

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Der Einsatz extrazellulärer Ribonukleasen (RNasen) als zytotoxische Wirkstoffe ist ein erfolgversprechender therapeutischer Ansatz für die Behandlung von Tumorerkrankungen. Aufgrund ihrer Ribonukleinsäure- (RNA) spaltenden Aktivität sind RNasen prinzipiell für alle Zellen toxisch, jedoch besitzen verschiedene RNasen eine selektive Wirkung auf Tumorzellen. Ihr Einsatz als Tumortheraeutika scheint daher aussichtsreich, zumal RNasen aus Säugetieren deutlich verringerte systemische Toxizitäten aufweisen als viele der bisher verwendeten bakteriellen bzw. pflanzlichen Toxine, was eine bessere Verträglichkeit erwarten lässt.

Onconase (ONC), eine RNase aus den Oozyten des Nördlichen Leopardfroschs *Rana pipiens*, befindet sich derzeit in Phase IIIb der klinischen Testungen (Alfacell Inc., Somerset, NJ, USA). Der entscheidende Nachteil der ONC-Behandlung liegt jedoch in einer dosisabhängigen Nephrotoxizität, wohingegen RNasen aus Säugetieren im Gegensatz zur ONC nicht in den Nieren angereichert werden.

Ein Problem bei der Verwendung von RNasen als Tumortheraeutika stellt die Anwesenheit des zytosolischen RNase-Inhibitors (RI) dar, der extrazelluläre RNasen der RNase A-Superfamilie mit hoher Affinität bindet und inaktiviert. Die geringe zytotoxische Potenz von RNase A aus Rinderpankreas wird daher vor allem dem Umstand zugeschrieben, dass RNase A mit hoher Affinität vom RI gebunden und dadurch inaktiviert wird. Für die Entwicklung wirksamer Enzympräparate gilt es also, Konstrukte zu kreieren, die ihre katalytische Aktivität - die Spaltung von RNA - unter physiologischen Bedingungen beibehalten. Das bedeutet, dass sie eine ausreichend hohe Stabilität besitzen und effektiv in die Zielzellen internalisiert werden müssen, dass sie katalytisch aktiv und gegen intrazelluläre Proteasen resistent sein sollten, sowie durch den zelleigenen RI nicht inaktiviert werden dürfen.

Die vorliegende Arbeit verfolgte einen Ansatz zum Design neuartiger, auf RNase A-basierender Antitumortheraeutika und beruht auf der Idee, gentechnisch zwei nicht zytotoxische monomere RNase A-Moleküle durch einen Peptidlinker zu fusionieren und somit sogenannte Tandemenzyme zu konstruieren, bei denen aus sterischen Gründen maximal eine RNase A-Einheit durch den RI gebunden werden kann. Die zweite RNase A-Einheit könnte somit enzymatisch aktiv bleiben und dadurch die gewünschte zytotoxische Wirkung entfalten. Durch Variation des Peptidlinkers, der die beiden Einheiten verknüpft, besteht die Möglichkeit, den Abstand der beiden RNase A-Einheiten und ihre sterische Anordnung zu modulieren und auf diese Weise die Eigenschaften des Konstrukts (Stabilität, Aktivität, Internalisierungseffizienz etc.) zu optimieren.

Aufbauend auf der in der Diplomarbeit entwickelten Strategie zur Erzeugung der *rnase A-tandemenzym*-Gene durch Genduplikation sollte durch die weitere Modifizierung der Linkersequenz deren Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der Konstrukte analysiert werden. Kernstücke der vorliegenden Arbeit waren neben dieser umfassenden biophysikalischen Untersuchung sowohl die Evaluierung des zytotoxischen Potentials als auch die umfangreiche Charakterisierung der RI-Bindung an die RNase A-

Tandemenzyme. Die Komplexbildung mit RI sollte dabei mittels Nativ-PAGE, Ultrazentrifugation und limitierter Proteolyse eingehend analysiert und unter Verwendung der 3D-Struktur der RNase A-Tandemenzyme (erhalten durch Röntgenstrukturanalyse nach Kristallisation) zusätzlich modelliert werden. Neben der Evaluierung der oben genannten Kriterien sollten ferner die Effizienz der Internalisierung in die Zelle und nachfolgend die subzelluläre Lokalisation der RNase A-Tandemenzyme untersucht werden. Aus diesen Ergebnissen sollten allgemeine Aussagen zur Verwendbarkeit von Proteinen als Therapeutika abgeleitet und spezielle Aussagen über die Anforderungen an RNase A-basierende Antitumortheraeutika getroffen werden können.