

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Universität zu Lübeck

Synthetische Derivate
des humanen Cathelicidins hCAP18/LL37
sind potentielle, antitumorale Medikamente

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Naturwissenschaften –

vorgelegt von
Christina Röbbke geb. Crusius
aus Zweibrücken
Lübeck 2011

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Jens E. Meyer
2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Gutsmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2011

zum Druck genehmigt: Lübeck, den 30.06.2011

Meinen Eltern und meinem Mann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Eukaryontenzelle	1
1.2. Tumoren	4
1.3. Kopf-Hals-Tumoren	6
1.4. Die humanen Antimikrobiellen Peptide	8
1.5. Das humane Cathelicidin	10
1.6. Ziel der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Geräte.....	15
2.1.2. Software.....	15
2.1.3. Chemikalien	16
2.1.4. Medien und Reagenzien	16
2.1.5. Puffer und Lösungen.....	17
2.1.6. Kits.....	18
2.1.7. Zelllinien.....	18
2.1.8. Peptide.....	19
2.1.9. Blutproben	19
2.2. Methoden	20
2.2.1. Zellkultur	20
2.2.2. Zellisolierung.....	20
2.2.3. Zytotoxizitätstests	21
2.2.4. Durchflusszytometrie.....	22
2.2.5. Immunhistochemie	23
2.2.6. xCELLigence.....	25
2.2.7. Proteinbestimmung	26

3. Ergebnisse	27
3.1. Intrazelluläres LL-37.....	27
3.2. Peptide.....	28
3.2.1. Die Peptide LL-32, IG-20, LL-20 und RK-20.....	28
3.2.2. Modifizierung Peptidfragmente.....	29
3.3. Zytotoxizität.....	29
3.3.1. <i>Cytotoxicity Detection Kit</i>	29
3.3.2. MTT-Test	32
3.3.3. xCELLigence.....	33
3.3.4. Weitere Zelllinien	37
3.3.5. Hämolysetest	38
3.3.6. Vorbehandlung der Zellen mit Magnesiumchlorid.....	39
3.4. Wirkung der Peptide.....	40
3.4.1. Bindung der Peptide an die Zellmembran	40
3.4.2. <i>Human Apoptosis Antibody Array</i>	41
3.4.3. <i>MitoCapture™ Mitochondrial Apoptosis Detection Kit</i>	42
3.4.4. <i>Organelle-ID™ RGB reagent III</i>	44
3.4.5. FACS-Analysen	48
3.4.6. Proliferationsmarker KI-67.....	50
4. Diskussion	52
4.1. Die Zytotoxizität der Peptide	52
4.2. Wirkung der Peptide.....	57
4.3. Ausblick	60
5. Zusammenfassung	62
6. Abstract	64
7. Literaturverzeichnis	66
8. Abbildungsverzeichnis	76

9. Tabellenverzeichnis.....78

10. Danksagung79

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielles Peptid
APC	Allophycocyanin
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	<i>Dulbeccos's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfonsäureoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanner</i>
FKS	fötales Kälberserum
FSC	Forward Scatter Channel
g	Erdbeschleunigung
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Cancers Squamous Cell Carcinomas</i>
HPV	humanes Papillomavirus
LDH	Laktatdehydrogenase
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolyl
PBS-Puffer	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PI	Propidiumjodid
RNA	Ribonukleinsäure
SSC	<i>Side Scatter Channel</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
WGA	Weizenkeimagglutinin

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

1. Einleitung

1.1 Die Eukaryontenzelle

Die Zelle (lat. *cellula* – kleine Kammer) ist die kleinste selbstständig lebensfähige Baueinheit aller Lebewesen (Abbildung 1). Eine Eukaryontenzelle hat eine Größe von etwa 10 μm bis 100 μm [Lodish *et al.*, 2007]. Umgeben ist die Zelle von einer Plasmamembran, welche aus einer Lipid-Doppelschicht von etwa 5 bis 8 nm besteht. Dabei ordnen sich die hydrophoben Seitenketten der Lipide nach innen und der hydrophile Anteil zeigt nach außen. Darin ein- beziehungsweise aufgelagert finden sich Membranproteine und Polysaccharide.

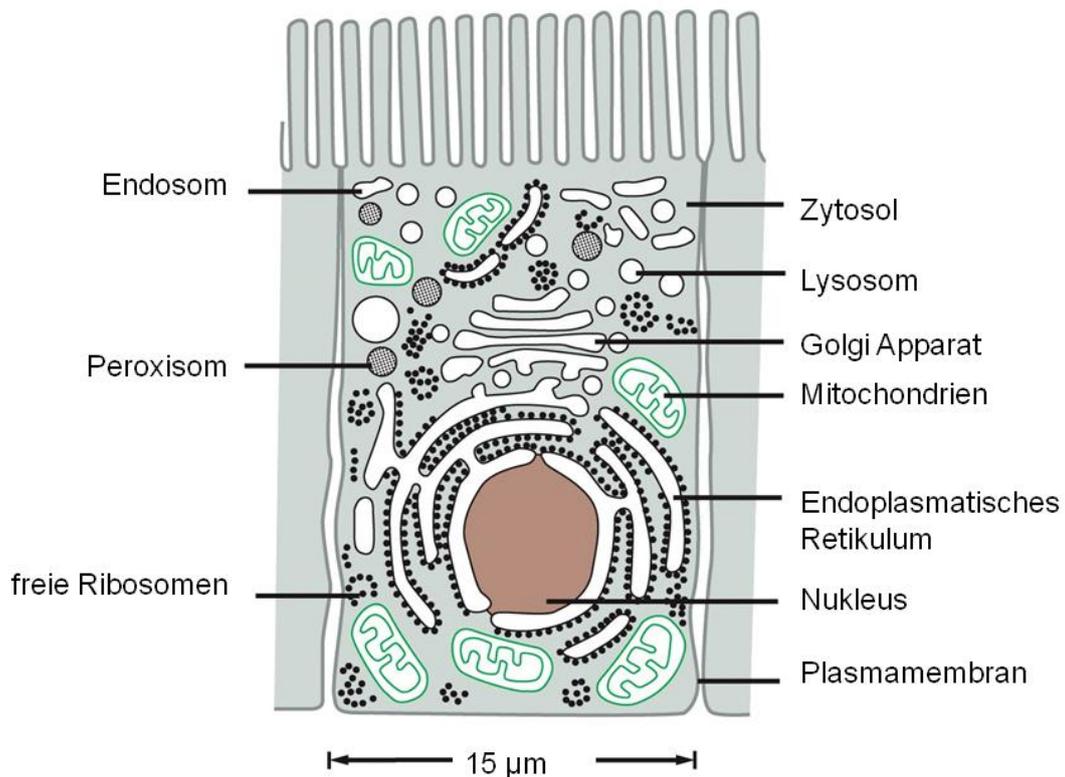


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung einer Eukaryontenzelle [Alberts *et al.*, 2008].

Die genaue Zusammensetzung der Plasmamembran (Abbildung 2) ist abhängig von Zellart und -zustand.

Der Anteil an Lipiden in der Plasmamembran beträgt etwa 50 %, den größten Anteil mit 50 bis 60 % machen hierbei die Phospholipide wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin aus. Die weiteren 40 % setzen sich aus Glykolipiden und Cholesterol zusammen [Cooper, 2000]. Durch ihren Aufbau ist die Membran semipermeabel, was bedeutet, dass sie durchlässig für kleinere Moleküle ist. Größere und besonders hydrophile Moleküle hingegen müssen durch aktiven Transport über Kanäle in die Zelle gebracht werden [Campbell *et al.*, 2009; Bayrhuber *et al.*, 2005].

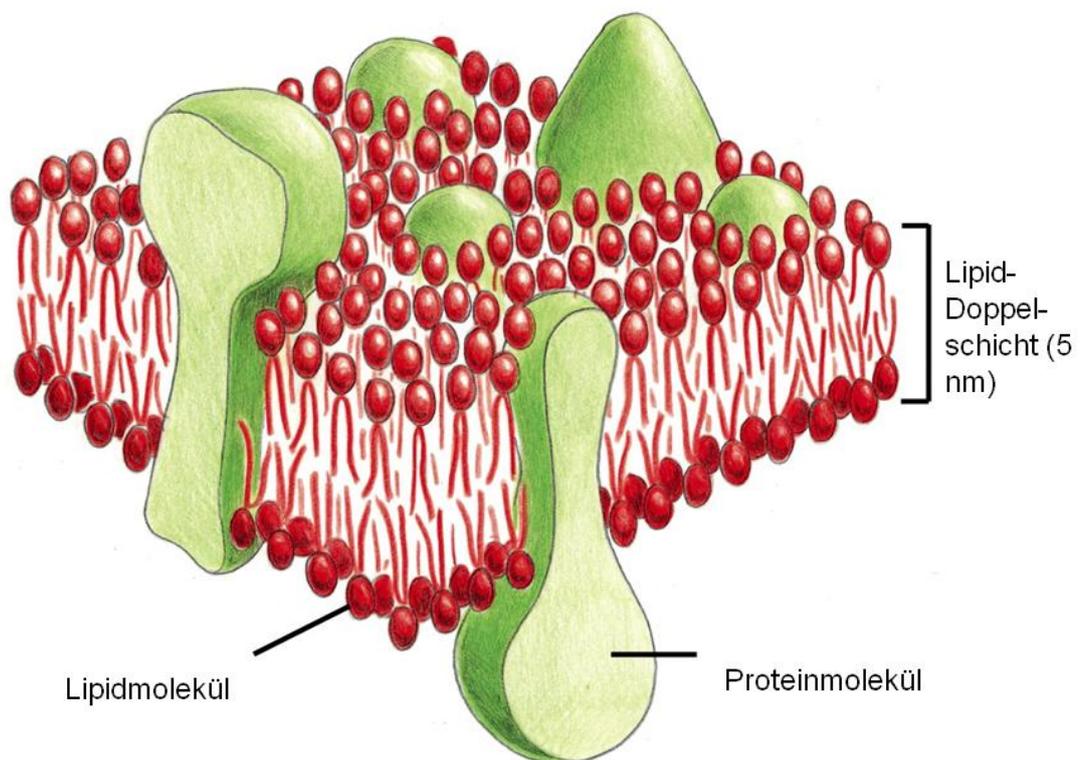


Abbildung 2: Darstellung der Zellmembran [Alberts *et al.*, 2008].

Der Zellkern stellt das größte Organell der Zelle dar und enthält das Erbgut, das als Chromosomen vorliegt. Er wird durch eine Kernmembran begrenzt, welche durch die Kernporen teilweise unterbrochen wird, und hat einen Durchmesser von 5 bis 16 μm . Die Hauptaufgabe des Zellkerns ist der Schutz der DNA (Desoxyribonukleinsäure). Außerdem kommt es im Zellkern sowohl zur Replikation der DNA als auch zur Transkription der DNA in RNA (Ribonukleinsäure) [Lodish *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008].

Die Mitochondrien, auch als Kraftwerke der Zelle bezeichnet, stellen die Energieversorgung der Zelle sicher. Mitochondrien haben einen Durchmesser von etwa 0,5 bis 1 μm und sind von einer Doppelmembran umschlossen. In der Membran der Mitochondrien befinden sich die Enzyme der Atmungskette. Ziel der Atmungskette ist die Bereitstellung von ATP (Adenosintriphosphat). ATP wird in der Zelle für alle Prozesse benötigt, bei denen Energie aufgewendet werden muss. Weiterhin finden in den Mitochondrien Abbauprozesse wie etwa der Zitratzyklus und die β -Oxidation von Fettsäuren statt [Lodish, 2007 *et al.*; Alberts *et al.*, 2008].

Das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein Membransystem, das vor allem zum Stofftransport in der Zelle benötigt wird. Die äußere Kernmembran geht dabei in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums über. Außerdem stellt das raue Endoplasmatische Retikulum den Ort der posttranslationalen Modifikationen von Proteinen dar. Die Proteine werden nach ihren Eigenschaften als sekretorische, lysosomale und Membranproteine eingeteilt [Lodish *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008].

Das glatte Endoplasmatische Retikulum dient der Zelle als Ort der Lipidsynthese und stellt einen Calciumspeicher der Zelle dar. Außerdem werden hydrophobe Komponenten wie etwa Pestizide oder Karzinogene detoxifiziert [Lodish *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008].

Der Golgi-Apparat ist ebenfalls für den Stofftransport in der Zelle zuständig. Außerdem werden im Golgi-Apparat sekretorische Vesikel gebildet und gespeichert, es werden Elemente der Plasmamembran modifiziert sowie lysosomale Proteine gebildet [Lodish *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008].

In höheren Organismen tritt der Zelltod in Form von Nekrose oder Apoptose auf. Die Induktion als auch die Prozesse, die zum Zelltod führen, unterscheiden sich grundlegend. Die Nekrose gilt als pathologischer Zelltod einzelner Zellen oder auch von Zellverbänden. Induziert wird die Nekrose durch schädigende Einflüsse wie etwa Gifte, Bakterien, Nähr-, Sauerstoffmangel oder auch Radioaktivität. Charakteristisch für die Nekrose ist ein Anschwellen der Zellen mit Schädigung der Zellmembran. Schlussendlich platzen die Zellen und der Zellinhalt, wie Zytoplasma oder auch Organellen, tritt in die Umgebung aus. Die anschließende Phagozytose der Zellfragmente führt zu einer Entzündungsreaktion der Umgebung [Lodish *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008].

Unter Apoptose wird der programmierte, physiologische Zelltod verstanden. Dieser Prozess ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Homöostase und wirkt als Gegenspieler zur Proliferation der Zellen. Die Apoptose stellt einen von der Zelle selbst aktiv ausgelösten Prozess dar. Der Vorgang beginnt mit einem Schrumpfen der Zellen, einem Kollaps des Zytoskeletts und einem Abbau der DNA durch Endonukleasen. Es bilden sich kleine membranumschlossene Fragmente, die so genannten *apoptotic bodies*, die

dann von Makrophagen phagozytiert werden. Durch den gezielten Abbau der Zellen tritt bei der Apoptose keine Entzündungsreaktion auf [Lodish *et al.*, 2007; Alberts *et al.*, 2008].

1.2 Tumoren

Tumor bedeutet zunächst nur die morphologische Zunahme eines Gewebavolumens. Es können benigne (gutartige) und maligne (bösartige) Tumoren unterschieden werden. Maligne Tumoren werden auch als Krebs oder Neoplasien bezeichnet und zeichnen sich durch schnelles, invasives Wachstum und kurze, häufig letale Verläufe aus (Abbildung 3).

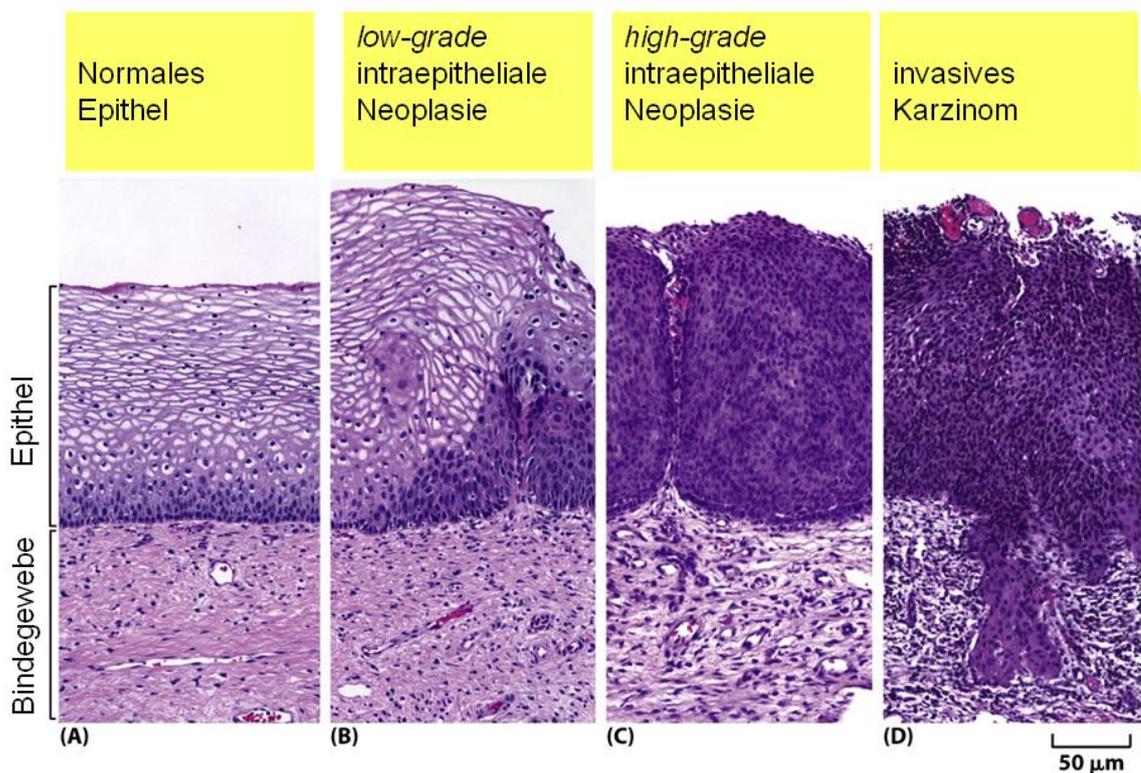


Abbildung 3: Darstellung der Tumorentwicklung bei Gebärmutterhalskrebs [Alberts *et al.*, 2008]. A) normales Epithel: Zellteilung einzig in der Basalschicht. B) *low-grade* (normales Zellaussehen, langsames Wachstum) intraepitheliale Neoplasie: Zellteilung im ersten Drittel der Epithelschicht, teilweise unvollständige Ausdifferenzierung. C) *high-grade* (verändertes Zellaussehen, schnelles Wachstum) intraepitheliale Neoplasie: Zellteilung in der gesamten Epithelschicht, defekte Ausdifferenzierung. D) invasives Karzinom: Malignität beginnt mit der Zerstörung der Basalmembran und Übergang der Tumorzellen in das Bindegewebe.

Tumorzellen werden durch eine Vielzahl struktureller und molekularer Veränderungen charakterisiert [Vineis *et al.*, 2010]. Sechs wichtige Veränderungen stehen dabei im Vordergrund: die Unabhängigkeit der Wachstumssignale, die Unempfindlichkeit gegen Wachstumsinhibitoren, die Fehlregulation der Apoptose, unbegrenzte Teilbarkeit, anhaltende Angiogenese (Wachstum von kleinen Blutgefäßen) sowie Eindringen in das umliegende Gewebe und Metastasierung [Hanahan *et al.*, 2000].

Die Entstehung von Tumoren wird immer noch kontrovers diskutiert. In einem aktuell veröffentlichten Paper von Vineis *et al.* werden die fünf aktuellen Modelle (Tabelle 1) der Karzinogenese dargestellt.

Tabelle 1: Die fünf Tumormodelle [Vineis *et al.*, 2010]

	Modell 1 Mutationen	Modell 2 genomische Instabilität	Modell 3 nicht-genotoxisch	Modell 4 darwinistisch	Modell 5 Gewebeorganisation
Hauptfokus	chemische Karzinogene Viren	genomische Instabilität	klonale Expansion Epigenetik	klonale Expansion Zellselektion	Micro-environment morpho-statische Stoffe
Beispiele	Tabak und Lunge HPV	Colon-karzinome Retinoblastoma	Diät Hormone	Beta-Carotin Chemotherapie	- -
Mechanismen	DNA-Addukte Mutationen Onkogene	Mikrosatelliteninstabilität <i>Mismatch Repair</i> Tumor-suppressorgene	Methylierung Histonacetylierung	selektive Vorteile	- -

Die Entstehung von Krebs wird im ersten Modell auf Mutationen durch chemische Einflüsse, Strahlung oder Viren zurückgeführt. Modell zwei geht von genomischer Instabilität aus, während bei Modell drei die klonale Expansion sowie epigenetische Veränderungen als Ursache angeführt werden. Modell vier kombiniert die Modelle eins bis drei und basiert auf dem Konzept der darwinschen Zellselektion, wobei die klonale Expansion sowie die daran anschließende Zellselektion berücksichtigt wird. Modell fünf beruht auf der Zellorganisation, wobei zum Beispiel das *Microenvironment* eine Rolle spielt [Vineis *et al.*, 2010].

Vineis *et al.* vereinen diese fünf Modelle zu zwei vereinfachten Systemen. Das erste System legt die alleinigen biologischen Veränderungen des Epithels als Tumorentstehung zu Grunde, das zweite System basiert auf den Veränderungen von Stroma und extrazellulärer Matrix.

1.3 Kopf-Hals-Tumoren

Kopf-Hals-Tumoren werden auch als HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) bezeichnet und liegen an sechster Stelle neu auftretender Neoplasien weltweit. Dementsprechend stirbt in den USA jede Stunde ein Mensch an den Folgen der Kopf-Hals-Tumorerkrankung [Kademani, 2007] und jährlich werden etwa 600.000 Neuerkrankungen diagnostiziert [Kamangar *et al.*, 2006]. Das Verhältnis der Neuerkrankungen bei Männern im Vergleich zu Frauen liegt bei 2:1 bis 3:1 [Kademani, 2007].

Die Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs sind zu 90 % Plattenepithelkarzinome [Hardisson, 2003], die in der Nase und Nasennebenhöhle, Pharynx, Larynx oder Mundhöhle vorkommen [Chin *et al.*, 2004].

HNSCC wird in drei klinische Kategorien eingeteilt: Frühstadium (Stadium I/II), lokal fortgeschrittenes Stadium (Stadium III/IV) und rezidivierendes/metastasierendes Stadium [Pan, 2009]. 36 % der Tumorerkrankungen werden im Frühstadium erkannt, in den meisten Fällen werden die Tumorerkrankungen jedoch erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert [Jemal *et al.*, 2004]. Risikofaktoren sind vor allem Tabak- und Alkoholkonsum [Johnson, 2001] sowie Infektionen mit den Humanen Papillomviren 16 und 18 [Goon *et al.*, 2009]. Die Mortalitätsrate bei HNSCC hat sich in den letzten 40 Jahren trotz verbesserter Strahlentherapie und chirurgischer Methoden nicht verändert, die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt bei 50 % [Chin *et al.*, 2004].

Die Tumoren im Kopf-Hals-Bereich entwickeln sich über mehrere Zwischenstadien, wobei es zunächst zur Ausbildung von Hyperplasien (Vergrößerung des Gewebes durch

vermehrte Zellteilung) in der normalen Mukosa kommt. Als nächste Krebsvorstufe bilden sich Dysplasien, welche histologisch eine Abweichung der Gewebestruktur aufweisen. Das Frühstadium des epithelialen Tumors, auch *Carcinoma in situ* genannt, zeichnet sich noch nicht durch invasives Wachstum aus und wächst ausschließlich intraepithelial. Schlussendlich kommt es zur Ausbildung eines Karzinoms, welches invasiv wächst und metastasiert [Pai *et al.*, 2009].

Der Verlauf der Krankheit (Abbildung 4) wird außerdem durch das Auftreten von mehreren karzinogenen Stellen in einem Areal bestimmt. Das Phänomen der multifokalen, syn- und metachronen Karzinogenese bezeichnete Slaughter 1953 als „*field cancerization*“ des oberen Aerodigestivtrakts [Slaughter *et al.*, 1953].

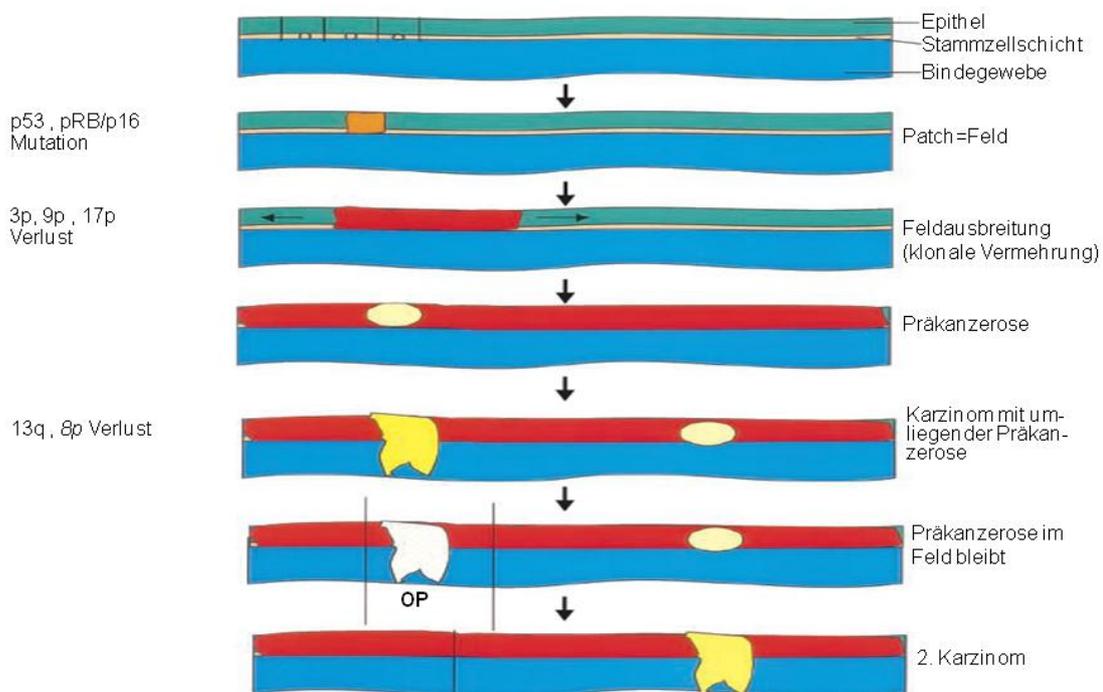


Abbildung 4: Prinzip der Karzinogenese bei HNSCC [Califano *et al.*, 1996]. Durch Mutationen, meist p53-Mutationen, kommt es zur Ausbildung eines Feldes. Nach klonaler Vermehrung entwickelt sich eine Präkanzerose, die durch chromosomale Verluste zum Karzinom wird. Weitere Präkanzerosen können im Umfeld entstehen. Durch operative Eingriffe wird das Karzinom entfernt, Präkanzerosen verbleiben jedoch im Feld und es kommt zur Entstehung eines zweiten Karzinoms.

Zur Standardtherapie bei HNSCC zählen je nach Gesundheitszustand des Patienten die Chemo- oder Strahlentherapie sowie die chirurgische Entfernung des Tumors. Durch nach wie vor schlechte Prognosen bei Kopf-Hals-Karzinomen gibt es immer neue alternative Therapieansätze wie zum Beispiel Immuntherapie, DNA-Impfstoffe, monoklonale Antikörper sowie Zytokine [Agada *et al.*, 2009].

1.4 Die humanen Antimikrobiellen Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind natürlich vorkommende Antibiotika des Körpers und gehören damit zum angeborenen Immunsystem. Das angeborene Immunsystem stellt das erste Abwehrsystem gegen Pathogene dar. Bereits 1956 beschrieb Hirsch Phagozytin, eine Proteinfraktion von polymorphkernigen Leukozyten mit antimikrobieller Aktivität [Hirsch, 1956]. Anfang der 1960er Jahre wurde das schon 1921 von Flemming entdeckte Lyoszym beschrieben [Glynn *et al.*, 1965], welches bakteriolytisch gegen Gram-negative Bakterien wirkt. Lactoferrin wurde 1977 charakterisiert [Arnold *et al.*, 1977] und in den frühen 1980er Jahren konnten die ersten Defensine isoliert werden [Ganz *et al.*, 1985; Lehrer *et al.*, 1983; Selsted *et al.*, 1984].

AMPs werden zusammen mit den Chemokinen der Gruppe der Alarmine zugeordnet [Oppenheim *et al.*, 2005], sind nicht nur beim Menschen beschrieben, sondern auch bei Pflanzen [Castro *et al.*, 2005], Insekten [Lemaitre *et al.*, 2007], Vögeln [van Dijk *et al.*, 2008], Amphibien [Zasloff, 1987] und Fischen [Cole *et al.*, 1997] bekannt [Diamond, 2009]. Inzwischen sind mehr als 1000 AMPs entschlüsselt [Gorr, 2009], welche aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und Struktur in fünf Gruppen unterteilt werden [Brogden, 2005; Boman, 2000]. Dabei umfasst die erste Gruppe alle anionischen Peptide, in der zweiten Gruppe sind die linearen, amphipathischen α -helikalen Peptide zusammen gefasst. Alle kationischen Peptide zählen zur Gruppe drei, Peptidfragmente bilden die Gruppe vier und schließlich umfasst Gruppe fünf die Peptide, die durch Cysteine intramolekulare Brücken bilden.

Die AMPs wirken gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen [Diamond *et al.*, 2009], wie Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien [Brogden, 2005], Pilze [Aerts *et al.*, 2008] oder auch Viren [Klotman *et al.*, 2006]. Über die Wechselwirkung der Peptidladung mit der Membranladung lagern sich die Peptide an der Oberfläche der Mikroorganismen an [Diamond *et al.*, 2009]. Anschließend kommt es zur Anhaftung der Peptide an die innere Lipidschicht durch Überwindung der externen Kapsel [Brogden, 2005]. Für die Einlagerung der Peptide in die Membran der Mikroorganismen existieren zurzeit fünf Modelle: das *Carpet-like*-Modell, das *Barrel-Stave*-Modell und das *Toroidal-Pore*-Modell [Brogden, 2005; Neville *et al.*, 2006] sowie das Detergensmodell [Chen *et al.*, 2003] und ein Modell von nicht-lamellaren Phasen [Lohner *et al.*, 1999]. In Abbildung 5 sind das *Carpet-like*-Modell, das *Barrel-Stave*-Modell sowie das *Toroidal-Pore*-Modell abgebildet [Brogden, 2005].

Beim *Carpet-like*-Modell interagieren die hydrophoben Anteile der Peptide mit der Membran. Nach Überschreiten einer sogenannten Grenzkonzentration dringen die Peptide ungeordnet in das Membraninnere, und es kommt zur Zerstörung der

Membranintegrität [Shai, 2002]. Das *Barrel-Stave*-Modell basiert auf der Bildung einer Transmembranpore durch Oligomerisierung der Peptide [Huang, 2000]. Im Gegensatz dazu bildet sich die Transmembranpore beim *Toroidal-Pore*-Modell durch Einlagerung von Peptidmonomeren und anschließendem Zusammenwirken der einzelnen Peptide [Yang *et al.*, 2001].

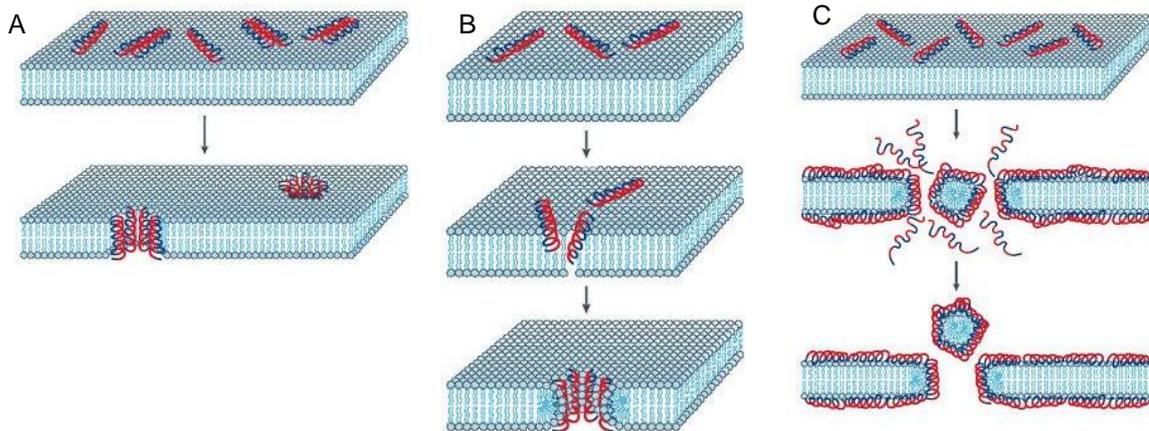


Abbildung 5: Darstellung der Wirkmechanismen der AMPs. *Barrel-Stave*-Modell (A), *Toroidal-Pore*-Modell (B) und *Carpet-like*-Modell (C). Die hydrophilen Regionen der Peptide sind rot, die hydrophoben Regionen blau markiert [Brogden, 2005].

Antimikrobielle Peptide weisen aber nicht nur eine Wirksamkeit gegen Mikroorganismen auf. Inzwischen konnte auch eine Mitwirkung der AMPs zum „*cross-talk*“ zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem nachgewiesen werden [Diamond *et al.*, 2009]. Bereits 1989 konnten Territo *et al.* zeigen, dass die von Neutrophilen freigesetzten α -Defensine chemotaktisch auf humane Monozyten wirken [Territo *et al.*, 1989]. Das β -Defensin 3 sowie das humane Cathelicidin LL-37 induzieren Chemokine wie etwa das Makrophagen Inflammatorische Protein 3 α (MIP-3 α) oder das Monozytenchemotaktische Protein 1 (MCP-1) [Niyonsaba *et al.*, 2007]. Biragyn *et al.* beschrieben 2001, dass durch ein Fusionspeptid aus dem murinen BD-2 und einem nicht-immunogenen Tumorantigen gegen Lymphome eine Immunantwort induziert werden kann. Dabei werden die unreifen dendritischen Zellen (iDC) zu reifen dendritischen Zellen (mDC) über den Rezeptor CCR6 auf den iDC aktiviert [Biragyn *et al.*, 2001].

Als weitere Wirkung der AMPs wurde eine direkte Zytotoxizität gegen Krebszellen festgestellt [Ohtake *et al.*, 1999; Ohsaki *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 1993; Jacob *et al.*, 1994; Winder *et al.*, 1998]. Die zytotoxischen AMPs können dabei in zwei Gruppen unterteilt werden [Papo *et al.*, 2005]. Die erste Gruppe umfasst die Peptide, die sehr

potent gegen Bakterien und Krebszellen wirken, gesunde Zellen aber nicht beeinträchtigen. Dazu zählen zum Beispiel Cecropine der Insekten [Steiner *et al.*, 1981; Chen *et al.*, 1997] oder die Magainine [Baker *et al.*, 1993; Zasloff, 1987; Cruciani *et al.*, 1991; Lehmann *et al.*, 2006], die aus der Haut des Froschs isoliert werden [Rozek *et al.*, 2000; Papo *et al.*, 2002]. Zur zweiten Gruppe gehören die AMPs, die toxisch gegen Bakterien und Zellen wirken, dabei aber sowohl zytotoxisch gegen Krebszellen als auch gesunde Zellen sind. Beispiele für diese zweite Gruppe sind das Bienengift Melittin [Habermann *et al.*, 1967] und die C-terminalen Fragmente des humanen Cathelicidins LL-37 [Li *et al.*, 2006 a; Okumura *et al.*, 2004]. Somit muss die antimikrobielle Wirkung der AMPs inzwischen um die chemotaktische sowie die immunstimulatorische als auch die antitumorale Aktivität ergänzt werden.

In unterschiedlichen Studien wurden Speichelproben von Probanden untersucht, um die AMPs zu identifizieren, die im Kopf-Hals-Bereich eine wichtige Rolle spielen. Es wurden vor allem kationische Peptide wie etwa α -Defensine, β -Defensine, Cathelicidin oder Histatine ermittelt [Gorr *et al.*, 2009]. Dabei sind einige AMPs konstitutiv exprimiert, andere werden nach mikrobiellem Kontakt induziert beziehungsweise hoch reguliert [Zasloff, 2002].

1.5 Das humane Cathelicidin

Das Antimikrobielle Peptid hCAP-18 (*human Cationic Antimicrobial Peptide*) gilt als das bislang einzige humane Cathelicidin [Agerberth *et al.*, 1995; Gudmundsson *et al.*, 1996]. hCAP-18 wird als 18 kDa großes Präproprotein synthetisiert und besteht aus einem Signal-Peptid, dem N-Terminus einer Cathelin-ähnlichen Domäne und einer C-terminalen antimikrobiellen Domäne (LL-37). hCAP-18 wird proteolytisch gespalten und dadurch das aktive Fragment LL-37 (Abbildung 6) freigesetzt [Zaiou *et al.*, 2002]. LL-37 wird auf der Haut durch Proteasen in noch kleinere Peptide gespalten wie beispielsweise RK-21, KR-20, KS-27, KS-30, KR-20 oder auch LL-23 [Murakami *et al.*, 2004; Yamasaki *et al.*, 2006]. Das aktive Fragment LL-37 wird in Neutrophilen, Makrophagen und verschiedenen Epithelzellen exprimiert [Doss *et al.*, 2010] und wirkt antimikrobiell gegen ein breites Spektrum an Pathogenen. Sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien sowie Viren und Pilze werden bei einer physiologischen Konzentration von etwa 2 $\mu\text{g/ml}$ durch LL-37 abgetötet [Bals *et al.*, 1999; Schaller-Bals *et al.*, 2002]. LL-37 (NH_2 -LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-COOH) zählt zu den kationischen AMPs mit einer Nettoladung von +6 bei pH 7,4 [Bucki *et al.*, 2010].

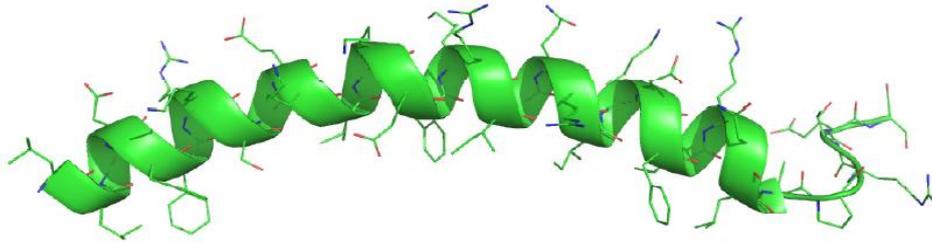


Abbildung 6: NMR-Darstellung von LL-37 (PDB ID: 2K6O) [Wang, 2008].

Kationische AMPs wie LL-37 sind an der Infektionsprävention von Lunge und Verdauungstrakt beteiligt [Bals *et al.*, 1998; Bals *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2007]. Außerdem schützen sie den Urogenitaltrakt [Andersson *et al.*, 2002; Smeianov *et al.*, 2000] das Ösophagusgewebe [Hosaka *et al.*, 2008], die Speicheldrüsen [Murakami *et al.*, 2002] sowie Haut [Frohm *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2005] und Augenoberfläche [Kumar *et al.*, 2007] vor Infektionen. Der Wirkmechanismus des Cathelicidins ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Das *Toroidal-pore*-Modell wurde als Möglichkeit diskutiert [Brogden, 2005], inzwischen gilt aber das *Carpet-like*-Modell [Oren *et al.*, 1999; Henzler-Wildman *et al.*, 2003] als das Wahrscheinlichste. Dies konnte nicht nur für LL-37, sondern auch für das synthetische Fragment LL-32, ein Peptid, das die ersten 32 Aminosäuren von LL-37 umfasst [Gutsmann *et al.*, 2001], gezeigt werden.

Das humane Cathelicidin spielt aber nicht nur in der Abwehr von Mikroorganismen eine Rolle, sondern erfüllt auch eine chemotaktische Funktion für Immunzellen wie zum Beispiel Neutrophile, Monozyten oder T-Zellen [Wu *et al.*, 2010 a]. Mittlerweile wird über eine Beteiligung von hCAP-18/LL-37 bei der Karzinogenese spekuliert. Dabei gibt es gegenteilige Untersuchungen, die zum einen zeigen, dass LL-37 die Tumorentstehung fördert (Abbildung 7), zum anderen aber auf eine Unterdrückung der Tumorgenese (Abbildung 8) deuten [Weber *et al.*, 2009; von Haussen *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010 a, b].

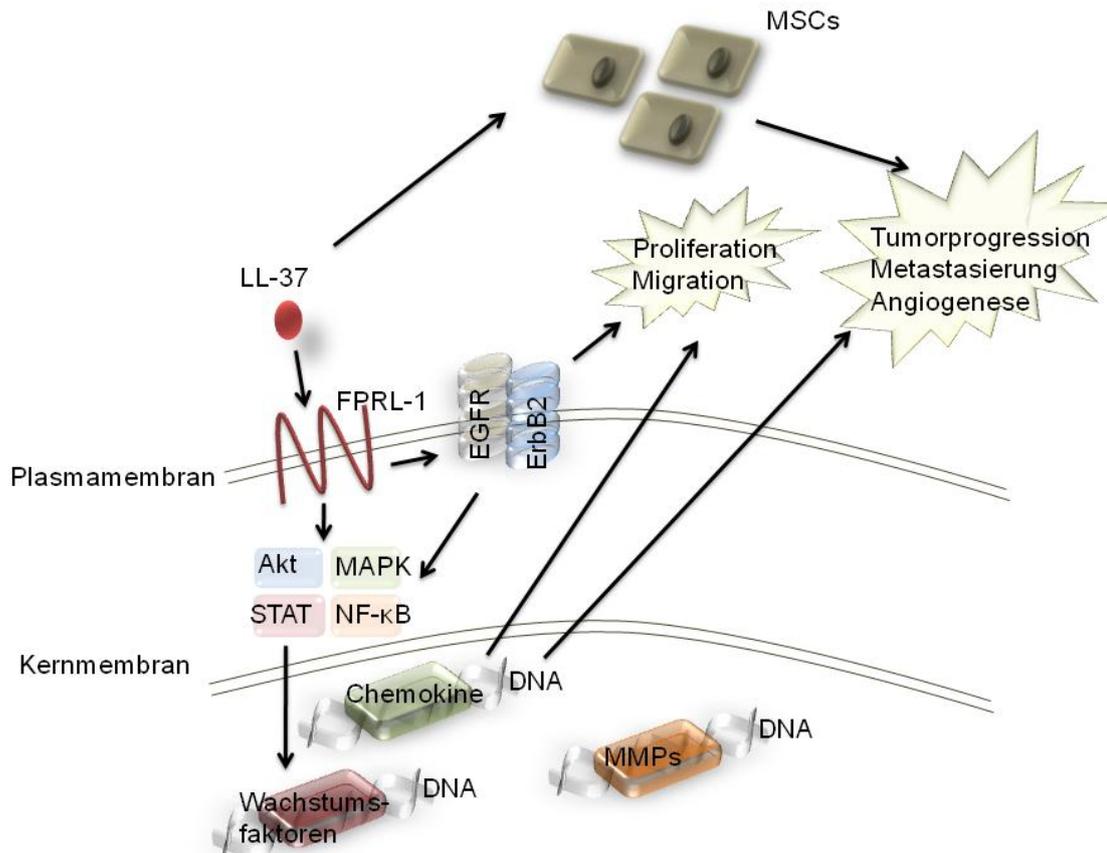


Abbildung 7: Möglicher Wirkmechanismus von LL-37 zur Wachstumsförderung von Tumoren [Wu *et al.*, 2010 a]. LL-37 reguliert dabei die Aktivierung von FPR2 und Transaktivierung von EGFR/ErbB2. Damit werden eine Vielzahl an onkogenen Signalwegen wie beispielsweise Proliferation und Migration stimuliert. Weiterhin rekrutiert LL-37 MSCs (Mesenchymale Stammzellen), die die Angiogenese und Metastasierung fördern.

Neueste Untersuchungen zeigen, dass Fragmente von LL-37 nicht nur Bakterien abtöten, sondern auch effektiv gegen Krebszellen wirken. Die C-terminale Region scheint für diese Wirkung verantwortlich zu sein [Li *et al.*, 2006 a]. Eine mögliche Erklärung für die Bindung von LL-37 an die Zellmembran der Krebszelle könnte auf die erhöhte Expression von anionischem Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche von Krebszellen [Schröder-Borm *et al.*, 2005] zurückzuführen sein.

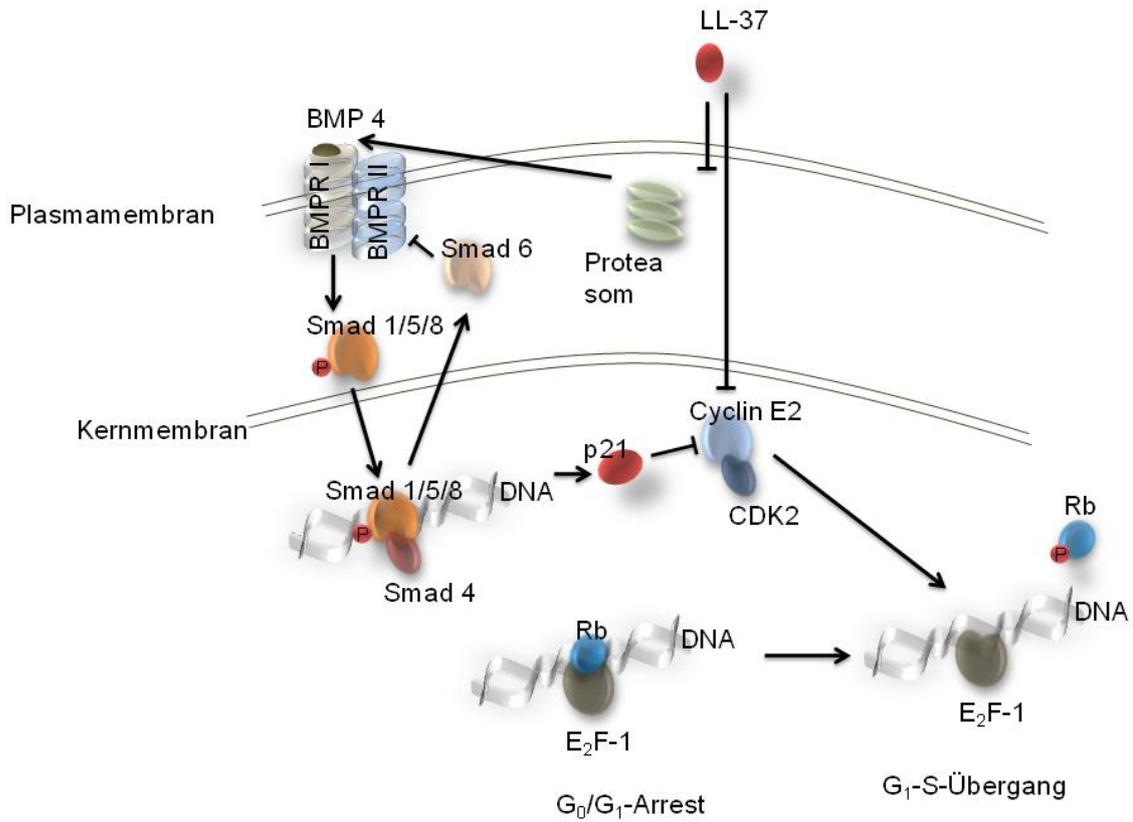


Abbildung 8: Möglicher Antitumor-Wirkmechanismus von LL-37 bei Magenkarzinomen [Wu *et al.*, 2010 a, b]. LL-37 inhibiert die Aktivität von Proteasomen über einen unbekanntes Mechanismus, was zu einer vermehrten Expression von BMP4 und damit zur Aktivierung von BMPR führt. LL-37 ist weiterhin für die Hemmung von Cyclin E₂ verantwortlich. Dies führt zu einem späten G₁-Phasen-Arrest.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung synthetischer Derivate des humanen Cathelicidins LL-37 und Förderung der zytotoxischen Aktivität gegen Tumorzellen mit Reduzierung der zytotoxischen Aktivität gegen gesunde Zellen.

1. Fragmente des humanen Cathelicidins LL-37 sollten synthetisch hergestellt werden. Im ersten Schritt bleibt die Aminosäuresequenz des natürlichen Peptids unverändert. Ziel ist es, die minimale Sequenz zu ermitteln, die zu einer deutlichen Zytotoxizität gegen Tumorzellen führt.
Durch die Ermittlung der minimalen Peptidsequenz werden für die Zytotoxizität störende Anteile der Sequenz eliminiert. Außerdem können auch die Herstellungskosten erheblich gesenkt werden, da der Aufwand zur Herstellung synthetischer Peptide sehr zeit- und kostenintensiv ist.
2. Da bisherige Experimente zeigen, dass die Zytotoxizität des humanen Cathelicidins auch gegen gesunde Zellen gerichtet sein kann, muss die minimale Aminosäuresequenz, die zur Abtötung von (Tumor-)Zellen führt, nun derart verändert werden, dass die zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen gesteigert und gegen gesunde Zellen minimiert wird.
3. Die Wirkung der synthetischen Derivate auf Zellmembranen oder Organellenmembranen sollte entschlüsselt werden. Wenn sich eine Bindung der synthetischen Derivate an die Zellmembran bestätigt, sollte im nächsten Schritt die Bindung der Peptide auch an andere Membranen der Zellen wie etwa Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien oder Kernmembran entschlüsselt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer FACS Canto	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Axio Cam MRn	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
<i>Microplate Spectrophotometer</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Imagingsystem Gel-Dok XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellzähler Cedex XS	Roche Applied Science, Mannheim
<i>xCELLigence Realtime Cell Analysis Instrument (RTCA) SP</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>Laser Confocal Scanning Microscope FV1000D IX81</i>	Olympus Europa GmbH, Hamburg

2.1.2 Software

Zeiss AxioVision Rel. 4.7	Zeiss, Jena
BD FACS Diva	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
FCAP™ Array	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmont (WA, USA)
EndNote X3	Thomson Reuters
RTCA 1.2	Roche Applied Science, Mannheim
Fluoview FV10 ASW 2.1	Olympus Europa GmbH, Hamburg

2.1.3 Chemikalien

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS, Hamburg
Aqua Spüllösung	Delta Select, Dreieich
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
DAPI	KPL, Gaithersburg (USA)
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories, Pasching (A)
EDTA	Sigma-Aldrich-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Apotheke UK-SH, Campus Lübeck
FACSFlowTM	Becton & Dickinson, Heidelberg
Fluoromount G	SouthernBiotech, Birmingham (USA)
Methanol	JTBaker, Griesheim
MgCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mycoplasma-Off [®]	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
<i>Texas-Red[®]-X-wheat germ agglutinin</i>	Invitrogen, Darmstadt
Triton-X-100 (4-(1,1,3,3-	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol)	
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim

Weitere verwendete Chemikalien stammen von Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Sigma-Aldrich, Steinheim und FLUKA, Buchs (CH).

2.1.4 Medien und Reagenzien

<i>Airway Epithelial Cell Growth Medium</i>	Promocell GmbH, Heidelberg
DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>)	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
DMEM ohne Phenolrot	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO, New York (CT, USA)
Einfriermedium für adhärente Zellen:	
DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
+ 20 % FKS	GIBCO, New York (CT, USA)
+ 10 % DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5 Puffer und Lösungen

RIPA-Puffer

99 ml 1 × PBS

1 % Igepal CA-630 (= 1 ml)

0,5 % Natrium-Deoxycholat (= 500 mg)

0,1 % SDS (= 100 mg)

Zugabe von Proteaseinhibitoren zu je 1 ml RIPA-Puffer

	Inhibitor von	Stock-Konzentration	Endkonzentration
+ 30 µl/ml Aprotinin (4°)	Trypsin	1 mg/ml	30 µg/ml
+ 10 µl/ml PMSF (-20°)	Serinproteasen	10 mg/ml in EtOH	100 µg/ml
+ 10 µl/ml Leupeptin (-20°)	Cysteinproteasen	1 mg/ml in H ₂ O	10 mg/ml

ECL-Lösung (nach Haan, 2007)

Luminol-Stammlösung

250 mM Luminol

44,29 mg/ml DMSO

para-Hydroxycumarinsäure-Stammlösung

90 mM para-Hydroxycumarinsäure

14,77 mg/ml DMSO

0,1 M Tris-HCl-Lösung (pH 8,8)

30 % H₂O₂ (9,88 M)

100 ml Arbeitslösung:

1 ml Luminol-Stammlösung

0,22 ml para-Hydroxycumarinsäure-Stammlösung

98,8 ml Tris-HCl-Lösung

Anwendung:

1 ml Arbeitslösung + 0,26 µl H₂O₂

2.1.6 Kits

<i>Annexin V-FITC Apoptosis detection kit</i>	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
<i>Mycoplasma Detection Kit</i>	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
<i>In Vitro Toxicologie Assay Kit (MTT-Test)</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Cytotoxicity Detection Kit (LDH)</i>	Roche Applied Science, Mannheim
<i>MitoCapture™ Mitochondrial Apoptosis Detection Kit</i>	BioVision Research Products (CA, USA)
<i>Organelle-ID™ RGB reagent III</i>	Enzo Life Sciences International Inc., (PA, USA)
CAMP (LL-37) ELISA	Uscn Life Science Inc., Wuhan P.R. China
<i>Proteome Profiler™ Array - Human Apoptosis Array Kit</i>	R&D Systems, Minneapolis, MN USA

2.1.7 Zelllinien

UTSCC-60 A	Primärtumor: Tonsillentumor, Stadium: T ₄ N ₁ M ₀ (Spender: männlich, 59 Jahre)
UTSCC-60 B	Metastase: Tonsillentumor, Stadium: T ₄ N ₁ M ₀ (Spender: männlich, 59 Jahre)
UTSCC-16 A	Primärtumor: Zungengrundtumor, Stadium: T ₃ N ₀ M ₀ (Spender: weiblich, 77 Jahre)
UTSCC-16 B	Metastase: Zungengrundtumor, Stadium: T ₃ N ₀ M ₀ (Spender: weiblich, 77 Jahre)
UTSCC-24 A	Primärtumor: Zungengrundtumor, Stadium T ₂ N ₀ M ₀ (Spender: männlich, 41 Jahre)
UTSCC-24 B	Metastase: Zungengrundtumor, Stadium T ₂ N ₀ M ₀ (Spender: männlich, 41 Jahre)
HeLa	Zervixkarzinom (Spender: weiblich, 31 Jahre)
SK-RC47	Nierenkarzinom
T24	Blasenkarzinom
HaCaT	spontan immortalisierte Keratinozytenzelllinie, nicht tumorbildend
HTB-43	schuppiges Kopf-Hals-Karzinom
HNEpC	<i>Normal Human Nasal Epithelial Cells</i> , PromoCell GmbH, Heidelberg

2.1.8 Peptide

LL-32	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV
LL-20	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQ
RK-20	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKD
IG-20	IGKEFKRIVQRIKDFLRNLV
LL-10-RI-10	LLGDFFRKSK.....RIKDFLRNLV
KI-21-1	KIGKFFKRIVQRIKDFIRNFV
KI-21-2	KIGKEFKRIVRRIKKFLRKLKLV
KI-21-3	KIGKFFKRIVRRIKKFIRKFFV

2.1.9 Blutproben

Um gesunde Erythrozyten als weitere Kontrollzellen zu gewinnen, wurden Blutproben von gesunden Spendern in Natrium-Zitrat-Puffer gewonnen. Als Blutspender stellten sich 18- bis 65-jährige gesunde Frauen und Männer zur Verfügung, die auf HIV sowie Hepatitis B und C Virus negativ getestet worden sind. Aus datenschutzrechtlichen Gründen war von den Spendern und Spenderinnen nur die Blutgruppe bekannt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung von HNSCC-Zelllinien

Die adhärenenten HNSCC-Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank unter Verwendung von DMEM + 10 % FKS kultiviert. Für die Subkultivierung wurden die Zelllinien bei einer Konfluenz von 70-80 % mit Accutase von den Zellkulturflaschen abgelöst, in DMEM resuspendiert und zum Pelletieren zentrifugiert (200 × g, 5 min, 30 °C). Nach dem Resuspendieren des Zellpellets wurde die gewünschte Verdünnung der Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen überführt. Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mit dem *Mycoplasma Detection Kit* auf Mycoplasmen-Kontaminationen untersucht. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zelllinien im Verhältnis 1:1 mit einem 2-fach konzentrierten Einfriermedium versetzt und in Kryoröhrchen (SARSTEDT) unter Verwendung eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussells bei -80 °C eingefroren.

Kultivierung HNEpC-Zellen

Nach Erhalt der Zellen wurden diese auf Morphologie und Zelldichte kontrolliert und im Brutschrank für etwa 2 bis 3 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Da die Zelldichte bei Lieferung unter 60 % Konfluenz lag, wurde am ersten Tag nur ein Mediumwechsel mit Selektivmedium (*Airway Epithelial Cell Growth Medium plus Supplement*) des Herstellers durchgeführt. Für die Subkultivierung wurden die Zelllinien bei einer Konfluenz von 70-80 % mit Accutase von den Zellkulturflaschen abgelöst, in Selektivmedium resuspendiert und zum Pelletieren zentrifugiert (200 × g, 5 min, 30 °C). Nach dem Resuspendieren des Zellpellets wurde die gewünschte Verdünnung der Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen überführt.

2.2.2 Zellisolierung

Isolierung von Erythrozyten

Für die Isolierung von Erythrozyten wurde ein Röhrchen Vollblut (siehe 2.1.9) in ein Natrium-Zitrat-Röhrchen abgenommen. Das Röhrchen wurde für 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Das Plasma (Überstand) wurde abgesaugt und verworfen, das Erythrozyten-Pellet wurde in 8 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2000 g für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und der

Waschschrift noch zweimal wiederholt. Die Zellzahl der Erythrozyten wurde bestimmt und direkt in den Versuchen eingesetzt.

2.2.3 Zytotoxizitätstests

Cytotoxicity Detection Kit

Zur Austestung der zytotoxischen Aktivität der Peptide wurde der *Cytotoxicity Detection Kit* (LDH) durchgeführt. Dabei wird die Menge an Lactatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand gemessen. Bei diesem enzymatischen Test wird ein Tetrazolium Salz (INT) in ein rotes Formazan-Produkt umgewandelt. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen. Die Absorption kann mit einem normalen 96-Well Plattenleser (*Microplate Spectrophotometer*) mit einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden.

Für den Test wurden in 96-well-Platten je 10.000 Zellen pro Well in 200 µl Medium oder Medium mit 5 mM MgCl₂ eingesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den Peptiden in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt 16 Stunden inkubiert. Dabei wurden pro Bedingung vierfache Ansätze gemacht.

Als Kontrollen für die nachfolgende Berechnung der Zytotoxizität wurden nur Zellen in Medium (*Low Control*), Zellen mit 1 % Triton-X-100 (4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenylpolyethylenglycol) (*High-Control*) sowie nur Medium (Hintergrund) mitgeführt. Triton-X-100 ist ein ungeladenes, neutrales Detergens, das Proteine relativ schwach denaturiert und zur Lyse der Zellmembran führt. Die weitere Durchführung erfolgte laut Angaben des Herstellers.

MTT Zell-Proliferationstest

Um die Ergebnisse des *Cytotoxicity Detection Kit* zu bestätigen, wurde exemplarisch mit einigen Zelllinien der MTT Zell-Proliferationstest durchgeführt. Dieser Test wird zur Messung der Zell-Überlebensrate und Zellproliferation verwendet. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird in lebenden Zellen von mitochondrialen Dehydrogenasen durch Abspaltung der Tetrazolringe zu violetten, wasserunlöslichen Formazankristallen reduziert. Durch die MTT Solubilization-Lösung werden die Kristalle in Lösung gebracht. Die optische Dichte des violetten Farbstoffes ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen [Mosmann, 1983]. Das resultierende violette Formazan kann spektrophotometrisch bei 550 - 600 nm bestimmt werden.

Für den Test wurden in 96-well-Platten je 10.000 Zellen pro Well in 100 µl Medium oder Medium mit 5 mM MgCl₂ eingesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den Peptiden in

unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und für 1,5 oder 16 Stunden inkubiert. Dabei wurden pro Bedingung vierfache Ansätze gemacht. Nach der Inkubationszeit wurden von der MTT-Gebrauchslösung (5 mg/ml) je 10 µl pro Well dazugegeben und die Zellen wieder im Brutschrank inkubiert. Nach 1 Stunde wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl MTT *Solubilization* Lösung abgestoppt. Die Platten wurden vor der Messung 24 Stunden im Dunkeln bei RT geschüttelt, um die Kristalle zu lösen. Die Absorption wurde bei 560 nm gegen die Referenzwellenlänge 650 nm im 96-Well Plattenleser (*Microplate Spectrophotometer*) gemessen.

Hämolysetest

Zusätzlich zu den Zytotoxizitätstests an Zelllinien wurde die Zytotoxizität gegen Erythrozyten getestet. Nach der Isolation (siehe 2.2.2) wurden je 1×10^7 Erythrozyten in 100 µl pro Well in eine 96-well-Platte pipettiert. Die Zellen wurden direkt mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide behandelt und für 1,5 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung des freigesetzten Hämoglobins im Überstand bei 540 nm im 96-Well Plattenleser (*Microplate Spectrophotometer*). Als Kontrolle wurden Erythrozyten nur in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert, um die spontane Lyse zu detektieren. Als Positivkontrolle wurden Erythrozyten mit 1 % Triton-X-100 behandelt.

2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Analyse von intrazellulären Proteinen und Oberflächenmolekülen sowie zur Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen. Die Methode basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern durchgeführt wird. Zellen in einer Zellsuspension werden einzeln in einem laminaren Probenstrom an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeführt, das Laserlicht wird gestreut und mit Hilfe von Photodetektoren gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forwardscatter) ist ein Maß für die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidescatter) ein Maß für die Granularität ist. Außerdem werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gebracht. Nach dem Lichtimpuls fallen die Elektronen auf das ursprüngliche Niveau zurück. Die Emission wird im Anschluss mit Photodetektoren registriert und verhält sich proportional zur Menge der an die Zelle gebundenen Antikörpern.

Probenvorbereitung: Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der Peptide

Um die zytotoxische Aktivität der Peptide mittels FACS bestimmen zu können, wurde ein *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* durchgeführt. Die Annexin V- und Propidiumjodid-Färbung dient als Nachweismethode für die Zell-Vitalität, da nekrotische und apoptotische Zellen nachgewiesen werden können. Phosphatidylserin (PS) ist normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle vorhanden, bei apoptotischen Zellen wird PS auf die Außenseite der Membran verlagert und kann von Annexin V gebunden werden. Durch die Markierung von Zellen mit Annexin V (FITC) können apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann Propidiumjodid (PI) in diese Zellen eindringen. Lebende Zellen sind damit Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-negativ und PI-positiv.

Am Vortag wurden je 40.000 Zellen in einer 12-well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach etwa 24 Stunden wurden die Zellen mit den Peptiden in unterschiedlichen Konzentrationen für 1,5 Stunden behandelt. Anschließend wurde der Überstand in Falcons überführt, die Zellen mit Accutase abgelöst, zum Überstand pipettiert und bei 200 g 5 Minuten abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* nach Herstellerangaben gefärbt. Die BD FACSDiva Software wurde zur Messung sowie Darstellung der Proben verwendet. Weitere Auswertungen erfolgten mit Hilfe der BD FACSDiva.

2.2.5 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbung: LL-32-NBD und WGA

Die Bindung von LL-32 an der Zellmembran wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem LL-32-NBD untersucht. Die Zellmembran wurde durch *wheat germ agglutinin* (WGA) dargestellt. WGA ist ein Lectin, welches durch *Texas-Red*[®]-X rot fluoresziert. *Texas Red*[®]-X WGA bindet an Salicylsäuren und N-Acetylglucosaminyl-Resten. Je 1×10^4 Zellen/well wurden in einer 4er-Kammer mit Medium ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und je 2 μ M LL-32-NBD für 16 Stunden dazugegeben. Danach wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und 10 Minuten mit WGA in HBSS laut Angaben des Herstellers inkubiert. Nach weiterem Waschen erfolgte die Färbung mit DAPI, die Kammern wurden entfernt und die Objektträger mit 1-2 Tropfen Fluormount G eingedeckt. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Confocal Scanning Microscope FV1000DIX81 von Olympus Europa GmbH, Hamburg und die Auswertung mit dem Fluoview FV10 ASW 2.1 durchgeführt.

Immunhistochemische Färbung: Zytotoxizität der Peptide

Die Auswirkung nach der Behandlung von Zellen mit den Peptiden auf Zellorganellen wurde in weiteren Versuchen immunhistochemisch betrachtet. Dafür wurden in *ChamberSlides* bei einem 8-Kammer-System 20.000 Zellen in 300 µl Medium, in einem 4-Kammer-System pro well 40.000 Zellen in 500 µl Medium und bei einem 2-Kammer-System 80.000 Zellen in 1 ml Medium ausgesät. Alternativ wurden 20.000 Zellen in 300 µl Medium in 12-well-Platten ausgesät. Nach etwa 24 Stunden wurden die Zellen mit den Peptiden in unterschiedlichen Konzentrationen für 1,5 Stunden behandelt.

Anschließend wurde das *MitoCaptureTM Apoptosis Detection Kit* oder *Organelle-IDTM RGB reagent III* nach Herstellerangaben angewendet.

MitoCaptureTM Apoptosis Detection Kit

Die Zerstörung der Mitochondrienmembran ist eine der ersten intrazellulären Vorgänge, die nach der Induktion der Apoptose auftreten. Das *MitoCaptureTM Apoptosis Detection Kit* ist eine Fluoreszenz-basierte Methode, um gesunde und apoptotische Zellen durch Detektion von Membranpotentialveränderungen zu unterscheiden. Das *MitoCaptureTM*, ein kationisches Fluorochrom, akkumuliert in Aggregaten von Mitochondrien gesunder Zellen und fluoresziert rot. In apoptotischen Zellen kann das Fluorochrom durch das veränderte Membranpotential nicht mehr in den Mitochondrien akkumulieren und verbleibt als grün-fluoreszierendes Monomer im Zytoplasma. Das Fluoreszenzsignal kann mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Die Zellen wurden mit der Zeiss AxioCam MRm Rev.3 FireWire fotografiert und mittels Zeiss AxioVision Rel. 4.7 Software ausgewertet.

Organelle-IDTM RGB reagent III

Das *Organelle-IDTM RGB reagent III* ist aus einem zellpermeablen rot fluoreszierenden Fluorochrom für das Endoplasmatische Reticulum, einem grün fluoreszierenden Farbstoff zur Färbung des Golgi-Apparates und einem blau fluoreszierenden Kernfarbstoff zusammengesetzt. Dadurch können diese Ziel-Organellen mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden und die Auswirkung nach einer Behandlung mit Peptiden untersucht werden. Die gefärbten Zellen wurden auf dem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mittels differentialer Interferenz Kontrast (DIC) Mikroskopie oder mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung unterschiedlicher Filtersets visualisiert. Die Zellen wurden mit der Zeiss AxioCam MRm Rev.3 FireWire fotografiert und mittels Zeiss AxioVision Rel. 4.7 Software ausgewertet.

2.2.6 xCELLigence

Das xCELLigence System erlaubt eine *Real-Time* Überwachung adhärenter Zellen über Stunden oder auch Tage. Dabei wird über die Impedanz-Messung eine quantitative Aussage über den biologischen Status der Zellen wie Zellzahl, Vitalität und Morphologie möglich. Ein dimensionsloser Parameter, *Cell Index* (CI), ergibt sich aus der relativen Änderung der messbaren elektrischen Impedanz zu einem bestimmten Zeitpunkt und einem bestimmten biologischen Status.



Abbildung 9: xCELLigence-System von Roche-Applied-Science (modifiziert nach roche-applied-science)

In die wells einer 96-well E-Plate (96-well Platte mit Gold-Mikroelektroden) wurden je 10.000 Zellen in 200 μl Medium oder Medium mit 5 mM MgCl_2 pipettiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide behandelt und über mehrere Stunden bis Tage beobachtet.

2.2.7 Proteinbestimmung

Proteome Profiler™ Array - Human Apoptosis Array Kit

Mit Hilfe des *Proteome Profiler™ Array - Human Apoptosis Array Kit* können Expressionsprofile von 35 Apoptose-relevanten Proteinen untersucht werden. Auf einer Nitrozellulosemembran sind Fänger- und Kontroll-Antikörper gespottet. Zelluläre Extrakte werden auf die Membranen gegeben und über Nacht inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membranen erfolgt eine Inkubation mit einem biotinylierten Detektions-Antikörper. Nach Zugabe von Streptavidin-HRP und einer ECL-Lösung werden die Spots detektiert und die Menge an gebundenem Protein kann ermittelt werden.

Eine T75-Flasche Zellen mit etwa 80 % Konfluenz wurde mit 12,5 µg/ml LL-32 für 16 h (10 µl einer 10 µg/µl Stammlösung in 8 ml Medium) behandelt. Eine weitere Flasche Zellen diente als Kontrolle.

Der Mediumüberstand wurde in 50 ml Falcons überführt. Nach Zugabe 10 ml kaltem PBS in die Flaschen wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und zu den Überständen pipettiert. Das Falcon wurde auf 50 ml aufgefüllt und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 µl *Lysis Buffer* des Kits aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden 5 min bei 13.000 rpm, 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es erfolgte eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay. Dazu wurden 250 µl Bradford-Reagenz mit 5 µl Probe vermischt, 10 min inkubiert und anschließend im Photometer bestimmt. Die Durchführung des *Proteome Profiler™ Array - Human Apoptosis Array Kit* erfolgte nach Angaben des Herstellers.

1 µl H₂O₂ wurden zu 4 ml einer ECL-Lösung pipettiert und auf die Membranen gegeben. Nach etwa 1 min Inkubation wurden die Membranen im ECL-Gerät gemessen. Dabei wurden Aufnahmen nach 30 sec, 1 min, 5 min und 10 min durchgeführt.

hCAP-18/LL-37 ELISA

Aus einem Zellpellet von etwa 6×10^6 Zellen wurde ein Proteinlysate hergestellt. Dazu wurden die Zellen in etwa 100-200 µl RIPA-Puffer aufgenommen und lysiert. Nachdem die Zellen zwei Stunden auf Eis inkubiert wurden, wurde die Gesamtproteinmenge mittels Bradford-Assay bestimmt. Die Gesamtproteinmenge wurde mit 1 x PBS auf 70 µg/100 µl eingestellt und die Durchführung des LL-37 ELISAs erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3. Ergebnisse

Die zytotoxische Aktivität unterschiedlicher Fragmente des humanen Cathelicidins wird in diesem Kapitel beschrieben. Dabei wurde die Zytotoxizität gegen Tumorzelllinien als auch gegen eine gesunde Primärkultur ausgetestet. In weiteren Versuchen sollten die Peptide so modifiziert werden, dass die Wirksamkeit gegen Tumorzellen gesteigert wird, die gesunden Zellen jedoch weniger beeinträchtigt werden. Außerdem sollte der zytotoxische Wirkmechanismus der Peptide entschlüsselt werden.

3.1 Intrazelluläres LL-37

In einem ersten Schritt wurde die Konzentration von intrazellulären hCAP-18/LL-37 gemessen. Dafür wurden Proteinlysate von verschiedenen Zelllinien hergestellt und im ELISA getestet. Der kommerziell erhältliche ELISA detektiert dabei sowohl hCAP-18 als auch das aktive Fragment LL-37. Die Detektionsgrenze des ELISAs liegt zwischen 3,12 und 200 ng/ml.

Tabelle 2: Intrazelluläre Konzentration von hCAP-18/LL-37.

HNEpC	15,5 ng/ml
UTSCC-60 A	7,9 ng/ml
UTSCC-60 B	21,3 ng/ml
UTSCC-24 A	7,9 ng/ml
UTSCC-24 B	4,7 ng/ml
UTSCC-16 A	11,8 ng/ml
UTSCC-16 B	14,2 ng/ml
HeLa	5,4 ng/ml
HTB-43	7,9 ng/ml
HaCaT	16,9 ng/ml

Wie aus der Tabelle 2 zu entnehmen ist, exprimieren alle untersuchten Zelllinien das humane Cathelicidin. Die Konzentrationen variieren dabei zwischen 4,7 und 21,3 ng/ml.

3.2 Peptide

3.2.1 Die Peptide LL-32, IG-20, LL-20 und RK-20

Die Peptide LL-32, IG-20, LL-20 sowie RK-20 sind verkürzte Fragmente des humanen Cathelicidins LL-37 (Abb. 10).

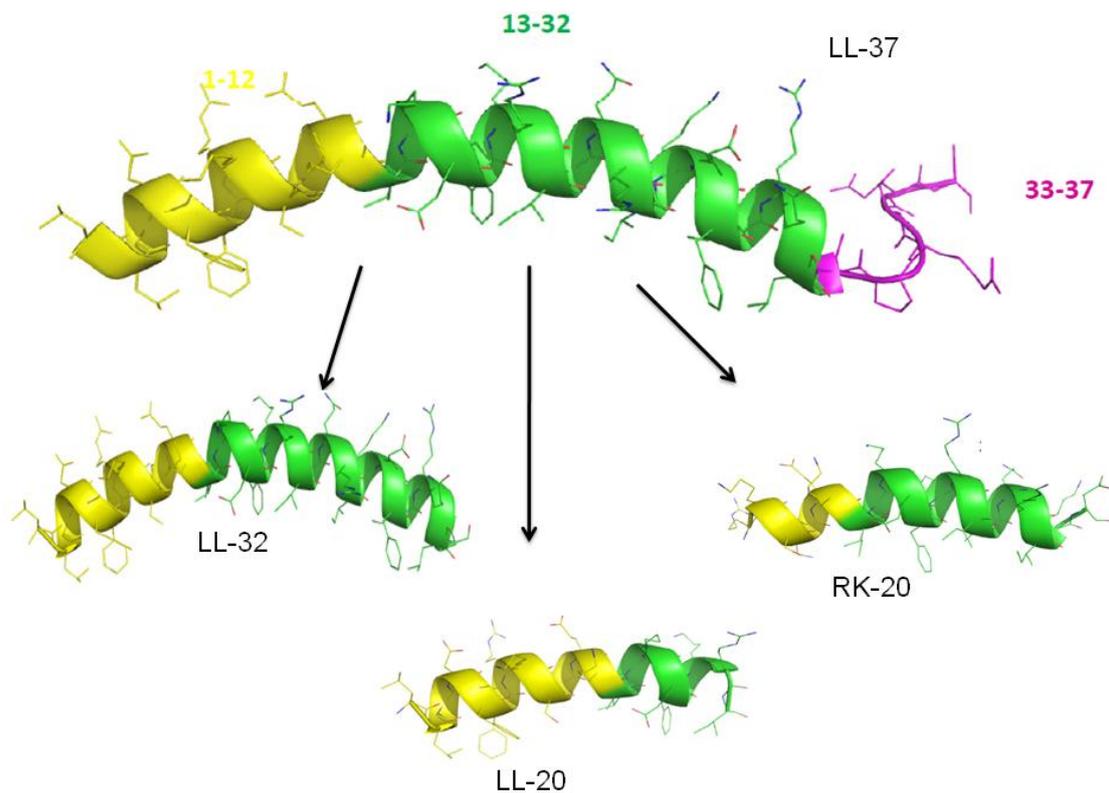


Abbildung 10: Darstellung des humanen Cathelicidins LL-37 und der Fragmente LL-32, LL-20 sowie RK-20 [Wang, 2008].

Die Peptide wurden am Forschungszentrum Borstel von der Arbeitsgruppe Strukturbiochemie von R. Bartels hergestellt und in aufgereinigter Form zur Verfügung gestellt beziehungsweise kommerziell erworben.

3.2.2 Modifizierung Peptidfragmente

Außer den Peptiden, deren Sequenz auf der natürlich vorkommenden Abfolge beruht, wurden drei weitere Peptide synthetisiert, deren Sequenz verändert wurde. Dadurch entstanden die Peptide KI-21-1, KI-21-2 und KI-21-3. Bei KI-21-1 (KIGKFFKRIVQRIKDFIRNFV) wurden Aminosäuren gegen hydrophobere Aminosäuren ausgetauscht. KI-21-2 (KIGKEFKRIVRRIKKFLRKLV) entstand durch den Austausch mit kationischen Aminosäuren und KI-21-3 vereinte die Modifikationen von KI-21-1 und KI-21-2 (KIGKFFKRIVRRIKKFIRKFV).

3.3 Zytotoxizität

3.3.1 Cytotoxicity Detection Kit

Die Peptide wurden mittels Lactat-Dehydrogenase-Assay von Roche auf ihre zytotoxische Aktivität gegen die Kopf-Hals-Tumorzelllinien UTSCC-60 A, UTSCC-60 B sowie der gesunden Primärkultur HNEpC getestet. Im LDH-Assay wurde gemessen, wie viel des cytoplasmatischen Enzyms Lactat-Dehydrogenase in das Medium freigesetzt wird. Als Positivkontrolle dienen Zellen, die mit 1 % Triton-X 100 behandelt wurden. Die Menge an Zellen, die durch Triton-X 100 abgetötet wurden, wurde gleich 100 % Zytotoxizität gesetzt und die Messwerte der behandelten Zellen in Relation dazu berechnet. In Abbildung 11 sind exemplarisch die Ergebnisse eines LDH-Assays aus vierfachen Werten der Peptide LL-32, IG-20, RK-20 und LL-20 dargestellt. Insgesamt wurden die Versuche mindestens dreimal wiederholt. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse von 60 A und HNEpC sehr gut übereinstimmten, die Ergebnisse von 60 B jedoch variierten.

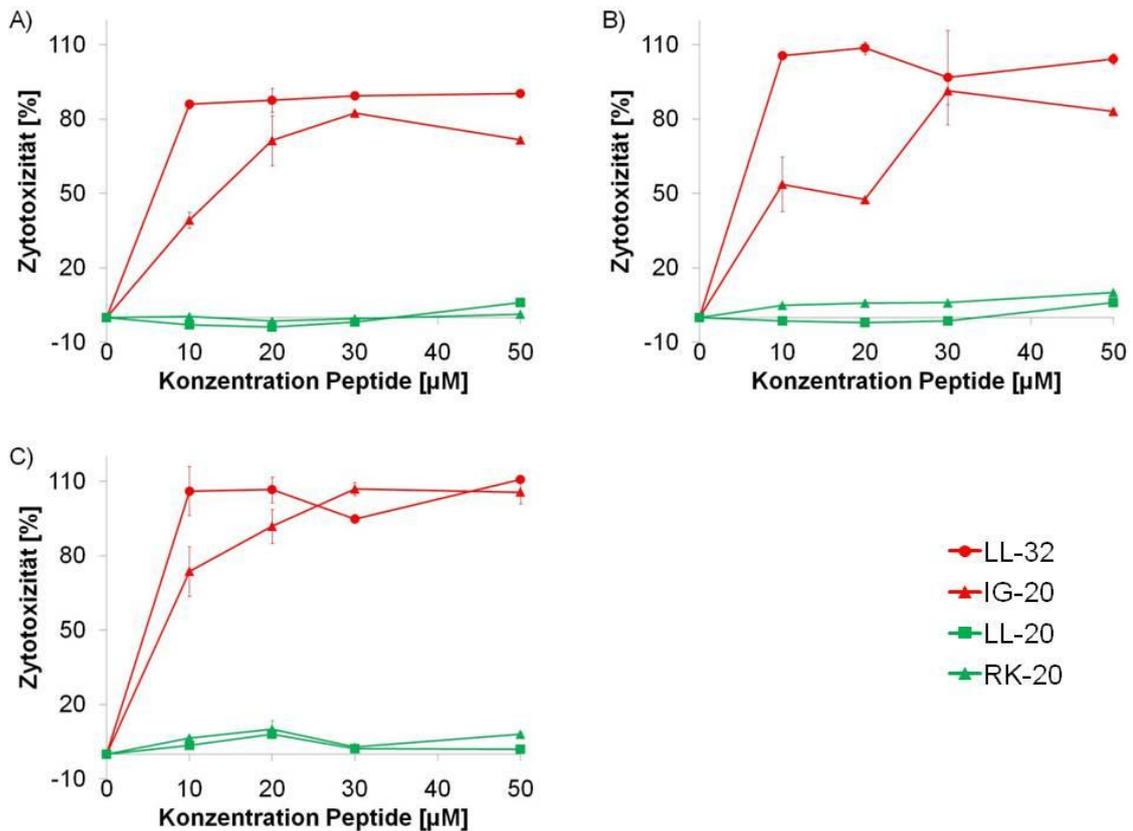


Abbildung 11: Darstellung der zytotoxischen Aktivität der Peptide LL-32, IG-20, RK-20 und LL-20. Ergebnisse von LDH-Assays an den Kopf-Hals-Tumorzelllinien UTSCC-60 A (A), UTSCC-60 B (B) sowie der Primärkultur HNEpC (C). Darstellung der unterschiedlichen Peptide: LL-32: rot, Kreis; IG-20: rot, Dreieck; LL-20: grün, Quadrat; RK-20: grün, Dreieck. Dabei wirken die Peptide LL-32 und IG-20 in höheren Konzentrationen stark zytotoxisch auf die Zellen, während die Peptide LL-20 und RK-20 kaum eine Wirkung auf die Zellen haben.

Die Versuche wurden in 96-well-Platten mit 10.000 Zellen/well an den Kopf-Hals-Tumorzelllinien UTSCC-60 A (A), UTSCC-60 B (B) sowie der Primärkultur HNEpC (C) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Peptide LL-32 und IG-20 bei einer Konzentration von 50 µM bis zu 90 % (LL-32) beziehungsweise 80 % (IG-20) der Zellen nach einer Inkubation von 16 Stunden abtöteten. Dagegen wiesen die beiden anderen Peptide LL-20 und RK-20 nur eine geringe zytotoxische Aktivität auf. Sowohl die Tumorzelllinien als auch die gesunde Vergleichskultur reagierten auf die Zugabe der Peptide IG-20 und LL-32. Dabei war sogar festzustellen, dass die zytotoxische Aktivität gegen die HNEpC-Zellen sogar noch stärker ausgeprägt war als gegen die Tumorzellen.

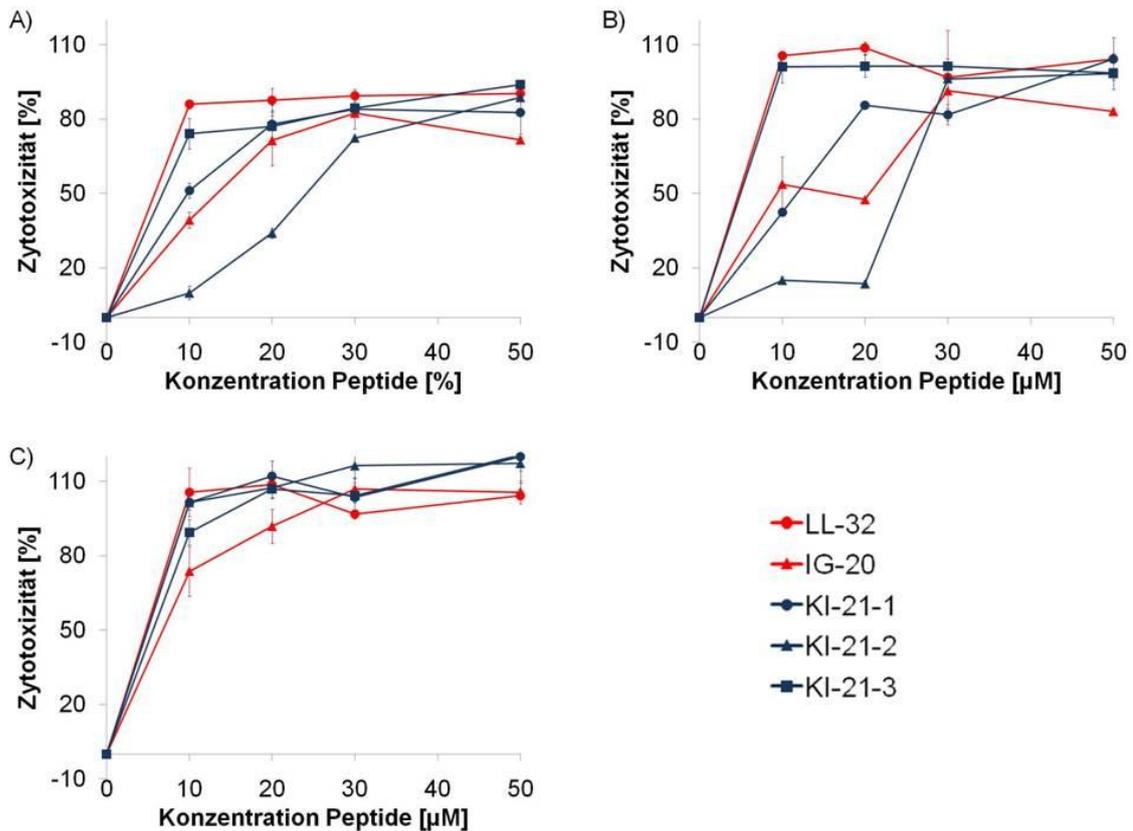


Abbildung 12: Darstellung der zytotoxischen Aktivität von LL-32, IG-20, KI-21-1, -2 und -3. Behandlung der Zelllinien UTSCC-60 A (A), UTSCC-60 B (B) und HNEpC (C). Darstellung der unterschiedlichen Peptide: LL-32: rot, Kreis; IG-20: rot, Dreieck; KI-21-1: blau, Viereck; KI-21-2: blau, Dreieck; KI-21-3: blau, Kreis. Dabei zeigt sich, dass die Peptide KI-21-1 und KI-21-3 zytotoxischer sind als IG-20, allerdings nicht zytotoxischer als LL-32. Die zytotoxische Aktivität gegen die HNEpC-Zellen übersteigt die Aktivität gegen die Tumorzellen.

Die Wirkung der modifizierten Peptide ist in Abbildung 12 dargestellt. Dabei ist bei allen Zelllinien deutlich zu sehen, dass die Peptide KI-21-1 und KI-21-3 stärker zytotoxisch auf die Zellen wirkten als IG-20. Eine Steigerung der Aktivität im Vergleich zu LL-32 konnte aber nicht erzielt werden. KI-21-2 zeigte im LDH-Assay eine schlechtere Zytotoxizität gegen die Tumorzellen als IG-20, wirkte jedoch besser als IG-20 bei den HNEpC-Zellen. Kein Peptid zeigte im LDH-Assay aber eine verbesserte Aktivität gegen die Tumorzellen als gegen die gesunden Zellen. Für die Peptide KI-21-2 und KI-21-3 konnte sogar eine verstärkte Zytotoxizität gegen die gesunden Epithelzellen ermittelt werden.

3.3.2 MTT-Test

In MTT-Tests sollten die Ergebnisse der LDH-Assays exemplarisch an einigen Derivaten bestätigt werden. Anders als im LDH-Assay wird im MTT-Assay die Proliferation der Zellen bestimmt. 10.000 Zellen/well wurden in einer 96 well-Platte eingesetzt und anschließend mit den Peptiden behandelt. Nach Zugabe der MTT-Reagenz, welche in lebenden Zellen akkumuliert und diese blau anfärbt sowie der anschließenden Lyse der Zellen konnte die blaue Färbung des Mediums im ELISA-Reader bestimmt werden. Unbehandelte Zellen, die ungehindert proliferieren können, wurden als 100 % vital gesetzt und die Werte der behandelten Zellen dazu in Relation berechnet.

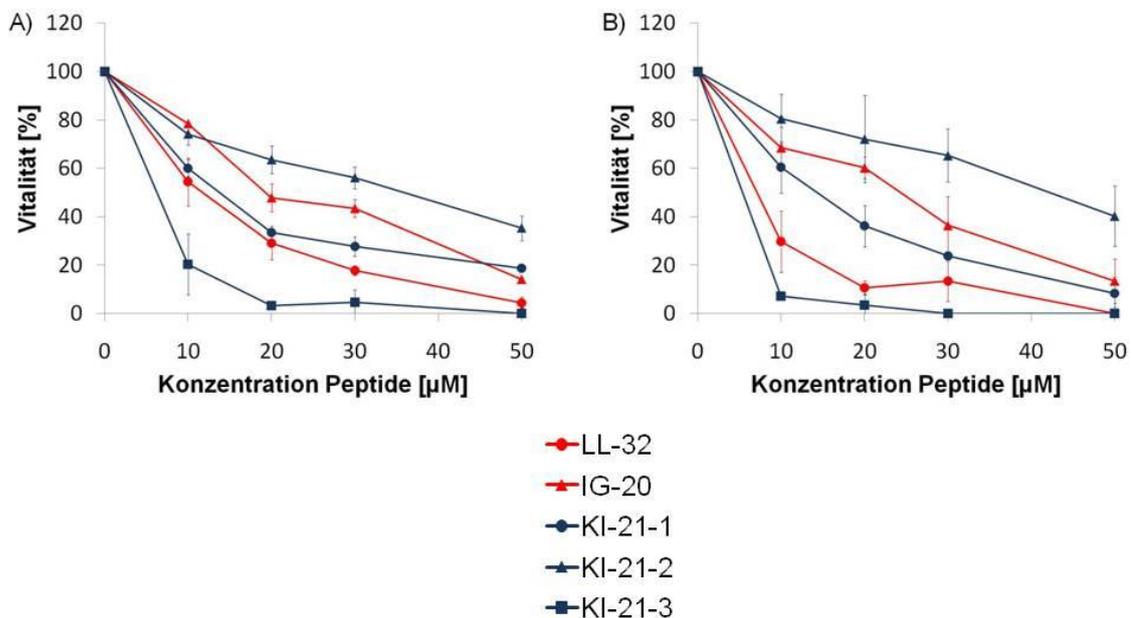
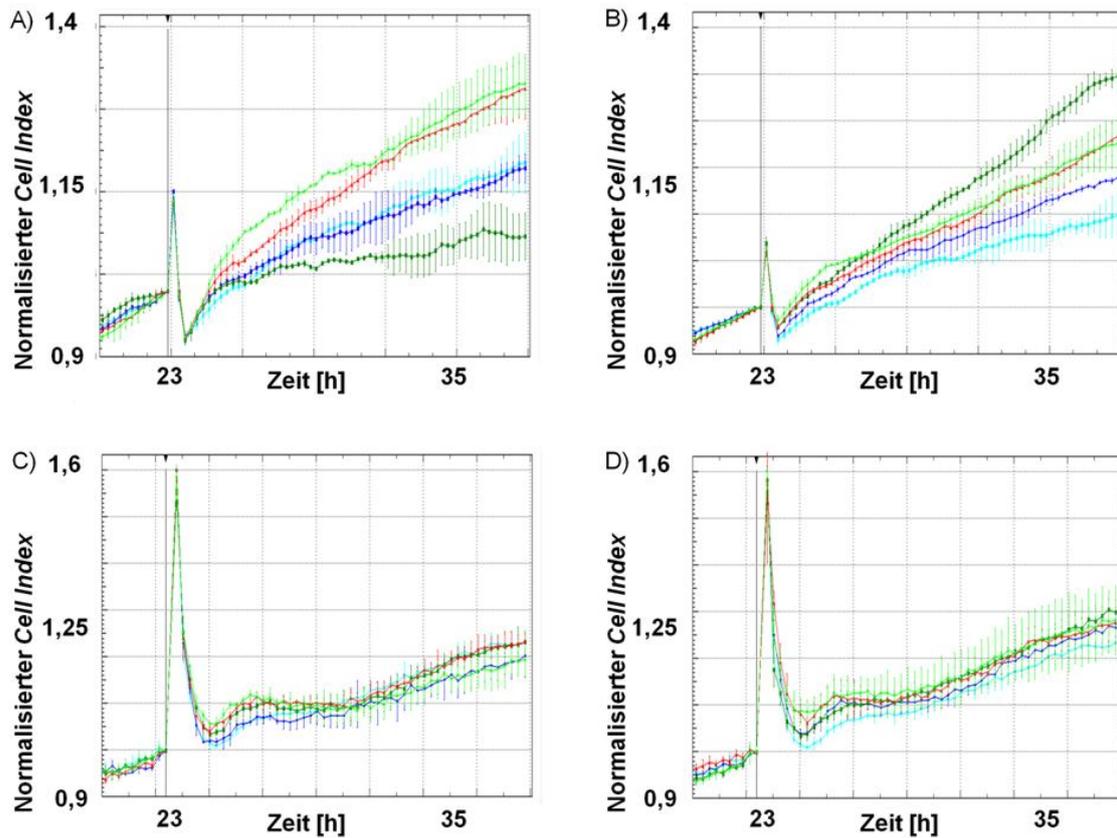


Abbildung 13: Darstellung des MTT-Tests. Behandlung der Zelllinien UTSCC-60 A (A) und UTSCC-60 B (B). Darstellung der unterschiedlichen Peptide: LL-32: rot, Kreis; IG-20: rot, Dreieck; KI-21-1: blau, Viereck; KI-21-2: blau, Dreieck; KI-21-3: blau, Kreis. Die Peptide KI-21-3 und LL-32 zeigten bei beiden Zelllinien bei einer Konzentration von 50 µM 100 % Zytotoxizität.

In den in Abbildung 13 dargestellten Graphen ist die zytotoxische Aktivität der Peptide LL-32, IG-20, KI-21-1, -2 und -3 gegen die Tumorzelllinien UTSCC-60 A und B im MTT-Test veranschaulicht. Dabei war festzustellen, dass 50 µM der Peptide LL-32 und KI-21-3 fast 100 % der Tumorzellen abtöten konnten. Die geringste Aktivität wurde bei KI-21-2 ermittelt, nach der Behandlung lag die Vitalität nur noch bei etwa 50 %.

3.3.3 xCELLigence

Eine weitere Möglichkeit, die zytotoxische Aktivität der Peptide zu testen, bietet das xCELLigence System von Roche (Abbildung 9). Mittels Impedanz-Messung wird dabei der *cell index* bestimmt, welcher abhängig ist von Größe, Morphologie und Anzahl der Zellen pro well.



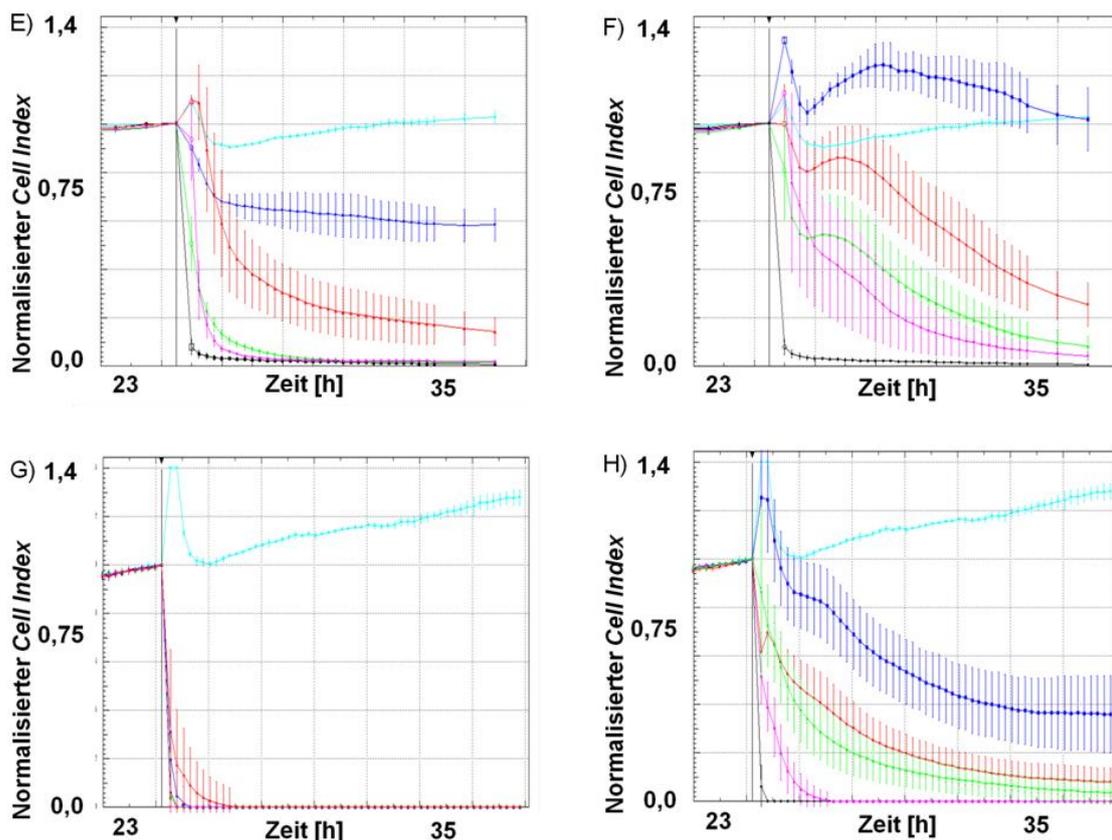


Abbildung 14: Darstellung der Impedanz-Messung mittels xCELLigence. Eingesetzte Peptidfragmente: LL-20 bei der Zelllinie UTSCC-60 A (A), RK-20 bei der Zelllinie UTSCC-60 A (B), LL-20 bei der Zelllinie HNEpC (C), RK-20 bei der Zelllinie HNEpC (D), LL-32 bei der Zelllinie UTSCC-60 A (E), IG-20 bei der Zelllinie UTSCC-60 A (F) LL-32 bei der Zelllinie HNEpC (G), IG-20 bei der Zelllinie HNEpC (H). Die unterschiedlichen Konzentrationen sind in blau (10 μM), dunkelgrün (20 μM), rot (30 μM), grün (50 μM) und magenta (100 μM) dargestellt. Unbehandelte Zellen sind in türkis und Zellen, die mit 1 % Triton-X behandelt wurden, in schwarz dargestellt. Dabei zeigte sich, dass bei den Peptiden LL-32 und IG-20 in höheren Konzentrationen fast 100 % der Zellen abgetötet werden können. Die Wirkung trat sogar schon nach etwa 30 bis 60 Minuten auf. Die Derivate LL-20 und RK-20 führten darüber hinaus zu einem vermehrten Wachstum der Tumorzelllinien.

In Abbildung 14 sind die Impedanz-Messungen im xCELLigence nach Behandlungen von UTSCC-60 A und HNEpC dargestellt. Nach einer Behandlung lösten sich die abgestorbenen Zellen vom Boden der wells ab, was zu einem verminderten *Cell Index* führt. Dies ist ein Maß für die Zytotoxizität der Peptide. Dabei war zu beobachten, dass die zytotoxische Aktivität von LL-32 und IG-20 schon nach 30 bis 60 Minuten auftrat und 100 % der Zellen von UTSCC-60 A bei Konzentrationen von 50 μM und 100 μM abgetötet wurden. Bei HNEpCs zeigte sich eine 100%ige Zytotoxizität von LL-32 sogar schon bei Konzentrationen von 10 μM . Ein deutlicher Unterschied war auch nach der Zugabe von IG-20 zu sehen. Die Tumorzellen wiesen nach einer Inkubation mit 10 μM IG-20 sogar ein verstärktes Wachstum auf, während HNEpCs bei dieser Konzentration zu fast 80 % lysiert wurden.

Die Messungen der Zellen nach der Gabe von LL-20 und RK-20 belegten sogar, dass Tumorzellen nach der Behandlung mit diesen Peptiden ein vermehrtes Wachstum aufwiesen. Eine Stimulation der Zellen mit 10 μM RK-20 führte schon zu einer vermehrten Proliferation der Tumorzellen. Nach der Inkubation der Zellen mit LL-20 trat dieser Effekt erst bei einer Konzentration von 30 μM auf. Im Gegensatz dazu wurde die Primärkultur aus HNEpCs durch die Peptide nicht beeinflusst. Weder die Behandlung mit LL-20 noch mit RK-20 führten zu einer vermehrten Proliferation der Zellen.

Alle Versuche wurden auch mit der Metastasenzelllinie UTSCC-60 B durchgeführt (Ergebnisse nicht abgebildet). Diese Ergebnisse waren mit den Ergebnissen der Zelllinie UTSCC-60 A vergleichbar. Ein Unterschied in der Wirkung der Peptide auf die Zellen des Primärtumors beziehungsweise der Metastase konnte nicht ausgemacht werden. Die Proliferationssteigerung durch LL-20 und RK-20 konnte bei 60 B ebenfalls nachgewiesen werden.

Die Versuche wurden dreimal durchgeführt und alle Ergebnisse zeigten alle die gleiche Tendenz. Es konnten lediglich kleinere Unterschiede in der Proliferationseffizienz der Zellen festgestellt werden. Da es sich aber um Experimente an lebenden Zelllinien handelte, war dies zu erwarten. Die Zellen wurden alle bei einer Passagenzahl zwischen 1 und 20 genutzt und es war festzustellen, dass Zellen aus unterschiedlichen Passagen unterschiedlich proliferierten, weshalb auch die Kurven der unbehandelten Zellen aus Abbildung 14 A/B beziehungsweise C/D nicht exakt mit E/F beziehungsweise G/H übereinstimmen. Dass die Kultivierung von Zelllinien über mehrere Passagen einen Effekt auf die Zellen hat, wurde mittlerweile in mehreren Studien bewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es zu Änderungen des Proliferationsverhaltens, Proteinexpressionsmustern sowie Verhalten auf zugesetzte Substanzen kommt [Esquenet *et al.*, 1997; Chang-Liu *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 2004].

Im nächsten Schritt wurde die genauere Wirkung der modifizierten Peptide ebenfalls mit dem xCELLigence System untersucht (Abbildung 15).

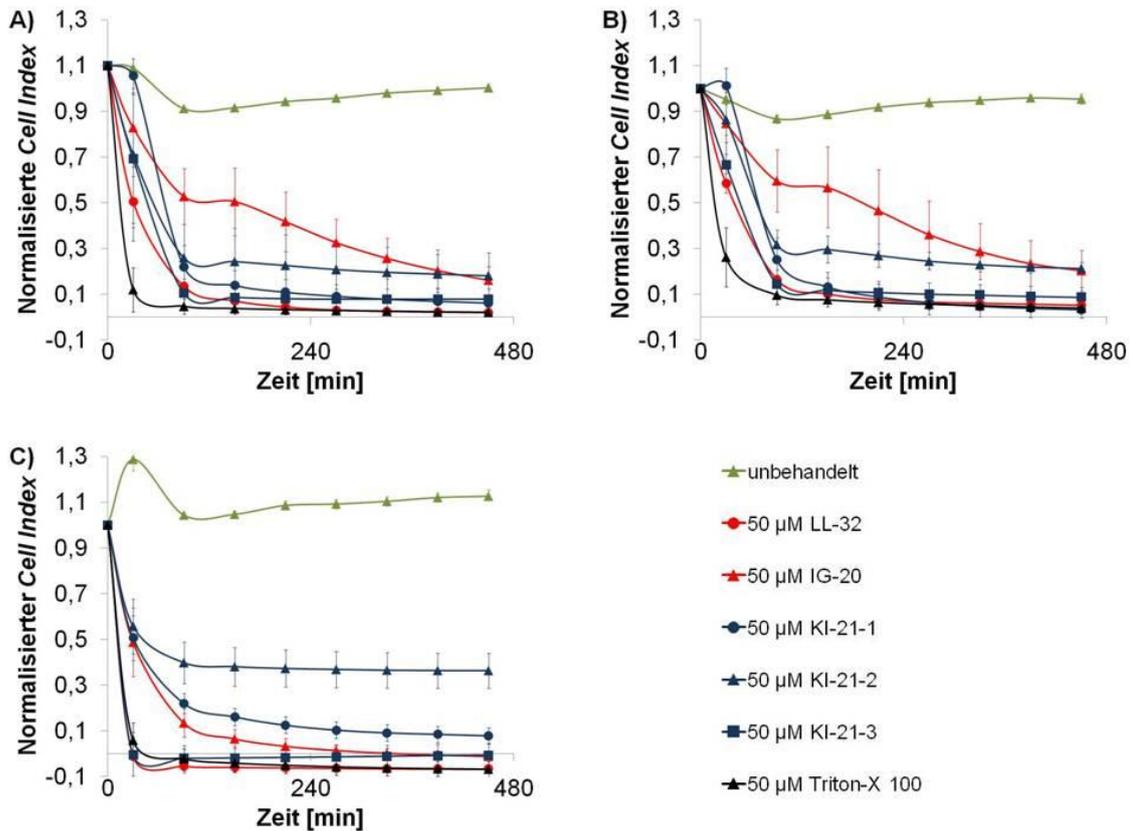


Abbildung 15: Vergleich der Wirkung der Peptide bei einer Konzentration von 50 µM. Peptide: LL-32 (rot, Kreis), IG-20 (rot, Dreieck), KI-21-1 (blau, Quadrat), KI-21-2 (blau, Dreieck), KI-21-3 (blau, Kreis). Die Kurven der unbeeidelter Zellen sind in türkis, die der Zellen mit 1 % Triton-X in schwarz dargestellt. Dabei wurden die Zelllinien UTSCC-60 A (A), UTSCC-60 B (B) sowie HNEpC (C) behandelt. Alle Peptide zeigen eine starke zytotoxische Aktivität gegen die dargestellten Zellen. Bei einer Konzentration von 50 µM der Peptide wurden fast 100 % der Zellen abgetötet.

In Abbildung 15 ist dargestellt, dass Konzentrationen von 50 µM der neu synthetisierten Peptide fast 100 % Zytotoxizität gegen die Zellen bewirken. Dabei wiesen einige Peptide schon nach rund 30 Minuten (LL-32 und KI-21-3) eine komplette Lyse der Zellen auf. Andere Peptide (IG-20) erreichten 100 % Zytotoxizität erst nach zehn bis zwölf Stunden. Die zytotoxische Aktivität gegen UTSCC-60 A und B zeigte dabei nur geringe Unterschiede. Die Wirksamkeit gegen die Primärkultur aus HNEpCs bei LL-32, KI-21-2 und -3 trat sogar noch deutlicher und schneller ein. KI-21-2 hatte im xCELLigence bei den Tumorzellen eine zytotoxische Wirkung von 100 %, bei den HNEpCs jedoch nur von etwa 50 bis 60 %.

3.3.4 Weitere Zelllinien

Um zu überprüfen, ob die Zytotoxizität gegen die Tumorzellen selektiv für HNSCC-Tumorzellen ist oder ob dieser Effekt auch bei anderen Tumorentitäten auftritt, wurden LDH-Assays mit HaCaT (immortalisierte Keratinozyten), HeLa-Zellen (Gebärmutterhalskrebs), SK-RC47 (Nierenkrebs), T24 (Blasenkrebs) sowie weiteren HNSCC-Zelllinien durchgeführt.

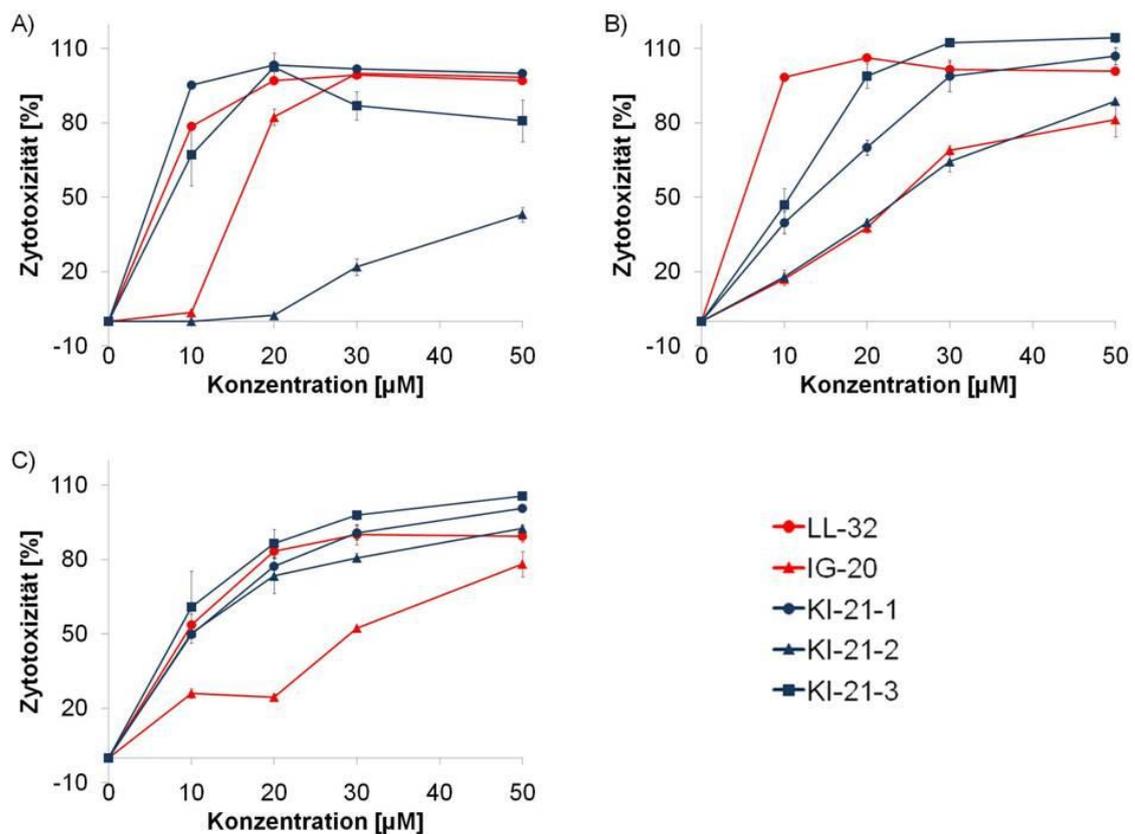


Abbildung 16: Zytotoxizitäts-Assay an Zelllinien anderer Tumorentitäten. Zelllinien: HaCaT (A), HeLa (B) und SK-RC47 (C). Darstellung der unterschiedlichen Peptide: LL-32: rot, Kreis; IG-20: rot, Dreieck; KI-21-1: blau, Viereck; KI-21-2: blau, Dreieck; KI-21-3: blau, Kreis. Die Zelllinien reagierten alle auf die Behandlung mit den Peptiden, wobei die Peptide unterschiedliche Aktivitäten aufzeigten.

Dabei war festzustellen, wie in Abbildung 16 dargestellt, dass alle Tumorzelllinien auf die Behandlung mit den Peptiden reagierten. Die Peptide wiesen aber eine unterschiedliche Aktivität gegen die Zellen auf. So wirkte KI-21-1 auf HaCaT am stärksten und KI-21-2 am schwächsten. Bei HeLa hingegen waren dies LL-32 mit der stärksten Aktivität und IG-20 sowie KI-21-2 mit der schwächsten Aktivität. Beim Nierenkarzinom SK-RC47 zeigte KI-21-3 den größten zytotoxischen Effekt, während IG-20 am schlechtesten wirkte. Gleiches

gilt auch für alle nicht dargestellten Zelllinien, die getestet wurden. Eine zytotoxische Aktivität der Peptide konnte immer nachgewiesen werden, die Wirksamkeit der einzelnen Peptide gegen die unterschiedlichen Zelllinien variierte jedoch.

3.3.5 Hämolysetest

In einem weiteren Test wurde das Hämolyse-Potential der Peptide getestet. Dafür wurden die Erythrozyten von fünf gesunden Spendern isoliert. Anschließend je 1×10^7 Zellen/well in einer 96 well-Platte ausgesät und mit den Peptiden für 1,5 Stunden behandelt. Die Hämolyse wurde dann durch Messung des Hämoglobins bei 540 nm im Medium bestimmt.

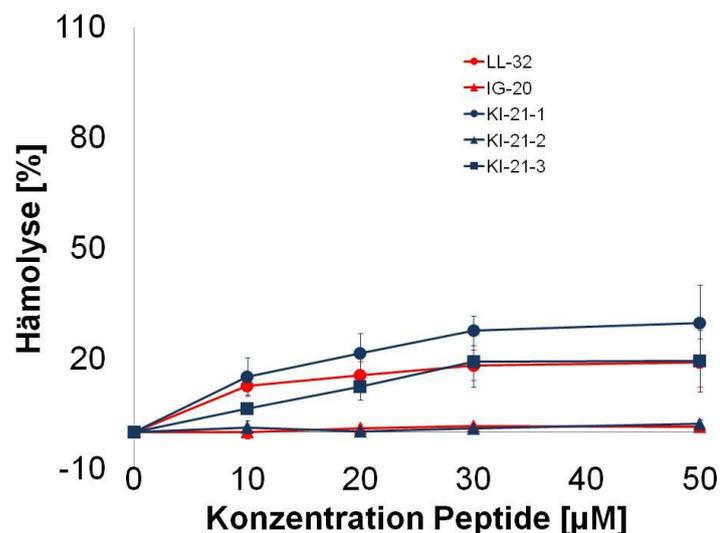


Abbildung 17: Hämolyse nach Behandlung von Erythrozyten mit den Peptiden LL-32, IG-20, KI-21-1, -2 und -3. Darstellung der unterschiedlichen Peptide: LL-32: rot, Kreis; IG-20: rot, Dreieck; KI-21-1: blau, Viereck; KI-21-2: blau, Dreieck; KI-21-3: blau, Kreis. KI-21-2 und IG-20 zeigen fast keine hämolytische Aktivität, während die anderen drei Peptide bei einer Konzentration von 50 μM bis zu 30 % Hämolyse bewirkten.

In Abbildung 17 ist das Ergebnis aus der Hämolyse bei den fünf Spendern dargestellt. Dabei handelt es sich um Mittelwerte aus fünf Einzelversuchen mit je vier Messwerten. IG-20 und KI-21-2 wiesen auch bei einer Konzentration von 50 μM keine hämolytische Aktivität auf. Dahingegen trat bei den Peptiden LL-32, KI-21-1 und -3 eine Hämolyse von bis zu 30 % bei einer Konzentration von 50 μM auf.

3.3.6 Vorbehandlung der Zellen mit Magnesiumchlorid

Da aus der Literatur bekannt ist, dass die Vorbehandlung von Bakterien mit Magnesium zu einer reduzierten Wirksamkeit von Antimikrobiellen Peptiden führen kann, sollte dieser Effekt auch bei den Tumorzellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit 5 nM $MgCl_2$ für 24 Stunden vorinkubiert, bevor die Zugabe der Peptide erfolgte und ein LDH-Assay durchgeführt wurde.

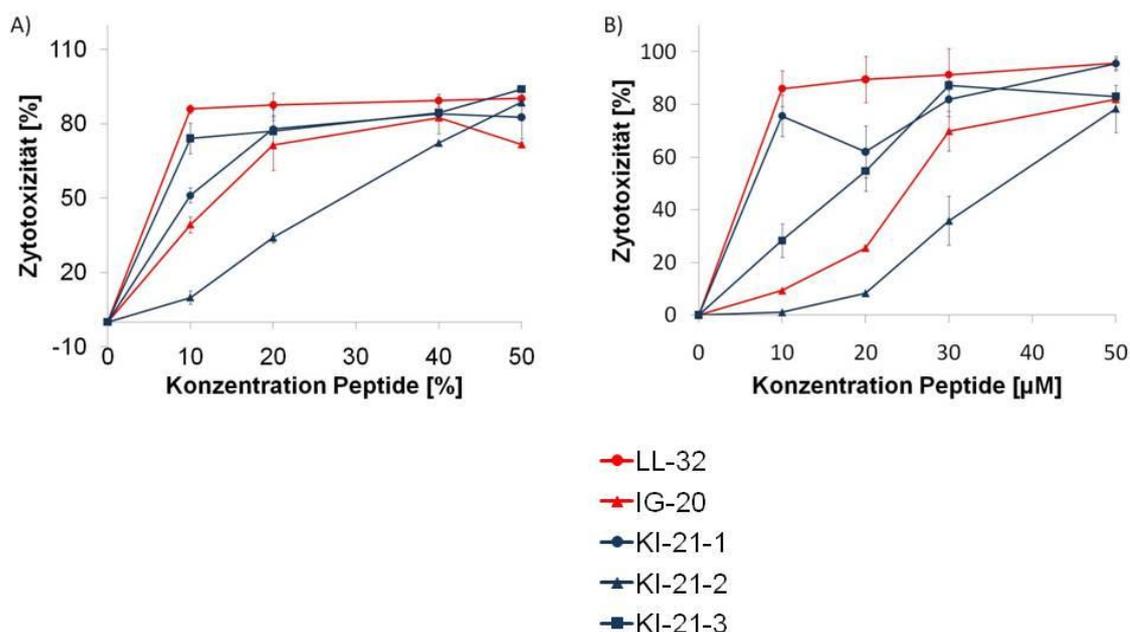


Abbildung 18: Einfluss von Magnesiumchlorid auf die Zytotoxizität der Peptide. LDH-Assay nach Vorbehandlung der Zellen UTSCC-60 A (A) ohne und (B) mit 5 mM Magnesiumchlorid für 24 h. Darstellung der unterschiedlichen Peptide: LL-32: rot, Kreis; IG-20: rot, Dreieck; KI-21-1: blau, Viereck; KI-21-2: blau, Dreieck; KI-21-3: blau, Kreis. Die Vorbehandlung hatte keinen Einfluss auf die Zugabe von LL-32. Die zytotoxische Aktivität der anderen Peptide wurde positiv (KI-21-1) beziehungsweise negativ (KI-21-2, -3 und IG-20) beeinflusst.

In Abbildung 18 sind die Graphen der LDH-Assays mit und ohne Vorinkubation mit Magnesiumchlorid dargestellt. Dabei konnte ermittelt werden, dass die Vorbehandlung keinen Effekt auf LL-32 hat. Allerdings wurde die Zytotoxizität der anderen Peptide beeinflusst. KI-21-2 und -3 sowie IG-20 zeigten in den niedrigen Konzentrationen eine geringere Aktivität. Allerdings wurde bei 50 µM eine ähnliche Effektivität gegen die Tumorzellen erzielt. Die Aktivität von KI-21-1 schien durch die Zugabe von $MgCl_2$ gefördert zu werden.

3.4 Wirkung der Peptide

3.4.1 Bindung der Peptide an die Zellmembran

Um die Bindung der Peptide an die Zellmembran zu untersuchen, wurde mit NBD markiertes LL-32 in einer Konzentration von etwa 2 μM zu den Zellen UTSCC-60 A, -B sowie HNEpC pipettiert und nach 16 Stunden unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet. Die Zellmembran wurde mittels rot-markiertem WGA (Weizenkeimagglutinin) in rot dargestellt und der Kern durch DAPI blau gefärbt.

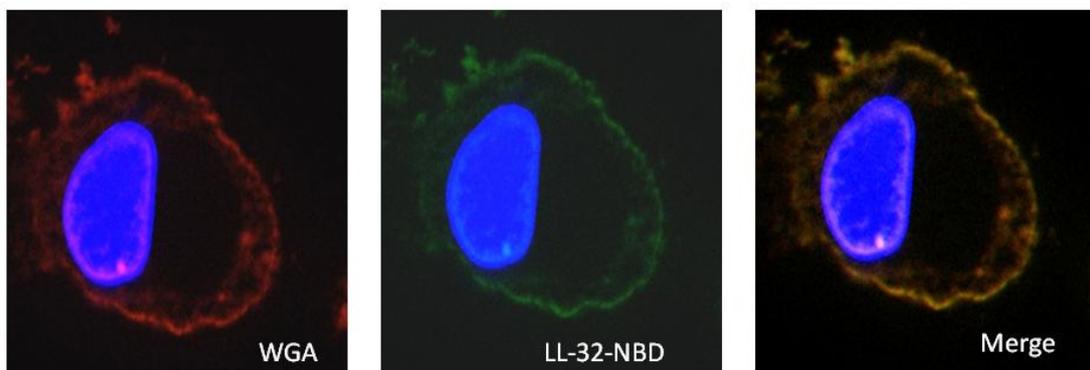


Abbildung 19: Konfokale Aufnahme einer Zelle der Linie UTSCC-60 A nach Behandlung mit LL-32-NBD. In rot ist durch WGA die Zellmembran dargestellt, LL-32 ist durch NBD grün markiert. Der Zellkern wurde mittels DAPI gefärbt. Deutlich ist die Bindung von LL-32 an die Zellmembran zu sehen.

In Abbildung 19 ist eindeutig zu sehen, dass die grüne Fluoreszenz genau an der Zellmembran auftritt, was dafür spricht, dass sich das Peptid LL-32-NBD an der Zellmembran von UTSCC-60 A anlagerte. Weitere Aufnahmen ließen erkennen, dass die grüne Fluoreszenz nicht nur an der Zellmembran zum Vorschein kommt, sondern die Fluoreszenz auch rund um den Kern zu sehen ist (Abbildung 20). Dies deutet darauf hin, dass LL-32-NBD nicht nur an der Zellmembran, sondern anschließend auch an der Kernmembran anlagerte. Dargestellt sind in Abbildung 19 und 20 die Zelllinie UTSCC-60 A. Alle Versuche wurden aber ebenfalls an UTSCC-60 B sowie HNEpC (Daten nicht gezeigt) durchgeführt, wobei die Ergebnisse ähnlich dem von UTSCC-60 A waren.

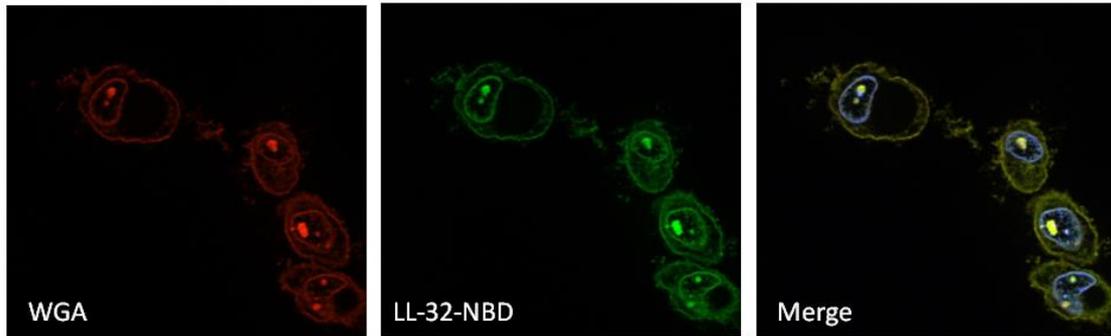


Abbildung 20: Bindung von LL-32-NBD an der Zellkernmembran. Konfokale Aufnahme einer Zelle der Linie UTSCC-60 A. In rot ist durch WGA die Zellmembran dargestellt, LL-32 ist durch NBD grün markiert, der Zellkern ist durch DAPI in blau dargestellt. LL-32 lagert sich nicht nur an die Zellmembran, sondern auch an die Kernmembran an.

3.4.2 Human Apoptosis Antibody Array

Mit Hilfe des *Proteom-Profiler-Arrays* von R&D Systems sollte die Hochregulation von typischen Apoptoseproteinen in behandelten Zellen (Abbildung 21) untersucht werden. Dazu wurden Zellen mit 30 μM LL-32 behandelt und anschließend ein Proteinlysat hergestellt. Als Kontrolle diente ein Lysat von unbehandelten Zellen. Nach Inkubation der Membranen mit den Proteinlysaten konnten die Membranen nach Angaben des Herstellers entwickelt werden.

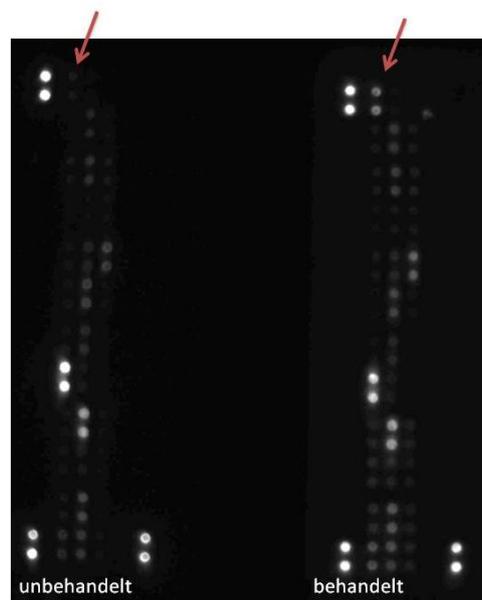


Abbildung 21: Ergebnis des Human Apoptosis Antibody Array. Im Array sind unbehandelte Zellen UTSCC-60 A und mit 30 μM LL-32 behandelte Zellen dargestellt. Dabei sind vor allem die mit den roten Pfeilen markierten Spots (Cytochrom C) nach der Behandlung hochreguliert.

Nach der Behandlung mit LL-32 waren vor allem die beiden Spots von Cytochrom C hoch reguliert (Abbildung 21). Cytochrom C gehört zur Familie der Cytochrome, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist und dort bei der oxidativen Phosphorylierung eine entscheidende Rolle als Elektronencarrier übernimmt. Nach Beschädigung von Mitochondrien wird Cytochrom C über die äußere Membran ins Zytoplasma der Zellen abgegeben. Im Zytosol führt Cytochrom C über eine Signalkaskade zum programmierten Zelltod.

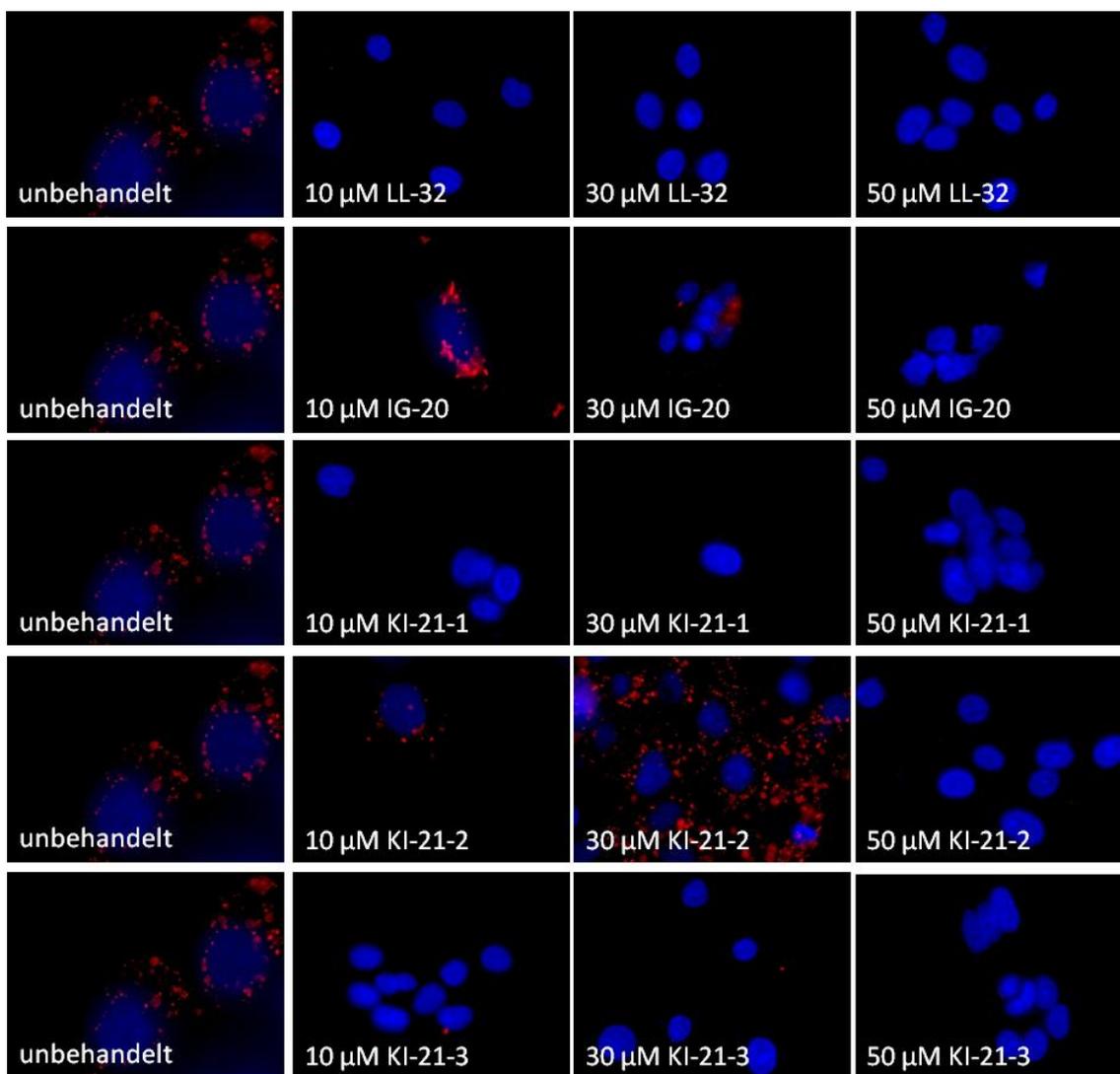
3.4.3 MitoCaptureTM Mitochondrial Apoptosis Detection Kit

Um die Wirkung der Behandlung auf die Mitochondrien der Zellen genauer darstellen zu können, wurde das *MitoCaptureTM Mitochondrial Apoptosis Detection Kit* von BioCaT angewendet. Die Zellen werden dabei auf *ChamberSlides* kultiviert und nach der Peptid-Behandlung mit dem *Mitocapture-Kit* angefärbt. Dabei erscheinen nach der Färbung voll funktionsfähige Mitochondrien in rot. Sind die Mitochondrien degradiert, verbleibt der Farbstoff im Cytoplasma und färbt dieses grün. Aufgrund der inhomogenen Grünfärbung und nach Rücksprache mit dem Hersteller wird auf die Darstellung der grünen Fluoreszenz verzichtet. Die Aussage ist allein durch die Reduktion der roten Fluoreszenz schon eindeutig. Die Bilder wurden alle mit der gleichen Vergrößerung aufgenommen, zur Verdeutlichung der Färbung wurden die Bilder der unbehandelten Zellen aber als Bildausschnitt noch einmal vergrößert.

Wie in Abbildung 22 zu sehen, wirkt sich die Behandlung der Zellen auf die Mitochondrien aus. Selbst in geringen Konzentrationen waren nach der Behandlung signifikante Reduktionen der Mitochondrien festzustellen. Dabei zeigen bis auf 10 μM IG-20 sowie 10 μM und 30 μM KI-21-2 bei der Tumorzelllinie alle anderen Peptiden in allen Konzentrationen eine Mitochondriendegradation. Vergleiche zwischen der Tumorzelle UTSCC-60 A und den HNEpC-Zellen belegen, dass die Peptide bei beiden Zellarten zum Abbau der Mitochondrien führen. Während jedoch 30 μM KI-21-2 bei den Tumorzellen noch keine Reduktion der Mitochondrien zeigt, sind bei den gesunden Epithelzellen die Mitochondrien schon degradiert.

Die Färbungen wurden ebenfalls an der Zelllinie UTSCC-60 B durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei bestätigten sich die Ergebnisse, die mit der Zelllinie UTSCC-60 A erhalten wurden.

A)



B)

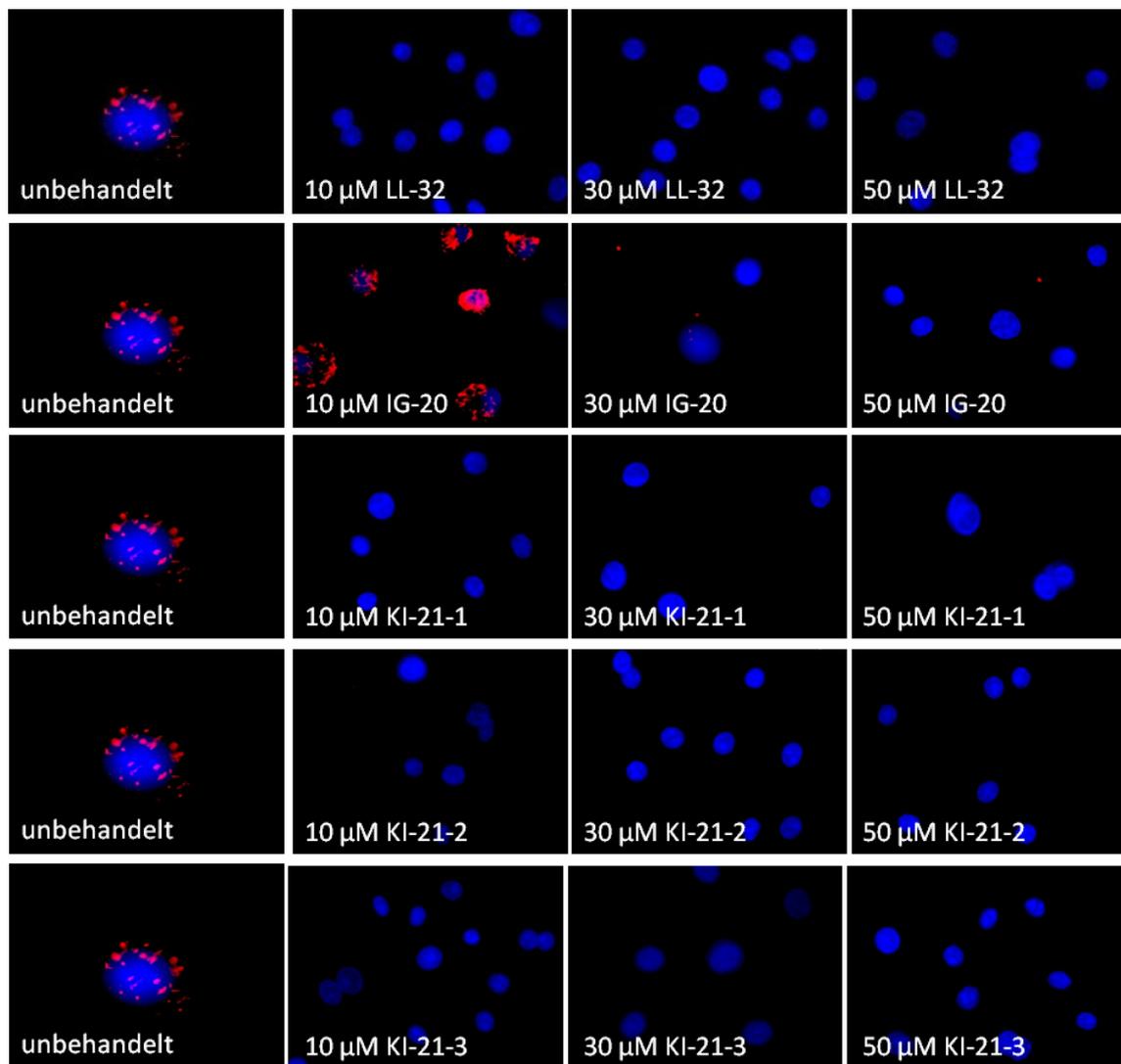


Abbildung 22: Mitocapture-Färbung an den Zelllinien UTSCC-60 A (A) und HNEpC (B). Dabei sind die Kerne der Zellen durch DAPI in blau, die Mitochondrien in rot dargestellt. Deutlich ist die Abnahme der Mitochondrien in den Zellen nach der Behandlung zu sehen.

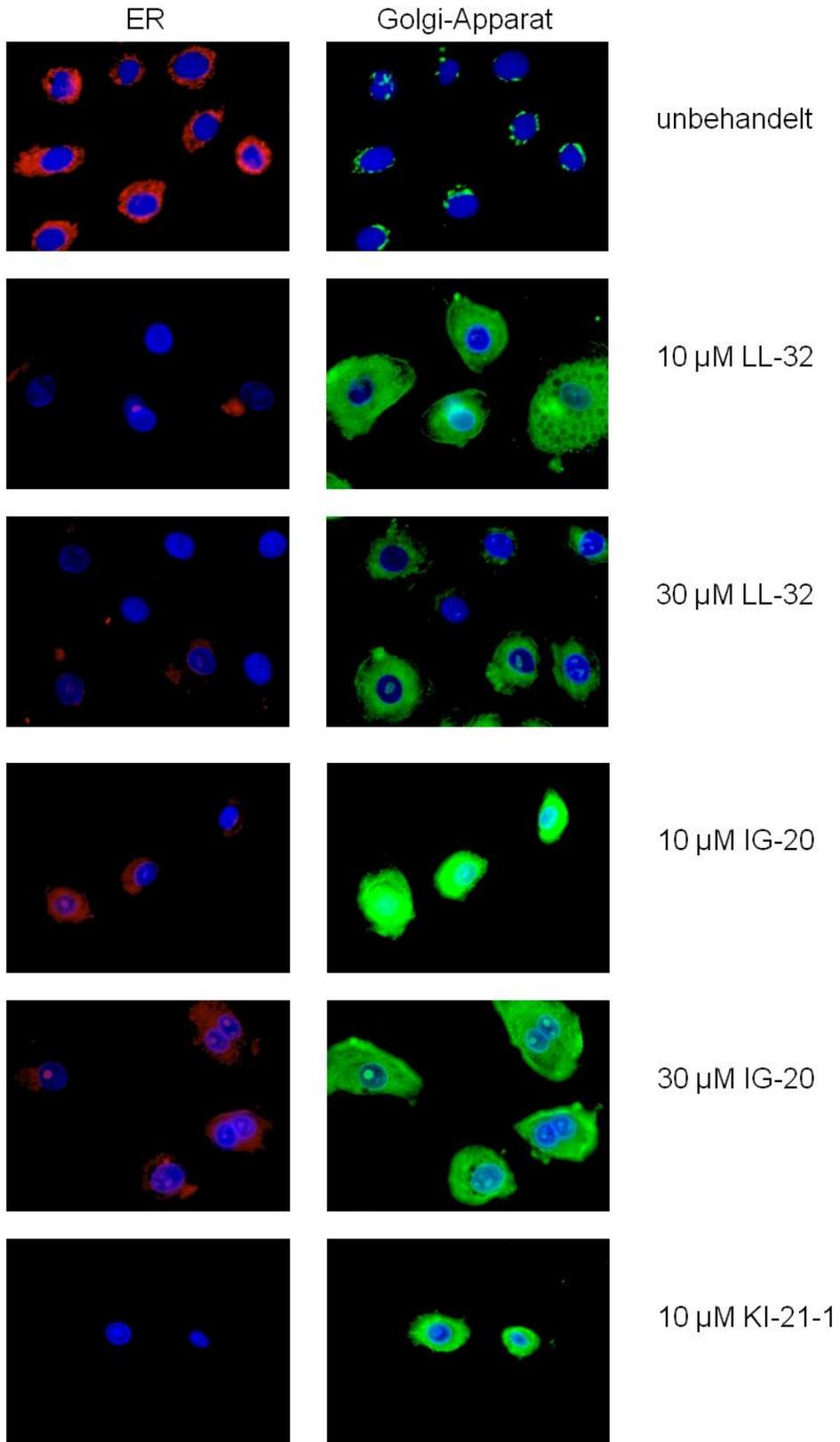
3.4.4 Organelle-ID™ RGB reagent III

Nachdem die Degradierung der Mitochondrien in den Zellen durch das *Mitocapture-Kit* dargestellt wurde, sollte im nächsten Schritt der Einfluss der Behandlung auf die Organellen wie Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum untersucht werden.

In Abbildung 23 sind die Färbungen der HNEpC-Zellen mit dem *Organelle-ID™ RGB reagent III* dargestellt. Dabei werden Kerne blau, Golgi-Apparat grün und das Endoplasmatische Retikulum rot angefärbt. Es lässt sich festhalten, dass es zu einer

Abnahme der roten Fluoreszenz und damit zur Abnahme von Endoplasmatischem Retikulum kommt, während es zu einer signifikanten Zunahme der grünen Fluoreszenz und damit zu einer starken Erhöhung von Anzahl und Volumen des Golgi-Apparats kommt. Durch die starke Zunahme des Golgi-Apparats vergrößerte sich ebenfalls das Zelllumen. Daher waren die behandelten Zellen deutlich größer als die unbehandelten Zellen.

Die Färbung wurde sowohl an den Tumorzellen UTSCC-60 A und B (Daten nicht gezeigt) als auch an den gesunden HNEpC-Zellen durchgeführt. In der Abbildung wurde auf die Darstellung der Tumorzellen verzichtet. Die Daten belegen aber, dass die Tumorzellen ebenfalls keinerlei rote Fluoreszenz aufwiesen, die grüne Fluoreszenz jedoch stark erhöht war.



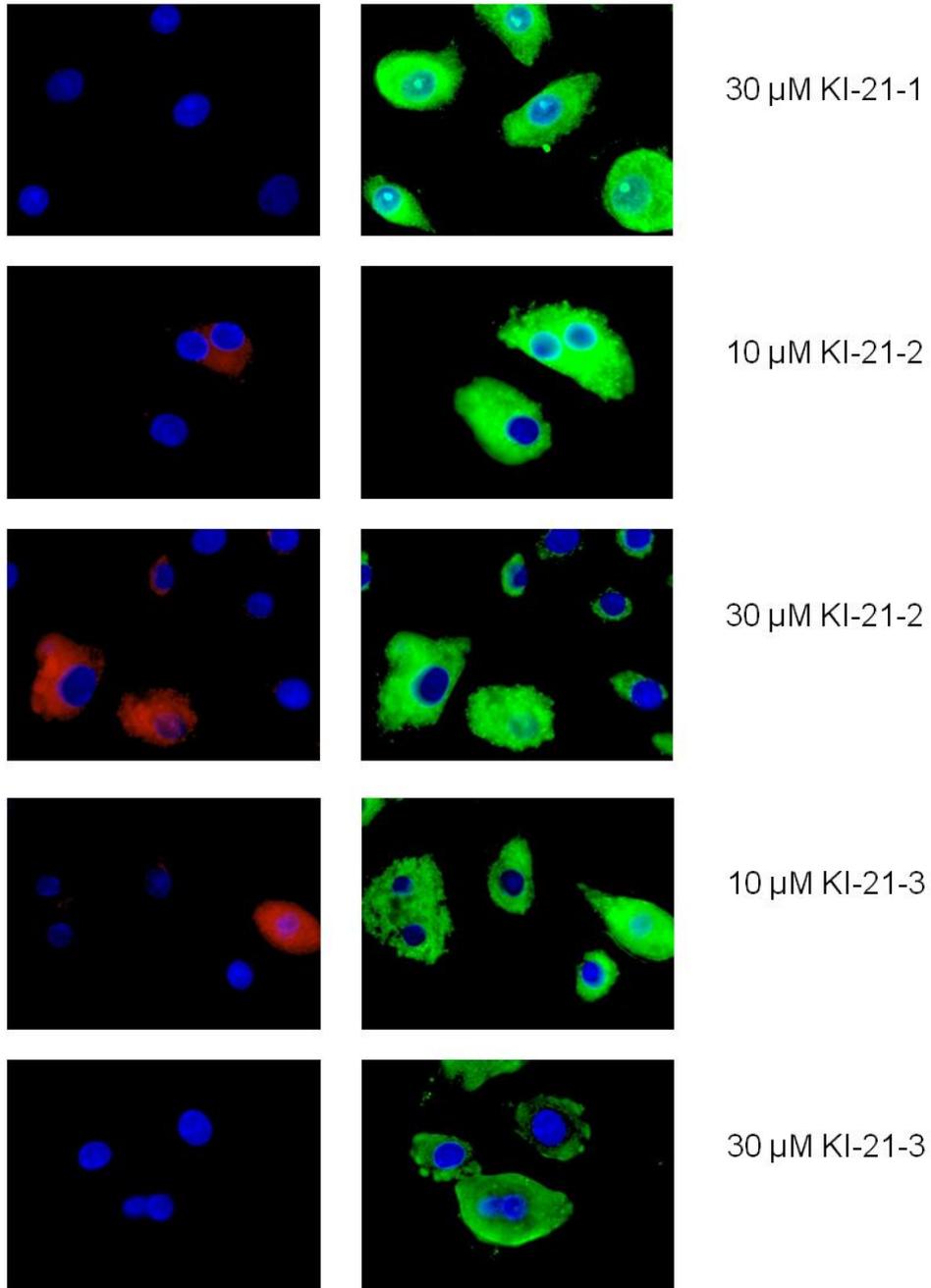
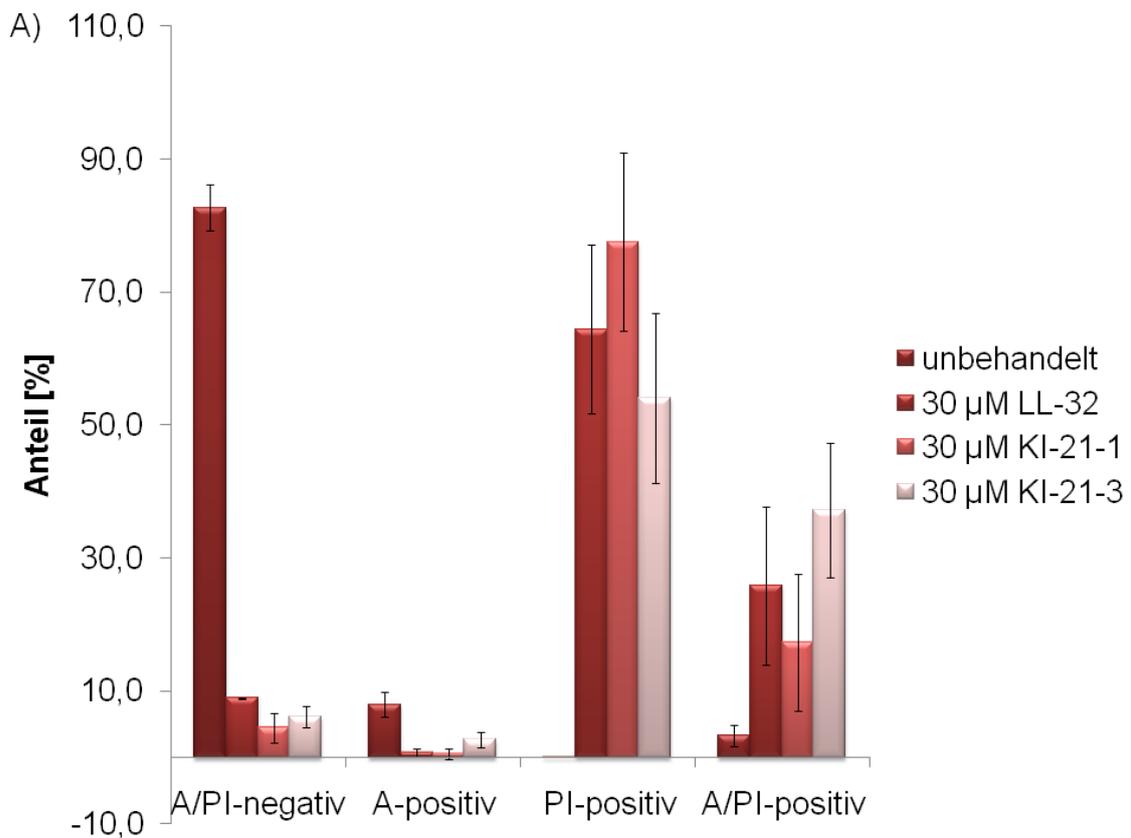


Abbildung 23: Organellen-Färbung bei der Primärkultur HNEpC. Kerne sind blau, Golgi-Apparat grün und Endoplasmatischen Retikulum rot gefärbt. Während die rote Fluoreszenz nach der Behandlung der Zellen abnahm, kam es zu einer signifikanten Erhöhung der grünen Fluoreszenz. Die Zellen wiesen damit eine Reduktion des Endoplasmatischen Retikulums und eine Zunahme des Golgi Apparats auf. Die Zunahme von Zahl und Volumen des Golgi-Apparats führte auch zu einer Vergrößerung der Zelle.

3.4.5 FACS-Analysen

Durch eine Färbung von behandelten Zellen mit Annexin-V und Propidiumjodid (PI) sollte der Wirkmechanismus nach Behandlung der Zellen aufgeklärt werden. Dabei bindet Annexin-V bei apoptotischen Zellen an das auf der äußeren Zellmembran exprimierte Phosphatidylserin. Bei nekrotischen Zellen gelangt PI durch die zerstörte Zellmembran in das Innere der Zelle. Somit können Apoptose und Nekrose unterschieden werden.



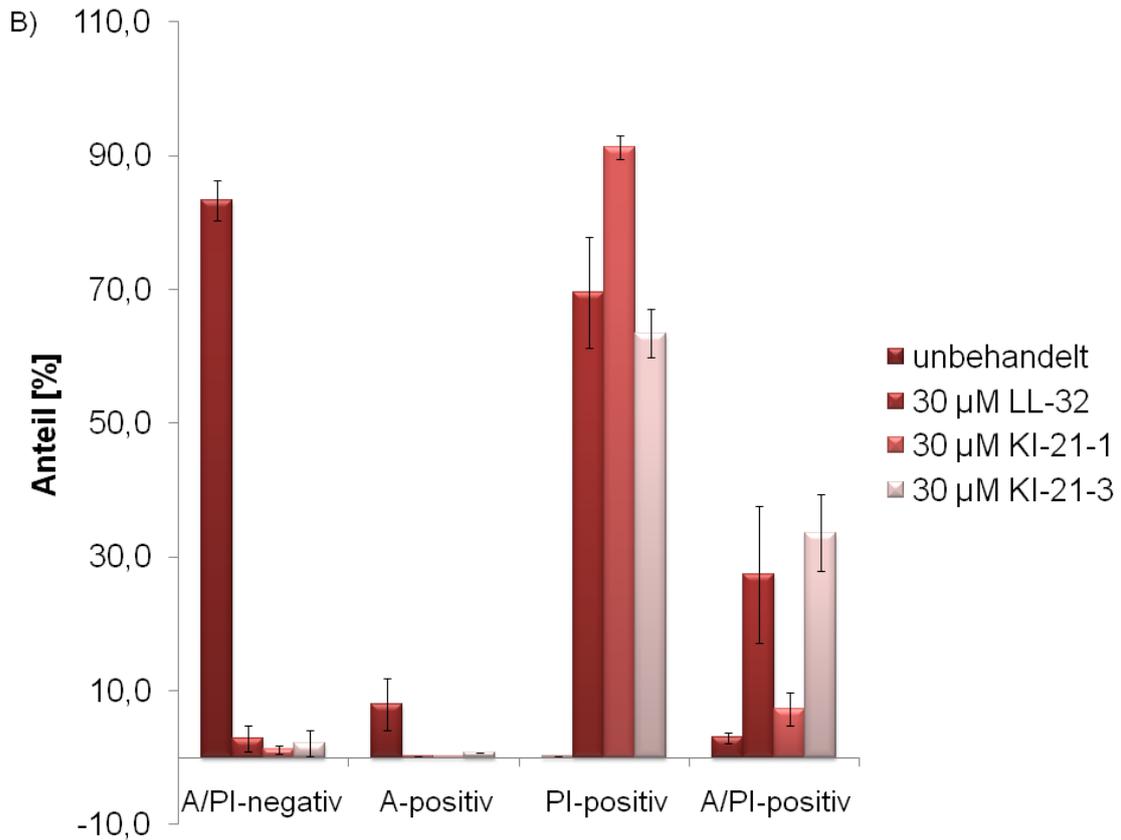


Abbildung 24: FACS-Analyse zur Wirkung der Peptide. Dargestellt sind LL-32 (rot), KI-21-1 (blau) und KI-21-3 (braun). Sowohl bei der Zelllinie UTSCC 60 A als auch bei 60 B nahm nach der Behandlung der Anteil an PI-positiven Zellen zu (A = Annexin V, PI = Propidiumjodid).

Wie in Abbildung 24 dargestellt, kommt es nach der Behandlung mit den Peptiden LL-32, KI-21-1 und -3 zu einer Zunahme der PI-positiven Zellpopulation. Der Anteil der lebenden Zellen (A/PI-negativ) nimmt signifikant ab. Es ist nur eine kleine Annexin-positive Population messbar. Allerdings tritt ein geringer Anteil an Annexin und PI-positiven Zellen auf, welche in der Zellkultur als sekundär nekrotische Zellen bezeichnet werden. Diese entstehen, wenn die Membran der nekrotischen Zellen derart durchlässig ist, dass Annexin in die Zelle eindringen kann und an der Membrannenseite an Phosphatidylserin bindet. Die Peptide IG-20 und KI-21-2 (Daten nicht gezeigt) wirken in schwächerem Maße auf die Zellen.

3.4.6 Proliferationsmarker KI-67

Da im xCELLigence bei den Peptiden LL-20 und RK-20 eine vermehrte Proliferation der Zellen zu beobachten war, sollte durch eine immunhistologische Färbung mit KI-67, einem Proliferationsmarker, das Ergebnis bestätigt werden. KI-67 ist ein Marker für die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation. In der G_0 -Phase ruhender Zellen ist das Protein nicht in der Zelle vorhanden, während es in den aktiven Phasen des Zellzyklus hochreguliert wird. Die Zellen wurden auf *ChamberSlides* kultiviert und anschließend mit 50 μ M LL-20 oder 50 μ M RK-20 behandelt. Danach erfolgte die immunhistologische Färbung des Markers KI-67.

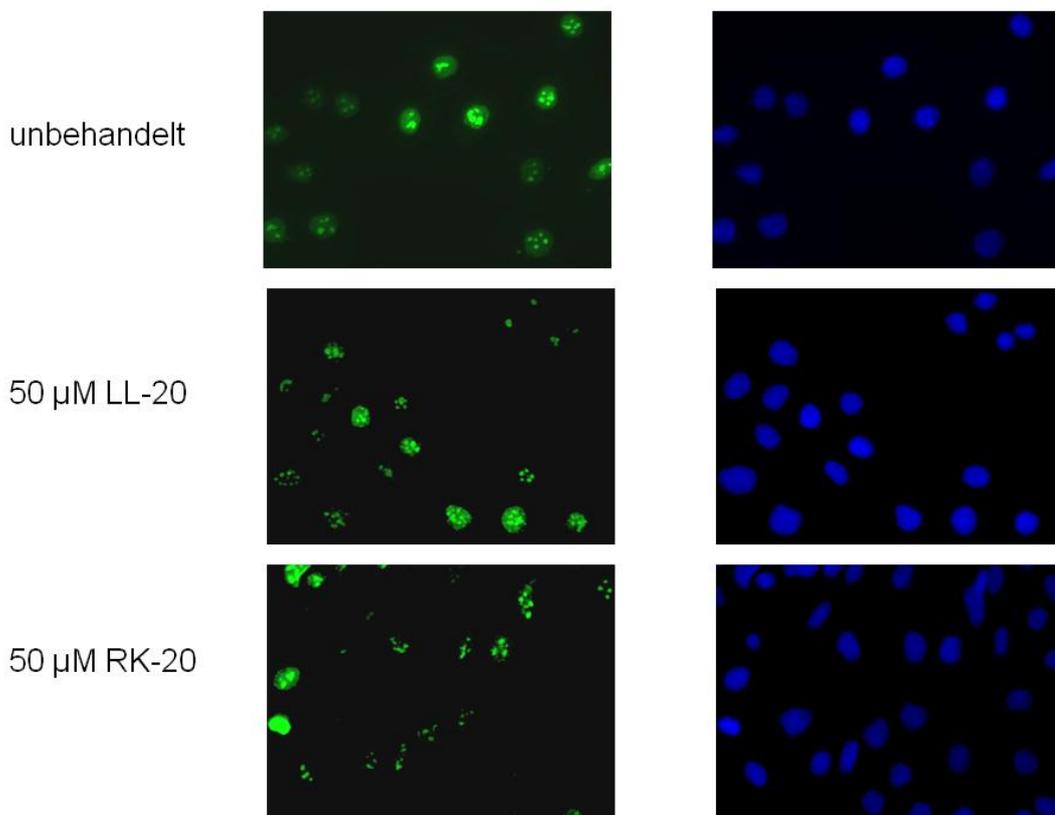


Abbildung 25: Färbung des Proliferationsmarkers KI-67 nach der Behandlung mit 50 μ M LL-20 und RK-20 bei UTSCC-60 A. KI-67 ist mittels sekundärem Antikörper in grün (Cy2) dargestellt. Die Kerne wurden mittels DAPI blau gefärbt. Dabei war bei der Zelllinie UTSCC-60 A deutlich eine vermehrte Expression von KI-67 nach Behandlung mit 50 μ M LL-20 oder 50 μ M RK-20 zu sehen.

Die Darstellung in Abbildung 25 zeigt die KI-67-Färbung nach der Behandlung der Zelllinie UTSCC-60 A. Dabei ist zu beobachten, dass bei der Behandlung mit 50 μ M LL-20 oder RK-20 kein Unterschied zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen

vorliegt. Das Auszählen von zehn Sichtfeldern (Abbildung 26) ergab, dass etwa 70 bis 90 % der Zellen KI-67 positiv sind, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Zellen ermittelt werden konnte.

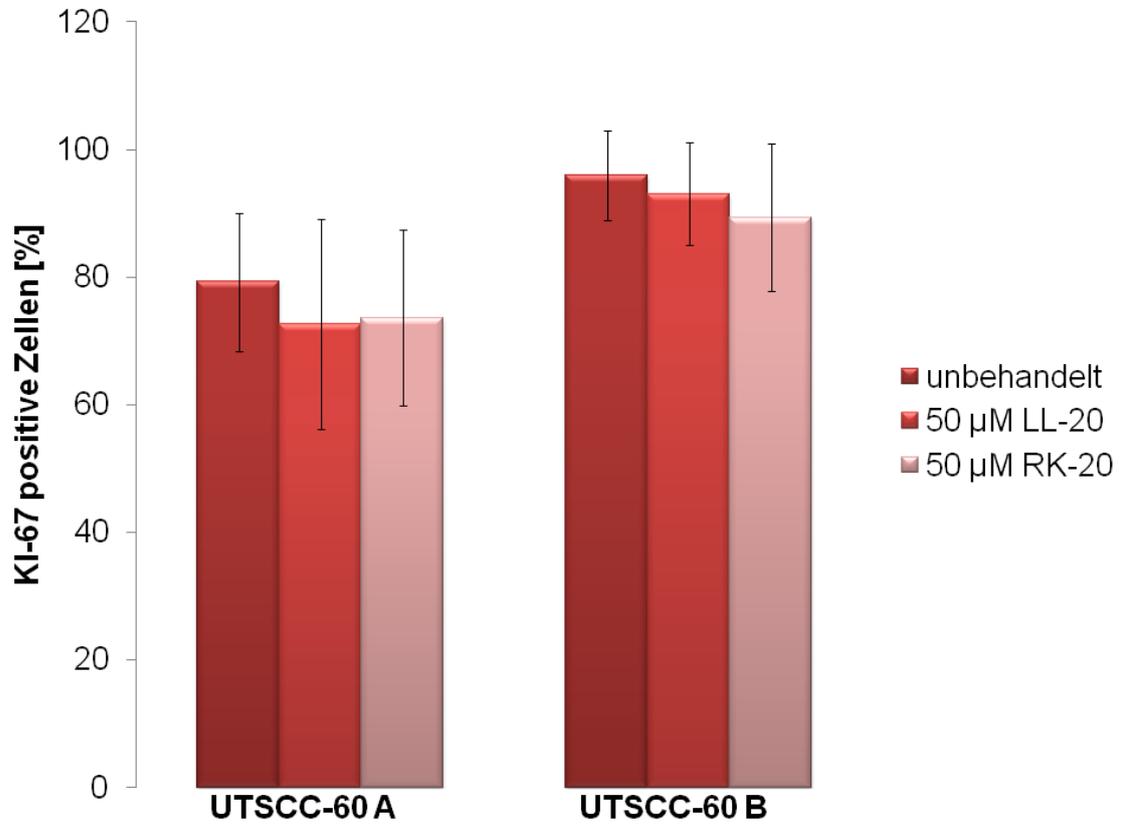


Abbildung 26: Mittelwerte aus zehn Sichtfeldern einer KI-67-Färbung nach Behandlung mit LL-20 und RK-20. Die Auszählung ergab, dass keine signifikante Änderung der Expression des Proliferationsmarkers KI-67 festzustellen war.

4. Diskussion

Da die Kopf-Hals-Tumoren weltweit an sechster Stelle neu auftretender Neoplasien stehen, ist es notwendig, die aktuellen Therapiemöglichkeiten weiter zu entwickeln. Zur Standardtherapie bei HNSCC zählen je nach Gesundheitszustand des Patienten die chirurgische Entfernung des Tumors, die Chemo- und/oder Strahlentherapie. Doch durch die anhaltend schlechten Prognosen bei Kopf-Hals-Karzinomen gibt es immer neue alternative Therapieansätze wie zum Beispiel Immuntherapie, DNA-Impfstoffe, monoklonale Antikörper sowie Zytokine [Agada *et al.*, 2009].

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind natürlich vorkommende Antibiotika des Körpers und gehören damit zum angeborenen Immunsystem. Neben der Wirkung der AMPs gegen die unterschiedlichsten Mikroorganismen wurde als weitere Wirkung der AMPs eine direkte Zytotoxizität gegen Krebszellen festgestellt [Ohtake *et al.*, 1999; Ohsaki *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 1993; Jacob *et al.*, 1994; Winder *et al.*, 1998]. Dabei können die kationischen Peptide in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe wirkt gegen Bakterien und Krebszellen nicht jedoch gegen gesunde Zellen. Die zweite Gruppe zeigt zudem eine zytotoxische Aktivität gegen gesunde Zellen. Zur zweiten Gruppe wird auch LL-37 zugeordnet [Papo *et al.*, 2005]. Für das humane Cathelicidin zeigen neueste Untersuchungen, dass Fragmente von LL-37 nicht nur Bakterien abtöten, sondern auch effektiv gegen Krebszellen wirken. Für diese Wirkung scheint vor allem der C-terminale Anteil verantwortlich zu sein [Li *et al.*, 2006 a]. Dabei könnte die Bindung von LL-37 an die Zellmembran der Krebszellen auf die erhöhte Expression von anionischem Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche von Krebszellen [Schröder-Borm *et al.*, 2005] zurückgeführt werden.

4.1 Die Zytotoxizität der Peptide

Es ist bekannt, dass α -Defensine und kationische AMPs wie BMAP-27 (*bovine myeloid antimicrobial peptide-27*) oder BMAP-28 (*bovine myeloid antimicrobial peptide-27*) Apoptose in Tumorzelllinien und Bakterien auslösen [Risso *et al.*, 1998; Risso *et al.*, 2002; Aarbiou *et al.*, 2002]. Die antitumoralen Effekte des humanen Cathelicidins gegen HNSCC-Zellen konnten ebenfalls gezeigt werden [Okumura *et al.*, 2004]. Okumura *et al.*

beschrieben 2004 die zytotoxische Aktivität eines Fragments von LL-37, welches um die ersten und letzten fünf Aminosäuren verkürzt ist. Sie konnten nachweisen, dass eine starke zytotoxische Aktivität gegen SAS-H1 Zellen, eine invasive HNSCC-Zelllinie, erzielt werden kann. Als Kontrolle dienten humane Fibroblasten des Zahnfleisches (HGF) und die humane Keratinozytenzelllinie HaCaT. Sowohl die HGF-Zellen als auch die HaCaT-Zellen wurden nicht beeinflusst, sodass Okumura *et al.* das Peptid hCAP18₁₀₉₋₁₃₅ als neues Antitumoragens postulieren [Okumura *et al.*, 2004].

Die zytotoxischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Peptide LL-32 und IG-20 sowohl gegen die HNSCC-Tumorzelllinien UTSCC-60 A (Primärtumor) als auch gegen UTSCC-60 B (Metastase) wirken. Allerdings werden die gesunden HNEpC-Zellen sogar in noch stärkerem Maße abgetötet. Die Peptide RK-20 und LL-20 weisen keinen Effekt auf die untersuchten Zelllinien auf. Weitergehende Untersuchungen mittels Impedanzmessung im xCELLigence entschlüsseln, dass die Wirkung der Peptide schon in den ersten 30 bis 60 Minuten nach Zugabe eintritt. Im Gegensatz zu Okumura *et al.* zeigen die in dieser Arbeit eingesetzten Peptide sowohl eine Wirkung gegen Tumorzellen als auch gesunde Zellen und bestätigen so die Ergebnisse von Papo *et al.*, dass LL-37 der Gruppe der Peptide zuzuordnen ist, die sowohl eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen und gesunde Zellen haben [Papo *et al.*, 2005]. Diese unterschiedlichen Wirkungen auf gesunde Zellen können damit begründet werden, dass in den Arbeiten unterschiedliche Fragmente von LL-37 getestet wurden. Allerdings ist es auch möglich, dass dies auf die unterschiedlichen Zellen zurückgeführt werden kann, die als gesunde Kontrollen eingesetzt wurden. In dieser Arbeit wurden HNEpC-Zellen, primäre nasale Epithelzellen gesunder Spender, die sich nur über etwa 15 Generationen kultivieren lassen, genutzt. Okumura *et al.* arbeiteten mit HGF-Zellen, humanen Fibroblasten des Zahnfleisches. Dies könnte darauf hindeuten, dass Epithelzellen von den Peptiden abgetötet werden, der Effekt aber nicht gegen Fibroblasten eintritt. Die Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs sind zu 90 % Plattenepithelkarzinome [Hardisson, 2003], die in der Nase und Nasennebenhöhle, Pharynx, Larynx oder Mundhöhle vorkommen [Chin *et al.*, 2004]. Da Plattenepithelkarzinome durch entartete Epithelzellen entstehen, scheinen gesunde Epithelzellen eine geeignetere Kontrolle zu sein. Allerdings muss bedacht werden, dass die Zellen im Gewebe alle im Verband vorliegen und somit nicht isoliert betrachtet werden können.

Nachdem Okumura *et al.* das Peptid hCAP18₁₀₉₋₁₃₅ als neues Antitumoragens postulierten [Okumura *et al.*, 2004], sollten weitere Peptidfragmente untersucht werden, die einen zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen, nicht jedoch auf gesunde Zellen, aufweisen.

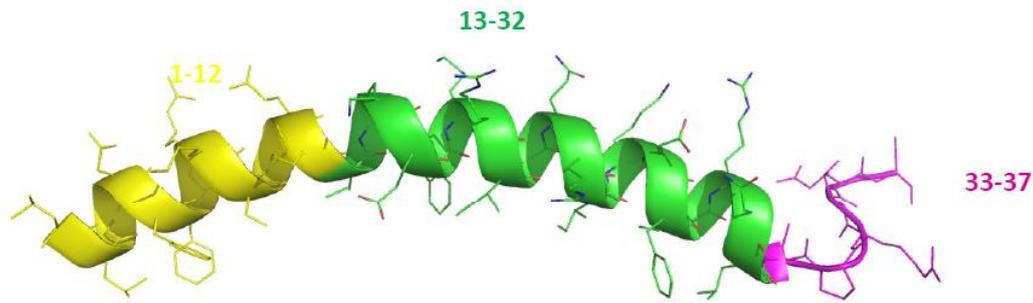


Abbildung 27: NMR-Darstellung von LL-37 (PDB ID: 2K6O) [Wang, 2008].

In Abbildung 27 ist das humane Cathelicidin LL-37 dargestellt [Wang, 2008]. Die Aminosäuren 1-12 (gelb) sind für den antibakteriellen oder antitumoralen Effekt nicht essentiell. Diese Aminosäuren sind in Chemotaxis, Peptidoligomerisierung, proteolytische Resistenz und hämolytische Aktivität involviert [Braff *et al.*, 2005; Oren *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1998]. Das C-terminale Ende des Peptids (Aminosäuren 33-37, magenta) ist ungeordnet und für die Bildung von Tetrameren bei einem physiologischen pH wichtig [Li *et al.*, 2006 b]. Der mittlere Bereich (Aminosäuren 13-32, grün) wurde in zahlreichen Studien als die antimikrobielle und antitumorale Region identifiziert [Li *et al.*, 2006 a; Braff *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Nell *et al.*, 2006; Sigurdardottir *et al.*, 2006]. Als kleinste antibakterielle Einheit, die jedoch keine zytotoxische Aktivität gegen humane Zellen aufweist, wird KR-12 (LL-37₁₈₋₂₉) beschrieben [Li *et al.*, 2006 a; Wang, 2008]. Wichtig für die Wirkung der Peptide scheint die Formung einer amphipatischen Helix zwischen den Aminosäuren 20-28 zu sein, die reich an kationischen Seitenketten ist [Wang, 2008]. Das Peptid RI-10 (LL-37₁₇₋₂₇) ist inaktiv, was auf die fehlenden Aminosäuren L₂₈ und R₂₉ zurückgeführt werden kann, wodurch ein hydrophobes Cluster zerstört wird [Wang, 2008]. KI-12 scheint antibakteriell zu sein, aber aufgrund eines fehlenden Phenylalanins an Position 17 ist es nicht toxisch für humane Zellen. Wang *et al.* konnten weiterhin nachweisen, dass für die Bindung von LL-37 an Mizellen vier Phenylalaninreste (F₄, F₅, F₁₇ und F₂₇) wichtig sind (Abbildung 28). Für die Bindung an Membranen scheint dabei vor allem F₂₇ von Bedeutung zu sein, da dies in Homologen des Cathelicidins hoch konserviert ist [Wang, 2008].

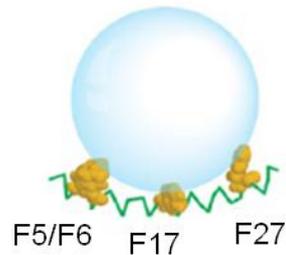


Abbildung 28: Bindung von LL-37 mittels Phenylalaninreste an Lipid-Mizellen. Dargestellt ist die Hauptkette von LL-37 mit den Phenylalaninen in einem „Space-Filling“ Modell (gold) [Wang, 2008].

Aufgrund der Vergleiche von Literatur und den vorliegenden Ergebnissen von LL-32, IG-20, RK-20 und LL-20 ergibt sich, dass LL-32 alle essentiellen Elemente enthält, die für eine zytotoxische Wirkung laut Wang wichtig sind. Das Peptid enthält drei hydrophobe Cluster an Position 5/6, 17 und 27 sowie das kationische Cluster zwischen den Aminosäuren 20-28. Es hat die volle Aktivität und scheint sogar noch aktiver zu sein als LL-37, da die nicht geordnete C-terminale Region fehlt. IG-20 ist um 17 Aminosäuren verkürzt und enthält nur noch zwei hydrophobe Cluster an den Positionen 17 und 27 sowie die kationischen Seitenketten. Durch das Fehlen der beiden ersten hydrophoben Cluster ist somit die Bindefähigkeit von IG-20 an die Zellmembran vermindert, was sich dann in einer reduzierten Wirksamkeit zeigt. LL-20 ist nicht aktiv gegen die humanen Zellen, was wohl auf das fehlende hydrophobe Cluster an Position 27 zurückgeführt werden kann, da dies für den Membran-bindenden Effekt wichtig ist. Auch bei RK-20 scheint das Fehlen von F₂₇ der Grund für die fehlende zytotoxische Aktivität zu sein. Gerade F₂₇ war von Wang als das Phenylalanin bezeichnet worden, dass für eine antitumorale Aktivität der Peptide am wichtigsten ist [Wang, 2008].

Bei KI-21-1 (KIGKFFKRIVQRIKDFIRNFV) wurde die Sequenz durch Austausch von Aminosäuren gegen hydrophobe Aminosäuren verändert, wodurch die hydrophoben Cluster verstärkt und somit die Bindung an die Membran verbessert werden sollte. KI-21-2 (KIGKEFKRIVRRIKKFLRKLV) entstand durch den Austausch mit kationischen Aminosäuren, um das kationische Cluster zu verstärken und so die Bindung an negativ-geladene Membran von Tumorzellen [Oren *et al.*, 1999] zu fördern. KI-21-3 vereinte die Modifikationen von KI-21-1 und KI-21-2 (KIGKFFKRIVRRIKKFIRKFV). Obwohl in allen drei Peptiden F₄ und F₅ fehlen, ist die Wirksamkeit der Peptide KI-21-1 und KI-21-3 im Gegensatz zu LL-32 nicht vermindert. Auch dies zeigt, wie wichtig die hydrophoben Cluster für die Wirkung der Peptide sind. Die zytotoxische Aktivität von KI-21-2 ist sogar noch geringer als die von IG-20. Die Einbringung von kationischen Aminosäuren

verstärkt die Wirkung nicht. Auch dieses Ergebnis unterstreicht, dass die hydrophoben Cluster für die Wirkung wichtiger sind als die kationischen Cluster [Oren *et al.*, 1999]. Ob dies allein auf die Bindung der Peptide an die Zellmembran zurückgeführt werden kann oder ob dies für die intrazellulären Effekte wichtig ist, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Wirkung gegen die gesunden HNEpC-Zellen konnte im Vergleich zu den Tumorzellen jedoch nicht verringert werden. Die Peptide wirken mindestens so gut oder sogar besser gegen die gesunden Zellen.

Demnach sind mit KI-21-1 und KI-21-3 Peptide entstanden, die ähnlich zytotoxisch aktiv wie LL-32, jedoch um elf Aminosäuren verkürzt und somit in der Herstellung deutlich günstiger sind. Nachteilig ist allerdings, dass die Peptide genauso stark oder sogar stärker auf die gesunden Zellen wirken. Aufgrund der Zusammensetzung der Aminosäuren konnte für diese Sequenzen zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Hydrophobizität für diese Sequenzteile von LL-37 entscheidender ist als die Kationizität. Außerdem führt die Verstärkung des kationischen Clusters nicht zu dem gewünschten Effekt, dass die Selektivität gegen die negativ-geladene Membran von Tumorzellen [Oren *et al.*, 1999] gefördert wird.

Neueste Erkenntnisse demonstrieren, dass das endogene LL-37 sowohl einen Antitumor-Wirkmechanismus bei Magenkarzinomen als auch einen tumorfördernden Effekt auf Brustkrebs aufweist [Wu *et al.*, 2010 b]. In den Impedanzmessungen im xCELLigence war festzustellen, dass die Peptide LL-20 und RK-20 einen proliferativen Effekt auf die Tumorzelllinien haben, nicht jedoch auf die gesunden Zellen. Dieser Effekt kann allerdings durch Färbung des Proliferationsmarkers KI-67 nicht bestätigt werden. Eine mögliche Proliferationsförderung durch das endogene LL-37 oder kleinerer Derivate bei Kopf-Hals-Karzinomen scheint möglich, wurde aber bisher noch nicht bewiesen.

Bereits 1998 beschrieben Lehrer *et al.* den Einfluss von Magnesium und Calcium auf die zytotoxische Aktivität von α -Defensinen. Sie konnten nachweisen, dass durch diese beiden Ionen der Effekt der α -Defensine auf *Candida albicans* inhibiert wird [Lehrer *et al.*, 1988]. Tomita *et al.* beschrieben, dass 10 mM von bivalenten Kationen das humane β -Defensin signifikant inaktivieren [Tomita *et al.*, 2000]. Die Vorbehandlung mit Magnesiumchlorid zeigt in den Zytotoxizität-Assays keinen Effekt auf LL-32. KI-21-2 und -3 sowie IG-20 werden in niedrigen Konzentrationen von Magnesiumchlorid inhibiert, die Aktivität von KI-21-1 wird durch die Zugabe von Magnesiumchlorid verbessert. Die Zugabe von Magnesiumchlorid hat also Einfluss auf die zytotoxische Aktivität der Peptide. Wie die Peptide jedoch reagieren, hängt vermutlich von der Aminosäurezusammensetzung ab. So verstärkt Magnesiumchlorid die Wirkung des Peptids mit vermehrten hydrophoben Clustern, schwächt aber die Wirkung der Peptide, die mehr kationische Aminosäuren enthalten. Dies könnte auch auf einen

unterschiedlichen Angriffs- oder Wirkmechanismus hindeuten. Die Peptide mit mehr kationischen Aminosäuren und das Magnesium scheinen miteinander zu konkurrieren, während dieser Effekt beim hydrophoberen Peptid keine Rolle spielt.

Um nachzuweisen, dass die Effekte der Peptide nicht HNO-spezifisch sind, wurden auch Zelllinien anderer Tumorentitäten getestet. In der Abbildung 16 ist zu sehen, dass die Peptide auf alle Zelllinien wirken, die Wirksamkeit der einzelnen Peptide gegen die unterschiedlichen Zelllinien variieren jedoch. Grundsätzlich wäre also ein Tumorthapeutikum auf Basis von LL-37 ein geeignetes Medikament für viele oder gar alle Tumorentitäten. Die unterschiedliche Wirkung der einzelnen Peptide hängt mit der unterschiedlichen Herkunft und damit der Zellbeschaffenheit der Zelllinien zusammen.

Schließlich wurde die hämolytische Aktivität der Peptide als weitere gesunde Kontrolle bestimmt. Die Tests wurden immer an 1×10^7 Zellen/well durchgeführt. Die hohe Erythrozytenzahl wurde daher gewählt, da bei einer intravenösen Gabe der Peptide im Verhältnis die Erythrozytenanzahl sehr viel größer ist als die Peptidmenge. Die Hämolysetests ergeben, dass hohe Konzentrationen der Peptide (50 μ M) LL-32, KI-21-1 und -3 einen hämolytischen Effekt von bis zu 30 % zeigen. Die Hämolysetests wurden bei fünf verschiedenen Spendern unterschiedlichen Alters und unterschiedlichen Geschlechts durchgeführt. Somit kann festgehalten werden, dass die Hämolyse quer durch alle Altersklassen und sowohl beim weiblichen als auch männlichen Geschlecht auftritt. Die Peptide IG-20 und KI-21-2 bewirken keine Hämolyse. Es zeigen also die Peptide, die am besten bei den Tumorzellen wirken, auch die höchste Aktivität gegen die Erythrozyten.

4.2 Wirkung der Peptide

Da LL-37/hCAP-18 zu großen Teilen amphipatisch ist und sowohl kationische als auch hydrophobe Regionen enthält, ist eine Bindung an negativ geladene Membranen von Tumorzellen möglich [Oren *et al.*, 1999]. Die Bindung an die Membranen der Zellen wurde mittels NBD-markiertem LL-32 untersucht. In Abbildung 19 ist dargestellt, dass die grüne Fluoreszenz des Peptides genau an der Membran, welche mittels WGA rot markiert wurde, zu sehen ist. Dies spricht dafür, dass sich LL-32-NBD an der Membran anlagert. Dass diese Bindung nicht aufgrund des angehängten NBDs entsteht, wurde von der Arbeitsgruppe Biophysik des Forschungszentrums Borstel untersucht (unveröffentlichte Daten). In weiteren Aufnahmen konnte zum ersten Mal deutlich gemacht werden, dass das Peptid nicht nur an der Zellmembran, sondern auch an der Kernmembran bindet. Kationische AMPs wie auch LL-37/hCAP-18 können sich an die

negativ-geladene Membran von Bakterien binden und führen zu einem Ausstrom von zytoplasmatischen Molekülen und zum Zelltod [Johansson *et al.*, 1998]. Die Zellmembran von Tumorzellen enthält mehr anionische Phospholipide als die Membran gesunder Zellen, weshalb Tumorzellen sensitiver gegen kationische Peptide sein sollten als die Membran gesunder Zellen [Van Blitterswijk *et al.*, 1982; Utsugi *et al.*, 1991]. Die Bindung von LL-32 ist zwar nur an der Zelllinie UTSCC-60 A dargestellt, die Bindung an die gesunden HNEpC-Zellen ist jedoch ähnlich ausgeprägt. Somit scheint nicht nur die negativ-geladene Membran für die Bindung der Peptide wichtig zu sein.

Das von Okumura *et al.* 2004 eingesetzte hCAP18₁₀₉₋₁₃₅ induziert die mitochondriale Depolarisation und damit Apoptose in SAS-H1 Zellen. Dabei handelt es sich um einen Caspase-unabhängigen Weg, der zur Apoptose in den Kopf-Hals-Karzinom-Zellen, nicht jedoch in den gesunden Vergleichszellen führt [Okumura *et al.*, 2004].

Die Auswertung des *Proteom Profiler Arrays* in dieser Arbeit ergibt eine deutliche Hochregulation von Cytochrom C nach der Behandlung der Zellen mit LL-32. Nach Beschädigung von Mitochondrien wird Cytochrom C über die äußere Membran ins Zytoplasma der Zellen abgegeben. Im Zytosol führt Cytochrom C über eine Signalkaskade zum programmierten Zelltod. Eine Hochregulation von Caspasen ist im *Proteom Profiler Array* nicht festzustellen. Demnach könnte auch LL-32 zu einer Caspase-unabhängigen Apoptose zu führen. Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur Caspase-abhängige Wege zur Apoptose führen, sondern auch weitere Signalwege für die Entstehung des programmierten Zelltods verantwortlich sind. Bisher konnte ein mitochondriales Protein AIF (*apoptosis inducing factor*) identifiziert werden, welches in den Mitochondrien lokalisiert ist und bei Apoptoseinduktion in den Zellkern wandert. Dort löst das zu den Flavoproteinen gehörende Protein eine Caspase-unabhängige Kondensation von Chromatin und die Fragmentierung von DNA aus [Susin *et al.*, 2000]. Durch eine Färbung von behandelten Zellen mit Annexin-V und Propidiumjodid (PI) sollte der Wirkmechanismus nach Behandlung der Zellen genauer aufgeklärt werden. Die Behandlung führt zu einem Einstrom von PI in die Zellen. Und somit zu einem signifikanten Anstieg an PI-positiven Zellen, was auf eine Nekrose hindeuten könnte. Da die Peptide an die Zellmembran binden und dadurch Poren formen (unveröffentlichte Daten, FZ Borstel), kann das PI die Zellmembran ungehindert passieren und in die Zelle gelangen, ohne dass dies direkt auf eine Nekrose schlussfolgern lässt. Somit kann der Wirkmechanismus trotz nachgewiesenem PI-Einstroms die Caspase-unabhängige Apoptose sein. Möglicherweise handelt es sich aber weder um eine Caspase-unabhängige Apoptose noch um eine Nekrose, sondern um eine unspezifische Zerstörung der Zelle durch die Peptide, auf die die Zelle nicht mehr reagieren kann.

Die Ergebnisse des *Proteom Profiler Array* lassen vermuten, dass es durch LL-32 zu einer Degradation der Mitochondrien kommt. Die Membran der Mitochondrien ist strukturell der Membran von Bakterien ähnlich und enthält viele anionische Phospholipide [Daum, 1985; Gray *et al.*, 1999]. Die Endosymbiontentheorie besagt, dass chemo- und phototrophe Bakterien von anderen prokaryontischen Zellen durch Endozytose aufgenommen wurden. Diese haben sich dann später zu Zellorganellen entwickelt. Auch heute noch tragen die Mitochondrien und Plastiden in Eukaryonten viele Merkmale von Prokaryonten. Ohne diese Organellen wären weder Zellatmung noch Photosynthese möglich [Alberts *et al.*, 2008].

Die prokaryontischen Eigenschaften der Mitochondrien führen dazu, dass die Peptide an der Membran binden können und zur Degradation der Organellen führen. Schon geringe Konzentrationen von LL-32 sowie KI-21-1 und -3 führen dazu, dass keine funktionsfähigen Mitochondrien detektiert werden können. Nachdem die Zellmembran perforiert ist und die Peptide in die Zelle gelangen, scheinen die Mitochondrien einer der nächsten Angriffspunkte der Peptide zu sein. Die Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials ist einer der ersten intrazellulären Prozesse beim Eintritt von Apoptose [Zamzami *et al.*, 1995]. Die Abnahme der roten Fluoreszenz und damit die Reduktion der Mitochondrien (Abbildung 22) in den behandelten Zellen ist jedoch nicht nur bei den Tumorzelllinien, sondern auch bei den gesunden HNEpC-Zellen, zu beobachten. In dieser Arbeit konnte somit dargestellt werden, dass es zu einer Degradierung der Mitochondrien durch die Behandlung mit Peptiden kommt, was die Ergebnisse von Okumura *et al.* bestätigt [Okumura *et al.*, 2004].

Da nicht nur die Mitochondrien durch Membranen als Organellen im Zytoplasma der Zelle abzugrenzen sind, wurden auch weitere Organellen betrachtet. Durch eine Dreifachfärbung von Endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat und Zellkern sollte der Effekt der Peptide auf diese Organellen untersucht werden. Die Abnahme der roten Fluoreszenz (Abbildung 23) deutet auf die Abnahme des Endoplasmatischen Retikulums hin. Die Peptide zerstören somit auch das Endoplasmatische Retikulum. Die grüne Fluoreszenz hingegen ist signifikant erhöht. Da diese Fluoreszenz für den Golgi-Apparat maßgeblich ist, führt die Behandlung mit den Peptiden zu einer starken Zunahme von Anzahl und Volumen des Golgi-Apparats. In vielen Fällen führt die intrazelluläre Akkumulation von fehlgefalteten Peptiden zu einer Vergrößerung von prä-Golgi-Intermediaten. Außerdem stellt der Golgi-Apparat ein Depot für die Zellmembran dar, da im Golgi-Apparat Elemente der Plasmamembran modifiziert und transportiert werden [Alberts *et al.*, 2008]. Durch die Zerstörung der Zellmembran nach der Behandlung mit den Peptiden reagiert die Zelle mit einer vermehrten Synthese von Zellmembranbestandteilen, was eine Vergrößerung des Golgi-Apparats zur Folge hat.

Demnach konnte in dieser Arbeit nicht nur der Effekt auf die Mitochondrien bestätigt werden, sondern die Effekte auf Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat entschlüsselt werden.

Zusammenfassend lässt sich damit festhalten, dass durch die Veränderung der Peptidsequenz mit hydrophoben Aminosäuren die Peptidsequenz um elf Aminosäuren bei gleichbleibender Zytotoxizität gegen Tumorzellen verkürzt werden kann. Allerdings sind die Nebenwirkungen gegen die gesunden Zellen nicht eingeschränkt. Wegen der Sequenzverkürzung können die Peptide zwar nun sehr viel kostengünstiger hergestellt werden, aber aufgrund der zytotoxischen Aktivität gegen die gesunden Epithelzellen muss die Selektivität noch gesteigert werden. Mittels immunhistologischer Färbungen zeigt sich die Bindung der Peptide an die Zellmembran sowie an die Kernmembran. Weitere Versuche ergaben die Degradation von Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum sowie eine Vermehrung von Zahl und Volumen des Golgi-Apparates. Der Wirkmechanismus bleibt unklar, da sowohl die Hochregulation von Cytochrom C, was auf eine Apoptose deutet, als auch der PI-Einstrom, der ein Merkmal für die Nekrose ist, dargestellt werden konnten.

4.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass Fragmente des humanen Cathelicidins eine starke zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen aufweisen. Es ist jedoch unbedingt notwendig, weitere modifizierte Fragmente zu synthetisieren und die Sequenz so zu verändern, dass die Effekte auf gesunde Epithelzellen minimiert werden können. Alternativ wäre eine Kopplung der Peptide an sogenannte *homing*-Domänen denkbar, die die selektive Wechselwirkung des Peptids mit Adhäsionsrezeptoren auf den Tumorzellen vermitteln. Denkbar ist in diesem Zusammenhang auch die Kopplung der Peptide an schon bereits etablierte Antikörper in der Tumorthherapie wie etwa Cetuximab bei HNSCC-Tumoren.

Eine weitere Rolle spielt natürlich auch die Applikation der Peptide. Je näher und gezielter man diese zum Tumor bringen kann, desto geringer können die Nebenwirkungen gehalten werden. Dabei ist zum Beispiel eine Pumpe denkbar, die in der Nähe des Tumors eingebracht wird und den diesen mit den Fragmenten umspült. Auch der Einsatz von so genannten *Microbubbles*, kleinen Gasbläschen, die ein Medikament enthalten, durch Ultraschallwellen in Schwingung versetzt werden können, um das Medikament am Wirkort freizugeben, wäre eine interessante Applikationsform.

Die Verträglichkeit der Peptide sollte in Mausmodellen abgeklärt werden. Dadurch lassen sich die Nebenwirkungen auch auf das umliegende Gewebe des Tumors gezielter betrachten. Darüber hinaus könnte mit Mausexperimenten der Einfluss des Tumormilieus untersucht werden. Außerdem wird sich der Effekt der Peptide auf die Zellen in einem Gewebeverband deutlich anders darstellen als bei isolierten Zellen in der Zellkultur. Die Peptide unterliegen dem Abbau durch Proteasen, was ihre Effektivität stark einschränken wird. Somit muss die Gabe der Peptide so vorgenommen werden, dass eine kontinuierliche Aktivität gegen die Tumorzellen erzielt werden kann, bevor die Fragmente abgebaut werden.

Demzufolge liegen weitere Forschungsschwerpunkte vor einer möglichen Anwendung der Peptide in der Tumorthherapie in einer weiteren Veränderung der Sequenz und eventuelle Kopplung der Peptide zur Selektivierung, der Austestung der Applikationsform, die Effektivität auf Tumoren sowie der Charakterisierung der Nebenwirkungen und der Halbwertszeit in einem Mausmodell.

5. Zusammenfassung

Kopf-Hals-Tumoren stehen weltweit an sechster Stelle neu auftretender Neoplasien. Zur Standardtherapie bei HNSCC zählen je nach Gesundheitszustand des Patienten die chirurgische Entfernung des Tumors, die Chemo- und/oder Strahlentherapie. Doch durch die anhaltend schlechten Prognosen bei Kopf-Hals-Karzinomen müssen neue Behandlungsmethoden gesucht werden. Möglicherweise eignen sich zur Therapie auch Antimikrobielle Peptide (AMPs), die natürlich vorkommende Antibiotika des Körpers sind und damit zum angeborenen Immunsystem gehören. Neben der Wirkung der AMPs gegen die unterschiedlichsten Mikroorganismen wurde als weitere Wirkung der AMPs eine direkte Zytotoxizität gegen Krebszellen festgestellt. Zu den AMPs zählt auch hCAP-18, das als das bislang einzige humane Cathelicidin gilt. Für das humane Cathelicidin zeigen neueste Untersuchungen, dass Fragmente von LL-37 nicht nur Bakterien abtöten, sondern auch effektiv gegen Krebszellen wirken. Für diese Wirkung scheint vor allem die C-terminale Region verantwortlich zu sein.

Ziel dieser Arbeit war es, verkürzte synthetische Fragmente von LL-37 auf ihre zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen und den zugrundeliegenden Wirkmechanismus zu untersuchen, diesen Effekt durch Remodeling zu verbessern und damit die Wirkung auf gesunde Zellen zu reduzieren.

Zytotoxizitätsassays und Impedanz-Messungen mit den ersten, modifizierten Fragmenten LL-32, IG-20, RK-20 und LL-20 zeigten, dass LL-32 und IG-20 effektiv gegen Tumorzellen wirkten, die Zytotoxizität aber auch gegen gesunde Zellen gerichtet war. RK-20 und LL-20 führten bei den Tumorzellen zu einer verstärkten Proliferation, gesunde Epithelzellen wurden hingegen nicht beeinflusst. Die vermehrte Expression von KI-67, ein Proliferationsmarker, konnte in den Tumorzellen aber nicht nachgewiesen werden. Um die Selektivität der Peptide gegen Tumorzellen zu fördern, wurden die Peptide auf dem Boden der ersten Untersuchungsergebnisse durch Einbringen von hydrophoben und kationischen Aminosäuren synthetisch weiter verändert. Dabei konnte die zytotoxische Aktivität verglichen mit IG-20 zwar gesteigert werden, jedoch waren die Effekte nicht größer als bei LL-32 und die zytotoxische Aktivität gegen gesunde Epithelzellen konnte nicht vermindert werden. Da die sequenzmodifizierten Peptide aber eine ähnliche Aktivität wie LL-32 zeigen, war eine Minimierung der Sequenz um elf Aminosäuren ohne Reduktion des zytotoxischen Effekts gelungen. Außerdem zeigte sich für weitere

Modifikationen, dass bei diesen Aminosäuresequenzen das Einbringen von hydrophoben Aminosäuren deutlich bessere Ergebnisse erzielte als das Einbringen von kationischen Aminosäuren.

Die Behandlung von Zellen mit fluoreszierendem LL-32 veranschaulichte, dass LL-32 an der Zellmembran und anschließend auch an der Kernmembran der Zellen anlagert und zudem die Mitochondrien degradierten. Auch eine Degradation des Endoplasmatischen Retikulums konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden. Darüber hinaus kam es zu einer Vermehrung von Anzahl und Volumen des Golgi-Apparates. Mittels *Human Apoptosis Antibody Array* konnte eine vermehrte Expression von Cytochrom C nachgewiesen werden, eine Steigerung der Caspase-Expression war jedoch nicht zu sehen. Es zeigte sich jedoch auch ein vermehrter PI-Einstrom in FACS-Versuchen, der für eine Nekrose, einen Caspase unabhängigen Apoptoseweg oder aufgrund der schnellen Tötung einen neuen, AMP spezifischen Wirkmechanismus sprechen könnte.

Experimente mit Tumorzelllinien weiterer Tumorentitäten konnten belegen, dass die zytotoxische Aktivität der Fragmente nicht nur gegen HNSCC-Zelllinien gerichtet war, sondern auch gegen andere Tumorentitäten auftrat. Eine Hämolyse war hingegen nicht zu ermitteln und spricht für eine mögliche, systemische Applikationsform.

Die hier eingesetzten Fragmente des humanen Cathelicidins zeigten eine starke zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen. Sollte die Sequenz so verändert werden können, dass die Effekte auf gesunde Epithelzellen ausgeschlossen oder stark vermindert werden kann, eignen sich die Fragmente sehr gut für eine Antitumorthherapie, nicht nur gegen HNSCC, sondern auch gegen andere wichtige solide Tumorentitäten.

6. Abstract

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) accounts for 2 % to 3 % of all malignancies. Treatment is most commonly chemo- or radiotherapy and surgery. Prognosis for HNSCC is still bad and new therapies have to be found like immunotherapy, DNA-vaccine or monoclonal antibodies as well as cytokines.

Antimicrobial peptides (AMPs) are antibiotics naturally occurring in the human body and belong to the innate immune system. Beside of killing microorganisms AMPs are directly cytotoxic toward cancer cells. hCAP-18 is the only human cathelicidin known so far. Its active fragment LL-37 is expressed in neutrophils, macrophages and different epithelial cells with a broad spectrum of activities.

This study investigated the cytotoxic effect of truncated synthetic peptides of LL-37 towards tumor and normal cells with the aim to elucidate their mode of action.

Cytotoxic assays and impedance-measurements with the peptides LL-32, IG-20, RK-20 and LL-20 were performed. The results indicated that LL-32 and IG-20 are cytotoxic towards tumor cells and normal cells. RK-20 and LL-20 induced an increase of proliferation in tumor cells but not in normal cells. The expression of KI-67, a proliferation marker, was not evated.

To develop enhanced selectivity of the cytotoxic effect towards tumor cells, certain amino acids of the peptides were changed to more hydrophobic or cationic amino acids. The cytotoxic effect could be enforced compared to IG-20 but was not increased compared to LL-32. The cytotoxic activity towards healthy epithelial cells was not reduced. Acitivity comparable to LL-32 by peptides with modified sequences can be stated as successful sequence truncation for eleven peptides without reducing the cytotoxic effect. Furthermore it could be shown in additional sequence modifications that insertion of hydrophobe amino acids produced significantly better results than insertion of cationic amino acids.

Treatment with LL-32 conjugated to a fluorochrome visualized LL-32 attaching to the cell and nucleus membranes. Staining of mitochondria and endoplasmic reticulum indicated their respective degradation. Staining of Golgi apparatus demonstrated his increase in number and volume. Perfomance of a Human Apoptosis Antibody Array revealed raised expression of cytochrom c after peptide treatment. Caspase expressions remain unaltered indicating caspase-independent apoptosis. Experiments with other tumor cell

lines confirm that the fragments' cytotoxic activity affects most or all tumor entities. Hemolysis could not be detected.

All results point to the fact that synthetic peptides of human cathelicidin are cytotoxic towards tumor cells. As amino acid changes are expected to reduce the cytotoxic effects on healthy epithelial cells, an improved understanding of the structure-activity profile as generated in this study will support the development of novel candidates for anticancer drugs, especially considering their cytotoxic potential on different tumor entities.

7. Literaturverzeichnis

Aarbiou J, Ertmann M, van Wetering S, *et al.* (2002). Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J Leukoc Biol* 72(1):167-74.

Aerts AM, François IE, Cammue BP, *et al.* (2008). The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell Mol Life Sci* 65(13):2069-79.

Agada FO, Alhamarneh O, Stafford ND, *et al.* (2009). Immunotherapy in head and neck cancer: current practice and future possibilities. *J Laryngol Otol* 123(1):19-28.

Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, *et al.* (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(1):195-9.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al.* (2008). *Molecular Biology of the cell*. Garland Science Fifth Edition.

Anderson N and Borlak J (2006). Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Lett* 580(23):5533-40.

Andersson E, Sørensen OE, Frohm B, *et al.* (2002). Isolation of human cationic antimicrobial protein-18 from seminal plasma and its association with prostasomes. *Hum Reprod* 17(10):2529-34.

Arnold RR, Cole MF and Mc Ghee JR (1977). A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197(4300):236-5.

Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, *et al.* (1993). Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res* 53(13):3052-7.

Bals R, Wang X, Zasloff M, *et al.* (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16):9541-6.

- Bals R, Weiner DJ, Meegalla RL, *et al.* (1999). Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* 103(8):1113-7.
- Bayrhuber H, Kull U and Linder H (2005). *Linder Biologie*. Schroedel Auflage: 22.; ISBN-10: 3507109301
- Biragyn A, Surenhu M, Yang D, *et al.* (2001). Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 167(11):6644-53.
- Boman HG (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 173(-):5-16.
- Braff MH, Hawkins MA, Di Nardo A, *et al.* (2005). Structure-function relationships among human cathelicidin peptides: dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities. *J Immunol* 174(7):4271-8.
- Brogden KA (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3(3):238-50.
- Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, *et al.* (2010). Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58(1):15-25.
- Califano J, van_der_Riet P, Westra W, *et al.* (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56(11):2488-92.
- Campbell NA and Reece JB (2009). *Biologie*. PEARSON STUDIUM Auflage: 8; ISBN-10: 3827372879.
- Castro MS and Fontes W (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pept Lett* 12(1):13-8.
- Chang-Liu CM and Woloschak GE (1997). Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett* 113(1-2):77-86.
- Chen HM, Wang W, Smith D, *et al.* (1997). Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochem Biophys Acta* 1336(2):171-9.

Chen FY, Lee MT and Huang HW (2003). Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophys J* 84(6):3751-8.

Chin D, Boyle GM, Theile DR, *et al.* (2004). Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg* 57(7):595-602.

Chung WO, Dommisch H, Yin L, *et al.* (2007). Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Curr Pharm Des* 13(30):3073-83.

Cole AM, Weis P and Diamond G (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem* 272(18):12008-13.

Coleman J, Xiang Y, Pande P, *et al.* (2010). A live-cell fluorescence microplate assay suitable for monitoring vacuolation arising from drug or toxic agent treatment. *J Biomol Screen* 15(4):398-405.

Cooper GM (2000). *The Cell: A Molecular Approach, Second Edition*. Sunderland, MA, Sinauer Associates, Inc.

Cruciani RA, Barker JL, Zasloff M, *et al.* (1991). Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(9):3792-6.

Daum G (1985). Lipids of mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 822(1):1-42.

Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, *et al.* (2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* 15(21):2377-92.

Doss M, White MR, Tecle T, *et al.* (2010). Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol* 87(1):79-92.

Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, *et al.* (1997). LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62(5-6):391-9.

Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, *et al.* (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 272(24):15258-53.

Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, *et al.* (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76(4):1427-35.

Glynn AA and Milne CM (1965). Lysozyme and immune bacteriolysis. *Nature* 207(5003):1309-10.

Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, *et al.* (2009). HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol* 14(1):36-44.

Gorr SU (2009). Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol* 2000 51(-):152-80.

Gray MW, Burger G and Lang BF (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283(5407):1476-81.

Greene FL, Balch CM, Haller DG, *et al.* (2002). *AJCC Cancer Staging Manual* (6th Edition). Springer, 6th edition ISBN 9780387952710.

Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, *et al.* (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 238(2):325-32.

Gutsmann T, Hagge SO, Larrick JW, *et al.* (2001). Interaction of CAP18-derived peptides with membranes made from endotoxins or phospholipids. *Biophys J* 80(6):2935-45.

Haan C and Behrmann I (2007). A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *J Immunol Methods* 318(1-2):11-9.

Habermann E and Jentsch J (1967). Sequence analysis of melittin from tryptic and peptic degradation products. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 348(1):37-50.

Hanahan D and Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.

Hardisson D (2003). Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260(9):502-8.

Henzler-Wildman KA, Lee DK and Ramamoorthy A (2003). Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* 42(21):6545-58.

Hirsch JG (1956). Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 103(5):589-611.

Hosaka Y, Koslowski M, Nuding S, *et al.* (2008). Antimicrobial host defense in the upper gastrointestinal tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20(12):1151-8.

Huang H (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39(29):8347-52.

Jacob L and Zasloff M (1994). Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. *Ciba Found Symp* 186(-):197-216.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, *et al.* (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 54(1):8-29.

Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, *et al.* (1998). Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem* 273(6):3718-24.

Johnson N (2001). Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 65(4):328-39.

Kademani D (2007). Oral Cancer. *Mayo Clin Proc* 82(7):878-887.

Kamangar F, Dores G and Anderson W (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24(14):2137-50.

Kim JE, Kim BJ, Jeong MS, *et al.* (2005). Expression and modulation of LL-37 in normal human keratinocytes, HaCaT cells, and inflammatory skin diseases. *J Korean Med Sci* 20(4):649-54.

Klotman ME and Chang TL (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 6(6):447-56.

Kumar A, Yin J, Zhang J, *et al.* (2007). Modulation of corneal epithelial innate immune response to pseudomonas infection by flagellin pretreatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(10):4664-70.

Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, *et al.* (2006). Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *Eur Urol* 50(1):141-7.

Lehrer RI, Selsted ME, Szklarek D, *et al.* (1983). Antibacterial activity of microbicidal cationic proteins 1 and 2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *Infect Immun* 42(1):10-4.

Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, *et al.* (1988). Modulation of the *in vitro* candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest* 81(6):1829-35.

Lemaitre B and Hoffmann J (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25(-):697-743.

Li X, Li Y, Han H, *et al.* (2006)a. Solution structures of human LL-37 fragments and NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region. *J Am Chem Soc* 128(17):5776-85.

Li Y, Li X and Wang G (2006)b. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Expr Purif* 47(2):498-505.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, *et al.* (2007). *Molecular cell biology*. W. H. Freeman and Company Sixth Edition.

Lohner K and Prenner EJ (1999). Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta* 1462(1-2):141-56.

Meyer JE and Harder J (2007). Antimicrobial peptides in oral cancer. *Curr Pharm Des* 13(30):3119-30.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.

Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, *et al.* (2002). Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res* 81(12):845-50.

Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, *et al.* (2004). Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 172(5):3070-7.

Nell MJ, Tjabringa GS, Wafelman AR, *et al.* (2006). Development of novel LL-37 derived antimicrobial peptides with LPS and LTA neutralizing and antimicrobial activities for therapeutic application. *Peptides* 27(4):649-60.

Neville F, Cahuzac M, Konovalov O, *et al.* (2006). Lipid headgroup discrimination by antimicrobial peptide LL-37: insight into mechanism of action. *Biophys J* 90(4):1275-87.

Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, *et al.* (2007). Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 127(3):594-604.

Ohsaki Y, Gazdar AF, Chen HC, *et al.* (1992). Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 52(13):3534-8.

Ohtake T, Fujimoto Y, Ikuta K, *et al.* (1999). Proline-rich antimicrobial peptide, PR-39 gene transduction altered invasive activity and actin structure in human hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 81(3):393-403.

Okumura K, Itoh A, Isogai E, *et al.* (2004). C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett* 212(2):185-94.

Oppenheim JJ and Yang D (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17(4):359-65.

Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, *et al.* (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* 341(Pt3):501-13.

Pai SI and Westra WH (2009). Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol* 4(-):49-70.

Pan Q, Gorin MA and Teknos TN (2009). Pharmacotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Pharmacother* 10(14):2291-302.

Papo N, Oren Z, Pag U, *et al.* (2002). The consequence of sequence alteration of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J Biol Chem* 277(37):33913-21.

Papo N and Shai Y (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci* 62(7-8):784-90.

Reasor MJ, Hastings KL and Ulrich RG (2006). Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. *Expert Opin Drug Saf* 6(5):567-83.

Risso A, Zanetti M and Gennaro R (1998). Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. *Cell Immunol.* 189(2):107-15.

Risso A, Braidot E, Sordano MC, *et al.* (2002). BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol.* 22(6):1926-35.

Rozek T, Wegener KL, Bowie JH, *et al.* (2000). The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis* the solution structure of aurein 1.2. *Eur J Biochem* 267(17):5330-41.

Schaller-Bals S, Schulze A and Bals R (2002). Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am J Respir Crit Care Med* 165(7):992-5.

Schröder-Borm H, Bakalova R and Andrä J (2005). The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine. *FEBS Lett* 579(27):6128-34.

Selsted ME, Szklarek D and Lehrer RI (1984). Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. 1984 45(1):150-4.

Shai Y (2002). Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 66(4):236-48.

Sigurdardottir T, Andersson P, Davoudi M, *et al.* (2006). In silico identification and biological evaluation of antimicrobial peptides based on human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother* 50(9):2983-9.

Slaughter DP, Southwick HW and Smejkal W (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6(5):963-8.

Smeianov V, Scott K and Reid G (2000). Activity of cecropin P1 and FA-LL-37 against urogenital microflora. *Microbes Infect* 2(7):773-7.

Steiner H, Hultmark D, Engström A, *et al.* (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292(5820):246-8.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, *et al.* (2000). Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 192(4):571-80.

Territo MC, Ganz T, Selsted ME, *et al.* (1989). Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* 84(6):2017-20.

Tomita T, Hitomi S, Nagase T, *et al.* (2000). Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol Immunol* 44(9):749-54.

Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, *et al.* (1991). Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res* 51(11):3062-6.

van Dijk A, Veldhuizen EJ and Haagsman HP (2008). Avian defensins. *Vet Immunol Immunopathol* 124(1-2):1-18.

van Blitterswijk WJ, DeVeer G, Krol JH, *et al.* (1982). Comparative lipid analysis of purified plasma membranes and shed extracellular membrane vesicles from normal murine thymocytes and leukemic GRSL cells. *Biochem Biophys Acta* 688(2):495-504.

Vineis P, Schatzkin A and Potter JD (2010). Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis* 11. Mai 2010.

von Haussen J, Koczulla R, Shaykhiev R, *et al.* (2008). The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer* 59(1):12-23.

Wang G (2007). Tool developments for structure-function studies of host defense peptides. *Protein Pept Lett* 14(1):57-69.

Wang G (2008). Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J Biol Chem* 283(47):32637-43.

Wang G, Watson KM and Buckheit Jr. RW (2008). Anti-human immunodeficiency virus type 1 activities of antimicrobial peptides derived from human and bovine cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother* 52(9):3438-40.

Weber G, Chamorro CI, Granath F, *et al.* (2009). Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res* 11(1):R6.

Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, *et al.* (2004). Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep* 24(6):631-9.

Winder D, Günzburg WH, Erfle V, *et al.* (1998). Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 242(3):608-12.

Wu WK, Wang G, Coffelt SB, *et al.* (2010)a. Emerging roles of the host defense peptide LL-37 in human cancer and its potential therapeutic applications. *Int J Cancer* 127(8):1741-7.

Wu WK, Sung JJ, To KF, *et al.* (2010)b. The host defense peptide LL-37 activates the tumor-suppressing bone morphogenetic protein signaling via inhibition of proteasome in gastric cancer cells. *J Cell Physiol* 223(1):178-86.

Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, *et al.* (2006). Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J* 20(12):2068-80.

Yang L, Harroun TA, Weiss TM, *et al.* (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* 81(3):1475-85.

Zaiou M and Gallo RL (2002). Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med* 80(9):549-61.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, *et al.* (1995). Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182(2):367-77.

Zasloff M (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15):5449-53.

Zasloff M (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415(6870):389-95.

8. Abbildungsverzeichnis

1.	Vereinfachte Darstellung einer Eukaryontenzelle	1
2.	Darstellung der Zellmembran	2
3.	Darstellung der Tumorentwicklung bei Gebärmutterhalskrebs	4
4.	Prinzip der Karzinogenese bei HNSCC	7
5.	Darstellung der Wirkmechanismen der AMPs.....	9
6.	NMR-Darstellung von LL-37	11
7.	Möglicher Wirkmechanismus von LL-37 zur Wachstumsförderung von Tumoren .	12
8.	Möglicher Antitumor-Wirkmechanismus von LL-37 bei Magenkarzinomen	13
9.	xCELLigence-System von Roche-Applied-Science.....	25
10.	Darstellung des humanen Cathelicidins LL-37 und der Fragmente LL-32, LL-20 sowie RK-20	28
11.	Darstellung der zytotoxischen Aktivität der Peptide LL-32, IG-20, RK-20 und LL-20	29
12.	Darstellung der zytotoxischen Aktivität von LL-32, IG-20, KI-21-1, -2 und -3	30
13.	Darstellung des MTT-Test	32
14.	Darstellung der Impedanz-Messung mittels xCELLigence	34
15.	Vergleich der Wirkung der Peptide bei einer Konzentration von 50 µM	36
16.	Zytotoxizitäts-Assay an Zelllinien anderer Tumorentitäten	37
17.	Hämolyse nach Behandlung von Erythrozyten mit den Peptiden LL-32, IG-20, KI- 21-1, -2 und -3.....	38
18.	Einfluss von Magnesiumchlorid auf die Zytotoxizität der Peptide	39
19.	Konfokale Aufnahme einer Zelle der Linie UTSCC-60 A nach Behandlung mit LL- 32-NBD	40
20.	Bindung von LL-32-NBD an der Zellkernmembran	41
21.	Ergebnis des <i>Human Apoptosis Antibody Array</i>	41
22.	<i>Mitocapture</i> -Färbung an den Zelllinien UTSCC-60 A und HNEpC	43

23.	Organellen-Färbung bei der Primärkultur HNEpC.....	46
24.	FACS-Analyse zur Wirkung der Peptide	49
25.	Färbung des Proliferationsmarkers KI-67 nach der Behandlung mit 50 μ M LL-20 und RK-20 bei UTSCC-60 A.....	50
26.	Mittelwerte aus zehn Sichtfeldern einer KI-67-Färbung nach Behandlung mit LL-20 und RK-20	51
27.	NMR-Darstellung von LL-37	54
28.	Bindung von LL-37 mittels Phenylalaninreste an Lipid-Mizellen.....	55

9. Tabellenverzeichnis

1. Die fünf Tumormodelle5
2. Intrazelluläre Konzentration von hCAP-18/LL-3727

10. Danksagung

Zum Abschluss der Dissertation gilt es nun allen zu danken, die mich im Laufe meiner Dissertation tatkräftig und moralisch unterstützt haben.

Besonders gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Jens E. Meyer, der die wissenschaftliche Betreuung meines Projektes übernommen hat und mit sowohl kritischen als auch inspirierenden Diskussionen den Fortgang der Arbeit beeinflusst hat. Die letzten drei Jahre waren eine tolle Zeit, besonders aufgrund der angenehmen und kollegialen Atmosphäre.

Ich danke weiterhin Prof. Dr. rer. nat. Thomas Gutschmann für die Übernahme des Gutachtens meiner Dissertation und für das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Für die tolle Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danke ich besonders Herrn Detlev Schult-Badusche. Außerdem gilt mein Dank Frau Susann Rosseck, die als Master an Teilen meiner Arbeit mitgewirkt hat.

Ein weiterer Dank ergeht an Frau Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg und Herrn Dr. rer. nat. Ralph Pries. Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Host Defense Peptides“ und „Tumorbiologie/Immuntherapie von Kopf-Hals-Karzinomen“ möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Ein großes Dankeschön ergeht auch an Frau Dr. rer. nat. Sandra Wulff für die kritische Durchsicht meines Manuskripts und für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung. Frau Brigitte Wollmann gilt ebenfalls ein herzliches Dankeschön für ihre freundschaftliche und moralische Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. rer. nat. Marina Gebert bedanken, die es mir ermöglicht hat, das xCELLigence-Gerät am Fraunhofer EMB in Lübeck zu nutzen.

Meinen Eltern Eva und Klaus Crusius danke ich sehr für die Unterstützung in der Zeit meines Studiums und der anschließenden Promotion. Insbesondere danke ich meinem Mann Jan Rübke für sein unendliches Verständnis und seine moralische Unterstützung.