildet die Tatsache, dass die chimären

Toxine in den spaltbaren Sequenzen nicht durch Furin oder apoptotische Zelllysate gespalten werden konnten (Daten nicht gezeigt). Obwohl die Aktivität von DTA in den Fusionsproteinen vollständig erhalten blieb, sind die übrigen Funktionen und insbesondere die Rezeptorbindung nicht vorhanden. Da die Proteine alle denaturierend aufgereinigt werden mussten, ist es möglich, dass bei der Renaturierung zwar lösliche aber dennoch falsch gefaltete Proteine gebildet wurden. Es ist anzunehmen, dass Fusionsproteine, für die nur die katalytische Domäne von DT verwendet wird, auch eher unlöslich sind oder ungünstige intramolekulare Verbindungen ausbilden. In der Literatur sind bisher üblicherweise zwei Varianten von DT in chimären Toxinen verwendet worden, die jeweils die Translokationsdomäne von DT beinhalteten. Einerseits die ersten 389 Aminosäuren von DT in dem bereits zugelassenen Wirkstoff Ontak [62] und außerdem die ersten 486 Aminosäuren von DT in dem Konstrukt DAB₄₈₆IL2 [222]. Wurden bei diesen Fusionsproteinen die ersten 60–90 Aminosäuren der Translokationsdomäne deletiert, resultierten daraus vollständig untoxische Proteine [212, 223]. Offensichtlich ist die Translokationsdomäne von DT für funktionierende chimäre Toxine mit DT und IL2 als Liganden unerlässlich und kann nicht durch MTPs substituiert werden. Jedoch kann durch die Wahl anderer Liganden die Gesamtstruktur des Fusionsproteins auch positiv beeinflusst werden, so dass in der Kombination mit anderen Liganden an DTA durchaus eine Bindung des Liganden an seinen Rezeptor und die resultierende Aufnahme des chimären Toxins in die Zelle denkbar ist.

4.3 Analyse unterschiedlicher Membrantransferpeptide als Bestandteil des Adapters

Der Transport von Makromolekülen bietet für viele Bereiche, vor allem in der Medizin zur Verbesserung der Aufnahme von Medikamenten, viele Anwendungsmöglichkeiten. In der Literatur wurden mittlerweile einige Peptide beschrieben, die die erwünschten Fähigkeiten aufweisen [65]. Zur Analyse der Rolle dieser sogenannten MTPs im molekularen Adapter der chimären Toxine wurden daher hier sechs Fusionsproteine mit Adapter und unterschiedlichen MTPs verglichen. Alle Proteine waren in der Lage, EF2 durch ADP-Ribose aus NAD⁺ zu modifizieren (Abb. 3.14). Demnach hatte die Verwendung des Adapters für keines der Konstrukte negative Auswirkungen auf die Enzymaktivität des im Fusionsprotein vorhandenen DT. Die Analyse des zytotoxischen Potentials ergab für die untersuchten Proteine jedoch wesentliche Unterschiede. Während die chimären Toxine mit TLM und ohne MTP gute IC₅₀-Werte unter 20 nM erreichten, zeigten die übrigen Proteine weniger Zytotoxizität. Insbesondere die beiden Konstrukte mit HA2 und HA2(4E) konnten nur geringe Zytotoxizitäten bewirken. Bei der Analyse der chimären Toxine auf den NIH-3T3-Zellen waren genau die chimären Toxine, die zuvor auf den EGFR exprimierenden

HER14-Zellen die geringste Cytotoxizität gezeigt hatten, am wirkungsvollsten. Daher kann vermutet werden, dass die HA2- und HA2(4E)-Sequenz stärkere unspezifische Wechselwirkungen mit den Oberflächen der Zellen eingehen und dadurch die Aufnahme in die Zellen auch auf den NIH-3T3-Zellen ohne humanen EGFR erreichen. Wie der Vergleich der cytotoxischen Wirkung der chimären Toxine mit EGF zeigt (Abb. 3.15 und Tab. 3.2), kommt für die chimären Toxine mit HA2- und HA2(4E)-Sequenz auf den HER14-Zellen vorwiegend die starke unspezifische Bindungskomponente und höchstens eine schwache spezifische Bindung an EGFR zum Tragen, weshalb diese chimären Toxine nicht die Spezifität der anderen Fusionsproteine erreichen. Bei dem Vergleich der chimären Toxine ohne EGF ergab sich für die vier getesteten Konstrukte mit TLM, MTS, SynB1 und ohne MTP jeweils auf den HER14-Zellen eine höhere Wirkung als auf den NIH-3T3-Zellen. Da die dabei gemessene Cytotoxizität nur aufgrund unspezifisch aufgenommener Toxine hervorgerufen worden sein konnte, unterscheiden sich die HER14-Zellen offensichtlich stärker von ihrer Parentalzelllinie NIH-3T3 als angenommen werden konnte. In Bezug auf diese Ergebnisse handelt es sich bei der durch die chimären Toxine mit EGF und den HA2-Sequenzen festgestellten Cytotoxizität möglicherweise auch nur um zelltypbedingte Unterschiede. Während auf den HER14-Zellen ein IC_{50} -Wert von 100 nM für die beiden Konstrukte bestimmt wurde, lagen die IC_{50} -Werte für NIH-3T3-Zellen bei 500 und 300 nM. Die augenscheinlich gesteigerte Wirkung auf den HER14-Zellen liegt jedoch vielleicht nur in einer größeren Empfindlichkeit der HER14-Zellen begründet. Die Kontrolle H6 DT390-EGF mit der natürlichen Translokationsdomäne von DT konnte den niedrigsten IC_{50} -Wert auf HER14-Zellen bewirken, was darauf hindeutet, dass der Membrantransfer durch die natürliche Translokationsdomäne von DT am wirkungsvollsten ist. Jedoch liegt die IC_{50} für vollständiges DT im pikomolaren Bereich, so dass die Wirkung von H6 DT390-EGF immer noch wesentlich schwächer ist als die von natürlichem DT. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem hier untersuchten Fusionsprotein und natürlichem DT liegt in der unterschiedlichen Zielstruktur und den möglicherweise unterschiedlichen Aufnahmemechanismen [121]. Vor allem auch die Anzahl der Rezeptoren und die Effizienz der Bindung und Aufnahme sind für die gemessene Cytotoxizität der Fusionsproteine von erheblicher Relevanz [68]. Ein in der Literatur beschriebenes chimäres Toxin aus EGF und den ersten 389 Aminosäuren von DT konnte jedoch die cytotoxische Wirkung von DT im pikomolaren Bereich erreichen [178]. Eine mögliche Ursache für die wesentlich geringere Cytotoxizität des hier untersuchten H6 DT390-EGF könnte in der Menge des auf der Zelloberfläche exprimierten EGFR begründet sein. Die Expression von EGFR auf den HER14-Zellen ist im Vergleich zu anderen EGFR überexprimierenden Zelllinien relativ gering [71, 99]. Das bedingt dann auch eine verringerte Aufnahme der chimären Toxine im Vergleich zu anderen Zellen. Um die Bindung der chimären Toxine und mögliche Einflüsse durch die MTPs auf die

Zellbindung zu ermitteln, wurden die Zellbindungsanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse waren sehr aufschlussreich, konnten sie doch belegen, dass die verschiedenen EGF tragenden chimären Toxine bei 4 °C miteinander vergleichbare Bindungssignale an HER14-Zellen aufwiesen (Abb. 3.17). Die Durchführung des gleiches Versuches bei 37 °C ermöglichte die Detektion solcher chimärer Toxine, die trotz der Möglichkeit der Aufnahme in die Zellen durch die physiologische Temperatur noch an der Zelloberfläche detektiert wurden. Die Fusionsproteine mit SynB1, HA2 und HA2(4E) zeigten bei 37 °C sogar stärkere Signale im Vergleich zur Zellbindung bei 4 °C. Offensichtlich wurden diese Konstrukte nicht in die Zellen aufgenommen. Eine Erhöhung der Signale kann durch die höhere Inkubationstemperatur erklärt werden, die eine schnellere Kinetik der Bindung an die Zellen bewirkt. Um diesen Punkt vollständig auszugleichen, hätten die Bindungszeiten erheblich verlängert werden müssen. Dagegen war eine Signalverringerung für die EGF tragenden Konstrukte mit TLM, MTS und ohne MTP sowie für ³H-DT390-EGF gemessen worden. Die zum Vergleich durchgeführte Analyse der Zellbindung an NIH-3T3-Zellen zeigte für die letztgenannten Proteine fast keine Bindung sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C auf, so dass für diese Konstrukte unspezifische Bindungen ohne definierte Rezeptor–Ligand–Wechselwirkung keine Rolle spielen (Abb. 3.17). Die drei EGF tragenden Fusionsproteine mit HA2, HA2(4E) und SynB1 wiesen zwar bei 4 °C nur wenig stärkere Zellbindungssignale auf, in der Messung bei 37 °C waren die Signale dieser drei chimären Toxine aber auf dem gleichen Niveau wie bei HER14-Zellen, was erneut die erhebliche unspezifische Bindung dieser Fusionsproteine an die Zelloberfläche belegt. Die Inhibition durch EGF, das in 10facher Konzentration vor den chimären Toxinen auf den Zellen inkubiert wurde, bewies die Rezeptor unabhängige Bindung der EGF tragenden chimären Toxine mit HA2(4E) und SynB1, da diese nur im geringen Ausmaß durch EGF inhibiert wurden. Die Bindung von dem Konstrukt mit HA2 konnte stärker durch EGF gehemmt werden, so dass für dieses Protein die Bindung an den EGFR eine stärkere Rolle spielte als für die anderen beiden Fusionsproteine. Die Bindung war jedoch wesentlich geringer als die der übrigen chimären Toxine. Die Messungen zur Zellbindung der EGF freien chimären Toxine ergaben zwar eine deutliche, aber unspezifische Bindung aufgrund von SynB1. Die HA2- und HA2(4E)-Sequenzen ohne EGF konnten nicht analysiert werden, da eine Expression dieser Proteine nicht möglich gewesen war.

Für die Interaktion mit dem EGFR könnten neben spezifischer und unspezifischer Bindung aber auch sterische Probleme der Fusionsproteine oder strukturelle Eigenschaften eine wichtige Rolle spielen. Auffällig war, dass ³H-DT390-EGF die höchste Cytotoxizität auf HER14-Zellen bewirkte und gleichzeitig in der Zellbindung auch wesentlich besser binden konnte als alle anderen Fusionsproteine mit EGF, obwohl für die Bindung nur EGF verantwortlich sein sollte. Möglicherweise ist EGF nur in diesem Konstrukt vollständig zugänglich. Für Probleme mit DTA in den anderen Konstrukten spricht ebenfalls, dass

keine der proteasesensitiven Schnittstellen durch Verdau mit Furin und apoptotischen Zelllysaten oder durch in Blutplasma enthaltenen Proteasen gespalten werden konnte. Auch die Insertion von bis zu vier repetitiven Peptiden aus zehn Aminosäuren als Abstandhalter zwischen DTA und dem Adapter konnte die Zugänglichkeit der Schnittstellen im Adapter nicht erhöhen (unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zu den zuvor diskutierten chimären Toxinen mit Liganden für den IL2R können die Konstrukte mit EGF jedoch ihren Rezeptor erfolgreich binden. Daher ist möglicherweise der Einfluss von DTA auf die Gesamtstruktur weniger relevant, wenn EGF als Ligand verwendet wird. Das könnte an der sehr kompakten und globulären Struktur von EGF liegen [129], die möglicherweise von DTA weniger beeinflusst werden kann. Nur der kurze molekulare Adapter könnte durch DTA verdeckt werden. Würde das Problem einer verringerten Zugänglichkeit des Adapters und des EGF gelöst werden, könnte möglicherweise auch die Cytotoxizität der Konstrukte verstärkt werden. Andere Arbeiten zeigten, dass durch Abspaltung des tumorspezifischen Liganden vom Toxin die cytotoxische Wirkung gesteigert wird [148]. In einer weiteren Untersuchung wurde die Effektivität von Immunotoxinen mit furinsensitiven Linkersequenzen analysiert und die Studie kam zu dem Ergebnis, dass durch Verwendung des spaltbaren Linkers die Cytotoxizität 2–30fach gesteigert werden kann [74]. Bei einem chimären Toxin mit *Pseudomonas* Exotoxin wurde die Cytotoxizität gegenüber EGFR exprimierenden Zellen durch eine Mutation in der Furinspaltstelle von *Pseudomonas* Exotoxin 100–500fach verringert, weil keine Spaltung mehr erfolgte [32]. Eine Abtrennung des tumorspezifischen Liganden vom Toxin, wie sie auch für den molekularen Adapter angestrebt wird, kann daher einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit des chimären Toxins haben. Die erfolgreiche Spaltung des Adapters in einem chimären Toxin mit EGF und SAP wurde bereits gezeigt [85] und konnte die erwartete Senkung von Nebenwirkungen *in vivo* auch belegen (unveröffentlichte Daten).

Die Idee der Verwendung von MTPs in Immunotoxinen zur Erhöhung der Aufnahme des Toxins wurde bereits von anderen Gruppen aufgegriffen. He *et al.* haben ein Immunotoxin beschrieben, bei dem zwischen dem Antikörper und dem Toxin ein basisches MTP aus neun Argininen eingesetzt wurde. Dieses MTP konnte in diesem Konstrukt erfolgreich sowohl die Zellbindung und die Aufnahme als auch die resultierende Cytotoxizität des Toxins verstärken [82]. Allerdings war das eingesetzte Toxin *Pseudomonas* Exotoxin, so dass in Kombination mit DTA der beobachtete Effekt durch ein Verdecken des MTP möglicherweise ausbleiben würde. Die Arbeitsgruppe um Kleinschmidt *et al.* hat einen polyionischen Linker zwischen Toxin und Ligand zum Verbinden der Teilstücke vorgeschlagen [106]. Dabei wird das Toxin mit einem negativ geladenem Linker und der Ligand mit einem positiv geladenem Linker separat aufgereinigt. Diese Methode kann die Herstellung chimärer Toxine erleichtern, da zuerst die Proteine nach denaturierender Aufreinigung separat renaturiert werden können und erst abschließend über den Linker

verbunden werden. Wie bereits zuvor diskutiert, können auch Mutationen von einzelnen Aminosäuren des N-Terminus von DT erheblichen Einfluss auf die Aufnahme des Toxins in Zellen haben [28]. Daher ist es verständlich, dass durch Verwendung eines aus mehreren Teilen zusammengesetzten chimären Toxins die Funktion durch bestimmte Bestandteile massiv beeinflusst werden kann. Außerdem wurde festgestellt, dass bei DT für die effiziente Translokation ins Cytosol die Domänen TH8 und TH9 in der Translokationsdomäne essentiell sind [211]. Fusionsproteine aus DT und EGF sind gut zur Bekämpfung EGFR überexprimierender Tumoren geeignet und werden auch weiterhin untersucht [122, 134]. Jedoch ist die Verwendung der eigenen Translokationsdomäne von DT für Fusionsproteine mit DT für eine hohe Cytotoxizität relevant. Interessanterweise wurde von Cawley *et al.* [24] DTA mit EGF verknüpft und es konnte für dieses Fusionsprotein bis 30 μM keine cytotoxische Wirkung festgestellt werden. Bei Verwendung von der katalytischen Domäne und der Translokationsdomäne von DT in Kombination mit EGF wurde allerdings eine sehr hohe Cytotoxizität mit 2 pM festgestellt [178]. Offensichtlich ist der durch die Translokationsdomäne von DT erreichte Membrantransfer der A-Kette von DT äußerst effektiv. Die Verwendung von DTA ohne die Translokationsdomäne von DT kann nur zur Entwicklung wirkungsvoller Wirkstoffe führen, wenn der erwünschte Transfer in das Cytosol durch die MTPs im Adapter effektiv abläuft.

Neue Literatur hat gezeigt, dass die durch MTPs gezeigte Aufnahme von Proteinen in das Cytosol der Zellen teilweise Artefakte von Fixierungen sein könnten [113, 162]. Daher sind die MTP vermittelten Ergebnisse stets kritisch zu beurteilen. Hinzu kommt, dass die Aufnahme von an MTPs gekoppelten Proteinen erst bei Konzentrationen im mikromolaren Bereich erfolgte [150, 164], während für den molekularen Adapter aufgrund der hohen Cytotoxizität von Proteintoxinen Wirkungen im nanomolaren Bereich erforderlich sind. Die sehr gut untersuchte und auch für viele Anwendungen getestete Tat-Sequenz wurde für die chimären Toxine nicht verwendet, da durch die große Anzahl von Argininen die Möglichkeit der Spaltung durch Furin in dieser Sequenz bestand. Andere Gruppen, die Tat als MTP eingesetzt haben, konnten teilweise die erwarteten Wirkungen zeigen [174], in anderen Studien erwies sich Tat jedoch als ungeeignet, so dass es für Anwendungen *in vivo* wahrscheinlich nicht effizient genug ist [213]. Insbesondere für DTA ist es jedoch ungeeignet, da Falnes *et al.* in einer Studie mit an Tat gekoppeltem DTA keine Translokation in das Cytosol von Zellen detektieren konnten [56]. Untersuchungen mit den MTPs Penetratin und MTS gekoppelt an DTA zur Aufnahme in Zellen zeigten nur sehr geringe Verstärkungen der Aufnahme durch die MTPs [102]. Die Forschung an MTPs wird jedoch weiterhin intensiv betrieben und es könnten in den nächsten Jahren bereits effektivere MTPs gefunden werden. Durch Verwendung dieser neuen Sequenzen im molekularen Adapter kann die erwünschte Verstärkung der Aufnahme des Toxins dann möglicherweise erreicht werden.

4.4 Charakterisierung unterschiedlicher Saponine in Kombination mit chimären Toxinen

Saponine verfügen über eine große Anzahl von unterschiedlichen Wirkungen, die seit langer Zeit untersucht werden [60, 193]. Die Vielfalt in ihren Funktionen ist wahrscheinlich durch die Varianz in ihren Strukturen begründet. Die permeabilisierende Wirkung von Saponinen auf Membranen ist eine der auffälligsten Eigenschaften [133]. Bei allen untersuchten Eigenschaften muss jedoch klar sein, dass sich das Ergebnis jeweils nur auf ein bestimmtes Saponin bezieht. Die Eigenschaften sind durch die entsprechende charakteristische Struktur bedingt. Viele Gruppen haben bereits die Bedeutung einzelner Faktoren der Saponinstruktur analysiert, jedoch ist aufgrund der großen Anzahl unterschiedlicher Saponine immer nur eine begrenzte Aussage möglich. Im Bereich der Tumorthherapie gibt es bisher erst wenige Untersuchungen über Saponine [105, 179, 185]. Durch die Ergebnisse von Hebestreit *et al.* und Heisler *et al.* kann die Rolle von Saponinen neu überdacht werden [83, 86]. Die Saponin vermittelte Erhöhung der Wirkstoffaufnahme in lebende Zellen bietet hervorragende Möglichkeiten für die Tumorthherapie. So können die Wirkstoffe effizienter in die Tumorzelle transportiert werden und ermöglichen damit einen reduzierten Einsatz von Wirkstoffen. Damit bietet sich auch die Möglichkeit der Verringerung von Nebenwirkungen, da der Körper des Patienten mit geringeren Mengen des Therapeutikums belastet wird.

Unter diesem Aspekt wurden die Untersuchungen zur Wirksamkeit einer Kombinationstherapie von Saponinen und chimären Toxinen *in vitro* an einem Zellkulturmodell untersucht. Durch die Verwendung von sieben unterschiedlichen Saponinen sollte außerdem die Möglichkeit zur Analyse bestimmter Strukturen innerhalb der Saponine ermöglicht werden, die für eine Kombinationstherapie von Bedeutung sind. Die erzielten Ergebnisse belegen eindeutig, dass alle getesteten Saponine die Aufnahme des vollständigen chimären Toxins H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF und des Kontrollkonstruktes H6 SAP in Zellen verbessern (Tab. 3.5 und Tab. 3.6). Da diese Verbesserung der Aufnahme jedoch für beide Konstrukte sowohl in EGFR exprimierenden als auch in EGFR freien Zellen erfolgte, war die Aufnahme zu einem gewissen Grad auch unspezifisch hinsichtlich der Rezeptor–Ligand–Interaktion von EGFR und dem chimären Toxin mit EGF. Durch Analyse der Cytotoxizitätsverstärkungsquotienten für die Saponine in Abhängigkeit der EGFR–Expression und der EGF abhängigen Bindung wurde nachgewiesen, dass vor allem Saponinum album besonders geeignet ist, die Aufnahme von H10 SAP-Ad*_{TLM}-EGF zu erleichtern (Abb. 3.23 und Abb. 3.24). Aus diesem Grund empfiehlt sich der Einsatz von Saponinum album für weitere Analysen in Maus-Tumormodellen. Für andere Saponine wie Helianthosid 2 und Ginsenosid Rd wurden ebenfalls hohe Quotienten für die Rezeptor- und die Ligandenspezifität berechnet, jedoch sind die absoluten Verstärkungsfaktoren nur

im Bereich von 10, während die Verstärkung durch Saponinum album 13600fach ist. Damit kann die Menge des applizierten chimären Toxins kaum reduziert werden und die erhoffte Verringerung von Nebenwirkungen würde geringer ausfallen. Aus diesen Gründen sind diese beiden Saponine keine geeigneten Kandidaten für weitere Untersuchungen. Quillajasaponin, das zwar sehr hohe Verstärkungsfaktoren für die Cytotoxizität der chimären Toxine bewirkt, ist jedoch aufgrund seiner unspezifischen Wirkungsweise nicht geeignet. Dieses Saponin erhöht die Aufnahme von EGF tragenden Toxinen auf HER14- und NIH-Zellen gleichermaßen, ohne dass an den Rezeptor gebundene chimäre Toxine vermehrt in die Zelle aufgenommen werden. Ebenso wird durch Quillajasaponin auch die Aufnahme EGF tragender und Ligand freier chimärer Toxine ungefähr gleichermaßen verstärkt, womit der für Saponinum album beobachtete Effekt der spezifischen Erhöhung für EGFR exprimierende Zellen nicht vorliegt.

Von den analysierten Saponinen waren nur Saponinum album und Quillajasaponin in der Lage, die Aufnahme der chimären Toxine um mehr als das Zehnfache zu erhöhen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es bei diesen Saponinen bestimmte strukturelle Komponenten gibt, die diese Erhöhung unterstützen. Alle beschriebenen Saponine bis auf Ginsenosid Rd besitzen ein triterpenoides Aglycon (Abb. 3.20). Innerhalb der Aglyconstrukturen gibt es jedoch eine Vielzahl von Modifikationen, so dass eine eindeutige Zuordnung einer bestimmten Struktur zu einer Eigenschaft der Saponine sehr schwierig ist. Interessanterweise besitzt aber Helianthosid 2 fast das gleiche Aglycon wie Saponinum album. Jedoch weist Helianthosid 2 an der Position C-3 nur eine Methylgruppe auf, während Saponinum album an dieser Stelle eine Aldehydgruppe besitzt. Auch Quillajasaponin hat an C-3 eine Aldehydgruppe, während keines der anderen Saponine an dieser oder einer anderen Stelle des Aglycons eine Aldehydgruppe aufweist. Möglicherweise stellt diese Aldehydgruppe eine Voraussetzung für die beobachtete starke Erhöhung der Aufnahme des chimären Toxins in die Zellen dar. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Analyse von Soltysik *et al.*, die durch chemische Modifikation der Aldehydgruppe in QS-21 die adjuvante Funktion des Saponins verhindern konnten [192]. Die Tatsache, dass Quillajasaponin auch als Adjuvans in Vakzinen verwendet wird, unterstreicht die hier beobachtete Fähigkeit zur erheblichen Steigerung der Aufnahme der chimären Toxine [149]. Dabei wird das Saponin in Komplexen mit Cholesterol, Lipiden und Immunogenen als so genannter *immunostimulating complex* als Vakzine eingesetzt [137, 186]. Für die Ligand spezifische Erhöhung der Aufnahme des an den EGFR gebundenen chimären Toxins kann die Aldehydgruppe jedoch keine Rolle spielen, da Quillajasaponin nicht über die Eigenschaft der spezifischen Erhöhung verfügt. Für diesen Effekt könnte die Komposition und die Anzahl der Zuckerketten am Aglycon von Relevanz sein, denn in den Zuckerketten unterscheiden sich Quillajasaponin und Saponinum album maßgeblich. Der Verlust der Zuckerketten kann für Saponine weitreichende Funktionsverluste bedeuten.

Nach Hydrolyse der Zucker von Avenacin A-1 gingen die permeabilisierenden Eigenschaften verloren [4]. Die Bedeutung der Zuckerketten für Quillajasaponin und Saponinum album wurde von Melzig *et al.* untersucht [131]. Dabei ergab sich, dass die verzweigten Zuckerreste von erheblicher Bedeutung für die Steigerung der Cytotoxizität eines zusammen mit den Saponinen auf Zellen inkubierten ligandfreien Toxins war. Offensichtlich sind für die Wirkungen der Saponine sowohl die Strukturen der Aglycone, die Anzahl und Zusammensetzung der Zuckerketten sowie die Eigenschaften der Zielzellen von erheblicher Relevanz. Es muss jedoch beachtet werden, dass Saponinum album keine Reinsubstanz ist, sondern eine Mischung mit dem Hauptbestandteil Gypsosid A, dem die in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften zugeschrieben werden. Möglicherweise sind die zu beobachtenden Effekte bei Verwendung von reinem Gypsosid A anders als bei der Mischung Saponinum album.

Für eine optimale Erhöhung der Aufnahme von Wirkstoffen ist die Vorinkubation von Saponinen auf den Zellen wichtig. Die Untersuchungen von Heisler *et al.* hatten gezeigt, dass eine Vorinkubation von fünf Minuten für die Steigerung der Aufnahme am Besten geeignet ist [86]. Wenn dagegen das chimäre Toxin bereits mit dem Saponin vorgemischt wird, ist die resultierende Aufnahme des Toxins drastisch herabgesetzt. Wahrscheinlich muss das Saponin erst eine Interaktion mit Komponenten der Membran eingehen, bevor das chimäre Toxin zugesetzt werden darf. Anderenfalls interagiert das Saponin mit dem chimären Toxin und kann nicht mehr mit der Membran wechselwirken, um die Toxinaufnahme zu steigern.

Die Konzentrationen der Saponine spielen bei den beobachteten Effekten eine wichtige Rolle. Um eine maximale Wirkung bei minimalen Nebenwirkungen, möglicherweise durch Permeabilisierungen von Membranen durch Porenbildung, zu erreichen, wurden die Saponine bei Konzentrationen von 1,5 µg/ml auf den Zellen vorinkubiert. Es ist zu vermuten, dass bei höheren Saponinkonzentrationen durch die Porenbildung der teilweise vorhandene Ligand spezifische Effekt der Saponine verloren geht. Wie die Cytotoxizitätsanalyse der Saponine allein ergeben hatte, war diese Konzentration für die meisten Saponine ohne Wirkung. Eine Ausnahme bildeten Quillajasaponin und Hederasaponin C, die bei dieser Konzentration bereits ein etwas verringertes Überleben der Zellen bewirkten. Möglicherweise weisen diese Saponine eine stärkere Interaktion mit den Zellmembranen auf, wie es für Quillajasaponin bereits beschrieben wurde [117]. Aufgrund ihrer möglicherweise auch *in vivo* erhöhten Auswirkungen auf Membranen wären diese Saponine für weitere Studien im Mausmodell ungeeignet. Die Applikation von Saponinen allein wurde bereits in Mengen bis zu 500 µg pro Maus und Tag als unbedenklich eingestuft. Bei dieser Analyse von Ginseng Saponinen als alleiniges Mittel zur Tumorbehandlung konnte bei dieser Konzentration sogar eine erfolgreiche Inhibition von Tumormetastasierung und Angiogenese beobachtet werden [135, 171]. Die für Saponinum

album ideale Konzentration von 1,5 µg/ml in der Zellkultur würde bei Mausversuchen einer Applikation von ungefähr 30 µg entsprechen. Im Abstand von drei Tagen durchgeführte subkutane Injektionen von 30 und 100 µg Saponinum album hatten keine erkennbaren Nebenwirkungen und wären bei einer Untersuchung für eine Kombinationstherapie mit chimären Toxinen in Mäusen denkbar. Jedoch ist zu beachten, dass die beschriebene Erhöhung der Aufnahme ein synergistischer Prozess ist, so dass eine Wirkung eintritt, obwohl die Einzelkomponenten der Kombinationstherapie in den verwendeten Konzentrationen wirkungslos sind. Eine genaue Vorhersage der geeigneten Konzentrationen für die Kombinationstherapie gestaltet sich daher schwierig und letztlich können die Parameter nur experimentell ermittelt werden.

Mit dem hier beschriebenen System zur Steigerung der Ligand spezifischen Aufnahme von chimären Toxinen, insbesondere durch Saponinum album, bieten sich hervorragende Möglichkeiten in der Tumorthherapie an, da man durch die kombinierte Anwendung von Saponin und spezifischem Wirkstoff durch den beschriebenen synergistischen Effekt das therapeutische Fenster einer möglichen Behandlung erweitern kann. Das bedeutet, dass die tumorspezifische Wirkung des chimären Toxins erhöht wird, während gleichzeitig durch die deutlich verringerte Konzentration des Toxins die Nebenwirkungen gesenkt werden können.