

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige Immunoadaptertoxine für die Krebstherapie entwickelt, die aus einem pflanzlichen Toxin, einem molekularen Adapter und einem tumorspezifischen Liganden bestehen. Dabei wurden verschiedene Variationen im Adapterbereich eingeführt sowie die vollständigen Immunoadaptertoxine rekombinant hergestellt und funktionell charakterisiert. Zur Bestimmung der *in vitro*-Aktivität dieser Toxinkonstrukte wurde ein neuartiger Assay, der Adeninquantifizierungsassay, entwickelt. Die Funktionalität in der Zellkultur wurde anhand der Cytotoxizität gegenüber Zelllinien ermittelt, die die Rezeptoren des zugehörigen Liganden exprimieren.

4.1 Toxindomäne

4.1.1 *In vitro*-Testsystem für RIPs: Der Adeninquantifizierungsassay

Bei der Arbeit mit rekombinanten Immunotoxinen bedarf es eines zuverlässigen Testsystems, das in der Lage ist, die Funktionalität der verwendeten Toxine zu überprüfen. Das in dieser Arbeit verwendete RIP-Toxin Saporin gehört zu der Klasse der N-Glycosidasen. Diese inaktivieren nach Eintritt in das Cytosol die Ribosomen, indem sie das Adenin an Position 4324 im Sarcin-Loop der 28S-rRNA abspalten.

Bisher wurden zur Detektion der RIP-Aktivität hauptsächlich vier Methoden verwendet (siehe 1.5.1). Diese lassen sich in indirekte Testsysteme, die die Auswirkung auf die Translationsaktivität im Reticulozytenextrakt [78,79] oder die aminkatalysierte Hydrolyse von RNA nach Deadenylierung [68,79] detektieren, und in direkte Testsysteme unterteilen, die die Freisetzung von radioaktiv markiertem Adenin aus einem radioaktiven DNA-Substrat [80] oder die Menge von fluoreszenzmarkierten Adenin in der HPLC [82] messen. Die genannten Methoden weisen jedoch gravierende Nachteile auf, die eine *screening*-artige Messung, die für die Analyse verschiedener Toxinmutanten und toxinhaltiger Fusionsproteine notwendig ist, unmöglich machen. Sie stellen sich entweder kompliziert und zeitaufwendig dar und ermöglichen nur eine

semiquantitative Bestimmung der Enzymaktivität oder erfordern eine sehr aufwendige apparative Einrichtung. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Adenin-quantifizierungsmethode entwickelt, mit der die Enzymaktivität der RIPs in einem einzigen Reaktionsansatz colorimetrisch bestimmt werden kann. Aufgrund der Tatsache, dass die N-Glycosidaseaktivität der RIPs nicht nur auf die 28S-rRNA der Ribosomen beschränkt ist, kann hier die Freisetzung von Adenin aus anderen RNA- und DNA-Substraten als direktes Maß für die Aktivität der RIPs herangezogen werden.

Bei der Kalibrierung des Assays zeigte die Messung von Adenin eine strikte Linearität in einem Bereich von 200 pmol bis 10 000 pmol (Abbildung 6, S. 50), so dass RIP-Aktivitäten über einen Bereich von mehreren Zehnerpotenzen gemessen werden konnten. Erst oberhalb von 10 000 pmol trat eine Substratsättigung auf.

In Bezug auf die Substratspezifität der verschiedenen Toxine zeigte sich in dieser Arbeit, dass die Verwendung von hsDNA die größte Freisetzung von Adenin bewirkte. Auch war eindeutig eine sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängige Linearität zwischen eingesetztem Toxin und freigesetzter Menge an Adenin zu detektieren (Abbildung 9, S. 52). Die Verwendung von rRNA als Substrat ergab im Vergleich zu hsDNA für Dianthin-30 und Saporin einen um 82 % bzw. 79 % verminderten Betrag an Adeninfreisetzung (Tabelle 9, S. 52). Dies wird durch Untersuchungen von Barbieri *et al.* [154] bestätigt, die mit Chloracetaldehyd markiertem Adenin in der HPLC eine Verringerung von 93 % und 82 % nachgewiesen haben. Ricin zeigte gegenüber den verwendeten Substraten eine weit geringere Adeninfreisetzung. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von poly (A)-RNA für die in dieser Arbeit untersuchten Toxine ungeeignet ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit großem Erfolg ein neuer Assay etabliert, der durch seine Vielseitigkeit und seine Messgeschwindigkeit gegenüber den bisher verwendeten Verfahren klare Vorteile zeigt. Er ist ähnlich sensitiv wie der von Zamboni *et al.* [82] entwickelte Assay, der die HPLC-Technik (Detektionsgrenze bei Saporin 0.1 pmol) nutzt, hat aber den klaren Vorteil, bis zu 96 Proben gleichzeitig messen zu können, während bei der HPLC-Technik die Proben nacheinander gemessen werden müssen. Eine Methode, die ebenfalls eine Parallelbestimmung der Proben ermöglicht und auch ähnlich sensitiv ist, ist die von Brigotti *et al.* [80], die allerdings der Verwendung von Radiochemikalien bedarf. Der in dieser Arbeit entwickelte Assay, der nicht radioaktiv arbeitet, bildet eine sehr gute Grundlage, im normalen Laborbetrieb schnell und unproblematisch Adenin in verschiedenartigen Anwendungen zu quantifizieren, insbesondere als Maß für die N-Glycosidaseaktivität der Toxinkonstrukte nach deren Expression und Reinigung.

4.1.2 Rekombinante Darstellung

Bislang wurde eine Vielzahl von Immunotoxinen aus isolierten Toxinen hergestellt, die mittels chemischer Kopplung an ihre Liganden gebunden wurden. In dieser Arbeit wurde die rekombinante Darstellung der Toxine gewählt. Bedingt durch die Codon-Zusammensetzung von Saporin zum einen und die N-Glycosidaseaktivität gegenüber prokaryotischen Ribosomen zum anderen war ein gut abgestimmtes Expressionssystem unausweichlich. Die Verwendung des *E. coli*-Bakterienstammes Rosetta (DE3)/pLysS ermöglichte die erfolgreiche Überexpression und gleichzeitig neue Aufreinigungsstrategien.

Als Expressionsplasmid wurde das durch den T7-Promotor kontrollierte pET-System ausgewählt, welches für eine ganze Reihe ähnlicher toxischer Konstrukte ebenfalls Anwendung findet [155-157]. Die Expression der Toxine mit einem poly-Histidinrest (*His-Tag*) ließ eine Reinigung der Toxine und auch der Fusionstoxine unter beinahe einheitlichen Bedingungen zu. Die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen zeigte den Vorteil, dass eine vorzeitige Spaltung innerhalb des Adapters vermieden wurde, da unter diesen Bedingungen die durch zelluläre Proteasen bedingten Abbauprozesse minimiert werden [158]. Der *His-Tag* ermöglichte darüber hinaus die gezielte Rückgewinnung der Konstrukte nach Inkubation mit humanem Plasma in den Untersuchungen bezüglich der Plasmastabilität (Abschnitt 3.2.6, S. 72).

4.1.3 Erzeugung von Deletionsmutanten

Zur Optimierung des Membrantransfers wurden eine Reihe von Deletionen in das zu transportierende Toxin Saporin eingeführt. Ziel hierbei war es, eine Variante zu finden, bei der die Größe des Toxins verringert war, ohne dass die enzymatische Aktivität verloren geht. Grundlage für die Wahl der Deletionen bildeten die aus der Ricin A-Kette gewonnenen Daten, die von der Arbeitsgruppe um Ira Wool veröffentlicht wurden [159,160]. Diese zeigten, dass Deletionen in einer Größenordnung von 5 Aminosäuren, die über die gesamte Sequenz von Ricin A verteilt wurden, in den meisten Fällen zu einem Erhalt der N-Glycosidaseaktivität führten, und ein am N-Terminus um 20 AS verkürztes Ricin A ebenfalls N-Glycosidaseaktivität zeigte. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten innerhalb der Gruppe der RIPs [150] wurden die eingefügten Deletionen weitestgehend mit diesen Daten abgestimmt.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch, dass bereits das Einführen von Deletionen mit einer Gesamtzahl von 12–14 AS im Saporin zu einem Aktivitätsverlust führte. Bislang wurde berichtet, dass ein am N-Terminus um 28 AS verkürztes Saporin enzymatisch inaktiv ist [161]. In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass schon

die Deletion der ersten 14 AS zu einem Verlust der Aktivität im Saporin führt. Um aber einen größenbedingt verbesserten Transfer des Saporins in die Zelle zu erzielen, wären weit größere Deletionen notwendig gewesen. Aus diesem Grund wurde auf weitere Mutationen verzichtet und Saporin-3 als ganzes für den Aufbau der Immunotoxine verwendet. Für die Optimierung des Transfers in die Zelle wurden andere Strategien gewählt (siehe 4.2).

4.1.4 Funktionelle Charakterisierung

Da es sich bei Saporin um ein pflanzliches Toxin handelt, welches viele für *E. coli* seltene Codons und eine hohe Toxizität gegenüber Bakterien aufweist, war die Untersuchung der enzymatischen Aktivität *in vitro* nach Aufreinigung der Fusionsproteine sehr wichtig.

Anhand ihrer N-Glycosidaseaktivität konnte erstmals gezeigt werden, dass Konstrukte mit einem N-terminalen His-Tag, die unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt wurden, nach einer Dialyse als Renaturierungsmaßnahme volle enzymatische Aktivität besitzen. Das Anhängen der Fusionspartner führte hier nicht zu einer signifikanten Abschwächung der *in vitro*-Aktivität (siehe Tabelle 11, S. 73), wie es von Chandler *et al.* [160] für rekombinante Saporin-hbEGF-Konstrukte nachgewiesen wurde. Dass dort die Aktivität um den Faktor 1 000 verringert war, ist möglicherweise damit zu erklären, dass hbEGF auf Grund seiner Größe (etwa 22 kDa) in wesentlich stärkerem Maße Einfluss auf die Aktivität des Toxins nimmt als EGF (etwa 6 kDa). Auch stellt der als Testsystem verwendete *in vitro*-Translationassay andere Voraussetzungen in Bezug auf den sterischen Aufbau der Toxine als der in dieser Arbeit entwickelte Adeninquantifizierungsassay. Andere Untersuchungen zum Einfluss eines Liganden auf die N-Glycosidaseaktivität von Saporin zeigten, dass Saporin-6-Fusionskonstrukte, die über eine Disulfidbrücke mit F(ab)₂-Fragmenten gegen HER1 verbunden sind, ebenfalls keine drastische Reduzierung der *in vitro*-Aktivität (Aktivitätsverlust von 30 %) aufwiesen [162].

Die rekombinante Herstellung und die anschließende denaturierende Aufreinigung stellen somit ein geeignetes System für die Darstellung der Immunotoxine in reiner und aktiver Form dar.

4.2 Adapterdomäne

Das Kernstück des in dieser Arbeit entwickelten Immunotoxins bildet der molekulare Adapter, der aus der endosomal spaltbaren Peptidsequenz (ESP) einer Transmembran-

domäne und einer cytosolisch spaltbaren Peptidsequenz (CSP) besteht. Er verbindet den Liganden mit dem Toxin und stellt dessen effektiven Membrantransfer in das Cytosol sicher, so dass es zur Akkumulation des Toxins in der Zielzelle kommt. Der Aufbau und Wirkmechanismus ist in Abbildung 2, S. 20 der Einleitung anschaulich dargestellt.

4.2.1 ESP

Im Anschluss an die clathrinvermittelte Endocytose gelangt das an den HER1-Rezeptor gebundene Immuntoxinkonstrukt in die Endosomen der Zielzelle, wo es innerhalb der ESP durch Furin oder furinähnliche Proproteinconvertasen gespalten wird. Ausgangslage für die endosomal spaltbare Sequenz war die von J. Keller (Institut für Klinische Chemie, UKBF, FU Berlin) hergestellte ESP. Diese basiert auf den zusammengefügt, proteasesensitiven Bereichen von *Pseudomonas* Exotoxin (PE) und Diphtheriatoxin (DT).

Furin selbst dient zum Aktivieren und Prozessieren vieler Proteine. Bei Furin handelt es sich um eine Ca^{2+} -abhängige Serinprotease, die ubiquitär in der Zelle vorliegt und sowohl in Assoziation mit dem endosomalen System, dem *Trans*-Golgi-Netzwerk als auch mit der Plasmamembran auftritt [163]. Das optimale Konsensusmotiv für Furin lautet Arg-X-Lys/Arg-Arg, eingeschränkt erkannt wird auch die Sequenz Arg-X-X-Arg [163,164]. Aus den Literaturdaten geht hervor, dass trotz Verwendung dieser beiden Sequenzen als Spaltmotiv nicht unbedingt Furin ausschließlich für eine Spaltung verantwortlich sein muss und dass diese auch außerhalb der Endosomen erfolgen kann [165,166]. Generell konnte die *in vitro*-Spaltbarkeit der ESP durch rekombinantes Furin innerhalb eines Adapters zwischen DT und eGFP von J. Keller [167] bestätigt werden.

In dieser Arbeit wurde die ESP in einer völlig neuen Umgebung untersucht. Die Spaltbarkeit wurde innerhalb des Immuntoxins SapAd_{CTE}EGF charakterisiert. Die Spaltung mittels Furin und Membranfraktionen in Abbildung 27, S. 71 belegt eindeutig die Funktionalität der ESP und ist ein Beweis für die Universalität dieses Adapterteils. Die nur unvollständige Spaltung und die unvollständige Inhibierung mittels Furinconvertase-Inhibitor untermauern die Theorie, dass nicht ausschließlich Furin für die Spaltung verantwortlich ist, sondern auch furinähnliche Enzyme (Proproteinconvertasen) an der Spaltung beteiligt sind [165,166]. Ein weiteres Indiz hierfür ist die Instabilität der ESP-haltigen Konstrukte während der Expression und Aufreinigung (Abschnitt 3.2.3.1, Abbildung 22, S. 67).

Durch die Verwendung einer mutierten ESP sollte geklärt werden, ob die optimale Erkennungssequenz für Furin maßgeblich für die in den Bakterien beobachtete Spaltung verantwortlich ist. Bereits im Zuge der Aufreinigung konnte ein starker Zugewinn an

Stabilität durch das Einführen einer Mutation (ESP*) erreicht werden, während die unmodifizierte ESP weiterhin starke Degradationen zeigte (Abbildung 22, S. 67).

In Untersuchungen der Stabilität der ESP- und ESP*-haltigen Immunoadaptortoxine und der adapterfreien Immunotoxine in humanem Blutplasma (Abbildung 28, S. 72) waren ebenfalls starke Unterschiede zu verzeichnen. Während die ESP bereits in der ersten Stunde fast völlig gespalten wurde (zu 69 %), zeigte die ESP* eine Halbwertszeit von ungefähr 6 Stunden. Bei der Bewertung der Plasmastabilität muss berücksichtigt werden, dass eine hohe Stabilität zu einer effizienteren Tumorpenetration führt, aber gleichzeitig die Gefahr von erheblichen Nebenwirkungen verstärken kann [100], so dass je nach Anwendung ein Kompromiss in Bezug auf die Stabilität getroffen werden muss. Eine sehr hohe Plasmastabilität zeigten hier die von Franssen *et al.* [42] verwendeten lysosomal spaltbaren Peptidlinker (Ala-Leu-Ala-Leu) sowie chemische Ester- und cis-Aconityllinker. Die von Fitzpatrick *et al.* [168] bestimmte Zeit der kompletten *in vitro*-Spaltung desselben lysosomal spaltbaren Peptidlinkers wies mit 48 h ebenfalls einen sehr hohen Wert auf. Durch diese langsame Spaltung ist dieser Peptidlinker aber ungeeignet für die notwendige schnelle Freisetzung des Toxins im Endosom / Lysosom. Mit den beiden in dieser Arbeit entwickelten Sequenzen ist hier die Möglichkeit geschaffen, durch rekombinante Herstellung Proteinbereiche beliebig zu kombinieren und damit deren Eigenschaften wie die Plasmastabilität stark variieren zu können.

4.2.2 TLM

Die funktionelle Charakterisierung der rekombinant hergestellten Membrantransfersequenz war nicht Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit. In unserer Arbeitsgruppe konnte durch den Vergleich verschiedener solcher Sequenzen (siehe Tabelle 4, S. 18) in Immunotoxinen, bestehend aus DT, Adapter und EGF, bislang keine Verbesserung der Toxinaufnahme, wohl aber eine Veränderung der Lokalisation in der Zelle gezeigt werden²(siehe auch 4.4.1).

4.2.3 CSP

Die Aufgabe der CSP innerhalb des Adapters ist die Sicherstellung der Akkumulation des Toxins im Cytosol. Die in dieser Arbeit verwendete CSP wurde aus den Erkennungsstellen von Caspasen zusammengesetzt, wie in Abbildung 17, S. 61 schematisch dargestellt ist. Solche Caspase-Erkennungssequenzen wurden ausgewählt,

² Mark Sutherland, Institut für Klinische Chemie, UKBF, FU Berlin, unveröffentlichte Daten.

da Caspasen wie die Caspase-1 bei entzündlichen Reaktionen aktiviert werden und auch die Immunotoxine selbst Apoptose induzieren, wodurch weitere Caspasen aktiviert werden, wie bereits ausführlich in Abschnitt 1.8.2, S. 16 beschrieben wurde.

In dieser Arbeit konnte experimentell bestätigt werden, dass die CSP im Cytosol gespalten wird. Sowohl rekombinante Caspase (Abbildung 24, S. 69) als auch Cytosolfractionen mit und ohne Staurosporinvorbehandlung der Zellen (Abbildung 25, S. 70) waren in der Lage, die Sequenz spezifisch zu schneiden. Die Zugabe eines Caspase-Inhibitors hingegen reduzierte eine Spaltung. Die Anwesenheit von aktivierten Caspasen durch Staurosporinvorbehandlung der Zellen führte wie zu erwarten zu einer schnelleren Kinetik als in den entsprechenden Experimenten ohne Voraktivierung. Der Vergleich der Spaltbarkeit der beiden Sequenzen CSP und CSP* (Abbildung 26, S. 71) zeigte, dass die Spaltung der CSP* schneller verläuft. Somit führt das Einfügen weiterer Spaltstellen zu einer Verbesserung der cytosolischen Spaltbarkeit der Sequenz. Ob dies durch eine Spacer-Funktion, also durch eine verbesserte Zugänglichkeit der Bindung erreicht wurde, oder durch die zusätzlichen Spaltstellen selbst, bleibt zu klären. Bislang war es nur auf dem chemischen Weg in Form einer Disulfidbindung möglich eine cytosolische Spaltung in einem Linker herbeizuführen. Eine Disulfidbindung hat aber den Nachteil, dass sie in humanem Plasma [50] und auch in FCS-haltigem Zellkulturmedium [169] sehr instabil ist. Durch die Verwendung sterisch gehinderter Disulfidbindungen innerhalb des Linkers lässt sich die Bindung stabilisieren [51], solche Linker sind jedoch bislang nur begrenzt kommerziell verfügbar und nicht in einem biochemischen Labor zu synthetisieren. Durch den Vergleich der Spaltbarkeit des kompletten Immunoadaptertoxins SapAd_{CTE}EGF mit denen ohne Liganden (Abbildung 26, S. 71), bei dem sich eindeutig eine Präferenz für das ligandenfreie Konstrukt als Spaltsubstrat zeigte, wird klar, dass das Gesamtkonzept des Adapters, dessen Aufgabe die stufenweise Freisetzung der einzelnen Komponenten darstellt (Abbildung 1, S. 6), von der CSP unterstützt wird, wohingegen mit chemischen Linkern bislang maximal eine einstufige Freisetzung im Cytosol erreicht werden kann.

4.3 Ligand

Der molekulare Adapter sollte in dieser Arbeit mittels eines Testliganden funktionell charakterisiert werden. Gewählt wurde hierfür EGF, da er hinsichtlich seiner Größe, Immunogenität, dem Vorhandensein des entsprechenden Rezeptors auf Tumorzellen und seiner Aufnahme über Endocytose die für eine Charakterisierung notwendigen Bedingungen (beschrieben in Abschnitt 1.5.2, S. 11) erfüllt. Auch wenn normale Zellen

EGF-Rezeptoren exprimieren, führt die erhöhte Expression der Rezeptoren auf Tumorzellen [170] zu einem höheren Grad der Zielzellspezifität.

Die Klonierung des Liganden stellte unter den in Abschnitt 3.2.3.1, S. 65, beschriebenen Bedingungen kein Problem dar. Die Expression des etwa 6 kDa großen Proteins als Fusionsprotein mit dem Immunotoxin gelang unter den für die Toxine optimierten Bedingungen gut und zeigte auch wie zu erwarten keine Einflüsse auf die Aufreinigung. Obwohl die Identität des EGF im Immunoblot aufgrund der schlechten Qualität der käuflich zu erwerbenden Antikörper nicht bestätigt werden konnte, wurde seine Funktionalität über die rezeptorvermittelte Aufnahme der Toxine nachgewiesen. Dies gelang indirekt über die Messungen der Cytotoxizität der saporinhaltigen, EGF-tragenden Immunotoxine. Außerdem konnte in der Arbeitsgruppe über Immunfluoreszenz gegen Diphtheriatoxin eine Aufnahme der EGF-tragenden Immunotoxine bestätigt werden³.

Für die weitere Charakterisierung der EGF-tragenden Immunotoxine wurden drei verschiedene Zelllinien ausgewählt, zum einen die HER1-defiziente humane Brustkrebszelllinie MCF7, zum anderen die mit HER1-transfizierte murine Zelllinie HER14 und die natürlicherweise HER1-überexprimierende epidermale Karzinomzelllinie A431. Die vorhergesagten Mengen an HER1 konnten im Westernblot eindrucksvoll bestätigt werden (Abbildung 29, S. 74). Obwohl EGF einen natürlichen Liganden darstellt, konnte in in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EGF in hohen Dosen einen antiproliferierenden Effekt auf die Zelllinie A431 zeigt (Abbildung 33, S. 77), wie auch bei Untersuchungen von Ballard und Pandiella [171,172] beobachtet wurde. Die Ursache für diese zellspezifische, antiproliferierende Wirkung bleibt aber unklar.

Der in dieser Arbeit gewählte Ligand EGF fand bislang noch keine Verwendung in Immunotoxinen. Erfolgreich wurde bislang nur der Ligand hbEGF [170], der ebenfalls an HER1 bindet, gegen Tumorzellen in der Zellkultur eingesetzt. Da EGF aber kleiner ist als hbEGF, sollte dies einen Vorteil in der Tumorpenetration bringen. Im Gegensatz zu rekombinanten Fragmenten monoklonaler Antikörper gegen die Rezeptoren von EGF, die ebenfalls erfolgreich als Liganden eingesetzt werden [99,173], ist rekombinantes EGF leicht zugänglich und ermöglicht so eine schnelle rekombinante Darstellung des Immunotoxins.

³ Mark Sutherland, Institut für Klinische Chemie, UKBF, FU Berlin, noch nicht veröffentlichte Daten

4.4 Immunoadaptortoxine

4.4.1 Bestimmung der cytotoxischen Aktivität

Die cytotoxische Aktivität von Immunotoxinen wird sehr häufig, wie bereits in Abschnitt 1.5.1, S. 9, beschrieben, im Rahmen des *in vitro*-Translationsassays anhand des Einbaus radioaktiv markierter Aminosäuren bestimmt. Bei dem in dieser Arbeit angewendeten FDA-Assay handelt es sich um ein einfaches und schnell durchführbares, nichtradioaktives Verfahren, das zusätzlich den Vorteil bietet, im Vergleich zu anderen Assays weniger kostenintensiv zu sein. Der FDA-Assay zeigte eine lineare Beziehung zwischen Zellzahl und detektiertem Fluoreszenzsignal innerhalb eines Bereiches von 0–25 000 Zellen (Abbildung 30, S. 75). Diese lineare Beziehung entspricht den in der Literatur beschriebenen Daten, die mittels vergleichbaren Testverfahren gewonnen wurden [174-176].

Zur Untersuchung, inwieweit das Wachstum der Zellen Einfluss auf diese lineare Beziehung hat, wurde die Zellzahl nach 72 h Kultivierung bestimmt. Aus der Abbildung 31, S. 76, ist klar ersichtlich, dass sich der lineare Detektionsbereich bei einer solchen Kultivierungszeit auf maximal 2 000 eingesäte Zellen beschränkt. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da die Teilungsrate von HER14-Zellen 20 h beträgt⁴ und somit sich die Anzahl der ausgesäten Zellen etwa verzweifelt. Aus 2 000 ausgesäten Zellen ergibt sich somit eine Gesamtzahl von etwa 24000 Zellen, was dem oberen Bereich des in diesem Abschnitt beschriebenen linearen Detektionsbereichs entspricht.

Im FDA-Assay wurden die in Abbildung 23, S. 68, dargestellten Konstrukte hinsichtlich ihrer Cytotoxizität gegenüber verschiedenen Zelllinien überprüft. Es zeigte sich (Abbildung 34 und Abbildung 35, S. 78), dass die Cytotoxizität der liganden-tragenden Immunotoxine vom Vorhandensein des HER1-Rezeptors abhängt. Die Immunotoxine SapAd_{CTE}EGF, SapAd_{CTE*}EGF und SapEGF zeigten gegenüber den HER1-rezeptortragenden HER14- und A431-Zellen erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Cytotoxizität mit IC₅₀-Werten zwischen 1 nM und 3 nM, wohingegen sie auf den rezeptordefizienten MCF7-Zellen nahezu wirkungslos blieben. Bei den MCF7-Zellen zeigte sich selbst bei Konzentrationen oberhalb von 100 nM eine Überlebensrate von über 75 %, die auch bei Einsatz der ligandenfreien Saporin-konstrukte Saporin und SapAd_{CTE} gemessen wurde (vgl. Abbildung 32, S. 76). Diese HER1-unabhängige Cytotoxizität konnte bei allen Zelllinien für die ligandenfreien

⁴ für NIH-3T3 Zellen nach der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

Saporinkonstrukte nachgewiesen werden, wobei die HER14-Zellen die höchste Sensibilität zeigten. Der IC_{50} -Wert von Saporin auf HER14-Zellen lag mit 300 nM aber immer noch etwa zwei Zehnerpotenzen über denen der in dieser Arbeit verwendeten EGF-tragenden Immunotoxine (Tabelle 12, S. 80). Diese gemessene leichte Cytotoxizität des Saporins steht im Einklang mit Untersuchungen von Cavallaro *et al.* [177], die eine schwache Wechselwirkung von RIPs des Typs I mit dem α_2 -Macroglobulinrezeptor an der Zelloberfläche und eine Aufnahme der Toxine in die Zelle nachwiesen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten über die Cytotoxizität der adapterhaltigen und adapterfreien Konstrukte stehen im Einklang mit Untersuchungen, die von Chandler *et al.* [170] mit hbEGF-Saporin-Konstrukten durchgeführt wurden. Dort wurde ebenfalls eine leichte Cytotoxizität von unkonjugiertem Saporin gefunden und eine dosisabhängige Cytotoxizität der hbEGF-tragenden Immunotoxine. Letztere zeigten im Vergleich zu den in dieser Arbeit hergestellten EGF-tragenden Immunotoxinen eine leicht höhere Cytotoxizität gegenüber A431-Zellen (IC_{50} -Wert von 0.3 nM) und eine wesentlich höhere Cytotoxizität gegenüber den HER1-defizienten MCF7-Zellen (IC_{50} -Wert von 27 nM). Dies lässt den Schluss zu, dass hbEGF im Vergleich zu EGF über eine geringere Spezifität gegenüber dem HER1-Rezeptor verfügt.

Betrachtet man die Resultate in Hinblick auf die Wirkung des Adapters, so geht aus dem Vergleich von Saporin und SapAd_{CTE} hervor, dass sich der Adapter nicht auf die Cytotoxizität auswirkt (siehe Abbildung 32, S. 76). Die gleichstarke Cytotoxizität der beiden Konstrukte spricht dafür, dass der Adapter ohne Ligand nicht in der Lage ist, einen rezeptorunabhängigen Membrantransfer durch die Plasmamembran zu vermitteln. Dies wird untermauert durch Untersuchungen von Lorenzetti *et al.* [178], die zeigen konnten, dass auch die N-terminale Fusion dreier verschiedener Membrantransfersequenzen an Dianthin ohne Liganden zu keiner verbesserten Cytotoxizität in der Zellkultur führt. Für die Anwendung des Immunotoxins ist diese Eigenschaft positiv, denn sie führt zu einer weiteren Reduzierung der Nebenwirkungen, da augenscheinlich ein Konstrukt nach Abspaltung seines Liganden auch seine Cytotoxizität verliert, sofern das Konstrukt noch nicht endocytiert worden ist.

Denkbar als mögliche Ursache für die gleichstarke Cytotoxizität von Saporin und SapAd_{CTE} wäre das Unvermögen der Transfersequenz, unter den eingesetzten Bedingungen den Transfer durch die Plasmamembran zu vermitteln. Zwar konnten Oess *et al.* [143] zeigen, dass die in dieser Arbeit verwendete TLM in der Lage ist, unterschiedliche Proteine in Zellen und Gewebe zu transportieren, doch wurden die Untersuchungen mit Proteinkonzentrationen durchgeführt, die mit 2 μ M deutlich über den der hier eingesetzten Immunotoxinkonzentrationen von 1–100 nM lagen.

Aus dem Vergleich der cytotoxischen Wirkung der ligandenträgenden Konstrukte mit und ohne Adapter geht hervor, dass die verwendete Membrantransfersequenz unter den eingesetzten Bedingungen ebenfalls nicht in der Lage ist einen Transport durch die endosomale Membran zu vermitteln. So zeigten die Konstrukte SapAd_{CTE}EGF, SapAd_{CTE*}EGF und SapEGF keinen Unterschied in ihrer Cytotoxizität gegenüber den verwendeten Zelllinien (Abbildung 34 und Abbildung 35, S. 78). Bekräftigt werden diese Ergebnisse zudem durch neueste Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe. An verschiedenen aus Diphtheriatoxin und EGF bestehenden Immunotoxinen wurde der Wirkungsgrad von Membrantransfersequenzen innerhalb des Adapters untersucht. Keine der verwendeten Trojanischen Peptide zeigte eine deutliche Verbesserung der Toxinaufnahme. Es gelang lediglich, eine unterschiedliche Lokalisierung der Konstrukte nachzuweisen⁵.

Die Abspaltung des Liganden im Endosom durch die Spaltung der ESP von SapAd_{CTE}EGF und SapAd_{CTE*}EGF, die durch *in vitro*-Versuche nachgewiesen wurde, führt im Vergleich zu dem nichtspaltbaren adapterfreien Konstrukt SapEGF zu keiner veränderten Cytotoxizität. Demnach wird die Aufnahme der Immunotoxine aus dem Endosom in das Cytosol durch EGF nicht blockiert. Bislang konnte dies nur für hbEGF von Chandler *et al.* [169] gezeigt werden. Das von ihnen rekombinant hergestellte hbEGF-Saporin-Fusionstoxin zeigte auch ohne spaltbaren Linker eine deutliche Cytotoxizität in der Zellkultur.

Um die Auswirkungen des Adapters hinsichtlich der Nebenwirkungen auf normal differenzierte Zellen zu untersuchen, wurde eine tumorähnliche Umgebung simuliert. Dazu wurden die Toxine mit unterschiedlichen Krebszelllinien vorinkubiert und im Anschluss die verbleibende Cytotoxizität auf HER14-Zellen gemessen (siehe Transferassay, Abschnitt 2.6.5, S. 42). In diesem Zellkulturmodell zeigte sich, dass die Spaltung des Adapters eine Reduzierung der cytotoxischen Aktivität zur Folge hat. Die adapterfreie Variante SapEGF zeigte hierbei erwartungsgemäß keine starke Veränderung in ihrer Cytotoxizität nach der Vorinkubation auf den Zellen im Vergleich zu einer Vorinkubation in zellfreiem Medium. Wie über Westernblotanalyse gezeigt werden konnte, ist die gemessene leichte Veränderung jedoch nicht auf eine Spaltung zurückzuführen.

Unterschiede von erheblicher Bedeutung ließen sich aber durch die Mutation der ESP an der Furinschnittstelle hervorrufen. Wie bereits aufgrund der Untersuchungen bezüglich der Plasmastabilität zu erwarten war, führte diese Mutation (ESP*) zu einer

⁵ Mark Sutherland, Institut für Klinische Chemie, UKBF, FU Berlin, unveröffentlichte Daten

deutlichen Stabilisierung im Zellkulturmedium. Während die unmutierte ESP bereits nach einer Stunde im Zellkulturmedium zu zwei Dritteln gespalten vorliegt, ist die Stabilität der ESP* sogar vergleichbar mit der des nichtspaltbaren SapEGF. Dies lässt den Schluss zu, dass fetales Kälberserum, welches dem Zellkulturmedium zugesetzt ist, ähnlich wie humanes Plasma nicht im Stande ist, eine Spaltung dieser Bindung innerhalb der ESP* in dem Maße zu vollführen wie innerhalb der unmutierten ESP. Dies wird auch durch die Untersuchungen des Spaltungsgrades im Immunoblot bestätigt, bei dem nur bei der ESP, nicht aber bei der ESP* eine nachvollziehbare Spaltung nachzuweisen war.

Eine Spaltung der ESP* konnte jedoch bei Vorinkubationen der Konstrukte sowohl mit HER14- als auch mit A431-Zellen gezeigt werden (Abbildung 38, S. 83), während sie bei MCF7-Zellen nicht nachweisbar war. Worauf diese zellspezifische Spaltung beruht, konnte in der Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Es bieten sich aber folgende Erklärungsmöglichkeiten:

- Im Zuge der Bindung und Internalisierung des Immunotoxins wird die ESP* in den Endosomen gespalten. Aufgrund der nicht vollständigen Funktionsfähigkeit der Membrantransfersequenz kommt es nur zu einer partiellen Diffusion des Toxins in das Cytosol. Ein Teil der Toxine gelangt über einen Recyclingweg des Rezeptors wieder aus der Zelle heraus und akkumuliert im Zellkulturüberstand.
- Als anderer Mechanismus der zellspezifischen Spaltung des Adapters, der unabhängig vom Endocytoseweg ablaufen kann, wäre die Spaltung an der Zelloberfläche durch sich an der Plasmamembran befindliche Furin-Proteasen denkbar [179]. Diese Spaltung des Adapters könnte entweder ähnlich wie die Prozessierung des Anthraxtoxins direkt nach der Bindung an den Rezeptor [180] oder aber unabhängig von dem Rezeptor durch eine direkte Spaltung an der Zelloberfläche ablaufen.

Diese Transferversuche zeigen eindeutig, dass das adapterfreie Konstrukt über einen längeren Zeitraum stabil bleibt und somit in verstärktem Umfang in der Lage ist, umgebende Gewebe, aber auch die blutreinigenden Organe wie die Leber über seinen Liganden zu schädigen. Der Adapter führt hier zielzellabhängig zu einer klar nachweisbaren Reduzierung der Nebenwirkungen, die durch die Stabilität herkömmlicher Immunotoxine verursacht werden.

Dies wird untermauert durch Ergebnisse einer noch nicht abgeschlossenen Phase I-Studie [100]. In dieser Studie zeigt das rekombinante Immunotoxin BL22, bestehend aus einem Fragment von *Pseudomonas* Exotoxin (PE38) und einem dsFv-

Antikörperfragment gegen CD22 im Gegensatz zu anderen Immunotoxinen mit dem selben Antikörperfragment keine starken Nebenwirkungen wie VLS. Der Autor vermutet hier ebenfalls die relativ kurze Halbwertszeit von 2–4 Stunden im humanen Plasma als Ursache für diese Verbesserung.

In einem weiteren Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, mit welcher Kinetik die Immunotoxine so an die Zelle binden, dass der nachfolgende Prozess der Internalisierung, des Eintritts in das Cytosol und der Vermittlung der Cytotoxizität unumkehrbar geworden ist. In Abbildung 39, S. 84, ist zu sehen, dass eine 30-minütige Inkubation mit dem Toxin ausreicht, um in den nachfolgenden 48 h die Cytotoxizität zu vermitteln. Dies erklärt, warum die schnelle Spaltung der ESP im Medium sich nicht mehr auf die vermittelte Cytotoxizität auswirkt. Die Erklärung hierfür könnte in einer kurzen Halbwertszeit des Rezeptors zu finden sein. Bestätigt wird diese Annahme durch Arbeiten von Vieira *et al.*, die zeigen, dass HER1 auf Fibroblasten in Gegenwart von EGF eine Halbwertszeit von 30 min besitzt und erst nach über 24 h die abgebauten Rezeptoren wieder vollständig ersetzt werden [181].

4.4.2 Universalität des Adapters

Der in dieser Arbeit entwickelte Adapter stellt in seiner Form ein völlig neuartiges universelles System für die rekombinante Kopplung von Immunotoxinen dar. Das verwendete Immunotoxin, bestehend aus Saporin und einem Liganden, dem EGF, bietet die Möglichkeit zur Weiterentwicklung und genauen Charakterisierung des Adapters. Die *in vitro*-Charakterisierung des Adapters bestätigt die Funktionsfähigkeit der einzelnen spaltbaren Sequenzen des Adapters. Gezeigt werden konnte, dass sowohl Ligand als auch Toxin einen Einfluss auf die Funktionalität des Adapters haben.

So zeigte die CSP in An- und Abwesenheit des Liganden unterschiedliches Spaltverhalten. Die sterische Zugänglichkeit des Adapters ist demnach ein wichtiger Faktor für seine Funktionalität. Dies würde erklären, warum Immunoadapter-toxinkonstrukte mit Diphtheriatoxin eine eingeschränkte Spaltbarkeit der CSP aufweisen [182]. Andere Konstrukte mit dem gleichen Adapter, die jedoch IL2 als Liganden enthalten, zeigen im Rahmen der bakteriellen Expression eine starke Abbaureaktion, die sich bei Verwendung der ESP* statt der ESP sogar verstärken [182]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anforderungen der Toxine an den Adapter sehr unterschiedlich sind und für jedes Toxin einzeln optimiert werden müssen. Im Fall des in dieser Arbeit entwickelten Saporin-Adapter-EGF-Immunotoxins ist diese Optimierung in beeindruckender Weise gelungen.

Dem gegenüber stehen die bislang verwendeten chemischen Linker für Immunotoxine. Sie verbinden Liganden und Toxin über ihre reaktiven Gruppen wie beispielsweise die ϵ -Aminogruppe von Lysin [183]. Häufig werden auch heterobifunktionelle Linker wie SPDP verwendet [50], die Liganden und Toxin über verschiedene Kopplungsreaktionen verbinden, um so einheitlichere Produkte zu bekommen. Ein Problem bei den chemischen Linkern bleibt weiterhin, dass sie sich entweder auf eine endosomale oder lysosomale Spaltung wie die pH-sensitive cis-Aconityl-Bindung [41] oder aber auf die Spaltung im Cytosol über Disulfidbindungen [50] beschränken und sich nur unter großem chemischen Aufwand zusammen mit einer Membrantransfersequenz beliebig kombinieren lassen.

Bei den rekombinanten Immunotoxinen BL22 [184] und Denileucin Diftitox (Handelsname Ontak[®]) [97], wurde die toxineigene Translokationsdomäne verwendet. Diese ermöglicht zwar das spezielle Toxin in die Zielzellen einzubringen, ist aber für andere Toxine nicht einsetzbar, besitzt also kein universell nutzbares Potential.

Die Ergebnisse zeigen, dass jedes System in sich eine optimale Anpassung an die jeweiligen Anforderungen benötigt. Durch den in dieser Arbeit vorgestellten molekularbiologischen Aufbau des Adapters ist aber gerade diese Anpassung sehr gut möglich. Wie bereits für die unterschiedlichen ESP und ESP* sowie CSP und CSP* gezeigt wurde, lassen sich in diesem Adapter Bereiche problemlos modulartig austauschen, während die chemischen Linker sich in ihrer Form nicht ohne weiteres variieren lassen. Da Tumorerkrankungen kein einheitliches Erscheinungsbild aufweisen und somit jeweils unterschiedliche Liganden oder Toxine für eine Therapie geeignet sind, ist genau ein solches universelles System, bei dem flexibel auf die jeweiligen Bedingungen eingegangen werden kann, erfolversprechend.

4.5 Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit wiederholt gezeigt werden konnte, steht mit Saporin-Adapter-EGF ein funktionierendes Modellsystem zur Testung der hergestellten molekularen Adapter zur Verfügung. Somit ist die Grundlage geschaffen, den Adapter durch Variation an beliebige Bedingungen anzupassen. Für die Weiterentwicklung des Adapters bieten sich Untersuchungen zur Wirkungsweise verschiedener Aufnahme-mechanismen, die durch den jeweiligen Liganden bedingt sind, an. Bislang wurde der HER1 als Testrezeptor verwendet, aber auch die Rezeptoren weiterer kleiner tumorspezifischer Liganden wie beispielsweise Interleukin 2 bieten sich an. Bei der Nutzung des Transferrinrezeptors als tumorspezifisches Antigen stellt neben Transferrin

auch das Hämochromatoseprotein HFE eine Alternative dar, dessen Rezeptorbindung sich auf eine etwa 20 kDa große Domäne beschränkt [185]. Erste Untersuchungen mit diesem Liganden in Kombination mit Diphtheriatoxin werden bereits durchgeführt und in naher Zukunft Ergebnisse über die Auswirkungen dieser Liganden auf die Wirkungsweise des Adapters liefern. Ein weitere Gruppe an Liganden, die in diesem Konzept untersucht werden soll, sind Antikörperfragmente. Da gerade diese hochspezifisch gegenüber bestimmten Tumorzellen sind, ist es wichtig, sie als Liganden in die Optimierung des Adapterkonzeptes mit einzubeziehen.

Ein ebenfalls wichtiger Punkt ist eine optimierte Aufreinigungsstrategie, die die Eigenschaften des Adapters wie die Spaltung, aber auch den Erhalt der Aktivität des Toxins und des Liganden berücksichtigt. Ebenso wie die Liganden sind auch die Toxine eine wichtige Variable des Immunoadaptertoxins. Aufgrund der möglichen Bildung von körpereigenen Antikörpern gegen diesen Teil des Immunotoxins innerhalb einer Therapie muss hier untersucht werden, ob es eine generelle Strategie für den Austausch dieses Bereiches gibt oder dieser eine Modifikation des Adapters nötig macht. Nach den Untersuchungen der unterschiedlichen Immunotoxine *in vitro* und an Zelllinien sollten die Eigenschaften auf primäre Zellkultursysteme übertragen und letztlich im Tiermodell bestätigt werden. Im Tiertumormodell können die physiologischen Eigenschaften dieses neuen Immunoadaptertoxins untersucht und die Grundsteine für eine mögliche therapeutische Anwendung gelegt werden.

Den Adapter selbst betreffend sollten insbesondere die Eigenschaften der Membrantransfersequenz näher charakterisiert werden. Die hierzu durchgeführten Untersuchungen zeigten bislang keine signifikant gesteigerte Aufnahme des Toxins in das Cytosol. Zu klären bleibt, ob dies ein Problem der Sequenzen selbst, des zu transportierenden Toxins oder einer sterischen Hinderung durch die ESP ist. Die aus der Membrantransfersequenz resultierende unterschiedliche Verteilung innerhalb der Zelle sollte ebenfalls weiter untersucht werden, da sich unabhängig von der eigentlichen Funktion dieser Sequenzen hier die Möglichkeit bietet, Toxine noch gezielter an ihren Wirkort zu leiten.