

5 Zusammenfassung

Bei der Behandlung von Krebserkrankungen gewinnen immuntherapeutische Verfahren aufgrund der schwerwiegenden Nebenwirkungen herkömmlicher Zytostatika zunehmend an Bedeutung. Immunotoxine, die sich aus einem tumorspezifischen Antikörper, Antikörperfragment oder Liganden und einer hochaktiven, toxischen Domäne eines Proteintoxins zusammensetzen, stellen innerhalb einer solchen Therapie ein vielversprechendes Konzept dar. Der Therapieerfolg wird hierbei hauptsächlich durch (a) die Selektivität des zielzellspezifischen Liganden, (b) die Effektivität der cytosolischen Aufnahme, (c) die cytotoxische Aktivität des Proteintoxins, (d) die Immunogenität sowie (e) die von der Größe des Immunotoxins abhängige effektive Tumorpenetration und (f) die Stabilität des Immunotoxins bestimmt.

Zur Optimierung der Immunotoxine wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein universeller, molekularbiologisch hergestellter Adapter entwickelt, der zu einer effizienten Akkumulation des Proteintoxins im Cytosol der Zielzellen führt und zudem unerwünschte Nebenwirkungen verhindern soll, die bislang aufgrund von hoher Stabilität herkömmlicher Linker in Immunotoxinen auftreten. Dieser Adapter besteht aus einem Membrantransferpeptid, das N-terminal von einer cytosolisch und C-terminal von einer endosomal spaltbaren Sequenz flankiert wird und das Toxin mit dem Liganden verbindet.

Als tumorspezifischer Ligand wurde der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), als Proteintoxin das ribosomeninaktivierende Protein Saporin verwendet. Nach erfolgreicher rekombinanter Darstellung des Saporins gelang es, zur Bestimmung seiner enzymatischen Aktivität einen neuartigen, nichtradioaktiven Multienzymassay zu entwickeln. Mit diesem Assay kann die N-Glycosidaseaktivität, auf der die toxische Wirkung des Proteins beruht, anhand des spezifisch freigesetzten Adenins aus einem DNA-Substrat quantifiziert werden.

Als endosomal spaltbare Sequenzen dienten die natürlichen und eine mutierte Spaltstelle aus *Pseudomonas* Exotoxin und Diphtheriatoxin. Die cytosolisch spaltbaren Sequenzen bestanden aus einem in Hefezellen spaltbaren Tripeptid sowie den Erkennungssequenzen von Caspase-1, Caspase-3 und Procaspase-3.

In dieser Arbeit konnte die Funktionalität des Adapters in *in vitro*-Versuchen nachgewiesen und durch Modifikation das Verhalten der spaltbaren Sequenzen in Bezug auf ihre Plasmastabilität optimiert werden. Nach der erfolgreichen Darstellung verschiedener Immunotoxinkonstrukte mit und ohne Adapter wurden mittels eines auf der Umsetzung von Fluoresceindiacetat basierten Cytotoxizitätsassays an verschiedenen Zelllinien IC_{50} -Werte ermittelt. Es zeigte sich für diese Immunotoxine erwartungsgemäß neben einer beeindruckenden Zielzellspezifität auch eine ausgeprägte hohe cytotoxische Aktivität.

Um die Auswirkung des Adapters auf Nebenwirkungen für normal differenzierte Zellen zu untersuchen, wurde durch Zellkulturtechniken eine tumorähnliche Umgebung simuliert, bei der die Auswirkung der zielzellspezifischen Spaltung und Akkumulation des Immunotoxins auf andere Zellen untersucht wurde. Die hieraus gewonnenen Daten belegen anschaulich, dass der Adapter das Potential der Nebenwirkungen von Immunotoxinen reduziert.

Weiterführende Arbeiten zeigten, dass bei der Verwendung anderer Toxine und Liganden eine optimale Anpassung des Adapters an die jeweiligen Anforderungen erforderlich ist. Durch den auf molekularbiologischer Ebene gezielt modular gestalteten Aufbau des Adapters lassen sich jedoch seine funktionellen Bereiche problemlos austauschen, so dass sich hier die einmalige Möglichkeit bietet, Immunotoxine den notwendigen Bedingungen einer Krebstherapie in einfacher Weise anzupassen.