

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen

Als Krebs bezeichnet man das unkontrollierte Wachstum von Zellen, die durch Mutationen in ihren genetischen Informationen die normale Wachstumskontrolle der Zelle und des Körpers umgehen. Krebs ist eine lange bekannte Erkrankung, so hatte bereits der griechische Arzt Hippokrates Krebserkrankungen beschrieben. Mit steigendem Alter nimmt die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Krebs zu. Der Grund dafür liegt in der Entstehung von Mutationen in der DNA normaler Zellen durch eine Vielzahl von Karzinogenen wie UV-Strahlung oder chemischen Substanzen. In einer Zelle müssen mehrere Regulationsmechanismen oder Signaltransduktionskomponenten durch Mutation modifiziert werden, damit eine Zelle zu einer Krebszelle transformiert. Außerdem muss auch die Apoptosekontrolle einer Zelle inhibiert sein. Liegt eine transformierte Zelle vor, so wird sie sich ungehemmt vermehren und bei Zellen im Gewebeverband zur Bildung eines Tumors (Ansammlung vieler transformierter Zellen) führen. Ist das Wachstum des Tumors zu schnell, kann das natürliche Abwehrsystem die Tumorzellen nicht erfolgreich bekämpfen, um das Wachstum zu stoppen. Bei Tumoren unterscheidet man benigne Tumoren, die ihr Wachstum durch eine Einkapselung auf ein Gewebe beschränken und sich nicht auf andere Körperregionen ausbreiten und maligne Tumoren, die sich in ihrem Wachstum auch auf andere Regionen des Körpers verteilen. Einzelne Tumorzellen des malignen Tumors brechen aus dem Zellverband des Tumors aus und wachsen an anderen Stellen in Form von Metastasen weiter. Die Tumorzellen können dabei über Blutgefäße oder das lymphatische System auf den ganzen Körper verteilt werden. Durch eine gestiegene Lebenserwartung und die Zunahme von Karzinogenen hat sich in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts die Zahl von Tumorerkrankungen wesentlich erhöht, obwohl die Behandlungsmöglichkeiten deutlich verbessert werden konnten.

## 1.2 Therapiemöglichkeiten

Obwohl es eine Vielzahl unterschiedlicher Tumorerkrankungen gibt, werden allgemein die gleichen Behandlungsmethoden angewandt. Eine wichtige Voraussetzung für eine Remission ist immer die frühe Erkennung eines Tumors, bevor der Tumor zu groß ist und sich Metastasen bilden können. Die konventionellen Therapiemöglichkeiten umfassen im Allgemeinen operative Methoden, Bestrahlungen und Chemotherapie. Die operativen Eingriffe und auch die Behandlung durch Bestrahlung können lokoregional eingesetzt werden, während die Chemotherapie generell systemisch wirkt. Operationen werden bei

soliden Tumoren als erstes eingesetzt, um möglichst viel Tumorgewebe zu entfernen. Bei einem chirurgischen Eingriff besteht die Gefahr, dass minimale Reste des Tumors nicht entnommen werden und zur Entstehung eines Rezidivs führen. Daher schließen sich nach operativen Eingriffen häufig Chemo- und Strahlentherapie an, um die Bildung von Metastasen zu verhindern. Bereits gebildete Metastasen des Tumors können operativ nicht entfernt werden, wenn sie nicht zuvor durch entsprechend sensitive, diagnostische Methoden detektiert wurden. Bei der Strahlentherapie wird zwischen äußerlicher und innerer Bestrahlung unterschieden. Zur äußerlichen Bestrahlung wird der Patient an der Stelle des Tumors üblicherweise mit Röntgenstrahlen behandelt. Um die energiereiche Strahlung noch näher am Tumor zur Wirkung zu bringen, werden bei der inneren Bestrahlung auch radioaktive Präparate direkt am Tumor eingesetzt. Bei der Chemotherapie werden hauptsächlich Medikamente mit einer cytotoxischen Wirkung verabreicht, wie zum Beispiel Doxorubicin [97]. Die Chemotherapie dient besonders der Bekämpfung von Leukämien, da diese durch die erstgenannten Methoden nicht beseitigt werden können. Zudem werden die Medikamente der Chemotherapie auch nach operativen Eingriffen zur Bekämpfung von Metastasen eingesetzt. Zur Chemotherapie werden auch Behandlungen mit Hormonpräparaten gezählt, wie zum Beispiel Tamoxifen gegen Brustkrebs [76], die das Wachstum der Tumorzellen stoppen sollen. Bei der Chemotherapie und der Strahlenbehandlung werden durch Wirkstoffe oder energiereiche Strahlung Zellen abgetötet. Da diese Methoden keine selektive Bekämpfung der Tumorzellen erlauben, werden auch gesunde Zellen geschädigt. Die Schädigung der Tumorzellen erfolgt jedoch aufgrund ihres beschleunigten Wachstums in größerem Maße, so dass nach mehrfacher Behandlung die Tumorzellen vollständig absterben, während sich das gesunde Gewebe wieder erholt. Dennoch bleiben deutliche Nebenwirkungen einer Behandlung durch Strahlen oder Medikamente nicht aus.

Als alternative Behandlungen in der Tumorthherapie werden auch biologische Verfahren eingesetzt. Neben Ansätzen, die Tumorzellen mittels Gentherapie zu bekämpfen [125, 180], ist vor allem die Behandlung durch Antikörper oder Antikörperkonjugate aussichtsreich.

### **1.3 Antikörper in der Tumorthherapie**

Die Verwendung von Antikörpern für die Tumorthherapie stellt ein viel versprechendes Konzept dar, da die Antikörper aufgrund ihrer spezifischen Wechselwirkung mit einer auf Tumorzellen vermehrt vorhandenen Oberflächenstruktur (tumorassoziierte Antigene) eine Unterscheidung von normalen Zellen und Tumorzellen erlauben. Daher erhofft man sich durch die tumorspezifischen Antikörper in der Tumorthherapie verbesserte Heilungsraten bei verringerten Nebenwirkungen. Die Antikörper basierten Therapiekonzepte werden

entweder nur mit Antikörpern oder modifizierten Antikörpervarianten sowie mit Antikörperkonjugaten durchgeführt.

### **1.3.1 Tumortherapie mit Antikörpern**

Die verwendeten Antikörper sind vom Ursprung murine monoklonale Antikörper, die gegen ein tumorassoziiertes Antigen gerichtet sind. Damit sie bei der Behandlung der Patienten nicht durch das Immunsystem eliminiert werden, sind sie durch den Austausch muriner und humaner Aminosäuresequenzen humanisiert [21]. Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der bei der Behandlung von metastasierendem Brustkrebs eingesetzt wird. Trastuzumab bindet sein Antigen, den HER2 Wachstumsfaktorrezeptor, auf Tumorzellen, die daraufhin in ihrer Proliferation behindert werden. Durch die Bindung wird der Rezeptor schwächer exprimiert und bewirkt damit das verlangsamte Wachstum [141]. Der Antikörper bedingt neben den beschriebenen cytotostatischen Effekten auch cytotoxische Wirkungen. So wird nach Bindung des Antikörpers eine Antikörper abhängige zelluläre Cytotoxizität beobachtet und das Komplementsystem aktiviert. Zudem kann bei Kombination mit herkömmlicher Chemotherapie die Wirkung der Medikamente gesteigert werden [53, 187]. Ferner konnte noch eine Hemmung der Angiogenese festgestellt werden [93]. Ein weiterer monoklonaler Antikörper ist Cetuximab, der gegen den *epidermal growth factor receptor* (EGFR) gerichtet ist und ebenfalls eine Zulassung als Medikament erhalten hat. Cetuximab ist aufgrund seiner synergistischen Wirkung zusammen mit Chemotherapeutika als Wirkstoff gegen metastasierende Colonkarzinome zugelassen [38, 169]. Mit Rituximab wurde in der Literatur ein monoklonaler Antikörper gegen CD20 beschrieben [3, 126]. Dieser Wirkstoff ist für die Anwendung gegen Non-Hodgkin B-Zell-Lymphomen zugelassen. Der monoklonale Antikörper Bevacizumab unterscheidet sich in seiner Zielstruktur von den vorhergenannten Antikörpern. Bevacizumab erkennt den *vascular endothelial growth factor*, der eine Rolle bei der Regulation der Angiogenese von Tumoren spielt [57]. Durch den Antikörper wird das Angiogenesesignal für die Tumoren blockiert und das Tumorstadium verhindert [107]. Bevacizumab ist in Kombination mit Chemotherapeutika für die Behandlung von metastasierenden Colonkarzinomen als erstes Anti-Angiogenesemedikament zugelassen [58]. Neben der Verwendung von reinen Antikörpern für die Tumortherapie werden Antikörper gegen tumorspezifische Antigene auch mit toxischen Substanzen verknüpft, um die antitumorale Wirkung zu steigern.

### **1.3.2 Antikörperkonjugate**

Durch Verknüpfung der tumorspezifischen Antikörper mit verschiedenen Substanzen sollen die erzielten positiven Effekte der Antikörper basierten Tumortherapie noch weiter gesteigert werden. Die Wirksamkeit von zellschädigenden Substanzen wird mit der

Tumorspezifität durch die Antikörper vereinigt und soll dadurch die zu geringe Spezifität der herkömmlichen Therapien überwinden. Als Verbesserung der Strahlentherapie werden auch Radionuklide für die Generierung von radioaktiven Antikörperkonjugaten (Radioimmunokonjugaten) verwendet. Die monoklonalen Antikörper binden an die tumorassoziierten Antigene der Tumorzellen und durch die emittierte Strahlung der Radionuklide an den Antikörpern werden die Zellen in der Nähe getötet. Bisher sind zwei Radioimmunokonjugate für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen, Zevalin [31, 224] und Bexxar [100, 216]. Die beiden Antikörper sind gegen CD20 auf B-Zellen gerichtet und mit unterschiedlichen Nukliden gekoppelt. Zevalin ist mit  $^{90}\text{Y}$  markiert und Bexxar mit  $^{131}\text{I}$  gekoppelt, die  $\beta$ - beziehungsweise  $\beta$ - und  $\gamma$ -Strahlen emittieren.

Für oberflächlich lokalisierte Tumoren gibt es weiterhin Ansätze zur photodynamischen Therapie. Dabei werden durch Laserlicht photosensitive Substanzen angeregt, die dadurch reaktive Moleküle freisetzen. Diese freigesetzten Substanzen, zum Beispiel Singletsauerstoff, sind toxisch für Zellen, die dadurch getötet werden [220]. Die Verwendung unterschiedlicher photosensitiver Substanzen ermöglicht die Anwendung dieser Methode auch für größere Tumoren, die tiefer im Gewebe durch das Laserlicht erreicht werden müssen. Langwelliges Licht kann dabei tiefer eindringen, weshalb photosensitive Substanzen mit einem Absorptionsmaximum im nahen Infrarotbereich bevorzugt werden. Goff *et al.* haben in Mäusen mit murinen Ovarkarzinomen den Effekt von Antikörper gekoppelten photosensitiven Substanzen untersucht und konnten das Überleben der behandelten Gruppe deutlich erhöhen [69]. Mit einem monoklonalen Antikörper gegen EGFR und einem gekoppelten Benzoporphyrinderivat als photosensitive Substanz wurden auch Analysen eines squamösen Zellkarzinoms im Hamstermodell durchgeführt [87].

Am häufigsten werden Konjugate mit cytotoxischen Substanzen verwendet. Die Cytostatika werden mit den Antikörpern durch chemische Linker verknüpft, wodurch die unspezifische Chemotherapie optimiert werden soll. Die erhaltenen Konjugate sollen im Körper vor Erreichen des Tumors nicht toxisch sein und der Linker muss stabil genug sein, um nicht bereits im Blut des Patienten gespalten zu werden. In den Tumorzellen soll jedoch die Spaltung des Linkers zur Freisetzung der cytotoxischen Substanz erfolgen [96]. Mit dem Konjugat Mylotarg aus dem monoklonalen Antikörper Gemtuzumab und der toxischen Substanz Ozogamicin wurde bereits im Jahr 2000 ein Antikörperkonjugat als Medikament für die Behandlung von akuter myelogener Leukämie zugelassen [78]. Weitere Konjugate in klinischen Studien sind das Maytansinoid enthaltende huC242-DM1 [120] und CTM01-Calicheamicin [25].

Da nur wenige toxische Moleküle mit dem Antikörper verbunden werden können ohne die Bindungsaffinität des Antikörpers zu verringern [26] oder die Immunogenität des

Konjugates zu erhöhen [79], werden üblicherweise sehr toxische Substanzen verwendet, um eine ausreichende cytotoxische Wirkung in den Tumorzellen zu gewährleisten. Beispiele sind Calicheamincin [78], Monomethylauristatin E [41] und CC-1065 [27]. Trotz seiner moderaten Toxizität wird Doxorubicin jedoch immer noch für Antikörperkonjugate verwendet [219]. Besonders hohe Cytotoxizitäten weisen die Proteintoxine Diphtheriatoxin (DT), *Pseudomonas* Exotoxin und Ricin auf, die auch für eine Vielzahl von Konjugaten verwendet werden.

## 1.4 Immunotoxine und chimäre Toxine

Immunotoxine sind Konstrukte aus Antikörpern oder deren Fragmenten, die entweder mit vollständigen Toxinen oder deren katalytisch aktiven Domänen verbunden sind. Die Antikörper sind üblicherweise gegen tumorassoziierte Antigene, insbesondere Rezeptoren auf der Zelloberfläche gerichtet, so dass eine Erkennung durch den Antikörper problemlos möglich ist. In funktioneller Analogie zu den Immunotoxinen gibt es auch chimäre Toxine, bei denen natürliche Liganden von auf Tumorzellen überexprimierten Rezeptoren mit Toxinen verknüpft werden. Die natürlichen Liganden weisen für die Bindung an ihre Rezeptoren ebenfalls eine große Spezifität auf, wodurch sie mit den Immunotoxinen vergleichbar sind<sup>1</sup>. Die Antikörper und Toxine werden dabei entweder durch chemische Kopplung verbunden oder als Fusionsproteine rekombinant exprimiert [109]. Immunotoxine und chimäre Toxine binden an ihre Zielstrukturen auf der Oberfläche von Zellen und werden dann durch endocytotische Prozesse in die Zelle aufgenommen [59]. Wenn das Toxin, üblicherweise ein Proteinbiosynthese inhibierendes Toxin, in das Cytosol der Zelle gelangt, kann es dort durch seine katalytische Aktivität den Proteinbiosyntheseapparat der Zelle inhibieren, wodurch die Zelle stirbt. Durch die Verwendung von tumorspezifischen Liganden und Antikörpern in Immunotoxinen können im Gegensatz zu herkömmlichen Verfahren wie operativen Methoden, Chemo- oder Strahlentherapie nicht nur die bestehenden Tumoren und Metastasen sehr effektiv bekämpft werden, sondern aufgrund der Spezifität gegenüber den gewählten Zielstrukturen Schädigungen gesunden Gewebes gering gehalten werden [77]. Das chimäre Toxin Ontak, ein Fusionsprotein aus der katalytischen Domäne und der Translokationsdomäne von DT sowie humanem Interleukin-2 (IL2) [63, 198, 200], ist bereits als Medikament zur Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen. Weitere Immunotoxine mit DT als Toxin sind zurzeit in der Entwicklung als mögliche Tumortherapeutika [161, 166]. Konjugate mit *Pseudomonas* Exotoxin [20, 118] und Ricin [90, 159] wurden ebenfalls in der Literatur beschrieben.

---

<sup>1</sup> In der Literatur wird häufig sowohl für chimäre Toxine als auch Immunotoxine im eigentlichen Sinne der Begriff Immunotoxin verwendet.

Immunotoxine sind jedoch nicht auf tumorassoziierte Antigene als Zielstrukturen beschränkt. Durch die Wahl des Antikörpers können auch andere Zellen als Ziel fungieren. So sind auch Immunotoxine gegen Zellen, die mit dem humanen Immunschwächevirus infiziert sind, beschrieben worden [155]. Durch die Wahl des Antikörpers oder des natürlichen Liganden für ein bestimmtes tumorassoziiertes Antigen wird die Spezifität des Immunotoxins oder chimären Toxins bestimmt.

### **1.4.1 Tumorassoziierte Antigene als Ziele der Tumorthherapie**

Als Ziele in der Tumorthherapie wurden bisher unter anderen der IL2 Rezeptor (IL2R) und der EGFR verwendet [110]. Diese Rezeptoren eignen sich sehr gut als Ziele, da sie in Tumorzellen überexprimiert werden und als Membranproteine von außen zugänglich sind. Während die EGFR-Expression vor allem auf soliden Tumoren stark erhöht ist [73, 92], ist die Expression von IL2R auf T-Zellen vor allem bei Lymphomen und Leukämien deutlich erhöht [181, 205].

#### **1.4.1.1 Der Interleukin-2 Rezeptor**

Der IL2R wird hauptsächlich auf T-Zellen exprimiert und besteht aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), die alle Transmembranproteine sind. Die molekularen Massen betragen für die  $\alpha$ -Untereinheit 55 kDa [37, 115, 144], für die  $\beta$ -Untereinheit ein 75 kDa [81] und für die  $\gamma$ -Untereinheit 64 kDa [199]. Der Ligand für den IL2R ist IL2, ein monomeres Protein aus 133 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 15–18 kDa mit variablen Glycosylierungen [163]. IL2 wurde zuerst als proliferativer Faktor für T-Zellen beschrieben [138]. T-Zellen können viele Jahre im Ruhezustand leben und werden bei auftretenden Infektionen sehr schnell und selektiv vermehrt. An dieser Proliferation sind der IL2R und IL2 maßgeblich beteiligt. In ruhenden Zellen werden nur die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des IL2R exprimiert und erscheinen als ein weniger affiner Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche [189]. T-Zellen können dann eine Aktivierung durch ein vom T-Zell-Rezeptor präsentiertes Antigen erfahren, wodurch eine selektive Immunantwort gegen das präsentierte Antigen ausgelöst wird. Die Aktivierung führt zur Expression von IL2 und der  $\alpha$ -Untereinheit des IL2R sowie zur verstärkten Expression der  $\beta$ -Untereinheit [142, 182]. Mit der  $\alpha$ -Untereinheit des IL2R wird in der Plasmamembran der T-Zelle der hochaffine Rezeptorkomplex aus allen drei Untereinheiten gebildet [199]. Das exprimierte IL2 wird sezerniert und bindet an seinen Rezeptor, wobei jede Untereinheit einen anderen Teil von IL2 bindet [136, 172, 217]. Diese Bindung ist das Signal für die Proliferation der T-Zelle, so dass durch klonale Expression eine Population von T-Zellen mit gleichem Antigenrezeptor entsteht.

Die Überexpression des IL2R bei Lymphomen [181] und Leukämien [205] ermöglicht die Bekämpfung der Tumoren durch Wirkstoffe, die gegen den IL2R gerichtet sind [151].

### 1.4.1.2 Der *epidermal growth factor receptor*

Der EGFR gehört zu der Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Der EGFR wird auch als HER1 (*human epidermal growth factor receptor-1*) bezeichnet und ist gemeinsam mit HER2, HER3 und HER4 in der HER-Tyrosinkinasefamilie zusammengefasst. Diese Rezeptoren liegen alle als Membranproteine mit einer extrazellulären Domäne zur Bindung von Liganden, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne vor. Durch die Bindung eines Liganden dimerisieren die Rezeptoren, phosphorylieren sich gegenseitig an bestimmten Tyrosinresten innerhalb der intrazellulären Domäne und aktivieren damit eine Signaltransduktionskaskade über *mitogen-activated protein kinases*. Dadurch wird im Zellkern die Aktivität von Transkriptionsfaktoren gesteuert [229]. Die einzelnen Mitglieder der HER-Tyrosinkinasefamilie können entweder Homodimere mit nur einem der HER-Membranproteine bilden oder auch Heterodimere aus unterschiedlichen Rezeptoren. Die resultierenden Signaltransduktionsereignisse unterscheiden sich je nach der Art der ausgebildeten Dimere und steuern eine Vielzahl von Prozessen wie Apoptose, Proliferation, Migration, Adhäsion und Differenzierung [230]. Als Ligand für EGFR sind der *epidermal growth factor* (EGF) und der *transforming growth factor  $\alpha$*  beschrieben. Natürliche Liganden für HER2 sind bis heute nicht beschrieben worden, jedoch wurde ein modifiziertes EGF veröffentlicht, das auch an HER2 bindet [196].

Die Expression von EGFR ist häufig auf soliden Tumoren erhöht. Daher ist EGFR auch als Tumormarker von Bedeutung. Besonders häufig ist die Expression bei Brustkrebs, Lungenkrebs und Tumoren im Bereich von Kopf und Hals und der Blase [30, 73, 92, 132]. Aufgrund seiner Relevanz als Tumormarker gibt es auch viele Ansätze zur Bekämpfung von Tumoren durch gegen EGFR gerichtete Wirkstoffe. Ein Beispiel sind Konjugate aus *single chain Fv*-Fragmenten von Antikörpern gegen EGFR und HER2 mit *Pseudomonas* Exotoxin zur Therapie von Hals- und Kopfkrebs, bei dem die entsprechenden Rezeptoren überexprimiert sind [5].

Durch die Wahl der toxischen Komponente eines Immunotoxins oder eines chimären Toxins kann die Wirkung erheblich beeinflusst werden. Es gibt eine Vielzahl geeigneter toxischer Substanzen für die Verwendung in Immunotoxinen. Beispiele sind Toxine bakteriellen Ursprungs wie DT und *Pseudomonas* Exotoxin [111, 208] oder pflanzliche Toxine wie Saporin (SAP), Ricin und Dianthin [18, 123, 158]. Neben der Verwendung von bakteriellen und pflanzlichen Toxinen kommen auch synthetische Toxine wie Analoga von cAMP zum Einsatz [108]. Die in Immunotoxinen verwendeten toxischen Substanzen können drei Gruppen zugeordnet werden. Man unterscheidet nicht-peptidische Toxine (Cytostatika), peptidische Toxine und die Gruppe der Proteintoxine.

## 1.4.2 Proteinbiosynthese inhibierende Proteintoxine

Es gibt eine Vielzahl toxischer Substanzen, die anhand ihrer Größe und Zusammensetzung in nicht-peptidische Toxine, peptidische Toxine und Proteintoxine unterteilt werden. Bei den nicht-peptidischen Toxinen handelt es sich in der Regel um Analoga von zellulären Molekülen, die nach Aufnahme in die Zielzelle in die Signaltransduktion (8-Chloro-cAMP [108]) oder die Proteinbiosynthese (5-Fluorouridin [22]) inhibitorisch eingreifen. Zu der Gruppe der peptidischen Toxine gehören viele Neurotoxine, die die extrazelluläre Signalweiterleitung unterbinden. Die peptidischen Toxine enthalten oft posttranslational modifizierte Aminosäuren und liegen cyclisch vor. Die Modifikationen erfolgen nur in den toxinproduzierenden Organismen, wodurch die Toxine schwer zugänglich sind. Ein Beispiel ist das Schlangengift Bungarotoxin, das die Signalübertragung am Acetylcholinrezeptor inhibiert [116]. Nicht-peptidische und peptidische Toxine können aufgrund ihrer Synthese nur chemisch mit Antikörpern oder natürlichen Liganden verbunden werden. Für die rekombinante Expression von Fusionsproteinen eignen sie sich nicht.

Für eine molekularbiologische Produktion von Fusionsproteinen sind Proteintoxine am Besten geeignet. Ihre Wirkungen sind weit gefächert. Sie bewirken Permeabilisierungen von Membranen, inaktivieren Ionenkanäle oder die Proteinsynthese, stören die Signaltransduktion und können neben der Hemmung von Transportprozessen über Membranen auch das Cytoskelett destabilisieren. Um unspezifische Zellschäden zu verhindern, werden für therapeutische Wirkstoffe nur intrazellulär wirkende, meist die Proteinbiosynthese inaktivierende Proteintoxine eingesetzt [109]. Proteinbiosynthese inaktivierende Proteintoxine werden nach ihrem Wirkungsmechanismus in drei Gruppen unterteilt. Die ADP-ribosylierenden Enzyme (DT und *Pseudomonas* Exotoxin) inaktivieren die Synthese durch Modifikation des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (EF2) [35]. SAP und Ricin gehören zu den N-Glycosidasen, die durch Spaltung der 28S-rRNA die Proteinsynthese stoppen [50]. Die Endonukleasen (zum Beispiel  $\alpha$ -Sarcin) können Phosphodiesterbindungen der 28S-rRNA bei Eukaryoten spalten und somit die Ribosomen inaktivieren [51].

Das in dem ersten für die Krebstherapie zugelassenen chimären Toxin Ontak enthaltene Toxin ist DT, das auch in vielen anderen Immunotoxinen eingesetzt wird [64, 207]. Es zeichnet sich durch eine sehr hohe Toxizität aus, da bereits 100–150 ng/kg Körpergewicht DT letal sind [67].

### 1.4.2.1 Diphtheriatoxin

DT ist ein von *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) gebildetes Protein, das durch seine toxische Wirkung bei Menschen das Krankheitsbild Diphtherie hervorruft. Bei Diphtherie handelt es sich meist um eine Erkrankung der Atemwege. Wenn durch die



Infektion jedoch das Herz- und Kreislaufsystem betroffen ist, kann es durch Absterben des Gewebes zu Kreislaufversagen und damit zum tödlichen Verlauf der Erkrankung kommen.

DT ist ein Protein mit einer Molekülmasse von 58 kDa und besteht aus 535 Aminosäuren. DT wird in Bakterien zunächst als eine Polypeptidkette synthetisiert und anschließend zu zwei separaten Polypeptidketten prozessiert, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind (A-Kette und B-Kette). Daher gehört DT zu der Gruppe der AB-Toxine. Die Prozessierung des Proteins kann durch Furin oder furinähnliche Enzyme erfolgen [72]. Die A-Kette von DT mit der katalytischen Domäne wird durch die Aminosäuren 1–193 gebildet [34]. Auf der B-Kette sind die Translokationsdomäne (Aminosäuren 201–384 [17]) und die Rezeptor bindende Domäne (Aminosäuren 385–535) [34] lokalisiert. Die Translokationsdomäne bewirkt den Transfer der A-Kette in das Cytosol der Zielzelle.

DT bindet auf Zielzellen mit der Rezeptor bindenden Domäne an den Vorläufer des Heparin bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors [140] und wird durch Rezeptor vermittelte Endocytose aufgenommen. Nach Fusion der Vesikel mit den Endosomen erfolgt durch deren niedrigen pH eine Konformationsänderung des am Rezeptor gebundenen DT. Die  $\alpha$ -Helices der Translokationsdomäne lagern sich in die endosomale Membran ein [184]. Ein Teil der B-Kette durchquert die Membran und der N-Terminus der B-Kette gelangt in das Cytosol. Die Disulfidbrücke zwischen der A- und B-Kette wird wegen des reduktiven Potentials im Cytosol gespalten. Es wird vermutet, dass die A-Kette mit der katalytischen Domäne im Endosom auch teilweise denaturieren muss, um die Membran zu durchqueren [54]. Von Falnes *et al.* wurde auch postuliert, dass der C-Terminus der A-Kette die endosomale Membran zuerst passiert [55]. Wie Versuche an Modellmembranen gezeigt haben, kann die Translokationsdomäne von DT allein die Translokation der A-Kette über Membranen bewirken [98]. Im Cytosol kann die katalytische Domäne durch die Erhöhung des pH-Wertes schnell renaturieren und ihre toxische Wirkung an den Ribosomen der Zelle entfalten. Die Ribosomen werden durch eine Modifikation am EF2 inaktiviert [36], wodurch der Proteinbiosyntheseapparat der Zelle zum Erliegen kommt und schließlich die Zelle stirbt. Untersuchungen des Mechanismus der Inaktivierung haben gezeigt, dass DT ADP-Ribose aus  $\text{NAD}^+$  unter Freisetzung von Nicotinamid auf EF2 überträgt [89]. Damit war DT eines der ersten entdeckten Toxine mit ADP-Ribosyltransferaseaktivität. Die Übertragung der ADP-Ribose auf den EF2 erfolgt an einem modifizierten Histidin, dem Diphthamid in der Position 715 [209, 210]. Durch die katalytische Aktivität von DT ist die Inaktivierung sehr vieler Ribosomen durch ein einziges Toxinmolekül möglich.

Ein weiteres hochwirksames Proteintoxin ist SAP, das wie DT die Proteinbiosynthese durch Modifikation der Ribosomen inhibiert. Jedoch ist SAP im Gegensatz zu DT ein pflanzliches Protein und verfügt über einen anderen Wirkmechanismus.

### 1.4.2.2 Saporin

Das pflanzliche Proteintoxin SAP wird von *Saponaria officinalis* gebildet [13]. Es besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit einer Molekülmasse von etwa 30 kDa. SAP gehört zur Gruppe der pflanzlichen *ribosome-inactivating proteins* (RIPs), die die Proteinbiosynthese vor allem von Säugetierzellen inaktivieren [9]. Im Unterschied zu DT inaktivieren sie jedoch nicht den EF2, sondern spalten Adenin aus der ribosomalen 28S-rRNA ab und werden daher als N-Glycosidasen bezeichnet. Die Abspaltung des Adenins der 28S-rRNA erfolgt am Adenin 4324 [195]. Dadurch wird die Proteinbiosynthese der Zelle gestoppt und die Zelle stirbt. Allerdings wurde für SAP gezeigt, dass sich seine N-Glycosidaseaktivität nicht auf die 28S-rRNA beschränkt, sondern dass Adenin auch aus anderer RNA und auch DNA freigesetzt wird [8, 84].

SAP besteht nur aus einer Kette und wird daher als Typ 1-RIP bezeichnet. Im Gegensatz dazu ist bei Typ 2-RIPs, wie Ricin, die Rezeptor bindende Domäne auf einer B-Kette lokalisiert. Für SAP ist dagegen keine solche Domäne beschrieben. Die Aufnahme in Zellen ist für SAP nicht eindeutig geklärt, man vermutet jedoch, dass SAP mit  $\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptoren interagiert und dann zusammen mit dem Rezeptor in die Zelle aufgenommen wird [23]. Der intrazelluläre Transport von SAP weicht offensichtlich von dem Weg ab, der für Ricin beschrieben wurde, da es für die Translokation in das Cytosol nicht durch Endosomen zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert wird [206]. SAP wird ebenfalls in einer Anzahl von Immunotoxinen und chimären Toxinen verwendet [91, 158, 221].

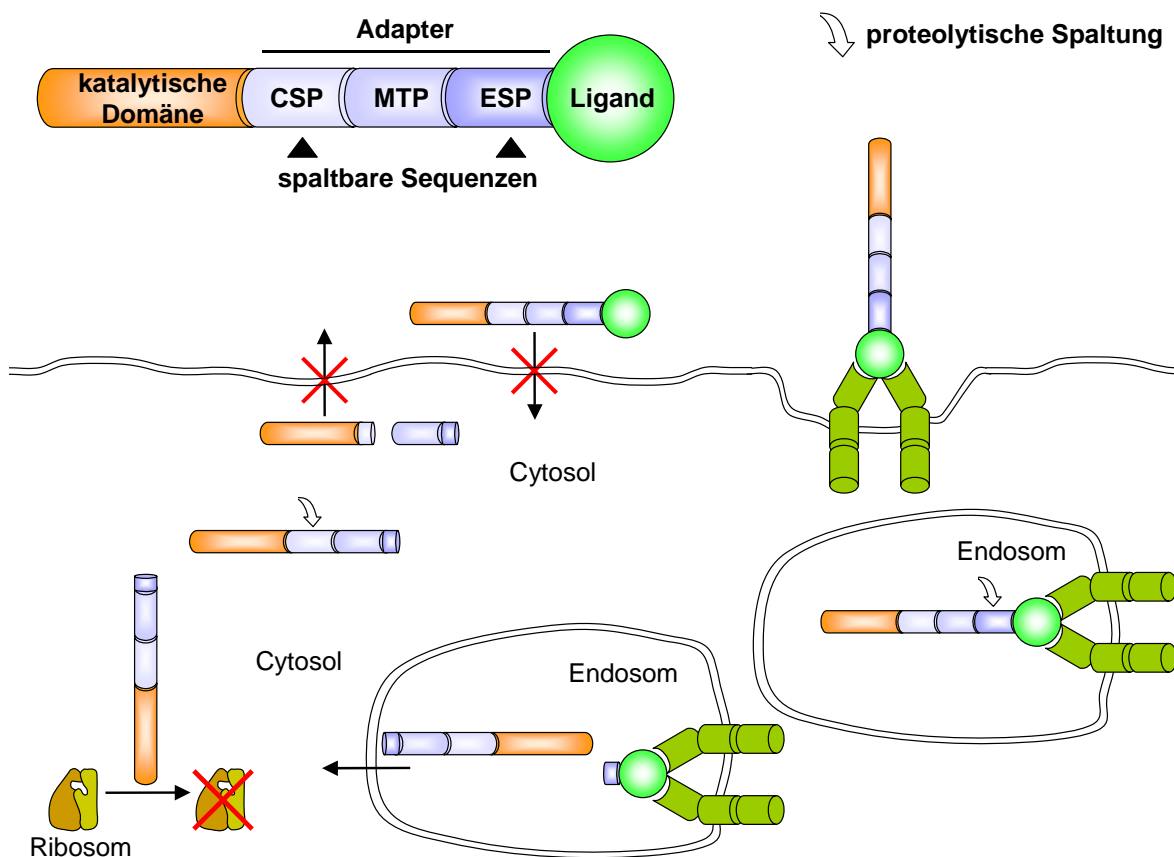
## 1.5 Optimierungen von Immunotoxinen und chimären Toxinen

Obwohl sich Immunotoxine und chimäre Toxine bereits mit einigen Vertretern in klinischen Studien befinden und Ontak auch schon als Medikament zugelassen ist, gibt es bei der Behandlung von Tumoren in Patienten dennoch Probleme. Trotz des tumorspezifischen Liganden wurden unerwünschte Schädigungen gesunder Zellen durch Immunotoxine und chimäre Toxine festgestellt [6, 152, 188]. Als Folge einer Schädigung von gesundem Gewebe tritt oft das *vascular leak syndrome* auf, bei dem durch eine Permeabilisierung der Endothelschicht die Gefahr pulmonaler Ödeme besteht [191]. Der Grund dafür liegt in der auf gesunden Zellen ebenfalls – nur in deutlich geringerem Ausmaß - erfolgenden Expression von den Zielstrukturen der Immunotoxine und chimären Toxine. Außerdem besitzen einige Immunotoxine und chimäre Toxine auch eine große Stabilität, wodurch sie lange nach Applikation im Körper zirkulieren und damit auch die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Schädigungen steigt [173]. Eine zu geringe Tumorpenetration stellt ein weiteres Problem dar, das bei soliden Tumoren die

Wirksamkeit verringert. Bedingt durch die Größe von Immunotoxinen und chimären Toxinen und den erhöhten interstitiellen Druck ist ihre Aufnahme herabgesetzt [94, 95]. Durch entsprechend kleinere Moleküle kann die Aufnahme jedoch verbessert werden [29]. Um das Konzept der Immunotoxine zu verbessern, wurde daher ein molekularer Adapter als Linker zwischen dem tumorspezifischen Liganden und der toxischen Komponente entwickelt.

### **1.5.1 Molekularer Adapter**

Der molekulare Adapter soll zwei Probleme von Immunotoxinen und chimären Toxinen verringern. Das primäre Ziel ist die Umgehung von Nebenwirkungen, vor allem des *vascular leak syndrome*, das aufgrund von langen Zirkulationsdauern durch die hohe Stabilität der Immunotoxine und chimären Toxine hervorgerufen wird. Als zweites Ziel soll der Adapter die Tumorpenetration verbessern, indem die resultierende Größe des Fusionsproteins verringert wird. Das wird erreicht durch Verwendung kurzer Peptide im Adapter, die den Transfer der katalytischen Domäne des Toxins ohne die toxineigene Transferdomäne bewirken. Der Adapter besteht aus drei Teilen und wird zum Verbinden des Toxins und des tumorspezifischen Liganden verwendet. Die Verknüpfung erfolgt dabei molekularbiologisch, so dass vollständige chimäre Toxine als ein Fusionsprotein exprimiert werden. Das Ziel der Verringerung von unspezifischer Toxizität gegenüber gesunden Zellen soll durch Senkung der Halblebenszeit erzielt werden, damit bei einer Behandlung von Patienten die zeitliche Belastung durch toxische Substanzen gering gehalten wird. Innerhalb des Adapters sind dazu Spaltstellen eingeführt worden. Der bereits in der Literatur beschriebene dreiteilige Adapter besteht aus einer cytosolisch spaltbaren Peptidsequenz (CSP), einem Membrantransferpeptid (MTP) und einer endosomal spaltbaren Peptidsequenz (ESP) [102]. Der Adapter besitzt durch seine geringe Größe, die durch ihn vermittelte Verringerung der Toxizität gegenüber gesunden Zellen und seine flexiblen Einsatzmöglichkeiten mit verschiedenen Liganden und Toxinen viele Vorteile gegenüber den herkömmlichen Immunotoxinen und chimären Toxinen. Der Aufbau und die Wirkungsweise von chimären Toxinen mit Adapter ist in einer schematischen Übersicht dargestellt (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Angestrebte Funktionsweise der chimären Toxine mit Adapter. Ohne Rezeptorbindung können die Konstrukte nicht in die Zelle eintreten (1). Durch Bindung an tumorspezifische Rezeptoren werden die chimären Toxine internalisiert (2). In den Endosomen wird der Ligand abgespalten (3). Nach Durchtritt des Toxins durch die endosomale Membran (4) werden im Cytosol die Ribosomen inaktiviert (5). Durch cytosolische Proteasen wird das MTP abgespalten (6) und das Toxin kann anschließend die Zelle nicht mehr verlassen (7).

Die Aufnahme des chimären Toxins in die Zelle ist nur durch die vom Liganden vermittelte Bindung an einen Rezeptor möglich (1). Dadurch kann das Konstrukt durch Rezeptor vermittelte Endocytose in Endosomen aufgenommen werden (2). Dort erfolgt eine Spaltung in der ESP, die zur Trennung des Toxins vom Liganden führt (3). Das durch Abspaltung des Liganden freigelegte MTP bewirkt den Transfer des Toxins mit CSP und MTP durch die Membran des Endosoms in das Cytosol (4). Im Cytosol kann das Toxin die Proteinbiosynthese der Zielzelle inaktivieren (5). In der apoptotischen Zelle kann die Spaltung in der CSP erfolgen, wodurch das Toxin von dem MTP abgetrennt wird (6). Die Abspaltung des MTP ist eine vorteilhafte Eigenschaft des Adapters, da das freigesetzte Toxin die Zelle nicht mehr verlassen kann. (7). Die cytosolische Abtrennung vom MTP ist zur Verminderung einer unspezifischen Aufnahme des Toxins in gesunde Zellen erforderlich. Anderenfalls könnte ein mit MTP freigesetztes Toxin die Plasmamembran anderer Zellen durchdringen. Auch ein nach Absterben der Zielzelle freigesetztes Toxin kann nicht in andere Zellen eindringen, da der für die Endocytose erforderliche Ligand nicht mehr an das Toxin gekoppelt ist.

Die CSP besteht aus einer zehn Aminosäuren langen Peptidsequenz, die Schnittstellen für verschiedene Proteasen beinhaltet. Caspasen sind Proteasen, die während der Initiation und Ausführung der Apoptose im Cytosol eine zentrale Rolle spielen und außerdem an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind [45, 128, 143]. Durch Immunotoxine wird in den Zielzellen Apoptose ausgelöst, wodurch einige Caspasen aktiviert werden [103, 104]. In der CSP liegen zwei Caspaseschnittstellen vor (YVHD für Caspase 1 [10] und DEVD für die Caspasen 3 und 7 [1]), sowie eine Erkennungssequenz für cytosolische Proteasen aus Hefe (RGP [233]) (Anhang Tab. 8.1). Die ESP besteht aus 13 Aminosäuren und die Sequenz wurde den natürlichen Spaltstellen von DT und *Pseudomonas* Exotoxin entlehnt [33] (Anhang Tab. 8.1). Die Spaltung in den proteasesensitiven Sequenzen der Toxine erfolgt durch Furin oder furinähnliche Enzyme in den Endosomen [72]. Die verstärkte Expression von Furin in Tumoren könnte eine Spaltung dieser Sequenz erleichtern [14, 15]. Die Funktionalität der Spaltung durch Furin innerhalb der ESP wurde durch *In-vitro*-Analysen erfolgreich bewiesen [197]. Als MTPs bezeichnet man Peptide, die Proteine oder DNA durch Membranen schleusen können. Die MTPs sind in der Regel nur bis 20 Aminosäuren lang, können jedoch vollständige Proteine erfolgreich translokieren [215]. Durch die Verwendung von MTPs besteht für Toxine mit eigener Translokationsdomäne die Möglichkeit nur die katalytische Domäne für ein chimäres Toxin zu verwenden, um somit die Gesamtgröße des Konstruktes zu verringern. Damit könnte die resultierende Tumورpenetration eines chimären Toxins durch die Verkleinerung erhöht werden. In der Literatur wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl unterschiedlicher MTPs mit teilweise großen Unterschieden beschrieben.

## 1.5.2 Membrantransferpeptide

Der Transport von Proteinen über Membranen ist ein Thema, das großes Interesse speziell im Bereich der pharmazeutischen Wirkstoffe hervorruft. Viele Wirkstoffe sind zwar potentiell sehr effektiv, können jedoch die Zellmembran nicht überwinden. Diese verhindert durch ihre Barrierefunktion den Transport von Makromolekülen, die größer als 600 Da sind und nicht durch aktive Prozesse durch die Membran transferiert werden [175]. Wirkstoffe, die die Zellen nicht erreichen können, werden daher schnell aus dem Körper entfernt und weisen schlechte Pharmakokinetiken *in vivo* auf [19].

Daher sind kleine Peptide, die andere Substanzen durch die Membran schleusen können, von großem Interesse. Solche Peptide werden als *protein transduction domains* [183], *cell penetrating peptides* [119], *membrane translocating sequences*, trojanische Peptide [39, 65] oder auch MTPs bezeichnet. Diese kleinen Peptide (in der Regel etwa 15 Aminosäuren) sind in der Lage, Makromoleküle durch die Zellmembran in das Cytosol von Zellen zu transferieren [16, 190, 204]. Der Transfer erfolgt dabei jedoch ungerichtet und unspezifisch für alle Zellen. Die MTPs entstammen unterschiedlichen Quellen und

sind auch in ihrer Komposition sehr variabel. So gibt es MTPs, die aus viralen, bakteriellen, pflanzlichen oder tierischen Proteinen stammen. Ihre biologische Funktion hat in vielen Fällen nichts mit der Transferfunktion zu tun. Sie sind üblicherweise auch nur ein kleiner Teil von Proteinen, die eine gänzlich unterschiedliche Funktion ausüben. Die Struktur dieser MTPs ist ebenfalls sehr unterschiedlich und lässt sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe besteht aus Peptiden, die sehr viele basische Aminosäuren enthalten. In der zweiten und dritten Gruppe sind solche Peptide zusammengefasst, die bevorzugt  $\alpha$ -Helices beziehungsweise  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweisen.

Der wohl bekannteste Vertreter der basischen MTPs ist die Tat-Sequenz aus dem *human immunodeficiency virus 1*. Sie ist Teil des *transcriptional activator Tat* Proteins [61, 75]. Die Tat-Sequenz besteht fast ausschließlich aus den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin und hat eine Länge von neun Aminosäuren. Es gibt eine Anzahl von Modifikationen in der Primärsequenz von Tat, die durch genetische Variationen in unterschiedlichen Virenstämmen bedingt wird. An Tat gekoppelte Liposomen wurden erfolgreich in Zellen transportiert [202, 203] und mit Tat verknüpftes Fluorescein wurde *in vivo* in Mäusen ebenfalls mit Erfolg in Geweben nachgewiesen [174]. Die Aufnahme durch Tat wurde zuerst als unabhängig von Endocytoseprozessen beschrieben, da die Aufnahme von Tat-Fusionen auch bei 4 °C erfolgte [214]. Aktuelle Untersuchungen der Tat vermittelten Aufnahme von Makromolekülen in Zellen zeigten jedoch, dass die Aufnahme mittels Tat doch durch endocytotische Prozesse erreicht wird [124, 183] und dass die zuvor beschriebene Unabhängigkeit des Transportes von der Endocytose vielmehr auf Artefakten der Fixierung beruht [162].

Die HA2-Sequenz gehört zu der Gruppe der  $\alpha$ -helicalen MTPs und entstammt der N-terminalen Sequenz der Hämagglutinin Untereinheit HA-2 des Influenzavirus [156]. Eine Sequenz von 23 Aminosäuren wurde identifiziert, die in der Lage ist, DNA sehr effektiv in Zellen zu transferieren [218]. Die HA2-Sequenz bildet bei niedrigem pH-Wert in den Endosomen eine  $\alpha$ -Helix aus, die durch einen neutralen pH-Wert destabilisiert wird [114]. Die  $\alpha$ -Helix ist in der Lage, sich in die Membran zu inserieren und damit den Durchtritt von HA2 und dem an das MTP fusionierte *cargo* in das Cytosol zu bewirken [156]. Um eine stärkere Destabilisierung der  $\alpha$ -Helix bei neutralem pH zu bewirken, wurde eine Modifikation innerhalb der HA2-Sequenz eingeführt. Dazu wurde Glycin in der Position 4 durch Glutamat ausgetauscht (HA2(4E)) [218]. In einem Modellversuch konnten Wagner *et al.* zeigen, dass die  $\alpha$ -Helixbildung und ein damit einhergehender Transport von Transferrin durch Membranen nur bei niedrigem pH erfolgt [218].

Protegrine bilden eine große Gruppe von zellpenetrierenden Proteinen [194], die eine natürliche Abwehr gegen mikrobielle Angriffe vermitteln und Teil des Immunsystems von Pflanzen und Tieren sind. Sie weisen eine erhebliche strukturelle Varianz auf, so dass viele

Protegrine  $\beta$ -Faltblätter ausbilden, während andere aus  $\alpha$ -Helices bestehen. Die  $\beta$ -Faltblatt ausbildenden Protegrine gehören damit zu der dritten Gruppe der MTPs. Das Protegrin-1 dieser Gruppe wurde als Porenbildner in der Membran von Mikroorganismen beschrieben [127]. Eine Variante von Protegrin-1 (SynB1) wurde als MTP beschrieben und konnte *in vivo* in Mausversuchen Doxorubicin in alle Gewebe und sogar über die Blut-Hirn-Schranke transportieren [167, 168]. Die Aufnahme des mit SynB1 verbundenen Wirkstoffes erfolgt durch einen temperatur- und energieabhängigen Endocytoseprozess [42].

Mit der Membrantransfersequenz (MTS) und dem Translokationsmotiv (TLM) wurden zwei weitere MTPs beschrieben, die jedoch keiner der drei zuvor beschriebenen Gruppen angehören. Die MTS ist ein 12 Aminosäuren langes Peptid, das aus Alanin, Valin, Leucin und Prolin besteht und einer modifizierten Signalsequenz von Wachstumsfaktoren aus Kaposi-Fibroblasten entstammt [164, 165]. Ein Fusionsprotein aus MTS und Glutathion-S-Transferase konnte erfolgreich in Zellen transportiert werden. Für das ebenfalls 12 Aminosäure lange TLM wurde der Transfer von *green fluorescent protein* in Zellen nachgewiesen [150]. Bei der TLM handelt es sich um eine Sequenz aus der PreS2-Domäne des Oberflächenantigens des Hepatitis-B-Virus. Damit wurden zwei MTPs beschrieben, die in der Lage sind große Proteine mit bis zu 40 kDa über Membranen in Zellen zu transportieren.

## 1.6 Alternative Tumorthapeutika

Neben den herkömmlichen Behandlungsmethoden gegen Tumorerkrankungen und den beschriebenen Alternativen mit Antikörpertherapien, Tumorstoffen, Immunotoxinen und chimären Toxinen gibt es auch Ansätze zur Behandlung von Tumoren durch Naturstoffe. Dazu gehören auch Saponine, eine breitgefächerte Substanzklasse mit vielen bemerkenswerten Eigenschaften.

Saponine sind Glycoside aus Pflanzen und bestehen aus einem Grundgerüst, dem Aglycon, und einer oder mehreren Zuckerketten, die mit dem Aglycon verknüpft sind. Das Aglycon kann entweder eine steroidale oder eine triterpenoide Struktur aufweisen. Innerhalb der Aglycone besitzen die Saponine eine erhebliche Varianz. Die Unterschiede innerhalb der Zuckerketten sind auch sehr groß, wobei sich die Unterschiede nicht nur auf die Zusammensetzung der Ketten durch verschiedene Zucker bedingen, sondern auch auf den Grad der Verzweigung dieser Zuckerketten. Üblicherweise sind Glucose, Galactose, Gluconsäure, Xylose, Rhamnose und Arabinose in den Saponinen vorhanden [60]. Die Vielfältigkeit der Funktionen, die für Saponine beschrieben sind, sind wahrscheinlich auch mit der großen Anzahl unterschiedlicher Strukturen verbunden. Unabhängig von saponinspezifischen Eigenschaften besitzen alle Saponine auch eine membran-

permeabilisierende Wirkung [157]. Es wird vermutet, dass Saponine die Zellmembranen ab einer bestimmten Schwellenkonzentration durch Porenformation permeabilisieren [130, 176]. Die Wirkung der Saponine auf Membranen wird durch eine hydrophobe Interaktion des Aglycons mit in der Membran vorhandenem Cholesterol und anderen Steroiden erklärt [7], und Gogelein *et al.* konnten zeigen, dass Cholesterol für die Membraninteraktion von Saponinen wichtig ist [70]. Jedoch konnten Segal *et al.* darlegen, dass für einige Saponine die Abwesenheit von Cholesterol in der Membran die Porenbildung nicht verhindert [177]. Die Unterschiede in den Ergebnissen sind vermutlich durch die Verwendung anderer Saponine mit unterschiedlichen Eigenschaften zu erklären. Gegen eine nur durch das hydrophobe Aglycon begründete Interaktion mit der Membran spricht die Tatsache, dass auch die Zuckerketten der Saponine einen immensen Einfluss auf die Wirkung der Saponine aufweisen. Wieder ergeben sich in Abhängigkeit des untersuchten Systems Unterschiede über die Auswirkungen von einer gegenüber zwei oder kurzen gegenüber langen Zuckerketten auf die Membranpermeabilität [225, 228]. Die Analyse von Melzig *et al.* bestätigt jedoch eindeutig die Relevanz von Zuckerketten, da die Aktivität von Saponinen ohne Zuckerketten erheblich vermindert ist [131]. Insgesamt hängt die individuelle Wirkung eines Saponins von seinem Aglycon, den Zuckerketten und der Zusammensetzung der Zielmembran ab [60].

Die antitumorale Wirkung von Saponinen hängt aber vermutlich auch mit der Interaktion von Saponin und Membranen zusammen. Die dabei ablaufenden Prozesse sind nicht bekannt, jedoch konnte in Mausmodellen eine inhibierende Wirkung auf Tumorwachstum und Angiogenese durch Saponine aus Seegurken festgestellt werden [201]. Für ein anderes Saponin konnte eine chemopräventive Wirkung und eine Verringerung von Mutageneseprozessen gemessen werden [153]. Einige Effekte, wie die durch Saponine bewirkte Aktivierung von natürlichen Killerzellen zur natürlichen Abwehr von Tumorzellen, scheinen jedoch nicht mit der Porenbildung durch Saponine zusammenzuhängen [226]. Interessanterweise konnte Nakata *et al.* durch gemeinsame Applikation des Ginsenosid Rh2-Saponins und cis-Diamminedichloroplatinum(II) das Wachstum von humanen Ovarialkarzinomzellen in Nacktmäusen signifikant senken. Durch Kombination des aus *Agrostemma githago* L. gewonnenen Saponins und des Toxins Agrostin konnte eindeutig eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen auf Zellen nachgewiesen werden [83]. In einer ersten Analyse der synergistischen Wirkung von chimären Toxinen und Saponinen konnte für Saponinum album eine eindeutige bis zu 100 000fache Steigerung der Cytotoxizität des chimären Toxins gezeigt werden [86]. Die durch Kombination mit anderen Substanzen erzielten Effekte der Saponine werden mit Saponinkonzentrationen erreicht, die deutlich unterhalb der für Porenformation notwendigen Konzentrationen liegen. Daher müssen andere Eigenschaften der Saponine für die Verstärkung der toxischen Wirkung verantwortlich sein.



## 1.7 Zielsetzung

Bei der Entwicklung von Immunotoxinen und chimären Toxinen stellt die Analyse neuer Konstrukte vor den *In-vivo*-Untersuchungen einen wichtigen Teilschritt für die Feststellung der Eignung für weitere Studien dar. Da viele erfolgreiche Fusionsproteine Proteintoxine enthalten, sind *In-vitro*-Testsysteme für eine schnelle und sensitive Analyse sehr wichtig. Daher war eines der Ziele die Weiterentwicklung eines Aktivitätsassays für ADP-ribosylierende Proteintoxine zu einem Festphasenassay. Der Assay sollte insbesondere Quantifizierungen ermöglichen sowie eine erhöhte Sensitivität erreichen.

Neben Untersuchungen zur Aktivität von chimären Toxinen *in vitro* ist die Entwicklung effizienter chimärer Toxine gegen tumorassoziierte Antigene von zentraler Bedeutung. Mit dem IL2R wurde in der Literatur ein Rezeptor beschrieben, der ein tumorassoziiertes Antigen ist und sich für gerichtete Tumortherapeutika als Zielstruktur eignet. Deshalb sollten unterschiedliche Liganden gegen IL2R in chimären Toxinen dargestellt werden und die erhaltenen chimären Toxine anhand von *In-vitro*-Aktivitätsassays auf ihre Toxizität und Zellbindung analysiert werden. Schließlich sollte die Cytotoxizität in IL2R überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden.

Da in dieser Doktorarbeit im Wesentlichen chimäre Toxine mit einem molekularen Adapter verwendet wurden, sollte aufbauend auf bestehenden Konstrukten der Adapter in seiner Funktion näher analysiert werden. Für die angestrebte Funktion des Adapters ist der Transfer des Toxins in das Cytosol nach Abspaltung des tumorspezifischen Liganden von größter Bedeutung, da die Toxine ihre cytotoxische Aktivität erst im Cytosol der Zielzellen entfalten. Um die Effektivität des Membrantransfers zu untersuchen, sollten chimäre Toxine mit unterschiedlichen MTPs im Adapter kloniert und charakterisiert werden. Die Charakterisierung sollte die Analyse der Aktivität der Toxine, die Untersuchung der Toxizität gegenüber Zellen sowie die Bindung an Zielzellen und Kontrollzellen umfassen. Die Feststellung, dass Saponine die Aufnahme und Wirkung von chimären Toxinen wesentlich steigern können, bietet eine hervorragende Möglichkeit zur Verbesserung von Tumortherapien. Um die Möglichkeiten zur Erhöhung der Wirkung von chimären Toxinen gegenüber Tumorzellen zu validieren, sollten bestehende und bereits umfassend charakterisierte chimäre Toxine mit Saponinen kombiniert werden, um eine mögliche Auswirkung auf die Cytotoxizität der chimären Toxine zu erfassen und zu beschreiben.