

2 Theoretischer Teil

2.1 Therapiekonzepte zur Krebsbekämpfung

2.1.1 Klassische Therapieansätze

Die Zahl der Krebsneuerkrankungen liegt weltweit bei über 10 Millionen pro Jahr. 250 von 100000 Menschen sterben an einer Krebserkrankung (Arnold und Ulbrich-Hofmann, 2006). In der Bundesrepublik Deutschland war in der Vergangenheit kein landesweites, einheitliches System zur Erfassung von Krebserkrankungen vorhanden. Lediglich die Sterbestatistik wird seit Mitte des vorigen Jahrhunderts flächendeckend dokumentiert. Unter den Todesursachen nahmen im Jahr 2003 bösartige Neubildungen den 2. Platz hinter den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems ein (Abb. 1). Es kann damit gerechnet werden, dass jeder dritte Deutsche im Laufe seines Lebens von einer Krebserkrankung betroffen ist. Dies verdeutlicht die hohe Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Tumorerkrankungen. Daher stellt die Bekämpfung von Krebs eine der wichtigsten Herausforderungen der modernen Medizin dar.

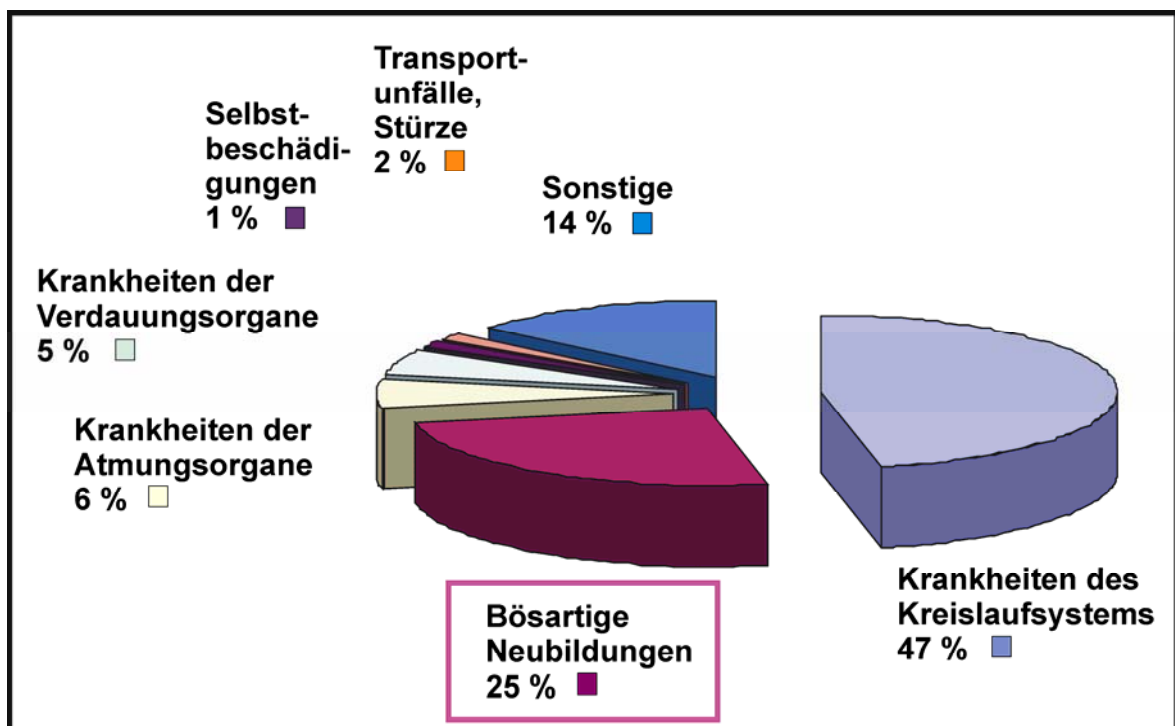


Abb. 1: Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2003

Nach Daten aus dem Bundesministerium für Gesundheit 2005.

Die Möglichkeiten der Krebsbehandlung und damit die Heilungschancen haben sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert. Ein Grund dafür ist die rechtzeitige Erkennung von Krebs, da dieser in frühen Stadien der Krankheit oftmals mit einer Chance von über 90% heilbar ist. Derzeit werden im Wesentlichen drei Therapieformen für die Behandlung eingesetzt: Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie (Johannes und Decaudin, 2005). Bei der Operation werden einzelne, örtlich begrenzte

Tumore chirurgisch entfernt. Dies ist aber meist nur möglich, solange sich der Krebs noch nicht auf das gesamte Organ ausgebreitet hat.

Bei der Strahlentherapie wird energiereiche Strahlung gezielt auf das Tumorgewebe gerichtet, um eine maximale Zerstörung des Tumors bei möglichst geringer Schädigung des normalen Gewebes zu erreichen. Als Strahlenquelle verwendet man natürliche radioaktive Isotope. Durch die Strahleneinwirkung hervorgerufene Ionisationsvorgänge lösen in der bestrahlten lebenden Materie eine Vielzahl von strahlenchemischen Vorgängen aus, wie z.B. Chromosomenbrüche. Die Strahlung zerstört damit unter anderem die DNA der Krebszellen, wodurch diese dann nicht mehr lebensfähig sind und absterben. Die Dosis an Strahlen, die zum Erreichen der Rezidivfreiheit verabreicht werden muss, ist jedoch größer als die Strahlendosis, die vermieden werden sollte, um gesundes Gewebe nicht zu schädigen.

Unter Chemotherapie versteht man die Applikation von Substanzen wie Cisplatin, Mitomycin, Doxorubicin oder 5-Fluorouracil, die durch Eingriff in den Stoffwechsel (Behinderung biochemischer Stoffwechselfvorgänge durch die Ähnlichkeit mit physiologischen Intermediärprodukten) und in Zellteilungsvorgänge (Interkalation in Nukleinsäuren, Quervernetzung von Nukleinsäuren, Kernspindelgifte) entweder zytostatisch oder zytotoxisch-zytolytisch wirken (Joensuu, 2008). Ob es letztlich nur zu einer Proliferationshemmung oder doch zu einer letalen Wirkung kommt, ist häufig von der Konzentration der verabreichten Substanzen abhängig, generell sind jedoch bereits für zytostatische Effekte hohe intrazelluläre Dosen erforderlich. Prinzipiell können diese Substanzen ihre Wirkung bei allen Zellen entfalten, jedoch zeigen Tumorzellen aufgrund ihres veränderten Stoffwechsels und der erhöhten Proliferation eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika. Gesunde Zellen, die sich zumeist in der G₀-Phase befinden, werden weniger stark beeinträchtigt, da Chemotherapeutika häufig zyklusphasenspezifisch sind (Joensuu, 2008). Die Nebenwirkungen einer Chemotherapie sind oft Durchfall, Übelkeit, Haarausfall und Einschränkungen der Herz-, Lungen- und Nierenfunktion (*British Cancer Agency*; <http://www.bccancer.bc.ca/default.htm>).

Ein weiterer Nachteil dieser Behandlungsform ist die Entwicklung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Dieses Phänomen ist als *multiple drug resistance* (MDR) bekannt und wird bei vielen Tumoren mit der Überexpression bestimmter Proteine in den Membranen der Tumorzellen in Verbindung gebracht, die in der Lage sind, chemotherapeutische Moleküle wieder aus der Zelle herauszupumpen (Sonneveld, 2000; Shtil, 2002; Swerts et al., 2006). Als Beispiele hierfür sind das *multiple drug resistance gp170 permeability glycoprotein* (Pgp, MDR1; Juliano und Ling, 1976), das *multi drug resistance protein 1* (MRP1), das *multi drug resistance related protein* (MDRP; Cole et al., 1992) oder das *lung resistance protein* (LRP; Scheffer et al., 1995; Izquierdo et al., 1996) zu nennen.

2.1.2 Ausgewählte neuere Therapiekonzepte

Aufgrund der beschriebenen Nebenwirkungen gibt es eine Reihe neuer Therapiekonzepte, die in Zukunft eine größere Bedeutung bei der Behandlung von Krebs haben werden. Durch die unzureichende Spezifität der Standardtherapien werden neben den erkrankten Zellen oftmals auch gesunde Zellen geschädigt. Deshalb versucht man inzwischen vermehrt, Zytostatika so zu verändern oder zu applizieren, dass sie selektiv nur im Tumorgewebe zur Wirkung kommen.

In neuen Therapieansätzen wird beispielsweise versucht, inaktive Vorläufermoleküle (*prodrugs*) zu verwenden, die gezielt im Gewebe durch exogene Faktoren wie Licht oder Chemikalien oder durch endogene Enzyme aktiviert werden können. Ein Beispiel für die enzymatische Aktivierung stellt das mit Spacersequenzen modifizierte, 200-fach weniger aktive Doxorubicinglucuronid dar (Bosslet et al., 1998). In Krebszellen überexprimierte β -Glucuronidase spaltet diese Sequenzen ab und aktiviert das Zytostatikum direkt im Tumorgewebe (Bosslet et al., 1998; Leenders et al., 1999).

Dennoch werden aber häufig nicht alle Tumorzellen eliminiert. Diese sogenannten residuellen Tumorzellen führen dann zur Bildung von Metastasen oder Rezidiven und stellen den Hauptgrund für einen Krankheitsrückfall dar. Dies verdeutlicht, dass bei der Entwicklung von neuen Therapiestrategien der Fokus auf die spezifische Eliminierung jeder malignen Zelle gerichtet sein sollte.

Die dafür erforderliche gezielte Anreicherung der Wirkstoffe, ein Prozess der als *drug targeting* bezeichnet wird, erfolgt hauptsächlich durch Vektorisierung des Toxins mit natürlichen Liganden, Antikörpern oder Antikörperfragmenten, die spezifisch Krebszellen erkennen (Johannes und Decaudin, 2005). Zusätzlich ist in den letzten Jahrzehnten das Interesse an einer Therapie mit monoklonalen Antikörpern, die bereits längere Zeit als Diagnostika etabliert sind, zunehmend gewachsen.

2.1.2.1 Therapeutische Antikörper

Die Idee, Antikörper in der Krebstherapie einzusetzen, ist schon sehr alt. Paul Ehrlich erkannte bereits 1897 die Bedeutung der Immunabwehr im Rahmen der Behandlung bösartiger Krankheiten („Seitenkettentheorie“ von 1897 in „*The collected Papers of Paul Ehrlich*“; Ehrlich, 1956). Die molekulare Charakterisierung von Immunglobulinen (Edelman et al., 1968) und die Erfindung der Hybridomtechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper im Jahre 1975 (Köhler und Milstein, 1975) verbesserten die diagnostischen Möglichkeiten in der Onkologie und eröffneten zugleich neue therapeutische Perspektiven.

Monoklonale Antikörper haben den Vorteil, dass sie – anders als Chemotherapeutika und Strahlenbehandlung – auf spezifisch ausgewählte Zielzellen wie z.B. Krebszellen abzielen und dabei gesundes Gewebe intakt lassen. Die Toxizität und die Nebenwirkungen sind damit vergleichsweise gering und die Therapie somit besser tolerierbar. Die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern stellt besonders für Patienten, die nicht auf die gängigen Therapien ansprechen (MDR), einen enormen

therapeutischen Fortschritt dar. Zusätzlich erschließt sich die Möglichkeit, herkömmliche Behandlungsmethoden und Antikörpertherapie zu kombinieren, um additive oder gar synergistische Effekte zu erzielen.

Probleme beim Einsatz von monoklonalen Antikörpern ergeben sich zum einen aus der Tatsache, dass die meisten Antikörper gegen Antigene gerichtet sind, die in geringen Mengen auch auf gesunden Zellen nachweisbar sind, und zum anderen aus der Tatsache, dass viele Teilaspekte der Wirkung von Antikörpern, z.B. die antikörpervermittelte Komplementaktivierung (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC), die antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC), die Aktivierung unspezifischer Killerzellen und die Blockierung bestimmter biologischer Funktionen des Antigens, noch weitgehend ungeklärt sind. Aber auch unabhängig vom Wirkmechanismus des Antikörpers können Hypersensitivitätsreaktionen auftreten, die der Antikörper als organismusfremdes Protein auslöst (Adams und Weiner, 2005).

Der Beginn des Einsatzes monoklonaler Antikörper in der Krebstherapie war die Einführung von Rituximab (MabThera[®], Roche Pharma) im Jahr 1998 für die Behandlung chemotherapieresistenter maligner follikulärer Lymphome und von Trastuzumab (Herceptin[®], Roche Pharma) für die Behandlung therapieresistenter Mammakarzinome im Jahr 2000.

Die Mechanismen, durch welche Antikörper ihre therapeutische Wirkung im Organismus entfalten können, sind sehr vielfältig. Man kann dabei generell zwischen direkten und indirekten Mechanismen unterscheiden. Die direkte Wirkung eines Antikörpers beruht allein auf der Bindung an sein Antigen. So können Interaktionen zwischen Rezeptoren (wie z.B. für Wachstumsfaktoren) und ihren Liganden unterbunden werden, indem der Antikörper entweder den Liganden oder den Rezeptor selbst bindet und damit einen blockierenden Effekt ausübt. Herceptin[®] wirkt unter anderem durch Blockade des Rezeptors Her2 (*human epidermal growth factor receptor type 2*, auch als Her2/neu oder ErbB2 bezeichnet), wodurch die Interaktion mit dem epithelialen Wachstumsfaktor (*epithelial growth factor*, EGF) verhindert wird, was wiederum zur Hemmung wachstums- und proliferationsfördernder Signale führt (Harries und Smith, 2002). Alternativ erfolgt das unmittelbare Induzieren von antiproliferativen und proapoptischen intrazellulären Signalen durch Kreuzvernetzung von Oberflächenantigenen wie z.B. durch den zur Behandlung von Non-Hodkin-Lymphomen eingesetzten Antikörper MabThera[®], der an das B-Zell-Antigen CD20 bindet (Shan et al., 1998; Ghetie et al., 2001; Johnson und Glennie, 2003).

Wichtige indirekte Mechanismen therapeutischer Antikörper sind die ADCC und CDC (Bokemeyer und Panse, 2005; Zafir-Lavie et al., 2007). Der therapeutische Effekt der ADCC beruht auf der Erkennung des Fc-Teils (konstante Region) des an die Tumorzelle gebundenen Antikörpers durch die Fc γ -Rezeptoren von Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen, welche die Tumorzelle durch die Ausschüttung zytolytischer Substanzen wie Perforin und Granzym oder durch Phagozytose zerstören, wohingegen die CDC die Komplementkaskade und die komplementabhängige Lyse der Zellen auslöst. Nach der Bindung an die Tumorzelle

werden die Kohlenhydratketten der CH₂-Domänen der Antikörper aufgrund einer Konformationsänderung für das Komplementsystem zugänglich. Dabei werden mehrere Antikörper über den C1-Komplex des Komplementsystems miteinander verbunden. Über den klassischen Weg der Komplementaktivierung wird die Schädigung der Zellmembran eingeleitet, die zur Lyse der Zelle führt (Bokemeyer und Panse, 2005). So wird z.B. der therapeutische Effekt von MabThera® zum Teil auch der CDC zugeschrieben (van Meerten et al., 2006).

2.1.2.2 Antikörperkonjugate

Die Wirkmechanismen unkonjugierter therapeutischer Antikörper sind oft von weiteren Effektorcomponenten abhängig, z.B. von natürlichen Killerzellen und Makrophagen. Eine Möglichkeit, solche Abhängigkeiten zu umgehen, ist es, die Wirkung zytotoxischer Substanzen mit der Spezifität von Antikörpern zu kombinieren und somit zugleich die systemische Toxizität dieser Substanzen zu reduzieren. Durch die Kopplung an Antikörper ist es möglich, die Wirkstoffe direkt an oder in die Tumorzelle zu befördern und diese unabhängig von weiteren Effektormechanismen abzutöten. Der entscheidende Punkt ist dabei der Wirkort der zytotoxischen Komponente. Liegt dieser im Inneren der Krebszelle ist es unbedingt erforderlich, dass das Antigen nach Bindung des Antikörpers internalisiert wird.

Für die Anwendung von Radionuklid-gekoppelten Antikörpern ist dies jedoch nicht erforderlich. Die verwendeten Radionuklide sind meistens β -Strahler wie z.B. ¹³¹Iod, ⁹⁰Yttrium, ¹⁸⁶Rhenium oder ¹⁸⁸Rhenium. Der Vorteil von Radionukliden ist ihre Fähigkeit, auch benachbarte Tumorzellen zu töten (*bystander effect*). Dadurch werden auch Krebszellen attackiert, die ihr Antigen bereits verloren haben. Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®, Bayer Schering Pharma) und Tositumomab (Bexxar®, Corixa Corporation, Seattle, WA, U.S.A), an ⁹⁰Yttrium bzw. ¹³¹Iod gekoppelte murine CD20-Antikörper, wurden bereits für die Therapie von Non-Hodkin-Lymphomen von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen. Hauptproblem der Radioimmuntherapie ist, dass durch das Zirkulieren der Radionuklide im Kreislauf das Knochenmark permanent radioaktiver Strahlung ausgesetzt ist, was zu schwerer Knochenmarksdepression führen kann (Sharkey und Goldenberg, 2006).

Eine weitere Anwendungsform von Immunkonjugaten sind antikörpergekoppelte Chemotherapeutika. Hierfür wurden zunächst klassische Zytostatika verwendet. Um eine Tumorzelle abzutöten, müssen jedoch sehr viele der herkömmlichen Zytostatikamoleküle in die Zelle gelangen. Dies kann aber oft wegen zu geringer Zielantigendichte auf der Tumorzelle und der begrenzten Zahl pro Antikörper koppelbarer Moleküle nicht in ausreichendem Maße bewerkstelligt werden. Deshalb verfolgt man die Strategie, Wirkstoffe mit sehr viel höherem zytotoxischen Potential für die Herstellung von Immunkonjugaten zu verwenden (z.B. Calicheamicine; Hinman et al., 1993).

Eine andere Möglichkeit, die Effizienz von Antitumor-Antikörpern zu verbessern, ist die Strategie des *pre-targeting*. Bei der ADEPT (*antibody directed enzyme prodrug therapy*) bindet zunächst ein tumorspezifischer Antikörper, der mit einem Enzym fusioniert ist, an der Oberfläche von Krebszellen (Niculescu-Duvaz et al., 1999; Syrigos und Epenetos,

1999). Anschließend wird dem Patienten ein pro-toxisches Agens verabreicht, das sich im gesamten Körper verteilt, jedoch im Idealfall nur durch das tumorassoziierte Antikörper-Enzymkonjugat direkt an der Krebszelle aktiviert wird.

Trotz der anfänglichen Misserfolge der Immunkonjugate in klinischen Studien und der Komplikationen, die in Verbindung mit den verwendeten Wirkkomponenten und den erforderlichen chemischen Linkern auftreten, macht der klinische Nutzen von Mylotarg® (Anti-CD33-Antikörper•Calicheamicin-Konjugat zur Behandlung von akuter myeloider Leukämie; Wyeth, Philadelphia, USA) deutlich, dass die Kopplung von Antikörper und Wirkstoff einen vielversprechenden, neuen Ansatz in der Krebstherapie darstellt und so im Vergleich zu den herkömmlichen Zytostatika ein besseres Toxizitätsprofil erreicht werden kann.

2.1.2.3 Immunotoxine

Zu den Immunkonjugaten zählen auch die Immunotoxine. Es handelt sich dabei um komplexe Makromoleküle, die aus zwei unterschiedlichen funktionellen Einheiten zusammengesetzt sind: einer Zellbindungsdomäne (Antikörper oder Antikörperfragment) und einer Toxindomäne (Barth et al., 1997). Im Gegensatz zu den herkömmlichen Immunkonjugaten sind Immunotoxine zwar ebenso chimäre Antikörpermoleküle, aber statt der niedermolekularen chemischen Substanzen enthalten diese natürlich vorkommende toxische und katalytisch aktive Enzyme als Wirkkomponenten. Nach der notwendigen Internalisierung des Immunotoxins wird im Zytosol durch die zytotoxische Komponente die Proteinbiosynthese inaktiviert und die Apoptose induziert (Frankel et al., 2000). So wurden beispielsweise pflanzliche Toxine wie Ricin aus der Rizinuspflanze (*Ricinus communis*), Saporin aus dem echten Seifenkraut (*Saponaria officinalis*), Gelonin aus *Gelonium multiflorum*, oder auch die bakteriellen Toxine Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* bzw. Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* als toxische Komponenten für Immunotoxine verwendet (Govindan et al., 2005; Johannes und Decaudin, 2005).

Im Vergleich zu den Immunkonjugaten besitzen die Immunotoxine den entscheidenden Vorteil, dass aufgrund der katalytischen Potenz der Toxine einige wenige Moleküle pro Zelle ausreichen, um diese abzutöten.

Obwohl sich eine Vielzahl von weiteren Immunotoxinen in klinischen Prüfungen befinden (Frankel et al., 2000), bleiben die Erfolge jedoch aufgrund der hohen Immunogenität und Toxizität im Patienten weit hinter den Erwartungen zurück (Thrush et al., 1996; Rybak und Newton, 1999). Zusätzlich stellt die eingeschränkte Tumorpenetration der Immunotoxine ein Problem dar, so dass aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit vornehmlich hämatologische Tumore im Mittelpunkt der Indikationsgebiete von systemisch applizierten Immunotoxinen stehen. Die hauptsächlich auftretende Nebenwirkung bei der Immunotoxinbehandlung ist die Permeabelisierung von Blutgefäßen durch die Bindung der Toxinkomponente an Endothelzellen (*vascular leak syndrome*), was den Austritt von Flüssigkeiten und Serumproteinen aus dem Blut in die umliegenden Gewebe zur Folge hat (Stone et al., 1996; Messmann et al., 2000).

Ein weiteres Problem ist die Immunantwort der Patienten gegen die verwendeten Antikörper oder die Toxinkomponente, die zu einer Neutralisierung der Moleküle im Patienten führt und die Wiederholung der Behandlung untersagt (Amlot et al., 1993; Grossbard et al., 1999). Nur durch die Entwicklung neuer, milder und immunologisch tolerierter Konstrukte können die starken Nebenwirkungen der Immunotoxine verbessert werden (Makarov und Ilinskaya, 2003).

Die Lösung des immunologischen Problems ist die Verwendung von humanen Proteinen mit zytotoxischem Potential, wie z.B. RNasen. Der wesentliche Vorteil der Verwendung humaner RNasen als Toxinkomponente im Immunotoxin liegt in der nicht vorhandenen Toxizität dieser RNasen im extrazellulären Raum. Rybak und Newton (1999) stellten zunächst verschiedene Fusionsproteine her, in denen ausgewählte RNasen durch chemische Kopplung oder bereits auf Genebene mit sogenannten *cell targeting agents* (Antikörper, Antikörperfragmente bzw. Wachstumsfaktoren) verbunden wurden. Neuere Ansätze gehen in Richtung humaner Antikörper-RNase-Konjugate und die Fusionierung von RNase und Antikörper erfolgt durch Peptidlinker anstelle chemischer Kopplung. So wurde beispielsweise humane pankreatische RNase (HPR) in Fusionsmolekülen verwendet, deren Antikörperfragmente spezifisch CD71 (Zewe et al., 1997) bzw. ErbB2-positive Karzinome erkennen (De Lorenzo et al., 2004; De Lorenzo et al., 2007). Die von De Lorenzo beschriebenen Fusionsproteine waren die ersten vollständig humanen Antikörper-RNase-Konstrukte. Neben der geringen Immunogenität ist auch die geringe Größe vieler RNasen, die für die Tumorpenetration entscheidend ist, ein Vorteil. Die Antikörper-gekoppelten RNasen stellen somit eine neue Generation von Immunotoxinen mit extrem geringer Immunogenität dar, deren therapeutisches Potential in Zukunft in klinischen Studien noch getestet werden muss.

2.2 RNasen als potentielle Antitumortheraeutika

Da die biologische Funktion der RNasen hauptsächlich im Abbau zellulärer RNA besteht, können sie als Toxine mit vielversprechendem therapeutischen Antitumorpotential betrachtet werden (Makarov und Ilinskaya, 2003). Nach der Internalisierung in die Zielzelle könnten exogene RNasen oder RNasen anderer Spezies durch enzymatischen RNA-Abbau die Proteinbiosynthese inhibieren und dadurch apoptotische Prozesse induzieren.

Jedoch schützt sich die Zelle vor dem Abbau ihrer RNA durch Fremd-RNasen mit der Anwesenheit großer Mengen an RI im Zytosol, der extrazelluläre RNasen der RNase A-Superfamilie mit hoher Affinität bindet und inaktiviert (2.3.1), was bei der möglichen Anwendung von RNasen als Antitumortheraeutika ein Problem darstellen kann. Die Schutzfunktion des RI bezüglich zellulärer RNA ist jedoch begrenzt. Sollte es einer RNase gelingen, der Bindung an den RI zu entgehen (Evasion) oder durch eine hohe Internalisierungsrate gegenüber RI im Überschuss vorzuliegen, führt dies zum schnellen RNA-Abbau und damit zum Zelltod.

Die Wirkung von RI ist klassenspezifisch. Beispielsweise inhibiert der humane RI (hRI) Amphibien-RNasen wie ONC nur schlecht, jedoch ausgezeichnet RNasen anderer Säuger, während diese wiederum nicht durch RI aus Amphibien und Vögeln inhibiert werden (Roth, 1963).

2.2.1 Vorkommen und biologische Aktivität verschiedener RNasen

Lebende Zellen enthalten ungefähr 20 verschiedene Exo- und Endonukleasen, deren Funktion in der Prozessierung der RNA und im RNA-*turn over* liegt (Makarov und Ilinskaya, 2003).

Einige Vertreter der verschiedenen RNase-Familien weisen jedoch neben dem digestiven Abbau von RNA eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten (wie Blutgefäßbildung, Zyto-, Spermato- und Embryotoxizität) auf. Diese RNasen werden unter dem Akronym „RISBASEN“ (**RI**bonuclease with **S**pecial **B**iological **A**ctions) zusammengefasst. Viele RISBASEN sind gegenüber bestimmten Zelltypen selektiv zytotoxisch. Diese unerwarteten biologischen Eigenschaften verschiedener RISBASEN eröffnen neuartige Möglichkeiten zur Behandlung unterschiedlicher Krankheiten.

Die in Bakterien, Pilzen und höheren Pflanzen vorkommenden zytotoxischen RNasen tragen zum Schutz des Organismus durch den Abbau von viraler Fremd-RNA bei (*host defense*; Rybak und Newton, 1999). Die hochspezifischen RNasen aus Pilzen inaktivieren die Ribosomen durch Spaltung einer einzigen Phosphodiesterbindung der großen ribosomalen RNA (28S-rRNA) im sogenannten Sarcin-Ricin-*loop* (Wool et al., 1992; Kao und Davies, 1999; Olmo et al., 2001), inhibieren dadurch die Translation und werden daher als Ribotoxine bezeichnet (2.3.2.4). Die Ribotoxine gehören aufgrund von Strukturhomologien zur RNase T1-Familie, einer Gruppe mikrobieller, extrazellulärer RNasen, zu der etwa 25 verschiedene Enzyme mit sowohl eukaryotischem als auch prokaryotischem Ursprung gehören (Hartley, 1980; Yoshida, 2001).

Die in Bakterien vorkommenden plasmidcodierten Colicine E3, E4 und E6 sind ebenfalls spezifische RNasen, die kleine rRNA-Moleküle (16S-rRNA) in sensitiven Konkurrenzstämmen spalten können (James et al., 1996), wohingegen die Colicine E5 und D spezifisch die Anticodons verschiedener tRNAs spalten (Ogawa et al., 1999; Tomita et al., 2000).

Die in der Tabak-Art *Nicotiana glauca* gefundenen Genprodukte der S-Locus-Allele (S-Glykoproteine) konnten ebenfalls als RNasen identifiziert werden (McClure et al., 1989). Dieser S-Genlocus ist verantwortlich für die Kontrolle der gametophytischen Selbstinkompatibilität, einer im Pollenschlauch erfolgenden Strategie von Samenpflanzen, nach einer Bestäubung die Befruchtung durch eigenen Pollen (Autogamie) oder genetisch ähnlichen Pollen zu verhindern. Aus den verschiedenen S-Locus-Allelen entstehen Proteine mit meist kleinen, aber wichtigen Unterschieden, die zur (Selbst-)Erkennung notwendig sind.

Auch Amphibien besitzen sekretorische, zytotoxische RNasen für Abwehrreaktionen und zur physiologischen Zellablation. Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen Entwicklung und Wachstumsregulation führten zur Entdeckung dieser zytotoxischen

Enzyme in den amphibischen Oozyten. Diese RNasen wurden aufgrund von Sequenz- und Strukturhomologien der pankreatischen RNase A-Familie (Klasse 9) zugeordnet (Ardelt et al., 1991; Irie et al., 1998).

RNase A (2.5) aus dem Rinderpankreas ist der prominenteste Vertreter dieser RNase-Superfamilie und gehört der Klasse der sekretorischen oder Säuger-RNasen (Klasse 1, Pankreas-Typ) an (Beintema, 1998). Zum pankreatischen Typ zählen zudem z.B. die HPR und die *bovine seminal* (BS) RNase. Homologe Vertreter der RNase A-Superfamilie wurden bisher ausschließlich bei Vertebraten gefunden. Andere Vertreter der Superfamilie sind die nicht-sekretorischen RNasen (z.B. *eosinophil derived neurotoxin*, EDN, oder *eosinophil cationic protein*, ECP), die Angiogenine und die Amphibien-RNasen (z.B. aus *Rana catesbeiana*, *Rana japonica* oder ONC aus *Rana pipiens*).

Einige dieser Proteine erfüllen nicht nur digestive Aufgaben. So stimuliert z.B. das Plasmaenzym Angiogenin das Wachstum neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Riordan, 1997; Vallee und Riordan, 1997). Die in den eosinophilen Granulozyten vorkommenden basischen Proteine ECP und EDN sind die einzigen Vertreter der RNase-Familie mit antiparasitärer Wirkung gegenüber Eingeweidewürmern (McLaren et al., 1981). Neben dieser helminthotoxischen Aktivität besitzen diese beiden RNasen eine selektiv zytotoxische Wirkung auf bestimmte Zellen des zentralen Nervensystems (Gleich et al., 1986; Gullberg et al., 1986). BS-RNase (2.3.2.1), das einzige dimere Homologe der RNase A, wirkt auf Tumorzellen selektiv zytotoxisch. Neben dieser Antitumoraktivität zeigt BS-RNase zusätzlich immunosuppressive, embryotoxische und aspermatogene Eigenschaften (D'Alessio et al., 1997). Eine selektive Zytotoxizität konnte ebenfalls für die Amphibien-RNasen nachgewiesen werden. Die Lektine aus *Rana catesbeiana* und *Rana japonica* verursachen ausschließlich die Agglutination von transformierten Zellen und auch ONC aus *Rana pipiens* (2.3.2.3) ist ein effektives Antitumormedikament (Kamiya et al., 1990; Ardelt et al., 1991; Okabe et al., 1991).

2.2.2 Untersuchungen zur Antitumoraktivität von RNasen

Im Jahr 1946 wurde RNase A erstmals in künstlich befruchtete Froscheier (aus *Rana temporaria*) injiziert, wodurch die weitere Zellteilung verhindert und die Degeneration dieser Zellen ausgelöst wurde (Thomas et al., 1946). Diese durch die Injektion von RNase A hervorgerufenen Effekte wurden nachfolgend unter Verwendung von Froscheiern aus *Rana fusca* (Ledoux et al., 1954) oder von Hühnerfibro- und -myoblasten bestätigt (Firket et al., 1955). Die bahnbrechenden Experimente von Ledoux und seinen Mitarbeitern an Tumorzellen *in vitro* (Ledoux und Baltus, 1954; Ledoux, 1956) und die Versuche zur Unterdrückung des Tumorwachstums *in vivo* (Injektion von RNase A in Mäusetumore; Ledoux, 1955a; 1955b; Ledoux und Revell, 1955) waren schließlich Auslöser vielfältiger Untersuchungen zu Möglichkeiten einer klinischen Anwendung von RNasen. Die toxische Wirkung von RNase A gegenüber Tumorzellen war jedoch an hohe Enzymkonzentrationen gebunden.

1973, fast 20 Jahre nach der Pionierarbeit von Ledoux, wurde im Plasma von Bullenspermien ein Homologes der RNase A entdeckt, das bereits in geringeren Konzentrationen und ohne direkte Injektion zytotoxisch wirkt (BS-RNase; Matoušek,

1973). RNasen können somit eine natürliche Antitumoraktivität besitzen, ohne dass eine direkte Injektion erforderlich ist. Die erhöhte Spezifität und Selektivität gegenüber Tumorzellen wird vor allem dem Umstand zugeschrieben, dass diese meist einen höheren Gehalt an negativ geladenen Phospholipiden in ihren Membranen aufweisen (James et al., 1956; Kojima, 1993; Slivinsky et al., 1997) und dadurch die Interaktion mit kationischen RNasen (hoher Gehalt an basischen Aminosäureresten) verstärkt und die Internalisierung erleichtert wird.

Ebenfalls im Jahr 1973 konnte dem Extrakt aus Embryonen des Nördlichen Leopardfroschs *Rana pipiens* Antitumoraktivität nachgewiesen werden (Shogen und Yoan, 1973), wobei jedoch das verantwortliche Enzym (ONC) erst 18 Jahre später identifiziert und der RNase A-Superfamilie zugeordnet werden konnte (Ardelt et al., 1991). ONC (2.3.2.3) besitzt eine hohe zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen (Darzynkiewicz et al., 1988; Mikulski et al., 1990a; Mikulski et al., 1992) und ist das einzige derartige Enzym, das sich derzeit im klinischen Test befindet (Phase IIIb, Alfacell, Somerset, New Jersey, USA). Ein Synergie-Effekt kann durch Kombination mit klassischen Chemotherapeutika erreicht werden (Mikulski et al., 1990b; Mikulski et al., 1992) und dies sogar bei *multi drug resistance* der MDR1-Form. Der entscheidende Nachteil der ONC-Behandlung, die dosisabhängige und reversible Nephrotoxizität (Vasandani et al., 1999), könnte durch wiederholte Applikation geringerer Dosen vermutlich umgangen werden. Dafür spricht, dass die Antitumorwirksamkeit von ONC auf A549-Tumore (humane karzinogene alveoläre Epithelzelltumore) durch die wiederholte Applikation kleinerer ONC-Mengen im Vergleich zur einmaligen Verabreichung einer hohen Dosis *in vivo* weiter gesteigert werden konnte (Lee und Shogen, 2008). Interessanterweise werden Säuger-RNasen im Gegensatz zu ONC nicht in den Nieren angereichert (Vasandani et al., 1999).

Wie im Kapitel 2.2.1 aufgeführt, enthalten auch andere Amphibien in ihren Oozyten zytotoxische RNasen. So interagieren die Proteine aus *Rana catesbeiana*- bzw. *Rana japonica*-Eiern über Sialinsäurereste mit bestimmten Glykoproteinen (Sialoglykoproteinrezeptoren) auf der Oberfläche von Tumorzellen und zeigen dadurch Antitumoraktivität (Nitta et al., 1987; Nitta et al., 1994a; Nitta et al., 1994b). Die untersuchten Zellkulturen entwickelten jedoch nach längerer Inkubationszeit mit diesen RNasen Resistenzen, wohingegen bei ONC-Verabreichung trotz jahrelanger Therapie keinerlei Resistenzentwicklung nachgewiesen werden konnte.

2.2.3 Mechanistische Grundlagen der Zytotoxizität von RNasen

Während die RNasen aus *Rana catesbeiana* (RC-RNase) und *Rana japonica* (RJ-RNase) den Zelltod bereits durch die Bindung an die Zelloberfläche durch die Induktion der Zellagglutination verursachen (Youle und D'Alessio, 1997), müssen die bekannten anderen sekretorischen RNasen für eine zytotoxische Wirkung in das Zytosol der jeweiligen Zellen gelangen. Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie diese extrazellulären Enzyme das Zytosol erreichen. Abb. 2 zeigt eine Vorstellung über den Ablauf dieses Vorgangs. Der erste Schritt des Transports in die Zellen ist eine Interaktion zwischen dem Enzym und der Plasmamembran der Zielzelle. Extrazelluläre RNasen der RNase A-Superfamilie sind Moleküle mit hoher positiver Nettoladung, die durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladenen Zelloberflächen adsorbieren und sich dadurch extrazellulär anreichern. Dadurch wird eine effiziente rezeptor- und transporterunabhängige Internalisierung in die Zellen bewirkt (Futami et al., 2001; Ilinskaya et al., 2002).

ONC bindet jedoch vermutlich durch Rezeptoren an die Plasmamembran (2.3.2.3; Wu et al., 1993). Dies führt zu einer spezifischen Anreicherung des Enzyms in sogenannten *coated pits*, aus denen das Enzym anschließend durch clathrinvermittelte Endozytose ins Innere der Zielzelle gelangt (Rodriguez et al., 2007). Die intrazelluläre Route der ONC entspricht der des Transferrins und führt durch das Rezeptor-Recycling-Kompartiment (frühes Endosom; Rodriguez et al., 2007). Der Mechanismus der Translokation des Enzyms aus diesem Kompartiment in das Zytosol ist dabei jedoch noch unbekannt, er erfordert aber keine Absenkung des pH-Werts in den Endosomen (Haigis und Raines, 2003). Die intrazellulären Routen anderer sekretorischer RNasen wurden ebenfalls durch die Verwendung von Wirkstoffen, die den intrazellulären Transport an unterschiedlichen Stellen unterbrechen oder durch Kollokalisationsstudien mit Markerenzymen einzelner Organellen bzw. mit Substanzen mit bekanntem zellulären Aufnahmemechanismus (z.B. Transferrin) teilweise aufgeklärt (Benito et al., 2008).

Die Internalisierung von RNase A und von HPR erfolgt ebenfalls durch einen endozytotischen Aufnahmemechanismus, gefolgt von der Translokation ins Zytoplasma, die vermutlich ebenso über die Endosomen erfolgt (Haigis und Raines, 2003; Bosch et al., 2004). Diese Internalisierungsprozesse unterscheiden sich aber deutlich von dem der ONC, da ein Teil der internalisierten RNasen im Gegensatz zur ONC den abbauenden Kompartimenten (Lysosomen) zugeführt wird (Bosch et al., 2004; Leich et al., 2007).

Innerhalb der Zelle treffen die RNasen auf verschiedene Proteasen und im Zytosol zusätzlich auf den RI. Nur RNasen, die das Zytosol erreichen und sich dort der Bindung und Inaktivierung durch den RI sowie einem proteolytischen Verdau entziehen können, sind in der Lage zelluläre RNA zu spalten. Die damit verbundene Induktion apoptotischer Prozesse führt letztendlich zum Zelltod.

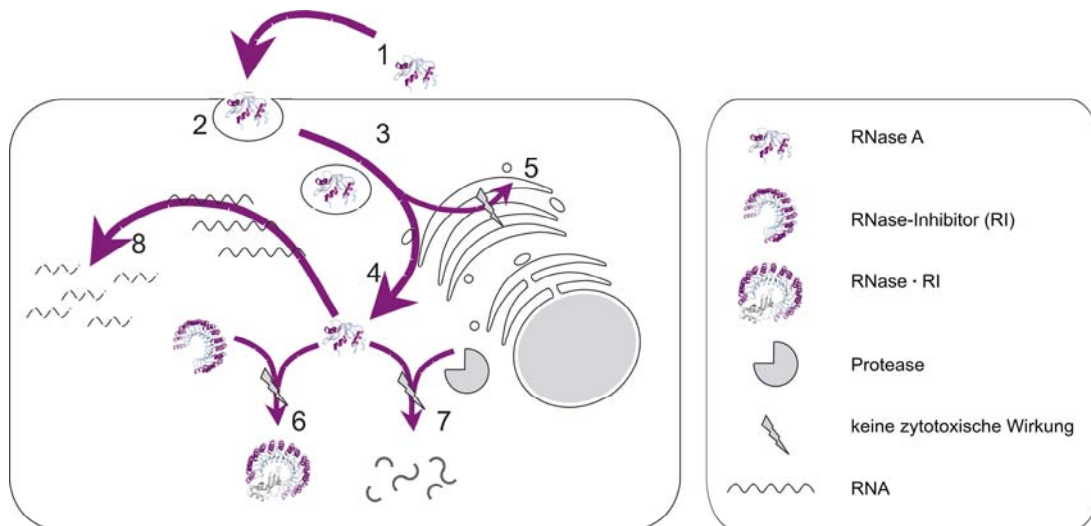


Abb. 2: Mutmaßliche intrazelluläre Route von RNase A

Die RNase A-Moleküle interagieren zunächst mit der Plasmamembran der Zielzelle (1) und gelangen durch Endozytose ins Innere der Zelle (2). Die umhüllten Vesikel fusionieren mit einem Endosom (3) mit nachfolgender Freisetzung der RNase A ins Zytosol (4) oder anschließender Einlagerung in die Zellorganellen (5). Im Zytosol treffen die RNase A-Moleküle auf den RI (6) und verschiedene Proteasen (7). Nur die RNase A-Moleküle, die sich der Inaktivierung durch den RI und dem proteolytischen Verdau entziehen können, spalten zelluläre RNA (8) und induzieren dadurch den Zelltod.

2.3 RI und seine Rolle in der RNase-vermittelten Zytotoxizität

2.3.1 Struktur und Funktion des RI

Der RI ist ein zytosolisches 50-kDa-Protein, das etwa 0,08% der gesamten im Zytosol von Säugerzellen vorkommenden Proteine ausmacht (Nadano et al., 1994; Haigis et al., 2003). Die intrazelluläre Konzentration wird somit auf ca. 4 μM geschätzt (Haigis et al., 2003). Das Inhibitor-Protein besteht aus 15 sich wiederholenden Leucin-reichen β - α -Einheiten (*leucine-rich repeats, LRRs*), die symmetrisch in Form eines Hufeisens angeordnet sind (Abb. 3; Kobe und Deisenhofer, 1993). Leucin ist dabei mit einem Anteil von 18% die am häufigsten auftretende Aminosäure des Proteins (Blackburn et al., 1977; Burton und Fucci, 1982). Die β -Stränge der *LRRs* bilden ein Faltblatt, welches das Innere des Inhibitors ausmacht und eine weitläufige Fläche für die Interaktion mit anderen Proteinen (RNasen der RNase A-Superfamilie) bildet. Die α -Helices sind dagegen an der Außenseite lokalisiert (Abb. 3). Der aus Schweinepankreas gewonnene Inhibitor (pRI) enthält 30, das humane Protein (hRI) hingegen 32 reduzierte Cysteinreste (Hofsteenge et al., 1988; Lee et al., 1988). Der RI benötigt für seine Aktivität eine reduzierende Umgebung, wie sie im Zytosol vorhanden ist. Die Oxidation von RI ist ein hochkooperativer Prozess (Fominaya und Hofsteenge, 1992). In seiner oxidierten Form verliert der Inhibitor die Fähigkeit, RNase A zu binden und wird rasch durch zelluläre Proteasen abgebaut (Blazquez et al., 1996). Somit könnte die Aktivität von RI im Zytosol über oxidative Prozesse reguliert werden.

RI bildet mit pankreatischen RNasen wie RNase A einen nichtkovalenten 1:1-Komplex (Abb. 3; Blackburn und Jaikhani, 1979). Der K_d -Wert des pRI•RNase A-Komplexes liegt bei $6,7 \times 10^{-14}$ M (Vicentini et al., 1990) und der des hRI•RNase A-Komplexes bei $4,4 \times 10^{-14}$ M (Lee et al., 1989a; Lee et al., 1989b). Der K_d -Wert für den Komplex aus hRI und Angiogenin liegt außergewöhnlich tief bei $7,1 \times 10^{-16}$ M (Lee et al., 1989a; Lee et al., 1989b), wobei auch der hRI•HPR-Komplex einen ähnlich niedrigen K_d -Wert aufweist ($K_d = 2,9 \times 10^{-16}$ M; Johnson et al., 2007). Damit gehören die Wechselwirkungen innerhalb dieser Komplexe zu den stärksten bekannten nichtkovalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen, vergleichbar mit den Wechselwirkungen zwischen Avidin und Biotin ($K_d = 6 \times 10^{-16}$ M; Green, 1975).



Abb. 3: Kristallstruktur des pRI•RNase A-Komplexes

Das Modell wurde der Brookhaven Proteindatenbank (PDB-Eintrag 1DFJ) entnommen und mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt. RNase A ist grau dargestellt.

Die Kontaktfläche zwischen RI und RNase A innerhalb des RI•RNase A-Komplexes ist mit 2900 \AA^2 um 60% größer als die eines typischen Antikörper•Antigen-Komplexes ($K_d \approx 10^{-12}$ M; Kobe und Deisenhofer, 1995; Dickson et al., 2005). Diese ausgedehnte Kontaktfläche bedingt die außergewöhnlich hohe Affinität des RI gegenüber RNasen. Von den 12 am Katalysemechanismus beteiligten Aminosäureresten der RNase A sind 7 in die intermolekularen Wechselwirkungen mit RI involviert (Kobe und Deisenhofer, 1996), so dass RNase A nach der Bindung an den RI keine RNA-Spaltung mehr katalysieren kann.

Neben RNase A, HPR und Angiogenin werden auch andere Säuger-RNasen, wie EDN oder die Monomere der BS-RNase, wirkungsvoll inhibiert (Papageorgiou et al., 1997; Iyer et al., 2005; Lee und Raines, 2005; Johnson et al., 2007). Die Tatsache, dass es sich bei allen bekannten RI-Liganden um sekretorische RNasen handelt und RI ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist, führte zur Hypothese, dass der RI dem Schutz zellulärer RNA vor der Wirkung ins Zytosol gelangter sekretorischer RNasen dient (Hofsteenge, 1997). Erstaunlicherweise enthalten aber auch humane Erythrozyten signifikante Mengen an RI ohne jedoch RNA oder RNasen zu beinhalten (Moenner et al., 1998). Aufgrund der bereits erwähnten Oxidationssensitivität des RI wurde zudem eine Sensorfunktion für den Oxidationszustand der Zelle und eine Schutzfunktion vor oxidativen Schäden abgeleitet.

So schützt die Überexpression des *ri*-Gens in Gliazellen der Ratte diese vor wasserstoffperoxidinduziertem Stress (Cui et al., 2003). Der RI könnte somit auch ein bestimmender Faktor der Lebenserwartung sein und einen Marker des Alters darstellen.

2.3.2 Natürliche RNasen mit Antitumorwirkung

2.3.2.1 BS-RNase

Die BS-RNase ist ein 27 kDa großes, im Rindersperma vorkommendes homodimeres Protein. Die Aminosäuresequenz der Monomere stimmt zu 83% mit der RNase A-Sequenz überein (Lee und Raines, 2005). Die BS-RNase ist der einzige natürliche Vertreter der pankreatischen RNasen mit dimerer Struktur. Das Dimer entsteht durch die Ausbildung von zwei intermolekularen Disulfidbrücken zwischen dem Cys31 einer Einheit und dem Cys32 der zweiten Einheit und umgekehrt. Die dimere Struktur der BS-RNase ist essentiell für deren zytotoxische Wirkung, da das Dimer aufgrund sterischer Abschirmung nicht vom RI gebunden werden kann (Murthy et al., 1996). Der K_d -Wert ist mit einem Wert von $> 2 \mu\text{M}$ angegeben (Antignani et al., 2001), der IC_{50} -Wert (Konzentration an Toxin im Zellkulturmedium, bei der 50% der Zellen überleben) liegt bei $1,3 \mu\text{M}$ (Lee und Raines, 2005). BS-RNase existiert in zwei miteinander im Gleichgewicht stehenden Formen: einem *M*×*M*-*domain-swapped*-RNase-Dimer (Abb. 4A), bei dem die N-terminale Helix einer Untereinheit mit dem jeweiligen Restmolekül der anderen Untereinheit interagiert und einer *M*=*M*-Form (Abb. 4B), bei der diese Wechselwirkung nicht auftritt (Piccoli et al., 1992; Kim et al., 1995a). Das Verhältnis der *M*×*M* : *M*=*M*-Form liegt bei 2:1 (Piccoli et al., 1992). Zwei weitere Aminosäuren, Pro19 und Leu28, spielen neben den beiden Cysteinresten bei der Ausbildung dieser dimeren Struktur eine bedeutende Rolle. Pro19 trägt entscheidend zur korrekten Konformation der *loop*-Region bei, die die N-terminale Helix mit dem restlichen Proteinmolekül verbindet (Mazzarella et al., 1993). Leu28 ist dagegen für hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den beiden monomeren Untereinheiten verantwortlich (Mazzarella et al., 1993).



Abb. 4: Kristallstrukturen der BS-RNase

Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt: **A:** *M* × *M*-*domain-swapped*-RNase-Dimer (PDB-Eintrag 1R5D), **B:** *M*=*M*-*unswapped*-RNase-Dimer (PDB-Eintrag 1R3M). Die Disulfidbrücken sind gelb hervorgehoben.

Unter physiologischen Bedingungen führt die Spaltung der Disulfidbrücken zur Entstehung von Monomeren (aus der M=M-Form) und von nichtkovalent gebundenen Dimeren (aus der M×M-Form; Cafaro et al., 1995; Kim et al., 1995a). Während die Monomere vom RI gebunden werden (Murthy und Sirdeshmukh, 1992; Kim et al., 1995a) und damit keine zytotoxische Wirkung vermitteln können, wirken die von der M×M-Form abgeleiteten RI-evasiven Dimere zytotoxisch (Vescia et al., 1980; Kim et al., 1995b; 1995c), dissoziieren jedoch aufgrund des erwähnten Gleichgewichts mit einer Halbwertszeit von 3,3 h (Antignani et al. 2001). BS-RNase schädigt jedoch nicht nur Tumorzellen, sondern zeigt zusätzlich embryotoxische, aspermatogene und immunosuppressive Aktivitäten (D'Alessio et al., 1997; Matoušek et al., 2003b). Die aspermatogene Eigenschaft beruht ausschließlich auf der Zerstörung der aus den Spermatogonien durch die Spermatogenese gebildeten Keimzellen (D'Alessio et al., 1991).

Die Internalisierung der BS-RNase beginnt mit der Bindung an die extrazelluläre Matrix der Zellen (Mastronicola et al., 1995) und die sich anschließende Endozytose führt zunächst zu einer Lokalisation in den Endosomen (Bracale et al., 2002). Durch Immunfluoreszenzstudien konnte BS-RNase auch im Trans-Golgi-Netzwerk detektiert werden. Die dimere BS-RNase destabilisiert künstlich hergestellte negativ geladene Membranen und hat damit Einfluss auf die Membranaggregation, die Fluidität und Fusionsprozesse (Mancheno et al., 1994; Notomista et al., 2006). Da das Ausmaß dieser Destabilisierung mit der zytotoxischen Potenz korreliert (Notomista et al., 2006), gilt die Permeation aus dem Trans-Golgi-Netzwerk ins Zytosol als wahrscheinlich (Bracale et al., 2002). Interessanterweise konnte BS-RNase auch ohne Kernlokalisationssequenz im Nukleolus maligner Zellen nachgewiesen werden (Bracale et al., 2002; Viola et al., 2005). Da BS-RNase auf normale und maligne Telomerase-positive Zellen toxisch wirkt und dabei sowohl die Telomeraseaktivität als auch den RNA-Gehalt der Telomeraseuntereinheit verringert, gilt die Induktion von proapoptischen Prozessen durch die Spaltung von telomeraler RNA als erwiesen (Viola et al., 2005).

2.3.2.2 RNase A-Multimere

Durch die Lyophilisierung von RNase A aus 50%iger Essigsäure entstehen verschiedene Formen nichtkovalent verbundener, instabiler RNase A-Oligomere (Crestfield et al., 1962; Fruchter und Crestfield, 1965). Dabei werden zwei verschiedene Dimer-Spezies gebildet. Die seltener auftretende Form (*minor domain-swapped*-RNase A-Dimer; Abb. 5A) entsteht durch die Interaktion der N-terminalen Helices zweier RNase A-Moleküle analog zur M×M-Form der BS-RNase (Liu et al., 1998). Die vorherrschende Form der *domain-swapped*-RNase A-Dimere entsteht jedoch durch die Interaktion der C-terminalen β -Stränge zweier RNase A-Moleküle (*major domain-swapped*-RNase A-Dimer, Abb. 5B; Liu et al., 2001). Das *domain-swapping* kann sogar gleichzeitig an beiden Termini eines RNase A-Moleküls erfolgen, was die Bildung höher geordneter, linearer oder zyklischer Oligomere gestattet (Abb. 5C), die im Gegensatz zu RNase A sowohl aspermatogene als auch zytotoxische Aktivität besitzen (Libonati, 2004). Im Gegensatz zur BS-RNase wirken die RNase A-Oligomere jedoch nicht embryotoxisch (Libonati, 2004).

Die dimere oder höher geordnete Struktur der RNase A-Oligomere ist in Analogie zur BS-RNase essentiell für die zytotoxische Wirkung. Die Dissoziation der Oligomere in monomere RNase A zieht den Verlust der Zytotoxizität nach sich (Libonati und Gotte, 2004). Während BS-RNase aufgrund einer sterischer Abschirmung nicht vom RI gebunden werden kann (Murthy et al., 1996), dadurch katalytisch aktiv bleibt und intrazellulär eine zytotoxische Wirkung vermittelt, werden die *domain-swapped*-RNase A-Dimere überraschenderweise in einem ähnlichen Ausmaß vom RI gebunden wie monomere RNase A (Naddeo et al., 2005). Die trotz der RI-Bindung auftretende zytotoxische Aktivität der RNase A-Oligomere wurde auf eine intensivere Interaktion der kationischen Oligomere mit der polyanionischen Zelloberfläche und einer damit verbundenen effizienteren Endozytose zurückgeführt (Libonati, 2004). Durch eine verbesserte Internalisierung kann die inaktivierende Wirkung des intrazellulären RI nivelliert werden, so dass nach Sättigung des RI nachfolgend aufgenommene RNase A-Oligomere RNA spalten und damit den Zelltod verursachen.

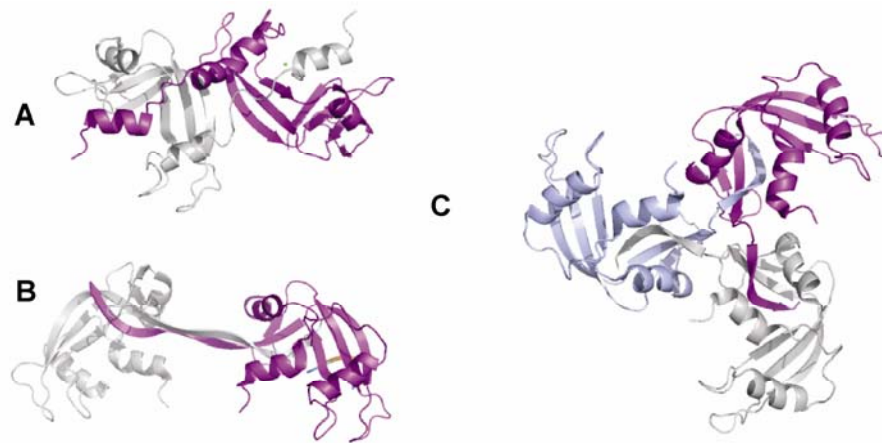


Abb. 5: Kristallstrukturen verschiedener RNase A-Multimere

Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt: **A:** *minor domain-swapped*-RNase A-Dimer (PDB-Eintrag 1JS0), **B:** *major domain-swapped*-RNase A-Dimer (PDB-Eintrag 1FOV), **C:** *minor domain-swapped*-RNase A-Trimer (PDB-Eintrag 1A2W).

2.3.2.3 Onconase

Die Aminosäuresequenzen von ONC (104 AS) und RNase A (124 AS) stimmen zu 30% überein, wobei sich die Tertiärstrukturen beider Enzyme stark ähneln (Abb. 6A, B) (Ardelt et al., 1991; Mosimann et al., 1994). Wie RNase A besitzt auch ONC vier Disulfidbrücken (Abb. 6B). Die Positionen dreier dieser Bindungen stimmen mit den entsprechenden Positionen innerhalb des RNase A-Moleküls überein (Abb. 6A). Die zur RNase A nicht homologe Disulfidbrücke am C-Terminus der ONC (Abb. 6B, rot dargestellt) trägt erheblich zu deren thermodynamischer Stabilität bei (T_m ONC = 90°C, T_m RNase A = 60°C; Leland et al., 2000; Notomista et al., 2001). Die Entfernung dieser Bindung führt zu einer Erniedrigung der Übergangstemperatur um nahezu 30 K (Arnold et al., 2006) und zur Verringerung der Zytotoxizität auf das RNase A-Niveau (Leland et al., 2000; Schulenburg et al., 2007). ONC enthält im Gegensatz zu RNase A am

N-Terminus einen für die Aktivität und Zytotoxizität essentiellen Pyroglutamyl-Rest (Abb. 6B; Boix et al., 1996).

Während RNase A eine 10^4 -fach höhere katalytische Aktivität im Vergleich zur ONC zeigt (Boix et al., 1996), ist die Inhibitorkonstante K_i für ONC mit $\geq 10^{-6}$ M (Boix et al. 1996) jedoch 10^7 -mal größer als die Dissoziationskonstante K_d des hRI•RNase A-Komplexes ($4,4 \times 10^{-14}$ M)*. Die stärkere zytotoxische Wirkung der ONC (IC_{50} gegenüber K562-Zellen: $0,5 \mu\text{M}$; RNase A ohne Auswirkung) wird aufgrund ihrer geringen ribonukleolytischen Aktivität daher vor allem dem Umstand zugeschrieben, dass ONC nicht vom intrazellulären RI der Säugetiere gebunden werden kann.

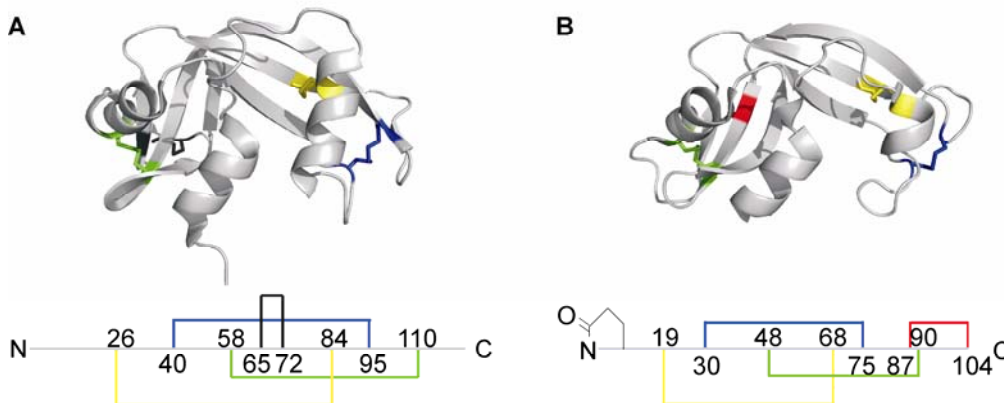



Abb. 6: Kristallstrukturen und schematische Darstellung der Disulfidbrücken von RNase A und ONC

Die Modelle wurden der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm Pymol (DeLano, 2002) erstellt: **A:** RNase A (PDB-Eintrag 7RSA), **B:** ONC (PDB-Eintrag 1ONC).

Die Positionen dreier Disulfidbrücken der ONC stimmen mit den entsprechenden Positionen innerhalb des RNase A-Moleküls überein (gelb, blau und grün gekennzeichnet).

 : Pyroglutamyl-Rest.

ONC wird unter Verbrauch von Energie in die Zellen internalisiert (Wu et al., 1993; Haigis und Raines, 2003). Nach der Akkumulation an der Zellmembran in sogenannten *coated pits* erfolgt die Endozytose (Clathrin/AP-2; Rodriguez et al., 2007). Die Existenz eines spezifischen ONC-Rezeptors wird jedoch kontrovers diskutiert. Die Analyse der Bindung von ^{125}I -ONC an 9L-Glioma-Zellen zeigte die Existenz zweier verschiedener Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität ($K_{d1} = 6,2 \times 10^{-8}$ M, $K_{d2} = 2,5 \times 10^{-7}$ M; Wu et al., 1993). Dies steht jedoch im Widerspruch zu dem an HeLa-Zellen nicht sättigbaren Internalisierungsprozess (Haigis und Raines, 2003). Die parallel zum Transferrin verlaufende Internalisierung lässt jedoch die Anwesenheit eines zellulären Membranrezeptors vermuten.

***Anmerkung:** Durch die Ausbildung eines vollständig inaktiven 1:1-Komplexes mit dem hochaffinen RI gilt für monomere RNase $K_i = K_d$; die Inhibitorkonstante K_i entspricht somit der Dissoziationskonstante K_d des RI•RNase A-Komplexes (Lee et al., 1989b).

Durch Kolokalisationsexperimente unter Verwendung von fluoreszenzmarkierter ONC und Markerproteinen der verschiedenen Zellorganellen konnte gezeigt werden, dass ONC nur mit den Markerproteinen Transferrin und Rab11 des Recycling-Endosoms kolokalisiert (Rodriguez et al., 2007). Die Anwendung von Substanzen, die den intrazellulären Transport zwischen den verschiedenen Organellen blockieren, bestätigt dieses Ergebnis, da ONC direkt und ohne eine Translokation ins Golgi-Netzwerk oder in das endoplasmatische Retikulum (ER) aus den frühen Endosomen in das Zytosol gelangt (Rodriguez et al., 2007).

Im Zytosol vermittelt ONC ihre zytotoxischen Effekte durch die Spaltung zellulärer RNA. Ursprünglich wurde die unspezifische Hemmung der Proteintranslation durch die Spaltung von 28S- bzw. 18S-rRNA vermutet (Wu et al., 1993), während später tRNA als präferiertes ONC-Substrat angenommen wurde (Saxena et al., 2002). Die verstärkte Transkription verschiedener zellzyklusregulierender Gene in ONC-behandelten Zellen spricht jedoch gegen eine unspezifische Translationsinhibierung durch den Abbau von rRNA oder tRNA (Juan et al., 1998). Vielmehr wurden zusätzlich mikroRNAs als ONC-Substrate postuliert (Ardelt et al., 2003), die eine wichtige Rolle im komplexen Netzwerk der Genregulation, insbesondere bei der Stilllegung von Genen durch RNA-Interferenz spielen. ONC-behandelte U937-Zellen weisen unter anderem sowohl eine deutlich herabgesetzte Expression der Gene des Zellzyklusproteins Cyclin D als auch eine deutlich erhöhte Genexpression von Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinase auf. Die dadurch verringerte Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase arretiert die ONC-behandelten Zellen in der Zellzyklusphase G₁, bevor mit einer Verzögerung von 24-48 h Apoptose stattfindet (Juan et al., 1998).

Die zytostatische bzw. zytotoxische Wirkung von ONC konnte *in vitro* gegenüber 9L-Zellen (Gliomzellen der Ratte; Wu et al., 1993), K562-Zellen (humane Mesotheliomzellen; Leland et al., 2000), Colo 320 CM-Zellen (humane Dickdarmkarzinomzellen; Darzynkiewicz et al., 1988), HL-60-Zellen (humane Leukämiezellen; Halicka et al., 2000), LNCaP- und JCA-1-Zellen (humane Prostatakrebszellen; Halicka et al., 2000), HT-29-Zellen (humane kolorektale Krebszellen; Rybak et al., 1996) und U937-Zellen (humane Lymphomzellen; Juan et al., 1998) nachgewiesen werden. Die zytotoxische Wirkung von ONC konnte durch gleichzeitige Zugabe von Tamoxifen (Mikulski et al., 1990b; Mikulski et al., 1992), Cisplatin (Mikulski et al., 1992) oder Vincristin (Rybak et al., 1996) weiter gesteigert werden.

In vivo verlängert ONC das Überleben tumortransplantierter Mäuse (Mikulski et al., 1990a; Rybak et al., 1996; Lee et al., 2003) und wurde dadurch zum klinischen Test zugelassen. In den klinischen Studien der Phase I konnte sowohl die optimale Dosis als auch das Terminraster der ONC-Applikation bestimmt werden. Die maximale Toleranzdosis lag bei 960 µg m² und für die sich anschließenden Phase II-Studien wurde eine wöchentliche Dosis von 480 µg m² empfohlen (Costanzi et al., 2005; Lee und Raines, 2008).

In den verschiedenen Studien der Phase II wurde ONC als Monopräparat gegen Lungenkrebs (nicht kleinzellig; Lee und Raines, 2008), Brustkrebs (Lee und Raines,

2008), Nierenzellkrebs (Vogelzang et al., 2001) und maligne Mesotheliome (Mikulski et al., 2002) eingesetzt.

Im klinischen Test der Phase III gegen maligne Mesotheliome wurden die Patienten entweder mit ONC oder mit dem herkömmlichen Chemotherapeutikum Doxorubicin behandelt, wobei die Überlebensdauer der ONC-behandelten Patienten deutlich erhöht wurde (Medikation der Vergleichsgruppe: Doxorubicin; Costanzi et al., 2005; Pavlakis und Vogelzang, 2006). In der momentan stattfindenden Studie der Phase IIIb wird untersucht, inwiefern Synergieeffekte durch kombinierte Applikation von ONC und Doxorubicin die Überlebensrate weiter steigern können (Costanzi et al., 2005; Pavlakis und Vogelzang, 2006).

2.3.2.4 Mikrobielle RNasen

Die zytotoxische Wirkung einzelner mikrobieller RNasen auf verschiedene Säuger-Zelllinien wird hauptsächlich dem Umstand zugeschrieben, dass RNasen aus Mikroorganismen nicht vom RI der Säugetiere inaktiviert werden (Makarov und Ilinskaya, 2003).

Die hochspezifischen RNasen aus Pilzen (Ribotoxine) inaktivieren die Ribosomen durch Spaltung der 28S-rRNA im sogenannten Sarcin-Ricin-*loop* (2.2.1; Wool et al., 1992; Kao und Davies, 1999; Olmo et al., 2001), wodurch die vom Elongationsfaktor 1 abhängige Bindung der Aminoacyl-tRNA und die guanosintriphosphatabhängige Bindung vom Elongationsfaktor 2 blockiert werden. Durch diese Translationsinhibierung hemmen u.a. die Ribotoxine α -Sarcin und Restrictocin (aus *Aspergillus restrictus*) sowie Mitogillin (aus *Aspergillus fumigatus*) die Proteinsynthese und verursachen den Zelltod. Neben dieser spezifischen Aktivität interagieren die Ribotoxine durch ihren hohen Gehalt an basischen Aminosäureresten (Sacco et al., 1983) sehr fest mit negativ geladenen Phospholipidvesikeln und können auch ohne Rezeptor die Lipidmembran der Zielzellen durchqueren (Onaderra et al., 1993; Martinez-Ruiz et al., 2001). Diese starke Interaktion vermittelt den Ribotoxinen eine leicht erhöhte Spezifität gegenüber Tumorzellen (Gasset et al., 1989; Gasset et al., 1990).

Neben den Ribotoxinen weisen auch einige andere Vertreter der RNase T1-Familie wie Binase (aus *Bacillus intermedius*) oder RNase Sa3 (aus *Streptomyces aureofaciens*) zytotoxische Aktivitäten auf. Im Gegensatz dazu vermitteln die RNasen Sa (aus *Streptomyces aureofaciens*) und T1 (aus *Aspergillus oryzae*) jedoch keine zytotoxischen Effekte und das obwohl die Mitglieder der RNase T1-Familie generell nicht vom RI gebunden werden können.

Mit der Erhöhung der Nettoladung durch gentechnische Modifizierungen gelang die Umwandlung von RNase Sa (isoelektrischer Punkt (pI) = 3,5) in ein basisches Molekül mit zytotoxischen Eigenschaften (pI = 10,2; Ilinskaya et al., 2002).

Die geringe Spezifität und die damit verbundene systemische Toxizität, sowie das hohe immunogene Potential verhindern jedoch den Einsatz der mikrobiellen RNasen als Therapeutika (Thrush et al., 1996; Youle und D'Alessio, 1997).

2.3.3 Gentechnisch veränderte und chemisch modifizierte RNasen mit Antitumorwirkung

Da die zytotoxische Wirkung der RNasen in außerordentlichem Maße davon abhängt, nicht vom intrazellulären RI gebunden zu werden (2.3), wurde versucht, die für die Bindung verantwortliche Region der RNasen durch Mutation oder durch chemische Modifizierung so zu verändern, dass durch elektrostatische oder sterische Abschirmung eine Bindung nicht mehr erfolgen kann. Des Weiteren wurden RNasen an Liganden oder Antikörper gekoppelt, die ein zellspezifisches *targeting* von Tumorzellen erlauben, um eine selektive Zytotoxizität von RNasen in der Krebstherapie zu erzielen.

2.3.3.1 Varianten

Der Umstand, dass die zytotoxische ONC und die ebenfalls zytotoxisch wirkende dimere BS-RNase in Anwesenheit des RI nicht inaktiviert werden, führte zur Herstellung von zahlreichen mutierten Formen ursprünglich nicht zytotoxischer RNasen. Die Einführung der für die dimere Struktur der BS-RNase verantwortlichen Aminosäurereste (Pro19, Leu28, Cys31 und Cys32) in RNase A (A19P/Q28L/K30C/S31C-RNase A; Di Donato et al., 1994) und HPR (Q28L/R31C/R32C/N34K-HPR; Piccoli et al., 1999) an adäquaten Positionen führte zur Dimerisierung analog zur BS-RNase und neben der dadurch verursachten verminderten RI-Bindung zu einer zytotoxischen Wirkung.

Auch die starken Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb des RI•RNase-Komplexes können durch den Austausch bestimmter Aminosäurereste im RNase-Molekül gestört werden. Anhand der Kristallstruktur des RI•RNase-Komplexes wurden verschiedene Mutanten der RNase A und der HPR entwickelt, die aufgrund sterischer oder elektrostatischer Behinderungen keine starken Protein-Protein-Wechselwirkungen mit dem RI ausbilden können. Die Aminosäurereste Asp38, Gly88 und Ala109 der RNase A bilden im RI•RNase A-Komplex feste Kontakte mit dem RI aus. Beim Austausch von Asp38 und Ala109 gegen Arginin zeigten sich jedoch keine Auswirkungen auf die RNase A-Inhibierung durch den RI, wohingegen G88R-RNase A auch in Gegenwart von RI katalytisch aktiv ist (Leland et al., 1998b). Der K_d -Wert ($K_d = 0,4$ nM; Leland et al., 1998b) liegt 10^4 -fach höher als der K_d -Wert der Wildtyp-RNase A und die zytotoxische Wirkung ($IC_{50} = 7$ μ M) ist nur geringfügig schwächer als die der ONC ($IC_{50} = 0,5$ μ M; Leland et al., 1998b). Ähnliche Effekte konnten beim Austausch von Gly88 mit Aspartat erreicht werden ($K_d = 0,052$ nM; $IC_{50} = 30$ μ M; Leland et al., 1998b). Die Einführung analoger Mutationen in HPR führte ebenfalls zu RI-evasiven Varianten mit vergleichbarer Zytotoxizität, wie beispielsweise L86E/N88R/G89D/R91D-HPR ($K_d = 0,2$ nM; $IC_{50} = 7$ μ M; Leland et al., 2001) oder K7A/N71A/E111A-HPR ($K_d = 0,5$ nM; $IC_{50} = 5,5$ μ M; Gaur et al., 2001).

Die intensivere Analyse der Interaktionen im RI•RNase A-Komplexes unter Verwendung des *fast atomic density evaluation* (FADE) - Algorithmus führte zur Herstellung einer weiteren RNase A-Variante. Der K_d -Wert für D38R/R39D/N67R/G88R-RNase A liegt mit 510 nM $1,2 \times 10^7$ -fach höher als der K_d -Wert von RNase A. Die dadurch

vermittelte zytotoxische Wirkung ist sogar stärker als die der ONC ($IC_{50} = 0,22 \mu\text{M}$; Rutkoski et al., 2005). Neben RNase A und HPR konnten auch die nicht zytotoxischen Monomere der BS-RNase so modifiziert werden (C31A/C32A/G38K/K39G/G88R), dass sie stärker zytotoxisch wirken als die dimere BS-RNase ($IC_{50} = 0,05 \mu\text{M}$; Lee und Raines, 2005).

Im Vergleich zur ONC ($K_d > 1 \mu\text{M}$; Boix et al., 1996) weisen die meisten mutierten RNase-Varianten niedrigere K_d -Werte auf. Da sie gleichzeitig auch eine geringere zytotoxische Wirkung vermitteln, galt eine geringe Affinität gegenüber RI als entscheidendes Kriterium für die zytotoxische Wirkung einer RNase (Hofsteenge, 1997; Haigis et al., 2003). Bei Varianten mit stark erniedrigter RI-Affinität (höhere K_d -Werte) wurde dementsprechend auch meist eine stark erhöhte zytotoxische Potenz (kleinere IC_{50} -Werte) detektiert.

Bosch et al. (2004) lieferten hierzu jedoch einen widersprüchlichen Befund. Die Einführung eines Arginin-Triplets in einen oberflächenexponierten *loop* führt nach der Internalisierung zur Translokation dieser HPR-Variante in den Zellkern. Der dort stattfindende Kontakt mit rRNA vor deren Verpackung in die Ribosomen verleiht dieser Variante trotz unverminderter Affinität zu RI eine zytotoxische Wirkung ($IC_{50} = 3 \mu\text{M}$; Bosch et al., 2004).

Alternativ wurde auf gentechnischem Weg durch die Erhöhung der Nettoladung versucht, die Interaktion der RNasen mit der polyanionischen Zelloberfläche zu verbessern, um die Internalisierungseffizienz zu steigern. Beispiele hierfür sind die Einführung von Polyarginin, das mit hoher Effizienz in die Zellen internalisiert wird (Mitchell et al., 2000; Fuchs und Raines, 2004), wie die C-terminale Verlängerung durch einen Polyargininschwanz (in Anlehnung an die Proteintranslokationsdomänen; Fuchs und Raines, 2005), oder das sogenannte *arginine grafting*, einer Methode, bei der saure Aminosäurereste in einem bestimmten Oberflächenbereich eines Proteins durch Arginin ersetzt werden (Fuchs et al., 2007). So kann bereits die Einführung eines Argininrests die Internalisierungseffizienz signifikant steigern, wie am Beispiel der G88R RNase A gezeigt werden konnte (Leich et al., 2007).

2.3.3.2 Chemisch modifizierte RNasen

Eine weitere Möglichkeit, die Internalisierung der RNasen zu verbessern und/oder ihre RI-Affinität zu verringern besteht in der chemischen Modifizierung dieser Moleküle. Moleküle mit hoher positiver Nettoladung adsorbieren durch elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladenen Zelloberflächen und reichern sich so extrazellulär an. Dadurch können kationische Polymere mit hoher Effizienz rezeptor- und transporterunabhängig, aber energieabhängig in die Zellen eindringen (Mitchell et al., 2000; Futami et al., 2001; Ilinskaya et al., 2002). Somit ergibt sich durch chemische Molekülpositivierung eine weitere Möglichkeit, die Internalisierungseffizienz der RNasen zu verbessern (Futami et al., 2001; Futami et al., 2002).

Beispielsweise wurden RNase A und HPR chemisch mit Ethylendiamin (Futami et al., 2001) oder Polyethylenimin (Futami et al., 2005) modifiziert. Die daraus resultierende Kationisierung der Carboxylgruppen erniedrigte zwar die katalytische Aktivität der Konstrukte, verlieh ihnen aber gleichzeitig eine bemerkenswerte Zytotoxizität.

Die Kopplung von BS-RNase oder RNase A an Poly[*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid] und die Kopplung von RNase A bzw. RNase A-Oligomeren an Polyethylenglykol führt zu Konstrukten mit deutlicher Antitumoraktivität (Poučkova et al., 2006). Dies ist sowohl auf die penetrationsfördernde Wirkung der Wirkstoffträger als auch auf die sterische Behinderung der RI-Bindung als Folge der chemischen Kopplung zurückzuführen (Matoušek et al., 2002).

Die ersten RNasen, die durch chemische Modifizierung an einen Antikörper gekoppelt wurden, um selektiv Zellen abzutöten, waren Restrictocin und α -Sarcin aus dem Schimmelpilz *Aspergillus restrictus* (Conde et al., 1989). Die hohe Immunogenität der Konstrukte verhinderte jedoch die therapeutische Anwendung. Die Kopplung an monoklonale Antikörper erfolgte unter Verwendung von *N*-Succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio)propionat (SPDP) als Kopplungsreagens, wodurch die zellspezifische Internalisierung und damit auch die zytotoxische Wirkung deutlich gesteigert werden konnte (Conde et al., 1989). In ähnlicher Art und Weise wurde eine Vielzahl von zellspezifischen Konstrukten hergestellt, bei denen RNasen chemisch an verschiedene zelloberflächenbindende und schnell in die Zielzellen internalisierende Liganden gekoppelt wurden (Rybak und Newton, 1999). Beispielsweise wurde RNase A an Transferrin oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente gegen den Transferrinrezeptor gekoppelt, was zu einer Steigerung der zytotoxischen Potenz der Konstrukte um 10^4 führte (Rybak et al., 1991; Newton et al., 1992).

Tumorzellen weisen aufgrund ihres gesteigerten Eisenbedarfs mehr Transferrinrezeptoren auf der Zelloberfläche auf als normale Zellen (Recht et al., 1990). Die Fähigkeit des Transferrins, an luminale Membranrezeptoren zu binden, löst jedoch einen endozytotischen Aufnahmeprozess über die Blut-Hirn-Schranke aus, so dass die damit verbundene Anreicherung im Gehirn den Einsatz dieser Konstrukte als Therapeutika limitiert (Broadwell et al., 1996).

Dagegen ist die Kopplung der RNasen an Antikörper gegen CD22 (Rybak und Newton, 1999), einem B-Lymphozyten-spezifischen, membranintegralen Oberflächenglykoprotein, aufgrund der schnellen Internalisierung ein erfolversprechender Testansatz für die Behandlung von Lymphomen.

Eine weitere Möglichkeit der chemischen Modifizierung von RNasen besteht in der Einführung von Cysteinresten (G89C-HPR, G87C-EDN; Suzuki et al., 1999), durch die die Verknüpfung mit größeren Molekülen über Thioetherbindungen möglich wird. Neben der Kopplung mit Liganden, die die Internalisierung beschleunigen, kann durch die ortsspezifische Modifizierung zusätzlich die Affinität zum RI herabgesetzt werden, was eine starke zytotoxische Wirkung ($IC_{50} = 1-150$ nM) zur Folge hat.

Insgesamt erscheinen aber alle diese Konstrukte aufgrund der chemischen Modifizierungen für therapeutische Applikationen ungeeignet.

2.3.3.3 RNase-Chimären und RNase-Fusionsproteine

Mit der Herstellung von RNase-Chimären sollten Konstrukte entwickelt werden, die günstige katalytische und RI-evasive Eigenschaften verschiedener RNasen in sich vereinen. Eine Chimäre aus den 21 N-terminalen Aminosäureresten des EDN und den 89 C-terminalen Aminosäureresten der ONC wies zwar eine EDN-ähnliche Substratspezifität und Aktivität auf, war jedoch weniger zytotoxisch als ONC (Newton et al., 1997). Ähnliche Chimären aus HPR und ONC besitzen Eigenschaften wie Aktivität, Substratspezifität, Affinität zum RI und zytotoxische Effizienz, die zwischen den für HPR und ONC angegebenen Werten liegen (Boix et al., 1996).

Wesentlich bessere Effekte hinsichtlich der vermittelten Zytotoxizität wurden durch die Fusion der RNasen an schnell internalisierende Liganden, sogenannte *cell targeting*-Einheiten erreicht (Rybak und Newton, 1999). Alle Fusionsproteine, bestehend aus Angiogenin, EDN, BS-RNase, RNase A, HPR oder ONC und der entsprechenden *cell targeting*-Einheit, vermitteln deutlich stärkere zytotoxische Effekte als unfusionierte RNasen. Beispiele hierfür sind das Fusionsprotein aus ONC und einem humanisierten Anti-CD22-*diabody* ($IC_{50} = 3\text{-}20\text{ nM}$; Krauss et al., 2005) und das erste vollständig humane Fusionsprotein aus HPR und einem gegen den ErbB2-Rezeptor gerichteten Antikörperfragment (IC_{50} -Werte im unteren nM-Bereich; De Lorenzo et al., 2004).

Durch die Fusion von ONC und LL2, einem humanisierten monoklonalen Anti-CD22-Antikörper, konnte die zytotoxische Potenz von ONC gegenüber Daudi-Zellen (humane Burkitt-Lymphomzellen) *in vitro* um einen Faktor von 10000 gesteigert werden ($IC_{50} = 20\text{ pM}$; Newton et al., 2001). Das Leben tumortransplantierter Mäuse konnte unter Verwendung von LL2-ONC deutlich verlängert werden. In Anbetracht der Tatsache, dass sich sowohl LL2 als auch ONC als Tumortheraeutika im klinischen Test befinden, sollte LL2-ONC zukünftig für die Behandlung von Non-Hodkin-Lymphomen große Bedeutung erlangen.

Tada et al. (2004) lieferten einen weiteren interessanten Ansatz, in dem der Wachstumsfaktor basischer Fibroblasten direkt in die HPR inseriert wurde. Das inserierte Protein dient einerseits als *cell targeting*-Einheit, andererseits wird durch die Insertion die Komplexbildung zwischen HPR und RI verhindert. Die IC_{50} -Werte dieses Konstrukts liegen im μM -Bereich und darunter.

2.4 Zusammenfassung

Trotz des vielversprechenden therapeutischen Potentials der vorgestellten RNasen und RNase-Antikörperkonjugate wird bislang nur ONC klinisch getestet. Alle chemisch modifizierten Konstrukte erscheinen für den therapeutischen Einsatz ungeeignet und auch die klinischen Erfolge der Immunotoxin-Anwendung sind weit hinter den Erwartungen zurückgeblieben. Trotz der ersten, möglicherweise bahnbrechenden Erfolge in der Therapie mit Immunotoxinen gilt es noch immer, eine Reihe von kritischen Faktoren zu überwinden, die eine ausgedehntere Anwendung dieser Substanzen bislang einschränken (Bildung neutralisierender Antikörper, Schädigung von normal differenzierten Zellen). Aufgrund der

zunehmenden Zahl der Krebsneuerkrankungen und der Limitierungen bereits zugelassener Wirkstoffe stellt die Entwicklung neuer Therapeutika zur Bekämpfung von Krebs auch weiterhin eine wichtige Herausforderung der modernen Medizin dar. Die klinischen Erfolge der ONC-Behandlung und die Vielfalt der therapeutischen Ansätze unterstreichen das immense Potential, das in der Anwendung und Weiterentwicklung von RNasen und RNase-basierenden Toxinen zur Therapie von Tumorerkrankungen steckt.

Wirksame RNase-basierende Präparate müssen für einen möglichen therapeutischen Einsatz vor allem ihre katalytische Aktivität (Spaltung von RNA) unter physiologischen Bedingungen beibehalten. Das bedeutet, dass sie durch den zelleigenen RI nicht inaktiviert werden dürfen und unter physiologischen Bedingungen eine ausreichend hohe Stabilität besitzen müssen. Ausgehend von den hier betrachteten Befunden zur Zytotoxizität von RNasen sollen unter Verwendung des Modellproteins RNase A (2.5) evasive Tandemenzyme einen alternativen Ansatz liefern. Da die Monomere im Tandemenzym über einen Peptidlinker kovalent verbunden sind, ist die Dissoziation der RNase A-Einheiten ausgeschlossen, was einen erheblicher Vorteil gegenüber BS-RNase und den analogen, künstlich hergestellten Dimeren von RNase A und HPR darstellt. Dem Design des Peptidlinkers gilt besondere Aufmerksamkeit, da dieser die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften der Tandemenzyme entscheidend prägen sollte.

Neben der Gewinnung neuer Therapeutika sind Erkenntnisse über die Konstruktion und Gewinnung von RNase A-Tandemenzymen sowie über deren Struktur und Wechselwirkung mit dem Inhibitor zu erwarten.

2.5 RNase A

RNase A aus Rinderpankreas (EC 3.1.27.5) ist ein kleines (124 Aminosäurereste, 13,7 kDa), in der Bauchspeicheldrüse von Rindern reichlich vorhandenes und stabiles Protein ($T_m = 60^\circ\text{C}$; Raines, 1998). Daher wurde es zu einem der am besten untersuchten Modellproteine. RNase A war das erste Enzym und das dritte Protein (nach Insulin und Hämoglobin), für das die korrekte Aminosäuresequenz bestimmt wurde (Smyth et al., 1963) und das dritte Enzym bzw. fünfte Protein (nach Myoglobin, Hämoglobin, Lysozym und Carboxypeptidase A), dessen dreidimensionale Struktur mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte (Kantha et al., 1967). Abb. 6A zeigt die Tertiärstruktur der RNase A. Die dominanten Sekundärstrukturelemente sind ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt und drei α -Helices (Wlodawer et al., 1982). Das Molekül enthält keine Tryptophanreste, jedoch vier für die Stabilität essentielle Disulfidbrücken (Abb. 6A und Abb. 7) und vier Prolinreste, von denen im nativen Zustand zwei in *cis*- (Pro93 und Pro114) und zwei in *trans*-Konfiguration (Pro42 und Pro117) vorliegen.

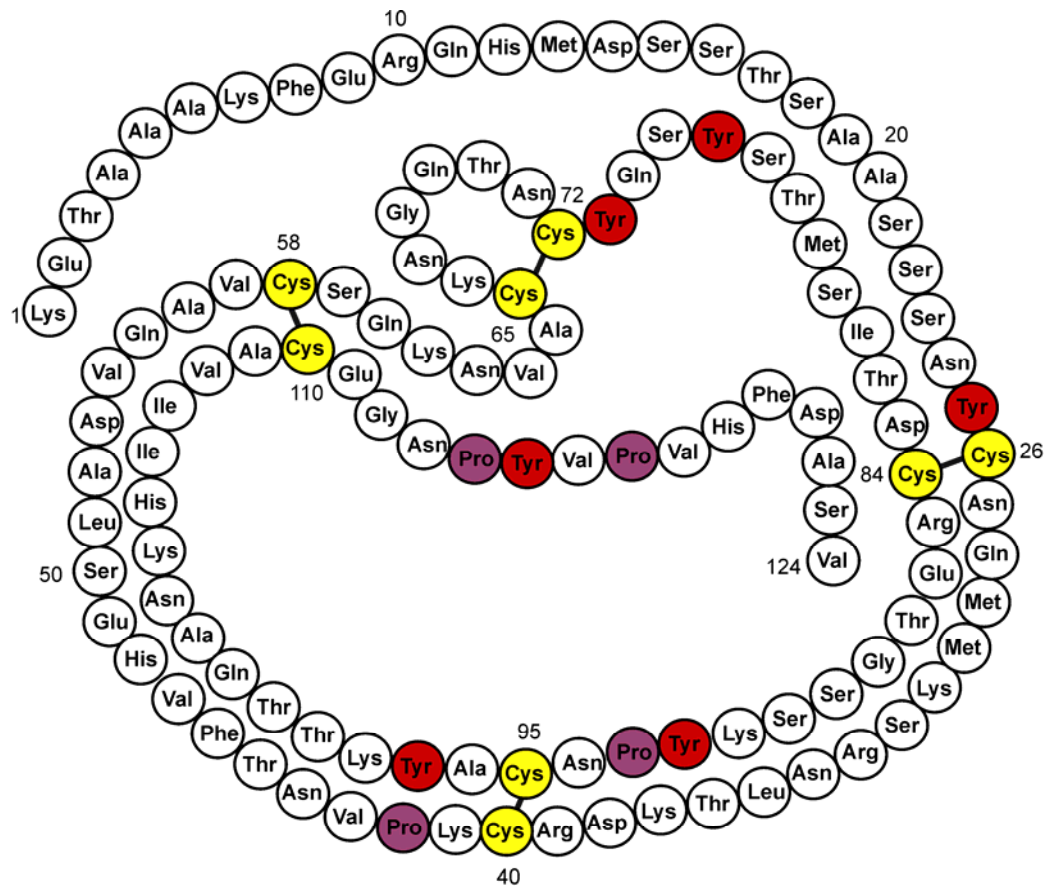


Abb. 7: Aminosäuresequenz von RNase A nach Smyth et al. (1963).

RNase A gehört zur Gruppe der Endonukleasen und bevorzugt die Spaltung einzelsträngiger RNA mit Pyrimidinbasen in P₁-Position, wobei die Affinität zu Cytidin 30-mal größer ist als zu Uridin (delCardayré und Raines, 1995). Der Katalysemechanismus von RNase A ist gut untersucht (Cuchillo et al., 1993; delCardayré und Raines, 1995; Raines, 1998). Bei der Phosphodiester-spaltung entstehen im ersten Schritt, der Transphosphorylierung, ein Oligonukleotid mit einem freien 5'-Ende und ein Oligonukleotid mit einem 2',3'-zyklischen Phosphat am 3'-Ende (Abb. 8; Cuchillo et al., 1993; Raines, 1998). Der 2',3'-zyklische Phosphodiester wird unter Spaltung der 2'-Phosphatbindung in einem separaten zweiten Schritt hydrolysiert (Cuchillo et al., 1993; Raines, 1998). Der Hydrolyseschritt erfolgt aufgrund der geringen Affinität des 2',3'-zyklischen Phosphodiesters zur RNase A deutlich langsamer, wodurch dieses Zwischenprodukt während der Spaltung von RNA angereichert wird (Cuchillo et al., 1993; Cuchillo et al., 2002). Das aktive Zentrum wird von den Aminosäuren Gln11, His12, Lys41, His119 und Asp121 gebildet (Raines, 1998), wobei His12 und His119 eine katalytische Diade bilden. Abb. 8 zeigt das Zusammenspiel dieser Aminosäuren während der Katalyse.

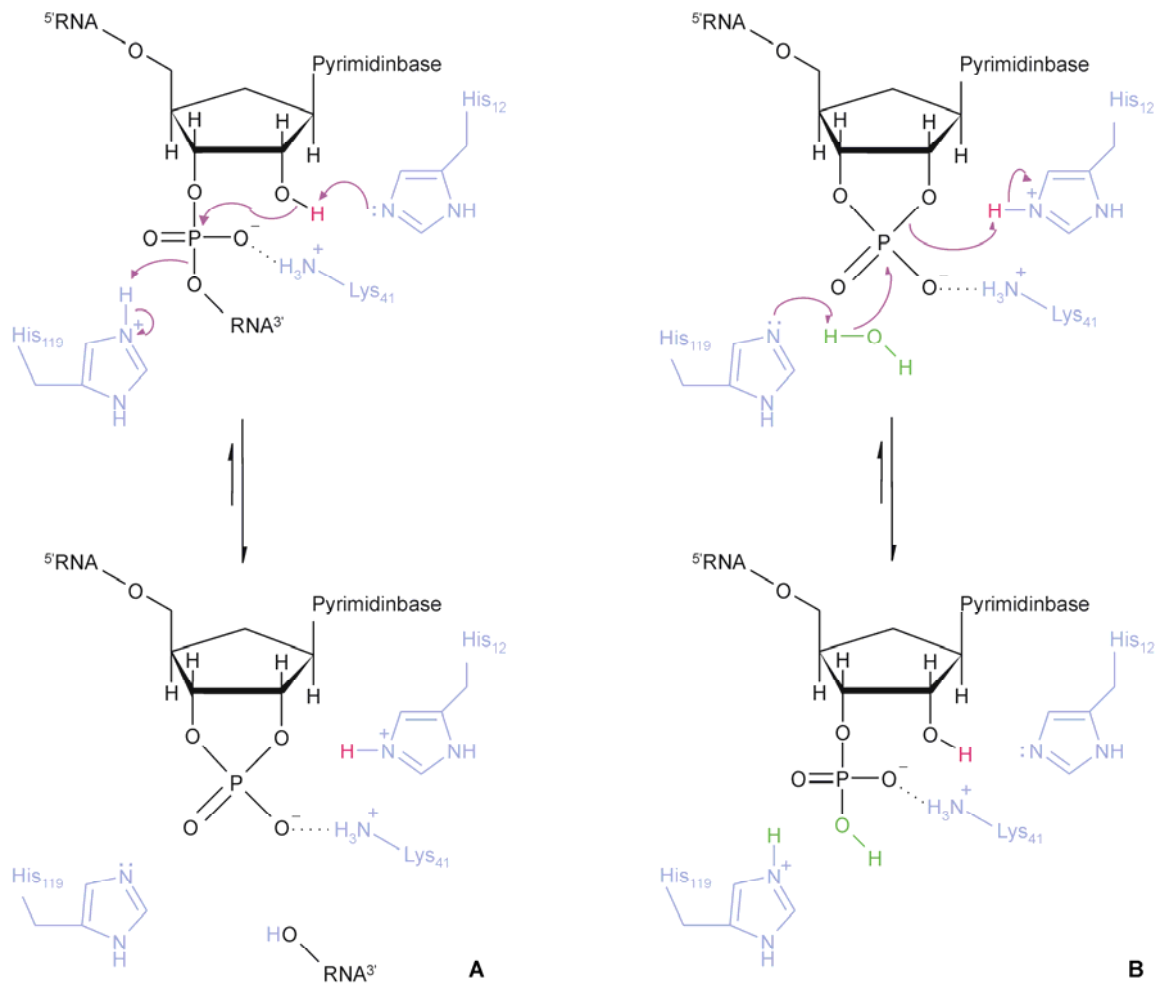


Abb. 8: Mechanismus der RNase A katalysierten Transphosphorylierung (A) und der Hydrolysereaktion (B)

His₁₂ abstrahiert als Base ein Proton von der 2'-OH-Gruppe der RNA und initiiert damit den nucleophilen Angriff auf das benachbarte Phosphoratom. His₁₁₉ fungiert simultan als Säure und unterstützt den Bruch der Bindung durch Protonierung der Abgangsgruppe (A). Das 2',3'-zyklische-Zwischenprodukt wird hydrolysiert (B). Dies ist im Wesentlichen eine Umkehrung des ersten Schritts, bei der Wasser die Abgangsgruppe ersetzt. So wirken hier His₁₂ als Säure und His₁₁₉ als Base.

Neben der hohen katalytischen Aktivität der RNase A hat die Verwendung dieses Modellproteins für die Generierung der RNase A-Tandemenzyme einen weiteren entscheidenden Vorteil. Die Ausbeuten der Herstellung rekombinanter RNase A liegen bei 50 mg pro Liter Kultivierungsmedium (delCardayré und Raines, 1995). Zudem könnte sich die Proteasestabilität der RNase A für die Herstellung RNase A-basierender Antitumortheraeutika als günstig erweisen. Beispielsweise können die Proteasen Thermolysin (EC 3.4.24.27) und Trypsin (EC 3.4.21.4) RNase A nur unter denaturierenden Bedingungen abbauen (Arnold et al., 1996).