

Aus dem Arbeitsbereich Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Abteilung für Allgemeine, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Ernst Klar

Host Defense Peptide zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



vorgelegt von

Samuel Johannes Marinkovic

geb. am 19.12.1985 in Lindenberg im Allgäu

Rostock, 2015

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter

PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher
Molekulare Onkologie und Immuntherapie
Klinik für Allgemeinchirurgie
Universitätsmedizin Rostock
Schillingallee 69
18057 Rostock

2. Gutachter

Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz
Institut für Toxikologie und Pharmakologie
Universitätsmedizin Rostock
Schillingallee 70
18057 Rostock

3. Gutachter

Priv.-Doz. Dr. med. Felix Rückert
Hepato-Pankreato-Biliäres Zentrum
Universitätsmedizin Mannheim
Theodor-Kutzer-Ufer 1 – 3
68169 Mannheim

Datum der Einreichung: 29.09.2015

Datum der Verteidigung: 19.04.2016

Zusammenfassung	1
Abkürzungsverzeichnis.....	1
Verzeichnis der Tabellen.....	1
Verzeichnis der Abbildungen	1
1 Einleitung.....	1
1.1 Kolorektales Karzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.3 Risikofaktoren	2
1.1.4 Pathogenese	3
1.1.5 Histologie	5
1.1.6 Tumorlokalisation	6
1.1.7 Tumorklassifikation	6
1.1.8 Vorsorge und Früherkennung	7
1.1.9 Therapie	8
1.1.10 Prognose.....	10
1.2 Individuelle Tumormodelle.....	11
1.3 Host-Defense-Peptide	12
1.3.1 Aufbau und Eigenschaften von HDPs.....	12
1.3.2 HDPs mit antitumoraler Aktivität	13
1.3.3 Charakteristika der Zelloberfläche von Tumorzellen.....	14
1.3.4 Onkolytische Wirkmechanismen der HDPs	16
1.3.5 <i>In vivo</i> Studien von HDPs mit antitumoraler Wirksamkeit.....	19
2 Zielsetzung	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Chemikalien, Reagenzien	22
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.4 Medien, Puffer, Lösungen.....	24
3.1.5 Primäre und sekundäre Antikörper	24
3.1.6 Peptide.....	25
3.1.7 Zelllinien.....	26
3.1.8 Versuchstiere	27
3.2 Zellbiologische Methoden	28
3.2.1 Kultivierung der Zelllinien.....	28
3.2.2 Passagieren der Zellen	28
3.2.3 Zellzahlbestimmung	28
3.2.4 Mykoplasmen PCR - Qualitätskontrolle	29
3.2.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen	31
3.3 <i>In vitro</i> Versuche	31
3.3.1 Durchflusszytometrie (fluorescence- activated cell sorting - FACS).....	31
3.3.2 Proliferations- /Viabilitätsassay	32
3.3.3 Kurzzeittest	34
3.3.4 Live Cell Imaging	34
3.3.5 Apoptose/Nekrose Assay.....	35
3.3.6 Western Blot Analyse.....	36
3.3.7 Hämolyseassay.....	36
3.4 <i>In vivo</i> Versuche.....	37
3.4.1 Subkutanen Xenograftmodell.....	37
3.5 Statistik	39

4	Resultate	40
4.1	Mykoplasmen PCR	40
4.2	<i>In vitro</i> Versuche	40
4.2.1	Durchflusszytometrischer Nachweis von PS auf der Tumorzelloberfläche.....	40
4.2.2	Vitalitäts- /Viabilitäts-Assay	42
4.2.3	Kurzzeittest	45
4.2.4	Live Cell Imaging	47
4.2.5	Apoptose/Nekrose Assay.....	47
4.2.6	Western Blot Analyse.....	49
4.2.7	Hämolyse- und Lymphotoxizitäts-Assay	50
4.3	<i>In vivo</i> Versuche.....	51
4.3.1	Subkutanen Xenograftmodell.....	51
5	Diskussion	53
5.1	Onkolytische Effekte von HDPs und deren Derivaten	53
5.2	NK-2-Derivate <i>in vitro</i>	53
5.2.1	NK-Lysin, NK-2 und seine Derivate	53
5.2.2	Molekulare Wirkmechanismen von HDPs – Korrelation mit membran- gebundenem Phosphatidylserin	54
5.2.3	Direkte membranolytische Effekte	56
5.2.4	Zytotoxizität gegen humane Zellen	56
5.3	NK-2-Derivate <i>in vivo</i> im murinen Xenograftmodell	58
5.3.1	Spezifische <i>in vivo</i> Effekte	58
5.3.2	Unspezifische <i>in vivo</i> Effekte	60
5.3.3	Folgerungen	60
5.4	Weitere <i>in vivo</i> Studien mit HDPs.....	61
5.4.1	Melittin.....	61
5.4.2	Magainin	62
5.4.3	Bovines Lactoferricin.....	62
5.4.4	Designer-HDP [D]-K ₃ H ₃ L ₉	63
5.5	Optimierung therapeutischer <i>in vivo</i> Ansätze.....	64
5.5.1	Verbesserung der Serumstabilität.....	65
5.5.2	Verbesserung der Selektivität	66
5.5.3	Ausblick.....	68
6	Thesen	70
	Literaturverzeichnis	72

Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist mit 447.000 Fällen im Jahr das am zweithäufigsten diagnostizierte Malignom in Europa und eine der Hauptursachen für krebisbedingte Todesfälle weltweit [1, 2]. Die derzeitigen therapeutischen Optionen des CRC, umfassen neben der chirurgischen Resektion, die beiden konventionellen zytotoxischen Behandlungen: Radiotherapie, welche relativ präzise ist und für eine lokale Tumorkontrolle eingesetzt wird und Chemotherapie, welche einen systemischen Effekt ausübt und eine wichtige Rolle sowohl in der kurativen als auch palliativen Situation spielt [3-8]. Aufgrund der starken Nebenwirkungen, der i.d.R. geringen Selektivität der angewandten Therapieregime sowie der Entwicklung von Resistenzen, besteht die Notwendigkeit, neue, selektivere und effektivere Therapieansätze zu entwickeln.

HDPs stellen diesbezüglich eine vielversprechende Alternative zur konventionellen Therapie dar. Es handelt sich hierbei um Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, welche in einer Vielzahl von Organismen, vom Insekt bis zum Menschen, nachgewiesen wurden [9-11]. Im Gegensatz zu herkömmlichen Antibiotika oder Chemotherapeutika wirken HDPs über eine direkte, physikalische Störung der Zellmembranintegrität ohne dabei einen spezifischen Rezeptor zu involvieren [9]. Neben ihrer bereits seit längerem bekannten antimikrobiellen und immunmodulatorischen Wirkung sind natürlich vorkommende und *de novo* synthetisierte (Designer-) HDPs in den letzten beiden Jahrzehnten wegen ihrer onkolytischen Aktivität zunehmend Gegenstand der Krebsforschung [11-15].

Das Ziel dieser kombinierten *in vitro* und *in vivo* Studie war es, zu untersuchen, ob Analoga des natürlich vorkommenden HDPs NK-Lysin eine (selektive) Zytotoxizität gegen CRC-Zellen aufweisen.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die onkolytische Aktivität von HDPs ursächlich auf oberflächenständiges Phosphatidylserin (PS) zurückzuführen ist. In einem ersten Ansatz wurden daher durchflusszytometrische Analysen zum Nachweis von PS auf 14 patienten-individuellen CRC Zelllinien durchgeführt. Basierend auf diesen Befunden konnten die analysierten Zelllinien in drei Kategorien unterteilt werden: PS^{high}, PS^{intermediate} und PS^{low}. Anschließend Vitalitäts- und Viabilitäts-Assays zeigten die onkolytische Wirksamkeit der untersuchten NK-2 Derivate, welche zwar teilweise in Relation zu den zuvor ermittelten PS-Werten stand, jedoch

auch zelllinienspezifisch war. Viabilitätstests nach kurzer Exposition (1h) sowie Live-Cell-Imaging Analysen bestätigten die in der Literatur beschriebene schnelle Wirkweise der HDPs. Mittels Apoptose/Nekrose-Assay und Western Blot Analyse wurde die Nekrose > Apoptose als Mechanismus der direkten Zelltötung registriert. Während ein Hämolyseassay an Vollblutproben verschiedener Probanden auch für höhere Peptidkonzentrationen keine unerwünschte Lyse nachwies, zeigte eine Viabilitätsuntersuchung von mit ansteigenden Konzentrationen behandelten humanen Lymphozyten einen dosisabhängigen Rückgang der Viabilität und eine damit verbundene unerwünschte und unselektive Wirkung der HDPs.

Die *in vitro* nachgewiesene onkolytische Wirksamkeit konnte auch *in vivo* bestätigt werden. Im murinen Xenograftmodell der Nacktmaus NMRI zeigte die neunmalige intratumorale Injektion (Einzeldosis 1 mg/kg Körpergewicht) über einen Zeitraum von drei Wochen eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums. Hervorzuheben ist, dass in keinem der behandelten Tiere Nebenwirkungen wie Hämolyse oder Lymphotoxizität auftraten. Ein inaktives Kontrollpeptid führte jedoch überraschend auch zu einer Tumorwachstumsverzögerung.

Gegenstand weiterführender Studien sollte, neben einer systemischen Applikation, auch die detaillierte Untersuchung der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen sein, welche in ihrer Gesamtheit zur Tumorkontrolle beitragen. Darüber hinaus könnte die exakte Identifikation der Eigenschaften der Tumorzelle, welche neben PS zur Bindung mit dem HDP führen, helfen, die Selektivität von neuen HDPs zu verbessern und damit einhergehend die Effektivität zu erhöhen und unerwünschte Nebenwirkungen zu reduzieren.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass onkolytische HDPs aufgrund ihrer selektiven Zytotoxizität und schnellen Wirkweise eine wichtige Rolle in zukünftigen Behandlungskonzepten des CRC spielen könnten.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC-Gen	Adenomatöses Polyposis Coli-Tumorsuppressorgen
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	bovines Serumalbumin
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CIN	chromosomale Instabilität
CRC	Kolorektales Karzinom
CT	Chemotherapie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCC	Deleted in colon cancer
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (eng.: epidermal growth factor receptor)
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde (eng.: hour)
HDPs	Host Defense Peptide
HNP	humanes neutrophiles Peptid
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
LFB	Bovines Lactoferrin
LfcinB	Bovines Lactoferricin
LK	Lymphknoten
M	Fernmetastase (TNM-Klassifikation)
mAk	monoklonaler Antikörper

MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
mCRC	metastasiertes Kolorektales Karzinom
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minuten
mM	Millimol
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2
MMR	Mismatch-Repair-Gens
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
N	Regionärer Lymphknoten (TNM-Klassifikation)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PARP	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase
PBLs	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung
PDX	Patient-derived Xenograft
PI	Propidiumiodid
RAS	Rat sarcoma Proto-Onkogen
RT	Radiotherapie
Stabw.	Standardabweichung
T	Primärtumor (TNM-Klassifikation)
ü.N.	über Nacht
UICC	Union International Contre le Cancer
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (eng.: vascular endothelial growth factor)
VM	Vollmedium
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Kolorektale Karzinogenesewege	4
Tabelle 2: TNM-Klassifikation	6
Tabelle 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide.....	26
Tabelle 4: Molekulare Charakteristika der CRC-Zelllinien	26
Tabelle 5: Mastermix für PCR Nachweis von Mykoplasmen	30
Tabelle 6: Standardisierte Reaktionsbedingungen für die Mykoplasmen-PCR	30
Tabelle 7: Primersequenzen der Mykoplasmen-PCR.....	30

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Tumorlokalisationen Krebsneuerkrankungen	2
Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz	5
Abbildung 3: Schema Hemikolektomie	8
Abbildung 4: Membranabhängige Wirkmechanismen der HDPs	18
Abbildung 5: Experimentelles Protokoll MTT/Calcein-Assay	34
Abbildung 6: Versuchsaufbau subkutanen Xenograftmodell	39
Abbildung 7: Mykoplasmen-PCR	40
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse.	41
Abbildung 9: MTT-Assay	43
Abbildung 10: HDP-vermittelte Zytotoxizität von CRC-Zellen.	45
Abbildung 11: Kurzzeit Exposition von HDPs gegen CRC-Zellen	46
Abbildung 12: Kurzzeitige HDP Exposition Live Cell Imaging	47
Abbildung 13: Apoptose/Nekrose-Assay	48
Abbildung 14: Western Blot Analyse	49
Abbildung 15: Hämolyse- und Lymphotoxizitäts-Assay	50
Abbildung 16: <i>In Vivo</i> Wachstumskinetik und Tumorzellapoptose	52

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Circa jede siebte Krebserkrankung in Deutschland betrifft den Darm. Nach den jeweils geschlechtsspezifischen Karzinomen [Mamma-Karzinom (71.000) bzw. Prostata-Karzinom (65.800)] steht Darmkrebs damit an dritter Stelle der häufigsten Krebsneuerkrankungen in Deutschland (s. Abbildung 1). 2010 erkrankten hierzulande circa 29.000 Frauen und 34.000 Männer an malignen Neuerkrankungen des Darmtraktes. Hiervon betrafen 2/3 aller Neoplasien den Dickdarm und etwa 30 % das Rektum [16]. Die Krebserkrankung des Dünndarms ist selten und wird im Folgenden nicht weiter berücksichtigt [16].

Das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom (*Colorectal cancer*, CRC) zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren für Männer und 75 Jahren für Frauen [16]. Von den 1980er Jahren bis zur Jahrtausendwende hat die altersstandardisierte Inzidenz an Darmkrebs zu erkranken bei Männern um 45 % und bei Frauen um 20 % zugenommen [17]. In den letzten zehn Jahren konnten jedoch sowohl ein geringer Rückgang der altersstandardisierten Inzidenz [18] sowie ein deutlicher Rückgang der altersstandardisierten Sterberate um 20 % festgestellt werden. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) lag in Deutschland zwischen 2009 und 2010 bei etwa 65 %. Etwa 14.000 Männer und 13.000 Frauen verstarben 2010 an Darmkrebs [16]. 2013 lag das Kolonkarzinom an dritter Stelle der häufigsten Todesfälle durch maligne Neoplasien, mit 17.108 Sterbefällen. Mit 7.610 Verstorbenen lag das Rektumkarzinom im selben Jahr an achter Stelle [19]. Hervorzuheben ist, dass trotz des demografischen Wandels, auch die absolute Zahl der Erkrankungs- und Sterbefälle in den letzten Jahren zurückgegangen ist [18].

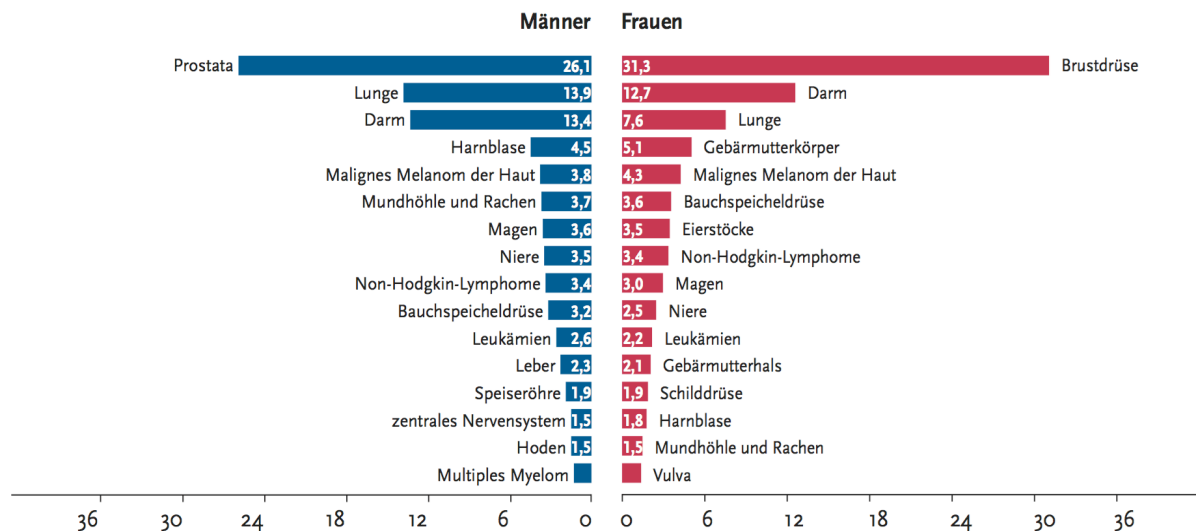


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2010 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) [16].

1.1.2 Ätiologie

Die Ursachen für das CRC sind multifaktoriell. Mit einem Anteil von über 85 % treten die meisten Karzinome sporadisch auf, ausgehend von multiplen Adenomen (Adenom-Karzinom-Sequenz s. Abbildung 2) [20, 21]. Genetische Faktoren spielen in 10 % aller Fälle eine Rolle. Zu nennende Ursachen sind einerseits, die als obligate Präkanzerose geltende Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) mit 1 % aller CRC-Fälle, das hereditäre, nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) mit 5 % aller CRC-Fälle, sowie eine positive Familienanamnese für das CRC [7]. Zu den Risikoerkrankungen zählen neben kolorektalen Adenomen, langjährige chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn. Hierbei besteht insbesondere für Patienten mit Colitis ulcerosa und gesicherter intraepithelialer Neoplasie ein erhöhtes Karzinomrisiko [20].

1.1.3 Risikofaktoren

Zu den als gesichert geltenden ernährungs-bedingten Risikofaktoren zählen eine ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung sowie Übergewicht. Die Bedeutung der Umweltfaktoren und insbesondere der Ernährung auf die Entwicklung des CRC wird aus der Beobachtung abgeleitet, dass Migranten aus Gebieten von niedriger CRC-Inzidenz in Gebiete mit höherer CRC-Inzidenz, diese höhere Inzidenz innerhalb einer Generation annehmen [7, 22].

Als Risikoerkrankungen gelten – wie zuvor bereits dargelegt – kolorektale Adenome und langjährige chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (insbesondere Colitis ulcerosa), Zustand nach Ureterosigmoideostomie, Karzinome von Mamma, Ovar und Corpus uteri [7]. Weitere Risikofaktoren sind ein langjähriger Nikotin-, sowie ein hoher Alkoholkonsum [7, 22].

1.1.4 Pathogenese

Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz als Erklärung der Pathogenese des sporadischen CRC führt auf die von Muto und Morson Mitte der 1970er Jahre beschriebenen morphologischen Veränderungen von Kolonadenomen zurück (s. Abbildung 2) [23, 24]. Etwa 15 Jahre später begründeten Vogelstein und Fearon das Tumorprogressions-Modell, auf Grundlage der von ihnen festgestellten molekularbiologischen Veränderungen. Dieses besagt, dass die Tumorentwicklung durch eine Akkumulation genetischer Veränderungen verursacht wird und über einen Zeitraum von ca. 10 - 15 Jahren vom Normalgewebe über das Adenom zum Karzinom führt [7, 25, 26].

Die Mutation des Adenomatöses Polyposis Coli-Tumorsuppressorgens (APC-Gen) stellt die Schlüsselmutation der Adenom-Karzinom-Sequenz dar. Entsprechend der Two-Hit-Hypothese nach Knudson, führen bei der sporadischen Tumorentstehung, zwei somatisch erworbene genetische Veränderungen zu einem Funktionsverlust des APC-Gens. Durch die Inaktivierung des APC-Proteins entstehen Tumoren. Dieser Phänotyp wird als chromosomal instabil (CIN) bezeichnet und liegt ca. 60 % aller sporadischen CRC zugrunde. Die daraus klassischerweise resultierenden Vorläuferläsionen sind das tubuläre und tubulovillöse Adenom [23]. Durch eine Mutation des Protoonkogens K-RAS kommt es zu einem weiteren Wachstum der entstandenen low-grade Dysplasie. Durch einen sich anschließenden Funktionsverlust des DCC (deleted in colon cancer), welches für ein Zelladhäsionsmolekül kodiert, kommt es zum high-grade Dysplasie Adenom. Die Mutation bzw. der Allelverlust des p53 Tumorsuppressorgens führt schließlich zur Ausbildung eines Karzinoms [21, 26-28].

10 - 15 % der sporadisch auftretenden Tumoren entstehen infolge von Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Zur Instabilität kommt es in Folge von somatischen

Mutationen von DNA-Reparaturgenen (hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2). Der Funktionsverlust führt zu einer erhöhten Mutationsrate, wovon insbesondere die Mikrosatelliten der DNA betroffen sind [29, 30].

5 - 10 % aller CRC sind erblich bedingt. Das HNPCC ist mit einem Anteil von 5 % aller CRC die häufigste Form des hereditären Karzinoms. Die Vererbung ist autosomal dominant und führt mit einer Wahrscheinlichkeit von über 80 % zum CRC, meist bereits in jüngerem Alter und gehäuft im rechten Kolon (Lynch-I-Syndrom). Zugrunde liegt eine MSI mit vererbter oder erworbener Mutation eines Mismatch-Repair-Gens (MMR), welches neben dem Kolonkarzinom (Lynch-Syndrom-I) auch andere Tumormanifestationen (Lynch-II-Syndrom: Hirn, Haut, Magen, Dünndarm, hepatobiliäres System, Ureter, Ovar und Endometrium) verursachen kann. Die ebenfalls erbliche FAP gilt als obligate Präkanzerose und ist für ca. 1 % aller CRC verantwortlich [7, 22].

Tabelle 1: Kolorektale Karzinogenesewege [23]

Vorläuferläsion	Schlüsselmutation	Sekundäre genetische Veränderungen	MSI-Status	Häufigkeit
Adenom	APC	KRAS-Mutation, TP53+++, CIN pos.	Stabil (MSS)	60 %
TSA oder (tub.-)villöses Adenom	KRAS	CPG-Methylierung mit Genausfällen (MGMT), TP53+++, CIN pos.	Stabil (MSS) oder niedrig instabil (MSI-L)	20 %
Sessiles serratiertes Adenom	BRAF	CPG-Methylierung mit Genausfällen (MLH1 part., MGMT, p16), TP53+, CIN neg.	Niedrig instabil (MSI-L)	12 %
		CPG-Methylierung mit Genausfällen (MLH1) CIN neg.	Hoch instabil (MSI-H)	8 %

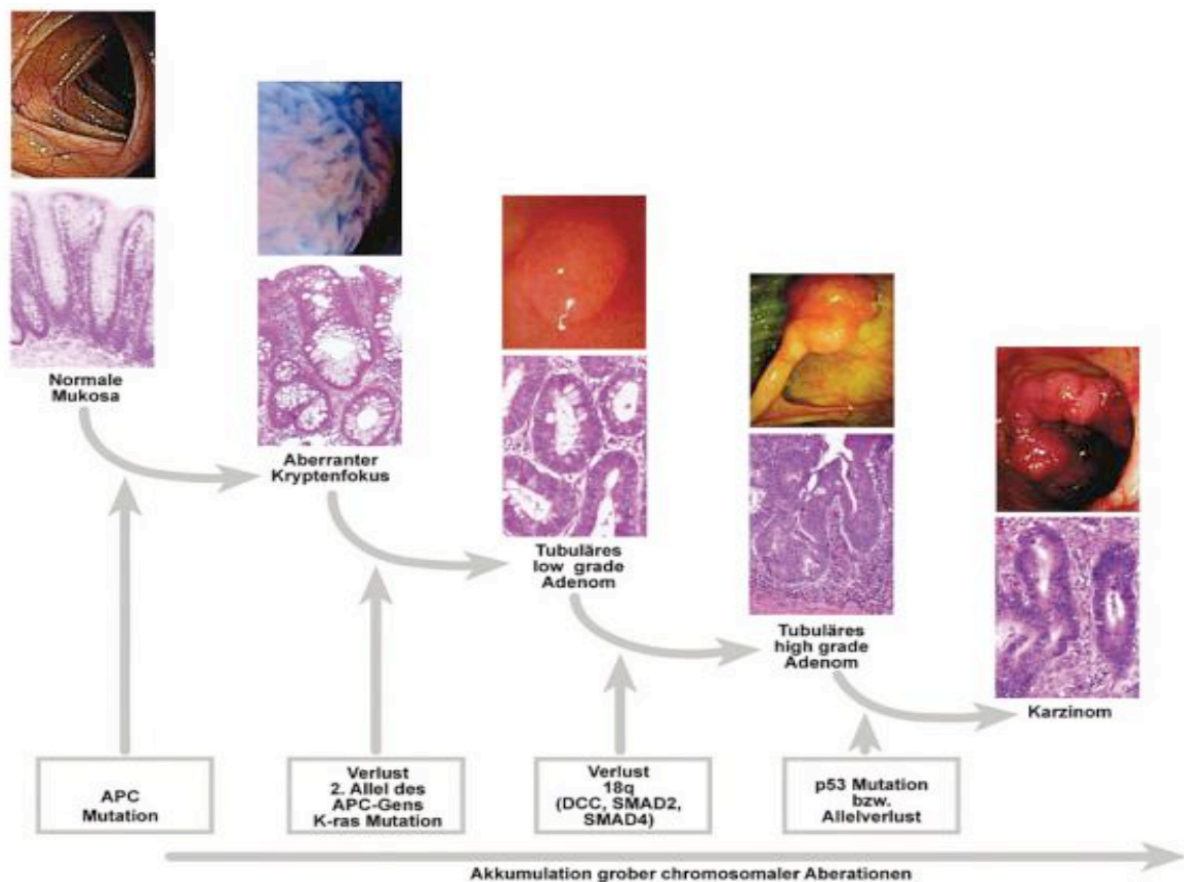


Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz mit den zugrunde liegenden molekularen Alterationen nach Fearon und Vogelstein[23].

1.1.5 Histologie

In Kolon und Rektum überwiegen epitheliale Tumoren vor anderen Entitäten. Nicht-epitheliale Tumoren, welche primär von ortsständigen mesenchymalen Zellen ausgehen, sind selten. Diese werden häufig als Stromatumoren bezeichnet, da eine eindeutige histogenetische Zuordnung oft nicht möglich ist [21].

Die epithelialen Karzinome entwickeln sich in über 90 % aller Fälle auf dem Boden kolorektaler Adenome [21]. Histologisch werden nach der WHO Klassifikation von 1989 drei Adenomtypen unterschieden. Das Entartungsrisiko steigt mit der Tumorgöße und korreliert mit dem Adenomtyp. Das tubuläre Adenom ist mit 60-65 % das häufigste und entartet in etwa 1-10 % der Fälle. Es ist aus verzweigten Tubuli aufgebaut und wächst häufiger gestielt, seltener breitbasig. Das villöse Adenom ist mit 20-25 % der zweithäufigste Adenomtyp und weist mit 20-40 % die höchste Entartungsrate auf. Es besteht aus finger- oder zottenartigen

Stromaauffaltungen und wächst überwiegend breitbasig. Mit 5-10 % kommt das tubulovillöse Adenom am seltensten vor und entartet in ca. 20 % der Fälle. Es stellt histologisch eine Mischform der anderen beiden Adenomtypen dar [21, 28].

1.1.6 Tumorlokalisation

Das CRC verteilt sich mit folgender Häufigkeit auf die unterschiedlichen Abschnitte des Dickdarms und Rektums: Rektum (50 %) > Sigma (30 %) > Coecum/Colon ascendens (10 %) > übriges Kolon (10 %) [7]. Das proximale Kolonkarzinom ist hierbei in seiner Karzinogenese häufiger mit MSI assoziiert, wohingegen beim distalen Kolonkarzinom die CIN im Vordergrund steht [29].

1.1.7 Tumorklassifikation

Die Dukes Klassifikation ist heute weitgehend durch die TNM-Klassifikation ersetzt worden [22]. Anhand der TNM-Klassifikation erfolgt die Einteilung in die Stadien 0 - IV gemäß UICC (Union International Contre le Cancer) [31].

Tabelle 2: TNM-Klassifikation (UICC, 2010) [31]

T-Primärtumor	
TIS	Carcinoma in situ: Intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
T1	Submukosa
T2	Muscularis propria
T3	Subserosa, nicht peritonealisiertes perikolisches/perirektales Gewebe
T4a	Viszerales Peritoneum
T4b	Andere Organe oder Strukturen
N-Regionäre Lymphknoten	
N0	Keine regionäre Lymphknotenmetastase (LK)
N1a	1LK
N1b	2-3 LK
N1c	Tumorknötchen [=Satellit(en)] im Fettgewebe der Subserosa oder perikolischen/-rektalen
N2a	4-6 LK
N2b	≥ 7LK
M-Fernmetastasen	

M0	Keine Fernmetastasen (M)		
M1a	Fernmetastasen in 1 Organ		
M1b	Fernmetastasen in mehr als 1 Organ oder im Peritoneum		
Stadiengruppierung (UICC, 2010)			
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T1	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N1	M0
Stadium IIC	T4b		
Stadium IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
Stadium IIIC	T1, T2	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T3, T4b	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b

1.1.8 Vorsorge und Früherkennung

Als erste orientierende Untersuchungen kommen die digitale rektale Untersuchung und die Stuhluntersuchung auf okkultes Blut zum Einsatz. Als Goldstandard mit höchster Sensitivität und Spezifität gilt die Koloskopie. Seit Oktober 2002 wird diese in Deutschland ab dem 55. Lebensjahr als Bestandteil des gesetzlichen Krebsvorsorgeprogramms eingesetzt. Nach einer Studie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) 2015, in welcher die Daten von 4,4 Millionen Koloskopien untersucht wurden, wurden im ersten Jahrzehnt seit deren Einführung 180.000 Darmkrebsvorstufen entdeckt und entfernt und mehr als 40.000 Fälle von Darmkrebs in einem frühzeitigen Stadium entdeckt, in welchem eine Heilung noch möglich war. Demgegenüber standen 4.500 Überdiagnosen [32]. Die ebenfalls vom DKFZ durchgeführte DACHS-Studie mit rund 5.000 Darmkrebspatienten und fast 5.000 Kontrollpersonen zeigte, dass das Risiko innerhalb von zehn Jahren nach einer Vorsorgekoloskopie an Darmkrebs zu erkranken, um 90 % niedriger ist als bei

Personen, die keine Vorsorge-Darmspiegelung in Anspruch genommen hatten [33], [6].

1.1.9 Therapie

1.1.9.1 Chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms

Die arterielle Gefäßversorgung spielt bei ausgedehnten Tumoroperationen mit kurativer Zielsetzung eine wichtige Rolle, da zum einen die drainierenden Lymphabflusswege entlang der arteriellen Gefäße verlaufen und en bloc mit dem tumortragenden Darmsegment entfernt werden müssen. Zum anderen muss postoperativ eine ausreichende Gefäßversorgung zur Versorgung der Anastomose und zurückgelassener Strukturen erreicht werden.

Davon ausgehend haben sich folgende Operationsverfahren in der chirurgischen Therapie des CRC etabliert: Hemikolektomie rechts, Hemikolektomie links, Transversumresektion, radikale Sigmaresektion, laparoskopische Kolonoperationen [22, 34].

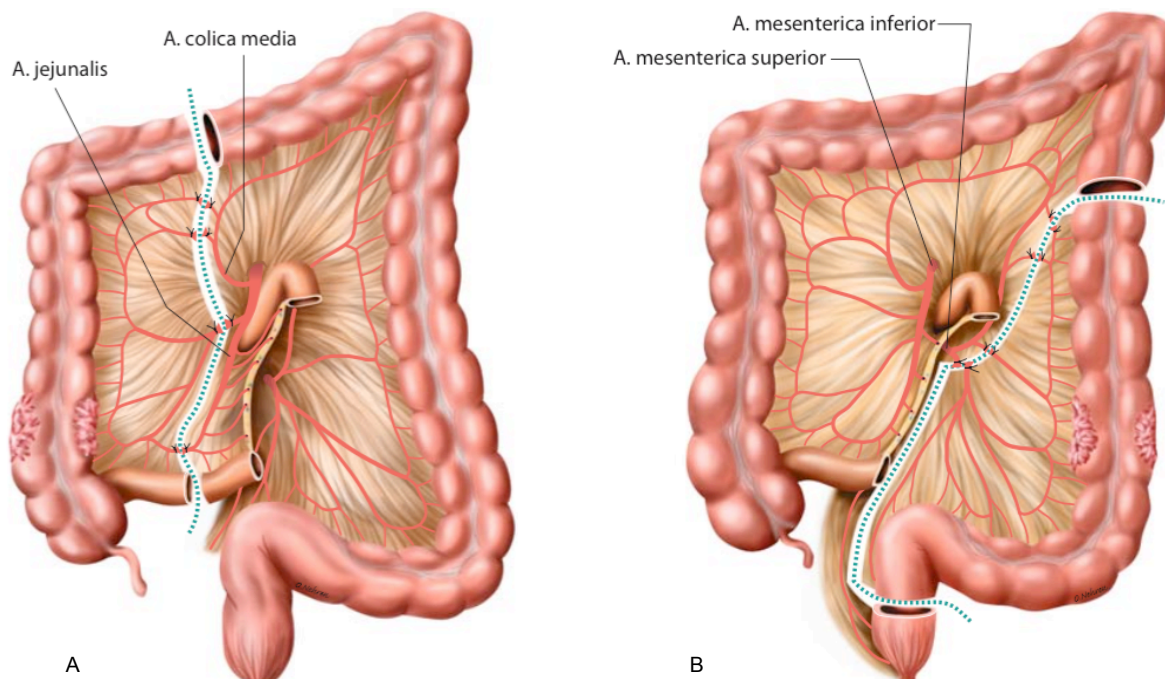


Abbildung 3: Schema der vollständigen Hemikolektomie rechts (Abbildung A) bzw. links (Abbildung B) (Nach Allgöwer et al. 1981) [22].

1.1.9.2 Multimodale perioperative Therapie beim Kolonkarzinom

Adjuvante Therapie

Beim Kolonkarzinom hat sich die adjuvante Chemotherapie (CT) mit 5-Fluoruracil (5-FU)/*Leucovorin* ab dem UICC Stadium III in zahlreichen randomisierten Studien als prognostisch günstig und mit signifikantem Überlebensvorteil erwiesen und stellt mittlerweile die Standardtherapie dar. Kein signifikanter Überlebensvorteil nach adjuvanter CT besteht für Patienten mit UICC Stadium II, so dass eine mögliche Behandlung im Einzelfall mit dem Patienten erwogen werden kann. Patienten mit kurativ reseziertem Kolonkarzinom und UICC Stadium I erhalten keine adjuvante Therapie [6, 22].

Als Chemotherapieprotokoll für das Kolonkarzinom hat sich das FOLFOX4-Regime etabliert. Es kombiniert Oxaliplatin mit Folinsäure (FS) und 5-FU. Durch die Kombination aus FS und 5-FU konnte in mehreren randomisierten Studien (Francini, G. et al. 1994; O'Connell, M.J., et al. 1997; Gill, S., et al. 2004; MOASIC-Studie 2004; NSABP-Studie C-07 2006) eine signifikante Senkung der Rezidivrate sowie des Gesamtüberlebens nachgewiesen werden.

Die Strahlentherapie, sowie die neoadjuvante (Chemo-)Therapie sind nicht Standard bei der Behandlung des Kolonkarzinoms [6, 22].

1.1.9.3 Innovationen in der multimodalen Therapie des metastasierten CRC - monoklonale Antikörper

Retrospektive Untersuchungen der letzten zwanzig Jahre zeigen eine deutliche Verbesserung der Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit metastasiertem CRC (mCRC). Lag das mediane Gesamtüberleben zu Anfang der 90er Jahre noch bei acht bis zwölf Monaten, so liegt es heutzutage bei mehr als 30 Monaten. Wichtig hierfür waren neben der Einführung der o.g. Zytostatika (Oxaliplatin, Irinotecan) und Kombination dieser mit dem Therapiestandard 5-FU, auch die Zulassung zielgerichteter Substanzen. Zu diesen zählen unter anderem der gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gerichtete monoklonale Antikörper (mAk) Bevacizumab und die gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichteten mAk Cetuximab und Panitumumab [35].

Anti-VEGF-mAK/Bevacizumab

VEGFs sind endothel-spezifische Mitogene und Induktoren der Angiogenese, welche von einer Vielzahl von Tumorzellen freigesetzt werden. Sie spielen eine entscheidende Rolle für das Tumorwachstum, da sie die Bildung neuer, intratumoraler Gefäße fördern und somit für die ausreichende Versorgung von Tumoren (ab einem Durchmesser von 1-2 mm) mit Sauerstoff und Nährstoffen verantwortlich sind [36, 37]. Bevacizumab bindet und inaktiviert von Tumoren produzierte VEGFs, wodurch die Bildung neuer Gefäße verhindert und die Tumorperfusion reduziert wird [38, 39].

Anti-EGFR-mAK/Cetuximab und Panitumumab

Der EGFR ist eine membrangebundene Tyrosinkinase, welche den MAP-Kinase-Signalweg aktiviert und damit einhergehend multiple prokarzinogene Effekte, wie Zellproliferation, Motilität, Adhäsion, Invasion, Zellüberleben und vermittelt. Die Überexpression von EGFR wurde für viele Tumoren – unter anderem das CRC – beschrieben und korreliert mit der Tumorprogression und dem Risiko zur Metastasierung [40, 41]. Die Gruppe dieser Biologika sind aufgrund ihrer Wirkweise auf ein intaktes Ras-Protoonkogen angewiesen und kommen daher nur beim mCRC mit KRAS-Wildtypstatus zum Einsatz [42]. Im Falle einer aktivierenden KRAS Mutation stimuliert diese den RAS/MAP-Kinase-Signalweg unabhängig von EGFR. Diese Mutation liegt in ca. 40-45% aller kolorektalen Adenokarzinome vor [43]. Die Untersuchung des KRAS-Mutationsstatus ist vor Einleiten einer Therapie mit anti-EGFR-mAk daher obligatorisch [44].

1.1.10 Prognose

Die Rezidivrate des Kolonkarzinoms ist mit 20-40 % als hoch einzustufen [8]. Etwa 50 % aller Rezidive werden in den ersten 18 Monaten postoperativ erkannt. Nach 36 Monaten treten nur 15 % der Rezidive auf. Die lokoregionäre Rezidivrate des Rektumkarzinoms beträgt 10-20 % und mehr [22].

Die 5-JÜR für das Kolonkarzinom ist stadienabhängig. UICC I: ca. 80-95 %, UICC II: 60-85 %, UICC III: 30-45 %, UICC IV: 5-20 % [7, 8].

Die 5-JÜR für das Rektumkarzinom ist ebenfalls stadienabhängig wie folgt verteilt: UICC I: bis 95 %, UICC II: bis 85 %, UICC III: bis 55 %, UICC IV: 5 % [7].

1.2 Individuelle Tumormodelle

Das CRC stellt eine auf histologischer und molekularer Ebene heterogene Erkrankung dar. Diese Heterogenität beeinflusst maßgeblich das Ansprechen auf Arzneimittel sowie die Prognose der Erkrankung im Allgemeinen. Derzeit sind, wie oben beschrieben, auf molekularer Ebene drei Hauptmechanismen der Pathogenese bekannt: CIN, CIMP und MMR-D oder MSI. Insbesondere Tumoren der letzten Kategorie zeigen eine große Heterogenität bzgl. des Ansprechens auf aktuell verwendete Zytostatika, welche bis zur Resistenz reicht [45].

Eine bessere Prognostizierbarkeit für das Ansprechen auf eine etwaige zytostatische Therapie ist daher von großer Bedeutung, um das Outcome von CRC-Patienten zu verbessern. Dafür ist es wichtig, weitere molekulare Marker zu finden und innovative Behandlungskonzepte zu testen, wofür wiederum adäquate *in vitro* und *in vivo* Modelle benötigt werden. Wichtig ist hierbei, dass Morphologie, Zelldifferenzierung und molekulare Signatur des Originaltumors erhalten bleiben [46]. Es existieren zwar eine Vielzahl etablierter und kommerziell verfügbarer CRC-Zelllinien [47], diese liegen jedoch in der Regel in einer hohen Zellpassage vor und repräsentieren daher nicht mehr die Biologie des Originaltumors [48, 49]. Die Etablierung von individuellen Tumormodellen, welche die Heterogenität und damit auch die Komplexität der Erkrankung reflektieren, ist daher von großer Relevanz für die onkologische Forschung im allgemeinen wie auch zukünftig im klinischen Alltag, im Sinne einer zielgerichteten und auf den jeweiligen Patienten abgestimmten individuellen Therapie. Vor diesem Hintergrund stellt ein Schwerpunkt der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie die Etablierung solcher individuellen Tumormodelle dar, welche idealerweise eine Zelllinie, das dazu gehörige Xenograft (Patient-derived Xenograft, PDX), sowie tumor-infiltrierende und zirkulierende T- und B- Zellen umfassen [45, 50, 51]. Bislang wurden über 100 individuelle Modelle von Patienten etabliert, welche alle molekularen Subklassen repräsentieren. Die Relevanz solcher Modelle, insbesondere in Hinblick auf deren prädiktiven therapeutischen Charakter, konnte in einer unserer Voruntersuchungen gezeigt werden. So zeigte eine patienten-individuelle Zelllinie mit MMR-D eine relative Resistenz gegenüber Irinotecan *in vitro*. *In vivo* wurde hingegen eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums nach systemischer Gabe von Irinotecan erzielt [45].

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich größtenteils auch um solche individuellen Tumorzelllinien in niedriger Zellpassage, wodurch die Biologie des Originaltumors erhalten bleibt und keine geno- und phänotypische Heterogenität auftritt, wie sie bei längerfristiger Zellkultur entstehen kann [52].

1.3 Host-Defense-Peptide

Host-Defense-Peptide (HDPs) sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, welche ubiquitär in der Natur vorkommen. Dort wurden sie in verschiedensten Lebewesen, wie Pflanzen, Insekten, Amphibien und Säugetieren, nachgewiesen [11, 53]. HDPs fanden ursprünglich aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung als alternative Behandlungsmethode bei bakteriellen Infektionen Beachtung [9].

In den letzten beiden Jahrzehnten sind sie wegen ihrer onkolytischen Aktivität zunehmend Gegenstand der Krebsforschung [15]. HDPs weisen darüber hinaus einige vielversprechende Vorteile gegenüber aktuell gebräuchlichen Chemotherapeutika auf. Diese umfassen u.a. eine selektive Zytotoxizität, die Fähigkeit, (intrinsische) Resistenzmechanismen von Tumorzellen zu umgehen und mögliche additive bzw. synergistische Effekte in Kombinationstherapien zu vermitteln [11].

1.3.1 Aufbau und Eigenschaften von HDPs

Bislang wurden mehr als 1000 natürlich vorkommende HDPs isoliert, welche jedoch keine einheitliche spezifische molekulare Zusammensetzung oder molekulare Konformation aufweisen. Sie variieren in einer Größe von ~ 12-50 Aminosäuren [54]. Trotz ihrer strukturellen Unterschiede, zeigen alle HDPs eine nach außen positive Ladung (Kation) sowie „a threshold of hydrophobicity“, was es ihnen ermöglicht, sich amphiphil verhalten zu können. [55]. HDPs sind klassischerweise oberflächen- und membranaktive Wirkstoffe. Sie können verschiedene Zellen töten, indem sie an diese binden und die Integrität der Zellmembran und damit auch die Homöostasemechanismen der Zielzelle zerstören [56]. Ihre Amphiphilität ermöglicht es den HDPs sich in Zellmembranen zu integrieren und diese permeabel zu machen, indem sie Poren, Löcher oder Ionen-Kanäle bilden [57]. Die Vorstellung, dass eine Zelle über eine für sie charakteristische Lipidzusammensetzung der Zellmembran besitzt ist weit verbreitet. Diese ermöglicht es den HDPs anhand unterschiedlicher

physiochemischer Eigenschaften der Lipide und spezifischer Lipid-Zusammensetzungen an der Zelloberfläche, zwischen den Zellmembranen von bspw. Bakterien und malignen, sowie benignen (Tumor-)Zellen zu unterscheiden [58].

Im Gegensatz zu Chemotherapeutika, welche eine rezeptorvermittelte Bindung mit der Zielzelle eingehen, gehen HDPs kovalente Bindungen ein. Die kationischen Peptide binden an anionische Lipide wie Phosphatidylserin (PS), welche an der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden ohne dabei einen spezifischen Rezeptor zu benötigen [57]. Diese Eigenschaft und die Fähigkeit ihre Wirkung innerhalb von sehr kurzer Zeit auszuüben, schützen sie vor Resistenzmechanismen wie der Mutation des Zielrezeptors – mit daraus resultierender Selektion von multiresistenten Varianten – [59], oder der Überexpression von Resistenzproteinen, welche das Effektormolekül aus der Zelle pumpen [60].

1.3.2 HDPs mit antitumoraler Aktivität

Im letzten Jahrzehnt stellte sich zunehmend heraus, dass einige HDPs die Fähigkeit haben eine Vielzahl von Krebszellen zu inaktivieren [61-63]. Strukturelle Analysen zeigten, dass die Mehrheit dieser HDPs kationisch ist und eine molekulare Architektur annimmt, die entweder eine α -Helix oder ein β -Faltblatt beschreibt, auch wenn mittlerweile weitere Strukturen bekannt sind [13, 63, 64]. Eine eingehendere Untersuchung dieser Peptide führte zu einer weiteren Einteilung in zwei Subgruppen. Erstere beinhaltet Peptide mit geringer Selektivität, welche toxisch gegen Tumorzellen aber auch gegen normale Zellen sind. Hierzu gehören die humanen Defensine, humanes neutrophiles Peptid 1 (HNP-1), HNP-2, HNP-3 [65] sowie das in dieser Arbeit verwendete Melittin [14]. Die Peptide der zweiten Gruppe üben eine Toxizität gegen Tumorzellen aus, aufgrund einer höheren Selektivität jedoch nicht gegen gesunde eukaryote Zellen und Erythrozyten [66].

Es gilt heutzutage als gesichert, dass drei peptidbasierte Faktoren die antitumorale Wirksamkeit von HDPs wesentlich bestimmen. Hierzu zählen die positive Nettoladung, Hydrophobizität und Amphiphilität [67-69].

1.3.2.1 Positive Nettoladung

Wie oben beschrieben ist die positive Nettoladung von fundamentaler Wichtigkeit für die Fähigkeit der HDPs, Krebszellen zu adressieren und zu töten [69]. Hierüber binden sie anionische Anteile der Zellmembran von Krebszellen kovalent und entfalten anschließend ihr onkolytisches Potential [10].

1.3.2.2 Hydrophobizität

Hydrophobizität kann als Maß für die Affinität eines Peptides für die apolare Kernregion der Lipiddoppelmembran angesehen werden [70]. Sie wird als Triebkraft für die Fähigkeit von α -Helix HDPs, sich in die Membran von Krebszellen zu integrieren, anerkannt [13, 61].

1.3.2.3 Amphiphilität

Unter Amphiphilität versteht man die klare räumliche Trennung von hydrophilen und hydrophoben Anteilen innerhalb eines Proteins oder Peptids. Sie stellt eine wichtige Determinante für die Fähigkeit dieser Moleküle dar, sich in die amphiphile Umgebung der Lipiddoppelmembran zu interkalieren [71, 72].

1.3.3 Charakteristika der Zelloberfläche von Tumorzellen

1.3.3.1 Anionisches Phosphatidylserin

Ein wichtiger Unterschied zwischen der Zellmembran von gesunden eukaryoten Zellen und Karzinomzellen ist die Anwesenheit von negativ geladenem PS an der Zelloberfläche. PS liegt physiologischerweise an der inneren Schicht der eukaryoten Plasmamembran [73]. Man spricht aufgrund der ungleichen Verteilung der Hauptphospholipide zwischen der inneren und äußeren Schicht der normalen, gesunden Zellmembran auch von Zellmembran-Asymmetrie [74]. Der Verlust der Zellmembran-Asymmetrie wurde für viele Tumorentitäten nachgewiesen und stellt einen einheitlichen Marker für maligne Zellen dar [75]. Bereits 1991 zeigten Utsugi et al., dass Tumorzellen drei- bis siebenmal mehr PS an ihrer Oberfläche präsentieren, als normale Keratinozyten [76]. Bei nicht malignen Zellen wird PS als Apoptosemarker nur im Rahmen des programmierten Zelltodes an der Zelloberfläche präsentiert. Diese Zellen locken dann Makrophagen und dendritische Zellen an, welche diese phagozytieren [77]. Tumorzellen haben hingegen Mechanismen

entwickelt, dem apoptotischen Zelltod und damit verbunden der Makrophagen-vermittelten Phagozytose zu umgehen, obwohl sie erhöhte PS-Level an ihrer Zelloberfläche aufweisen [12].

Kationische HDPs hingegen binden selektiv an PS an diesen Tumorzellen. Als Bestätigung dieser Annahme konnten Papo et al. 2006 die Kollokalisierung des synthetischen HDPs [D]-K₆L₉ mit PS auf der Oberfläche von Tumorzellen nachweisen [78].

1.3.3.2 Mikrovilli

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen malignen und benignen Zellen ist deren vergrößerte Oberfläche, resultierend aus einer erhöhten Anzahl von Mikrovilli auf diesen Zellen. Dies sollte für den Einsatz membranaktiver Peptide von Nutzen sein, da eine vergrößerte Zelloberfläche die Bindung von einer größeren Menge Peptid ermöglicht und die Effizienz somit erhöht werden kann [11, 79]. 1998 wiesen Chan et al. beim Einsatz des HDP Ceropin B gegen Tumorzellen verschiedener Entitäten (u.a. wie Ags (Magenkarzinom) und KG-1 (Leukämie)) einen stärkeren zytolytischen Effekt als bei Anwendung gegen Fibroblasten und Erythrozyten nach. Sie führten ihre Ergebnisse auf eine erhöhte Anzahl an Mikrovilli auf den untersuchten Tumorzellen zurück [80].

1.3.3.3 Veränderte Membranfluidität

Die Membranfluidität stellt einen wichtigen Parameter dar, da eine erhöhte Fluidität eine Insertion des amphiphilen Peptides in die Membran erleichtert. In vielen tumorösen Zellen scheint dieser Parameter verändert, auch wenn bislang unklar ist, ob diese Annahme für alle Karzinome gleichermaßen zutrifft [12]. Die Mehrzahl der Studien weist auf eine erhöhte Membranfluidität bei malignen Zellen hin, wie beschrieben für Lymphome, Lungentumoren und Gliome [62, 81-83]. Andererseits gibt es Beobachtungen, dass Zellen solider Tumoren eine niedrigere Membranfluidität aufweisen, als ihre gesunden Ausgangszellen [84].

1.3.4 Onkolytische Wirkmechanismen der HDPs

1.3.4.1 Membranabhängige Wirkmechanismen

Heute sind zwei Hauptmechanismen als Folge der membranabhängigen Zelltötung durch HDPs beschrieben: Nekrose und Apoptose [11, 61, 85]. Zur Nekrose kommt es durch eine Lyse der Zellmembran, wohingegen eine Apoptose durch den mitochondrialen lytischen Effekt erzielt wird. Dabei scheinen beide Mechanismen von der Anwesenheit anionischer Lipide – wie PS – auf der Zellmembran abhängig zu sein [78].

Apoptose durch Unterbrechen der mitochondrialen Membran

Pro-apoptotische Effekte können von solchen HDPs erzielt werden, die eine funktionelle Domäne besitzen. Diese ermöglicht eine rezeptor-vermittelte oder rezeptor-unabhängige Internalisierung in eukaryotische Zellen, ohne Zerstörung der Zellmembran. HDPs reichern sich im Zytosol an und verursachen eine Unterbrechung der mitochondrialen Membran. Daraus resultiert eine Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und die Einleitung des programmierten Zelltodes der Zielzelle [86, 87]. Andere HDPs translozieren spontan ins Zytoplasma und depolarisieren die innere Membran der Mitochondrien, was ebenfalls eine Apoptose induziert. Noch ist unklar, ob die Zerstörung der Mitochondrien in ansonsten intakten Zellen auf direkten oder indirekten Mechanismen beruht [88, 89].

Nekrose durch Destabilisierung der Integrität der Zellmembran

Es existieren verschiedene Modelle, welche die biologische Aktivität der HDPs zu erklären versuchen. Die geläufigsten sind das „Toroidal-Pore-Model“ [90, 91], das „Carpet-Model“ [92] und das „Barrel-Stave-Model“ [11] (s. Abbildung 4).

Gemäß dem „Toroidal-Pore-Model“ bilden Peptide und Lipide eine supramolekulare Verbindung, welche eine wassergefüllte Pore formt. Nachdem sich die HDPs an der Plasmamembran bis zu einer gewissen Schwellenkonzentration angereichert haben, wölbt sich diese punktuell nach innen und es bildet sich eine Pore aus HDPs und Membranlipiden. Diese negativ geladenen Phospholipidanteile der Zellmembran wirken hierbei als Stabilisatoren der Porenwand, zwischen den kationischen und sich daher abstoßenden HDPs. Als Folge dessen kann es durch zwei unterschiedliche Vorgänge zur Zelltötung kommen. Entweder durch Aufhebung der Membranintegrität und Micellenbildung der Zellmembran, oder durch die Depolarisierung der Membran

über die Pore [13]. Obwohl unter experimentellen Bedingungen solche Porenbildungen gezeigt werden konnten [93], besteht wenig Anhalt dafür, dass die Mehrzahl der HDPs auch unter *in vivo* Bedingungen transmembranäre Poren ausbildet [94].

Im „Carpet-Model“ reichern sich kationische, amphipatische Peptide parallel zur anionischen Membranoberfläche an und bedecken diese anschließend wie eine Art „HDP-Teppich“. Sobald der „Peptid-Teppich“ zu dicht wird und ein Schwellenwert erreicht wurde, wird die Doppellipidschicht der Zellmembran destabilisiert. Daraus resultiert eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran und die HDPs werden in die Zellmembran integriert und durchdringen diese anschließend. Dabei kommt es zur Aufhebung der Membranintegrität, zur Micellenbildung der Membran und damit einhergehend zur Zelltötung. Dieses Modell tritt überwiegend bei HDPs die selektiv gegenüber Tumoren sind auf [11, 92].

Das „Barrel-Stave-Model“ tritt überwiegend bei nicht-tumorselektiven HDPs auf, welche eine bestimmte Menge von Aminosäureresten aufweisen müssen, um die gesamte Plasmamembran zu überbrücken. Die HDPs formen dabei eine transmembranale Pore, welche nur aus HDPs aufgebaut ist. Dies führt zur Depolarisierung der Zellmembran und daraus resultierend zum Zelltod durch Nekrose [13]. In der Literatur finden sich verschiedene molekulare Erklärungen, welche zur Destabilisierung der Lipiddoppelschicht führen, diese werden hier jedoch nicht im Einzelnen aufgeführt.

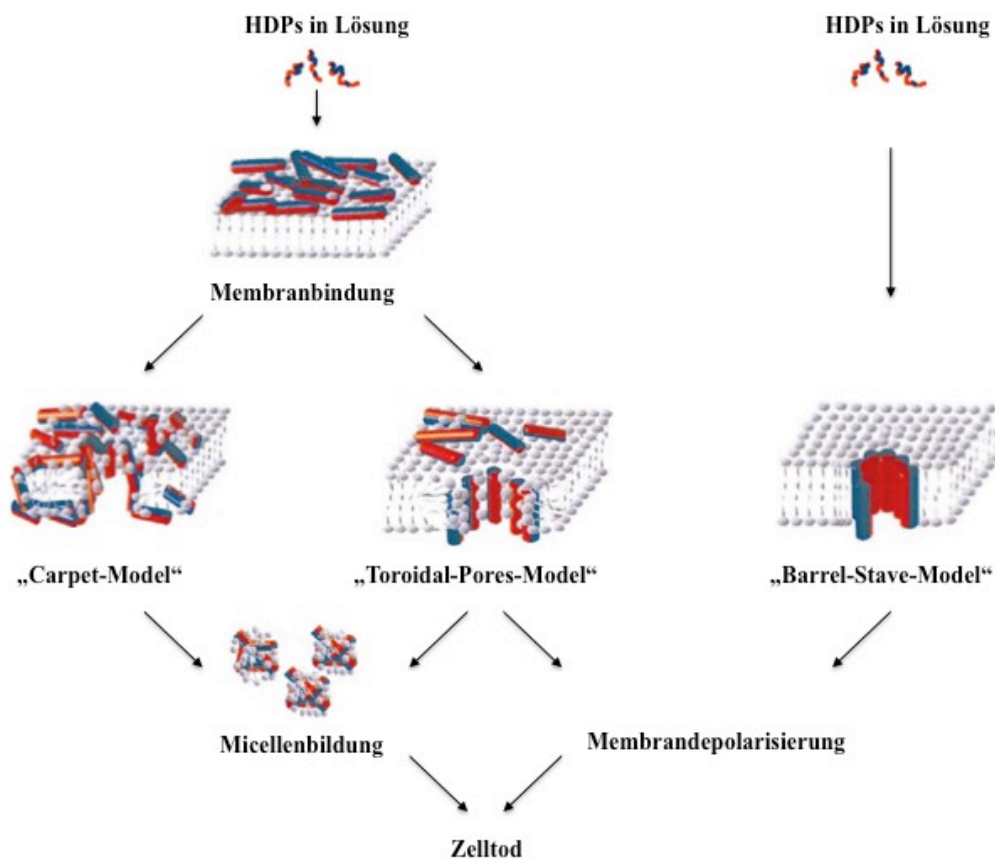


Abbildung 4: Membranabhängige Wirkmechanismen der HDPs. Illustration und Übersicht verschiedener Mechanismen der durch HDPs vermittelten Lyse der Zellmembran. Peptide, die nicht zellselektiv sind, binden alle Arten von Membranen und formen transmembrane Poren via des „Barrel-Stave“ Mechanismus. Tumorzell-spezifische HDPs hingegen führen über das „Carpet-Modell“ zur Zelltötung. Eine Zwischenstufe stellt die Formierung transients Poren dar. Diese werden als „toroidale Poren“ beschrieben, welche bei Peptiden auftreten, die lang genug sind, um die gesamte Membran zu überbrücken [11].

HDP-Aktivierung durch saures Milieu in der Umgebung solider Tumoren

Neben den oben aufgeführten charakteristischen Veränderungen der Zellmembran, besitzen solide Tumoren noch eine weitere Besonderheit, welche sie für eine gezielte Behandlung mit HDPs anfällig macht. Sie bilden in ihrer Umgebung ein saures Milieu [95]. Dieses entsteht größtenteils durch das Anfallen von Laktat als Produkt einer anaeroben Glykolyse und dessen insuffizienten Abtransportes. Dieses saure Milieu aktiviert HDPs, die aus Aminosäuren wie Histidin zusammengesetzt sind, da diese nur bei niedrigen pH-Werten positiv geladen vorliegen [96]. Diese Herangehensweise beschrieben Makovitzki et al. 2009, als sie am synthetischen HDP [D]-K₆-L₉ Lysinreste gegen Histidin austauschten. *In vivo* konnte so im murinen Xenograftmodell ein signifikanter Rückgang von Prostata Tumoren (Zelllinie: 22RV1)

sowohl für die intratumorale als auch für die systemische Applikation, bei gleichzeitiger Reduktion der systemischen Nebenwirkungen im Vergleich zum Vorläuferpeptid (mit Histidin), gezeigt werden [96].

1.3.4.2 Membranunabhängige Wirkmechanismen

In der Literatur werden unterschiedliche membranunabhängige Wirkmechanismen für die verschiedenen HDPs beschrieben. Bei HDPs mit antimikrobieller Wirkung gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass diese ihre Wirkung auch über immunmodulatorische Effekte ausüben [97-99]. So ist bspw. für das aus Insekten isolierte antimikrobielle Peptid Alloferon eine Stimulation von sowohl natürlichen Killer-Zellen (NK) als auch die Synthese von Interferon bekannt [100]. Ob dies in gleichem Maße auch für HDPs mit antitumoraler Aktivität zutrifft, ist noch nicht ausreichend bekannt [12]. Für die Bienengifte Melittin und Ceropin sind ein inhibitorischer Einfluss auf die Transkription durch eine Beeinflussung der Signaltransduktion beschrieben [101]. Ferner zeigte die Arbeitsgruppe um Sharma, dass Melittin bevorzugt Tumorzellen mit einer Überexpression des ras Onkogens angreift und dort zu einer Aktivierung der zellulären Phospholipase A2 führt [102].

1.3.5 *In vivo* Studien von HDPs mit antitumoraler Wirksamkeit

Neben vielen beschriebenen *in vitro* Studien wurden einige Peptide auch *in vivo* getestet, um das therapeutische Potential der HDPs eingehender zu untersuchen [10, 11, 78, 96, 103-105]. Hierbei kamen sowohl solide Tumormodelle als auch Metastasemodelle an (Nackt-) Mäusen und Ratten zum Einsatz. Eliassen et al. zeigten bspw. 2006 in einer *in vivo* Studie eine massive Nekrose kolorektaler Tumoren nach Behandlung mit bovinem Lactoferricin (LfcinB) [104]. 2006 beschrieben sie eine signifikante Tumorwachstumshemmung von Xenografts des Neuroblastoms nach wiederholter Behandlung mit LfcinB [103].

Diese Studien belegen eindeutig das onkolytische Potential von HDPs und begründen deren Einsatz in der (experimentellen) Tumorthherapie.

2 Zielsetzung

Das CRC ist das am zweithäufigsten diagnostizierte Malignom in Europa und eine der Hauptursachen für krebserkrankte Todesfälle weltweit. Bei der Erstdiagnose liegen in ca. einem Viertel aller Fälle Metastasen vor. Noch einmal genauso viele treten bei initial lokal begrenzten Tumoren als metachrone Metastasen im Verlauf auf. Dies erfordert eine systemische Chemotherapie, welche oftmals mit schweren Nebenwirkungen verbunden ist. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für selektivere und effektivere Therapieansätze. Onkolytisch wirksame HDPs stellen diesbezüglich eine mögliche Alternative dar. Ziel dieser Arbeit war es, die onkolytische Wirksamkeit von HDPs gegenüber molekulargenetisch unterschiedlichen CRC-Zelllinien *in vitro* und *in vivo* zu analysieren. Diese Arbeit soll damit dazu beitragen, die Frage zu klären, ob HDPs eine mögliche Therapieoption in der Behandlung des CRC darstellen können.

Hierzu waren folgende Arbeitsschritte Gegenstand dieser Arbeit:

- Charakterisierung der Zelllinien anhand von oberflächenpräsentiertem PS – eine Vergleichende Analyse zwischen frisch etablierten und langzeitkultivierten Tumorzellen
- Bestimmung der onkolytischen Wirksamkeit der HDPs *in vitro* anhand von Proliferations- und Vitalitätsassay
- Analyse des onkolytischen Wirkmechanismus *in vitro*
- Ausschluss einer unerwünschten Zytotoxizität gegen normale Zellen des Blutes
- Untersuchung der onkolytischen Wirksamkeit der HDPs *in vivo* – murines Xenograftmodell

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Absaugesystem Integra Vacusafe	Integra Biosciences GmbH (Fernwald, D)
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH (Osterode, D)
Chirurgisches Besteck	Aesculab B. Braun (Melsungen, D)
Cryo 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus (Hamburg, D)
Keyence BZ 9000	Keyence Deutschland GmbH (Neu-Isenburg, D)
Kühl- und Gefrierschränke -4, -20, -80 °C	Liebherr (Kirchdorf an der Iller, D)
Lichtmikroskop Olympus CKX 41	Olympus
Microplate Reader LP400	Diagnostics Pasteur (Wien, Ö)
Multistepper HandyStep®	Brand GmbH (Wertheim, D)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda Königsheim, D)
Motorpipettierhelfer	
Pipetboy	Integra Bioscience GmbH
accu-jet® pro	Brand GmbH
Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR-Biosciences (Lincoln, NE, USA)
Pipetten 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson (Limburg, D) und Eppendorf (Hamburg, D)
Schüttler Mini Rocker MR-1	Lab4You GmbH (Berlin, D)
Sterilwerkbänke	
Nunc™ safeflow 1.2	Bio Air Instruments s.r.l. (Siziano, Italien)
MSC-Advantage™	Thermo Fisher Scientific
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA)
Vortex-Genie2™	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, D)
Zentrifugen	

Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Labofuge 400e Function Line	Heraeus (Hanau, D)
Multifuge 3S-R	Heraeus

3.1.2 Chemikalien, Reagenzien

Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D)
Annexin V-APC	Immunotools (Friesoythe, D)
Bacilol® AF	Bode Chemie (Hamburg, D)
Calcein-AM	Sigma-Aldrich (Hamburg, D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM / Ham's F12)	PAA (Pasching, Österreich)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Dinatriumhydrogenphosphat + 2xH ₂ O	Merck (Darmstadt, D)
FACS-Flow™	BD Biosciences
FACS™ Lysing Solution (10x)	BD Biosciences
Fetales Kälber Serum (FKS)	PAA
Isopropanol	J.T.Baker (Griesheim, D)
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Ketamin 10 %	bela-pharm (Vechta, D)
Kompressen	Hartmann (Heidelberg, D)
L-Glutamin	PAA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
MTS	Promega (Mannheim, D)
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA
PCR-Puffer complete	Bioron (Ludwigshafen, D)
Phenazine-Methosulfate (PMS)	Sigma-Aldrich
Primer	Metabion (Martinsried, D)
Propidium-Iodid	Sigma-Aldrich
RNAse A	Sigma-Aldrich
Rnase freies Wasser	Promega
Rompun® 2 %	Bayer (Leverkusen, D)
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)

TAE-Puffer (50x)	AppliChem GmbH
TaqMan-Sonden	Applied Biosystems
Taq-Polymerase	Bioron
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tissue Tek [®]	Sakura (Staufen, D)
TMB (3,5,3',5' Tetramethylbenzidin)	Promega
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Trizol [®] Reagenz	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Trypanblau (0,02 %)	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDT	PAA
Tween20	Sigma-Aldrich

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

BD Micro-Fine + Demi 0,3 ml	BD Biosciences
BCA Protein assay kit	Merck Calbiochem (Darmstadt, D)
Cryomold [®] Einbettschälchen	Sakura
Dispenser Tips Plastibrand [®] 1,25, 2,5, 5ml Brand (Wertheim, D)	
EDTA-Röhrchen Microvette [®]	Sarstedt (Nümbrecht, D)
End to End Kapillaren	Sarstedt
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf
FACs-Röhrchen	Sarstedt
Kompressen	Hartmann
Kryoröhrchen Cryo.s TM	Greiner-Bio-One (Frickenhausen, D)
Mikrotiterplatten	Greiner-Bio-One
Omnican [®] F 1ml	B. Braun (Melsungen, D)
Pasteurpipetten	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen	Greiner-Bio-One
Serologische Pipetten	Greiner-Bio-One
Transwells ThinCert TM	Greiner-Bio-One
Zellkulturflaschen 40, 125, 200ml	Greiner-Bio-One
Zellkulturplatten	
96 Well, flat bottom, transparent	Greiner-Bio-One
24 Well, flat bottom, transparent	Greiner-Bio-One

Zellstrainersieb (100 µm Nylon)	BD Biosciences
Zentrifugenröhrchen	Greiner-Bio-One

3.1.4 Medien, Puffer, Lösungen

Blocking Puffer	47,5 ml PBS + 2,5 ml BSA
Erythrozytenlysepuffer	Tris (0,16 M = 19,38 g/l) Ammoniumchlorid (0,17 M = 9,1 g/l) → im Verhältnis 1:10 frisch ansetzen
Freezing Medium	FKS + 10 % DMSO
PBS (pH 7,2-7,4)	80,00 g Natriumchlorid +2,00 g Kaliumchlorid +18,05 g Dinatr.hydrogenphosphat + 2xH ₂ O + 2,00 g Kaliumhydrogenphosphat ad 1000 ml Aqua dest.
Zellkulturmedium	DMEM Ham's F12 + 10 % FKS + 10 ml L-Glutamin

3.1.5 Primäre und sekundäre Antikörper

Antigen	Konjugat	Spezifität	Klon	Hersteller
CD11b	FITC	mouse+human	M1/70.15.11.5	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
CD11c	FITC	mouse	N418	Miltenyi Biotec GmbH
CD19	FITC	mouse	PeCa1	Immunotools
CD45rb	PE	human	MEM-55	Immunotools
CD62L	PE	mouse	MEL 14	Immunotools
CD69	FITC	mouse		ebiosciences (San Diego, CA, USA)
CD71	PE	human	MEM-75	Immunotools
CD134	PE	mouse		Immunotools
CD166	PE	mouse	eBioAk48	eBiosciences
CD326	PE	human	HEA-125	Miltenyi Biotec GmbH
Gr1	PE	mouse	RB6-8C5	Immunotools

γδ-TCR	FITC	mouse	GL-2	Immunotools
Cytokeratin 18	unmarkiert	mouse	M30	Roche (Mannheim, D)
IgG	FITC	mouse	polyklonal	Dako Envision Link, Hamburg, D)
Bax	unmarkiert	mouse+human	polyklonal	New England Biolabs (Frankfurt , D)
Cleaved PARP	unmarkiert	mouse	polyklonal	New England Biolabs
β-actin	unmarkiert	mouse	polyklonal	New England Biolabs
IgG	IRDye®800CW	mouse		Licor (Bad Homburg, D)
IgG	IRDye®680	mouse		Licor

3.1.6 Peptide

Die in dieser Arbeit verwendeten und untersuchten Peptide wurden im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Andrä der Universität Hamburg, Fakultät Life Sciences, Department Biotechnologie, zur Verfügung gestellt. Das HDP NK-2 wurde synthetisiert mit einem amidierten C-terminus (KILRG VCKKI MRTFL RRISK DILTG KK-NH₂) und bezogen von WITA GmbH (Berlin, Germany) mit einem Reinheitsgrad von > 95 %. Die hier verwendeten Peptide (C7A, C7A-D21K, C7A-Δ) und NK11 basieren auf NK-2 (s. Tabelle 3). Die grundlegendste Veränderung beinhaltete den Austausch des funktionslosen Cystein7-Restes innerhalb der NK-2 Sequenz mit einem Alanin-Rest. Durch diesen Austausch konnte eine Verbesserung der Anti-Tumoraktivität erreicht werden. Ein Anheben der positiven Oberflächenladung von C7A wurde durch den Austausch von Asparginsäure21 mit einem Lysin-Rest erzielt (C7A-D21K). Darüber hinaus wurde C7A durch das Entfernen von vier Aminosäureresten (darunter Asparginsäure21) verkürzt, woraus das Peptid C7A-Δ resultierte. Als Negativkontrolle diente NK11, ein unwirksames Derivat von NK-2. Die Peptide wurden als 1mM Stocklösung in DMSO gelöst und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Melittin (in HPLC-grade), die wichtigste lytische Komponente des Bienengiftes und etablierte Referenzkomponente, wurde als synthetisches Peptid von Sigma gekauft (Deisenhofen, Germany) und ohne weitere Purifikation verwendet.

Tabelle 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide

Peptid		Sequenz ¹	Nettoladung ²
	NK-2	KILRGVCKKIMRTFLRRISKDILTGKK	+10
#1	C7A	KILRGVAKKIMRTFLRRISKDILTGKK	+10
#2	C7A-D21K	KILRGVAKKIMRTFLRRISKKILTGKK	+12
#3	C7A-Δ	KILRGVAKKIMRTFLRR ILTGKK	+10
#4	NK11	KISKRILTGKK	+6
#5	Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	+6

¹Alle Peptide wurden mit einem amidierten C-Terminus synthetisiert

²Die Ladung der Peptide wurde berechnet, indem die Anzahl der Asparginsäure-Reste (der einzige negativgeladene Aminosäurerest) von der Summe aller positiven Ladungen (Lysin, Arginin und der N-Terminus des Peptids) subtrahiert wurde. Da der C-Terminus der Peptide amidiert wurde, wies er keine negative Ladung auf.

3.1.7 Zelllinien

Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen sind adhärent wachsende kolorektale Karzinomzellen, die von der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie etabliert und zu Beginn der Arbeit zur Verfügung standen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die molekularen Charakteristika dieser Zellen, sowie Alter und Geschlecht des Patienten, aus deren Tumor die Zelllinie etabliert wurde. Alle HROC-Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie und Immuntherapie der Universität Rostock etabliert. HCT116 ist eine kommerziell erworbene, primär kolorektale Zelllinie humanen Ursprungs.

Tabelle 4: Molekulare Charakteristika der untersuchten patientenindividuellen Zelllinien

Zelllinie	Patient/Tumor TNM-Stadium	Molekularer Typ	CIMP	p53	APC	Kras	Braf
HROC18	♂ 65J./	spStd	0	wt	mut	wt	wt

HROC24	♂ 98J./ G2T2N0M0	spMMR-D	high (5)	wt	wt	wt	mut
HROC32	♀ 82J./ G2T4N2M1	spStd	0	wt	wt	mut	wt
HROC40	♂ 69 J./ G3T3N1M0	CIMP-H, non MSI	low (3)	mut	wt	mut	wt
HROC46	♂ 66J./ G3T3N0M1	spStd	0	wt	wt	mut	wt
HROC60	♂ 71 J./ G2T2N0M0	CIMP-H, non MSI	high (4)	mut	mut	wt	wt
HROC80	♂ 72J./ G2T3N2M1	spStd	low (1)	wt	wt	mut	wt
HROC107	♂ 81J./ G3T3N0M0	spStd	0	wt	wt	mut	wt
HROC113	♀ 41J./ G3T4N2Mx	HNPCC	0	wt		mut	wt

3.1.8 Versuchstiere

Verwendet wurden ausschließlich männliche, thymusaplastische *NMRI Foxn1^{nu}* Mäuse (Naval Medical Research Institute) im Alter von fünf bis zehn Wochen und mit einem mittleren Körpergewicht von 20 g. Es handelte sich hierbei um Nacktmäuse, die aufgrund des fehlenden Thymus einen absoluten Mangel an reifen T-Lymphozyten, bei normaler B-Zell Entwicklung aufweisen. Dies führt dazu, dass sie nur über ein eingeschränktes Immunsystem verfügen, welches es ermöglicht, sowohl homologe als auch xenogene Transplantate einzubringen, ohne dabei eine Immunreaktion im Sinne einer Abstoßung zu induzieren.

Die Versuchstiere, wie auch die Räumlichkeiten zur Behandlung und Untersuchung wurden von der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung (Direktorin: Prof. Dr. med.

B. Vollmar) zur Verfügung gestellt. Die fachgerechte Haltung erfolgte ebenfalls durch Zentrale Versuchstierhaltung mit maximal fünf Tieren pro Käfig, freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter und unter optimalen Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Lärmfreiheit, Lichtrhythmus).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zelllinien

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer keimfreien Sicherheitswerkbank unter Verwendung steriler Materialien vorgenommen. Die Kultivierung der ausschließlich adhärent wachsenden Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Als Kultivierungsmedium wurde DMEM/Hams F12 verwendet, welches mit 10 % FKS (fetales Kälber Serum) und 2 mM Glutamin angereichert wurde (=Vollmedium, VM). Das Medium wurde bei Bedarf, jedoch mindestens ein bis zweimal pro Woche gewechselt.

3.2.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70–90 % passagiert, um zu vermeiden, dass sich die Zellen bei zu hoher Dichte in ihrem Wachstum hemmen. Dazu wurde das Kulturmedium unter Verwendung steriler Pasteurpipetten abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um sie vom Boden der Flasche abzulösen wurde 1x Trypsin/EDTA hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen möglichst vollständig vom Boden gelöst waren. Durch Zugabe von VM wurde die Reaktion abgestoppt und das Trypsin somit neutralisiert, um ein weiteres Spalten der extrazellulären Proteine zu verhindern. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml/50 ml Falcon überführt und vor weiterer Behandlung gezählt.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden je 50 µl der entsprechenden Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:2 mit einer 0,2-prozentigen Trypanblaulösung

verdünnt. Trypanblau färbt ausschließlich Zellen, die aufgrund irreversibler Schäden ihre Membranintegrität verloren haben. Dadurch gelangt Trypanblau in das Zytosol und bindet dort Proteine, woraus eine tiefe Blaufärbung der toten Zellen resultiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in zwei sich gegenüberliegenden Großquadranten (mit je 16 Kleinquadranten) ausgezählt und die Zellzahl mittels nachfolgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnung} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$$

3.2.4 Mykoplasmen PCR - Qualitätskontrolle

Mykoplasmen sind 0,3 - 0,8 µm große, gram-negative Bakterien. Sie wachsen obligat intrazellulär und beeinflussen Wachstum und Stoffwechsel ihrer Wirtszellen. Um auszuschließen dass Ergebnisse durch eine etwaige Kontamination mit Mykoplasmen verändert und beeinflusst werden, wurden sämtliche Zellkulturen in regelmäßigen Abständen auf einen Befall mit Mykoplasmen hin untersucht. Der Nachweis beruht auf der Vervielfältigung eines Abschnittes des 16 s rRNA - Gens, welches für die Bakterien spezifisch ist und mittels PCR nachgewiesen werden kann. Eine bereits positiv getestete Zelllinie diene hierbei als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde PBS mitgeführt.

Für die Untersuchung wurden Zellen (1×10^6) zunächst pelletiert und in 200 µl PBS resuspendiert. Zusätzlich wurde eine 1:100 Verdünnung der Zellsuspension hergestellt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95 °C erhitzt. Danach wurden zur Zellsuspension, wie auch zur Verdünnung Mastermix (s. Tabelle 5) hinzugefügt. Die PCR wurde am Thermocycler unter Standardbedingungen (s. Tabelle 6) durchgeführt. Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Gelelektrophorese in einem 1-prozentigen Agarosegel mit Ethidiumbromid und TAE-Laufpuffer (30 min 70 V, 1 h 100 V). Als Bezug wurde ein 100 bp Marker verwendet. Tabelle 7 zeigt die verwendeten Primer und die resultierenden Produktgrößen.

Tabelle 5: Mastermix für den PCR Nachweis von Mykoplasmen

Reagenz	µl/Ansatz
PCR-Puffer complete (10x conc.)	2,5
dNTP's (10 mM)	0,5
Vorwärtsprimer (10 pMol/µl)	0,5
Rückwärtsprimer (10 pMol/µl)	0,5
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2
A. dest	18,3

Tabelle 6: Standardisierte Reaktionsbedingungen für die Mykoplasmen-PCR

Reaktion	Temperatur	Dauer
Initiale Phase	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	60 °C	45 s
Elongation	72 °C	45 s
Schlussphase	72 °C	5 min
Lagerung	4 °C	∞

40 Zyklen

Tabelle 7: Primersequenzen und Produktgrößen der Mykoplasmen-PCR.

Primer	Sequenz	Produktgröße
Vorwärtsprimer	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG	~500 bp
Rückwärtsprimer	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G	

3.2.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden vor Gebrauch, sowie zur langfristigen Lagerung bei -80 °C kryokonserviert. Hierzu wurden fünf bis acht Mio. Zellen in 1,5 ml Einfriermedium (FKS + 10 % DMSO) suspendiert und in ein Kryoröhrchen gegeben. Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein organisches Lösungsmittel, welches bei der Kryokonservierung als Gefrierschutzmittel eingesetzt wird. Es verhindert die intrazelluläre Kristallbildung und somit ein Zerstören der Zellen. Mit Hilfe eines „Freezing Containers“ wurden die Kryoröhrchen unter zellschonenden Bedingungen um ein Grad C/Min auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend im Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und umgehend mit 10 ml VM versetzt, um das unter Raumtemperatur zelltoxische DMSO heraus zu waschen. Anschließend wurden die Zellen für 8 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in VM resuspendiert und abschließend in eine Zellkulturflasche überführt.

3.3 *In vitro* Versuche

3.3.1 Durchflusszytometrie (fluorescence- activated cell sorting - FACS)

Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Prinzip der Durchflusszytometrie zum quantitativen und qualitativen Nachweis von PS an der Zelloberfläche genutzt.

Um einen Hinweis hinsichtlich der quantitativen Menge an extrazellulärem PS zu erhalten, wurden neben den patienten-individuellen Kolonkarzinomzellen in niedriger Passage, auch Standardkarzinomlinien des Kolorektums, Gioblastoms, und Pankreas, Leukämie- und Lymphomzelllinien, sowie nicht-maligne humane Lymphozyten untersucht.

Die Zellen wurden mit Annexin V-APC gefärbt. Dieses Protein bindet kovalent an auf der Oberfläche gelegenes und negativ geladenes PS. Dieses Verfahren wird normalerweise genutzt um apoptotische Zellen nachzuweisen. Hier sollte das Ausmaß der PS-Präsentation quantifiziert werden, um festzustellen, ob dieses mit einem potentiell onkolytischen Effekt der untersuchten HDPs auf die jeweilige Zelllinie korreliert.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert, trypsinisiert und gezählt. Pro Zelllinie wurden ein Annexin V-APC gefärbter und ein ungefärbter Ansätze hergestellt. Pro Ansatz wurden 5×10^5 Zellen in 100 μ l 1x PBS (mit Ca und Mg) in ein FACS-Röhrchen überführt. Zum gefärbten Ansatz wurden je 4 μ l Annexin V-APC und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Färbung wurde mit 1x PBS (mit Ca und Mg) abgestoppt, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und in je 200 μ l 1x PBS (mit Ca und Mg) resuspendiert.

Unmittelbar vor jeder Messung wurden zum gefärbten, wie auch zum ungefärbten Ansatz PI mit einer Endkonzentration von 100 μ g/ml hinzugefügt, um tote Zellen anzufärben und sie anschließend ausschließen zu können.

Abschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer FACSCalibur™ gemessen. Die Analyse der Messdaten erfolgte mit der Software CellQuestPro (BD-Biosciences).

3.3.2 Proliferations- /Viabilitätsassay

3.3.2.1 MTT-Assay

Allgemeines Funktionsprinzip

Um die metabolische Aktivität der zu untersuchenden Zellen zu ermitteln, werden diese mit dem gelben Redoxfarbstoff Tetrazoliumsalz versetzt. Vitale Zellen reduzieren den wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Die Menge des reduzierten und damit messbaren Anteils des Farbstoffs ist abhängig von den intrazellulär vorhandenen Reduktionsäquivalenten NAHD sowie NADPH und korreliert dadurch mit der zellulären Glykolyserate.

Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zehn HROC-Zelllinien auf ihr Ansprechen gegenüber drei aktiven Derivaten von NK-2, auf das nicht-wirksame Derivat NK11 (als Negativkontrolle), sowie Melittin (als Positivkontrolle) untersucht. Zunächst wurden die zu untersuchenden Zellen gezählt und auf einer 96-Wellplatte ausgesät. Je nach Wachstum der jeweiligen Zelllinie wurden zwischen 1×10^4 – 2×10^4 Zellen in je 100 μ l Vollmedium (VM)/Well pipettiert. Am darauffolgenden Tag wurden die HDPs in einer fünfstufigen Verdünnungsreihe (0,25 μ M, 0,5 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M und

12,5 μM ; gelöst in VM) im Dreifachansatz auf die 96-Well-Platten titriert. Als Lebendkontrolle wurden Wells ausschließlich mit VM versetzt. Anschließend wurden die Platten erneut für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am letzten Tag wurden 10 μl MTT/Well hinzugefügt und die Platten anschließend im Dunkeln inkubiert. Die quantitative Analyse erfolgte am Microplate Reader bei einer Absorptionswellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge: 620 nm).

3.3.2.2 Calcein-Assay

Allgemeines Funktionsprinzip

Um die Zellviabilität der untersuchten HDPs nachzuweisen, wurde neben dem Proliferationsassay eine Quantifizierung der lebenden Zellen durch Färbung mit Calcein-AM durchgeführt. Calcein-AM ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch die intakte Zellmembran in das Zytoplasma gelangt. Dort wird die Acetoxymethylgruppe unspezifisch durch Esterasen, welche ausschließlich in vitalen Zellen aktiv sind, abgespalten und es entsteht Calcein. Dieses bindet in der Zelle an Calcium was zu einer Emission grüner Fluoreszenz führt, welche wiederum von außen detektiert werden kann. Dem Komplex aus Calcein und Calcium ist es dabei nicht mehr möglich die Zellmembran zu durchdringen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist somit direkt proportional zu der Anzahl vitaler Zellen.

Durchführung

Das experimentelle Vorgehen beim Calcein-Assay entspricht dem MTT-Assay. Eine schematische Übersicht gibt Abbildung 5. Neben den experimentellen Ansätzen wurden je drei Wells als Lebendkontrolle (unbehandelte Zellen in VM) und Totkontrolle mitgeführt. Am dritten Tag wurde aus den Wells der Totkontrolle das VM abgesaugt und je 200 μl Tween 20 (4 %) hinzugefügt. Tween 20 ist ein nichtionisches Tensid, welches zu einer Lyse der Zellen führt. Nach 30 min wurde zu allen Wells je 50 μl einer Calcein-AM Working Solution (Stocklösung: 4 mM) hinzugefügt. Die Messung erfolgte nach 30 minütiger Inkubation in Dunkelheit, am TecanReader, bei einer Anregung von 485 nm und Detektion der Emission bei 535 nm.

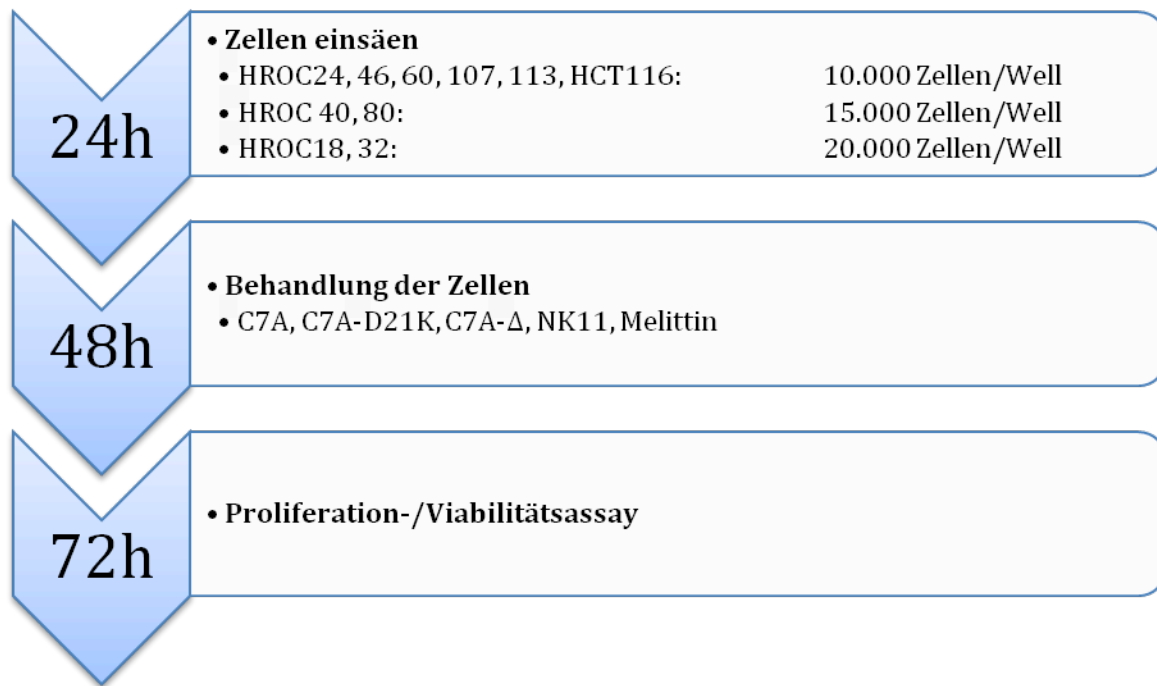


Abbildung 5: Experimentelles Protokoll zur Untersuchung von Proliferation und Viabilität.

3.3.3 Kurzzeittest

Um die schnelle Wirksamkeit der HDPs auf die Tumorzellen zu untersuchen, wurde, in einem parallelen Ansatz, ein Kurzzeittest durchgeführt (1h Behandlung). Untersucht wurden insgesamt fünf Zelllinien: HROC24, HROC32, HROC40, HROC60 und HCT116 hinsichtlich ihres Ansprechens auf eine Behandlung mit den drei NK-2 Analoga, NK11 und Melittin.

Zunächst wurden, wie zuvor beschrieben, die Zellen in 96-Wellplatten eingesät und ü.N. adhäriert. Anschließend wurden die fünf untersuchten Peptide mit einer insgesamt höheren Konzentration als zuvor beschrieben in einer dreistufigen Verdünnungsreihe (5,0 µM, 12,5 µM und 25 µM) auf die 96-Well-Platten titriert. 30 min vor Abschluss der Inkubation wurde analog zum oben beschriebenen Calcein-Assay Tween 20 (4 %) zur Totkontrolle sowie Calcein-AM zu allen Wells hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Messung am Tecan Reader, bei einer Anregung von 485 nm und Detektion der Emission bei 535 nm.

3.3.4 Live Cell Imaging

Mithilfe der *in vitro* Mikroskopie sollten zwei Aspekte des Effekts von C7A-D21K – das wirksamste Derivat von NK-2 – geklärt werden. Zum einen der Einfluss des

Peptids auf die Integrität und Morphologie der Zelle. Zum anderen der zeitliche Aspekt der Reaktion der Zelle auf das Peptid.

Zunächst wurden Zellen der Linie HROC24 zu je 1×10^4 pro Well ausgesät. Nach 24h wurde das VM aus den entsprechenden Wells abgesaugt und die darin enthaltenen Zellen mit der 96-Well-Platte direkt in die Untersuchungskammer eines Keyence BZ-9000 A3 Mikroskops gegeben. Bei 4-facher Vergrößerung wurden zwei Areale innerhalb eines Wells ausgesucht. Initial wurde von diesen Regionen ein Bild mit 40-facher Vergrößerung gemacht. Anschließend wurde mit der Aufnahme der Bilderserie bei 20-facher Vergrößerung begonnen, wobei von jeder der beiden Regionen alle fünf Sekunden ein Foto gemacht wurde. Anschließend wurde 100 µl einer 25 µM C7A-D21K Lösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Bilderserie für 8 min fortgesetzt. Abschließend wurde wie bereits zu Beginn von beiden Regionen eine Detailaufnahme mit 40-facher Vergrößerung gemacht.

3.3.5 Apoptose/Nekrose Assay

Der Zelltod wurde mittels einer YO-PRO-1 (Invitrogen) und PI Doppelfärbung quantifiziert. Ausgewählte Tumorzelllinien (HROC24 und HROC18, 1×10^4 Zellen/Well) wurden auf 24-Well-Platten ausgesät und ü.N. inkubiert. Anschließend wurden die HDPs in aufsteigender Konzentration hinzugefügt (0,25 µM – 12,5 µM). Unbehandelte Zellen dienten als Lebendkontrolle. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde der Überstand entfernt, die Zellen trypsinisiert und in PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit YO-PRO-1 (Endkonzentration: 0,2 µM) für 20 min bei Raumtemperatur gefärbt. Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde PI mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugefügt. Der fluoreszierende Nukleinsäurefarbstoff YO-PRO-1 tritt selektiv durch die Plasmamembran von apoptotischen Zellen und färbt diese. Nekrotische Zellen hingegen werden durch den DNA-selektiven Farbstoff PI gefärbt. Dies ermöglicht eine Unterscheidung zwischen den beiden membranvermittelten Zelltötungsmechanismen Apoptose und Nekrose. Zur Quantifizierung des Zelltodes wurde der Wert der Zelltodbasalrate (=unbehandelte Kontrolle) vom Wert der mit HDP-behandelten Zellen abgezogen.

3.3.6 Western Blot Analyse

Zelluläre Proteine wurden aus HDP-behandelten Zellen und unbehandelten Kontrollzellen nach Inkubation mit Lysepuffer (1 M Tris, pH 7.5, 5 M Natriumchlorid, 0.25 M Ethylenediaminetetraacetat-Essig, 10 % (v/v) Triton-x 100, 4 % (v/v) Natriumsalz, 0.1 M Phenylmethansulfonylfluoride, Protease-Inhibitor-Cocktail) für 30 min auf Eis gewonnen. Das Zelllysate wurde bei 10.000 x g für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Die Peptidkonzentrationen wurden mittels BCA Protein Assay Kit nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Die Proteine (20 µg) wurden auf einem 14 % SDS-Polyacrylamid Gel separiert und auf Polyvinylidenfluorid-Membranen übertragen. Die Membranen wurden für 1h mit Pufferlösung (Rockland, Gilbertsville, PA) blockiert, bevor sie mit primären Antikörpern gegen Bax, gespaltenes PARP, HSP90, und β -Actin inkubiert wurden. Bax, gespaltenes PARP und HSP90 sind Proteine, welche in die Apoptose-Kaskade involviert sind. β -Actin gehört zu den am höchsten konservierten Proteinen und ist in allen eukaryoten Zellen exprimiert. Es dient daher als verlässliche Ladekontrolle, die zur Normalisierung der Proteinmenge in Western Blots verwendet wird. IRDye® 800 CW- und IRDye® 680 CW-konjugierte sekundäre Antikörper wurden für 30 min hinzugefügt (Verdünnung: 1:10.000). Die Blots wurden bei einer Wellenlänge von 700 nm (um IRDye® 680 CW zu detektieren) und bei einer Wellenlänge von 800 nm (um IRDye® 800 CW zu detektieren) unter Verwendung eines Odyssey® Infrared Imaging System gescannt. Signal integrierte Intensitäten wurden über die Odyssey® Software Version 3.16 quantifiziert. Die Proben wurden normalisiert, in dem das Verhältnis von korrespondierendem Zielprotein zu β -Actin Signal berechnet wurde.

3.3.7 Hämolyseassay

Um die Reaktion der Peptide auf humane Blutzellen zu untersuchen, wurde ein Hämolyseassay durchgeführt. Hierzu wurde insgesamt sechs weiblichen und männlichen Probanden Blut entnommen und heparinisiert. Dann wurde das Vollblut im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Hierbei sollte ein ausreichend großes Volumen erreicht werden, welches eine Durchführung im doppelten Ansatz für eine Auswertung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten ermöglicht. Anschließend wurde das verdünnte Vollblut in Triplikaten zu je 20 µl pro Well auf eine 96er U-Wellplatte ausplattiert. Zum experimentellen Ansatz wurden diese Wells zu einem Volumen von

75 µl mit unterschiedlichen Substanzen ergänzt. Als „Nullkontrolle“ wurde ausschließlich PBS in das jeweilige Well gegeben. Für die Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt, d.h. mit PBS verdünntes Vollblut. Zur Positivkontrolle wurde zum Vollblut als Detergenz 1 % SDS bzw. 2 % Triton-X 100 hinzugefügt. Die Inkubationszeiten betrugen 30 bzw. 120 min im Brutschrank. Anschließend wurden die 96-Wellplatten bei 1000 x g für 10 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde vorsichtig in eine neue Platte pipettiert, ohne dabei das Pellet zu tangieren, da dies zu Falschpositiven Werten geführt hätte. Die Messung erfolgte am Tecan Reader bei 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm. Zur Berechnung der hämolytischen Aktivität wurde nachfolgende Formel verwendet.

$$\% \text{ Hämolyse} = ((OD_{Probe} - OD_{Puffer}) / (OD_{Max} + OD_{Puffer})) * 100$$

Probe = Negativkontrolle bzw. Testsubstanzen

Puffer = PBS

Max = Positivkontrolle

Gegebenenfalls erfolgte ein Abgleich gegen die Erythrozytenzahl. Als Richtwert galt hier, dass die Zellzahl zwischen 1×10^7 bis 1×10^8 Erythrozyten liegen sollte.

3.4 *In vivo* Versuche

3.4.1 Subkutanes Xenograftmodell

Allgemeines Prinzip

Mit diesem Mausmodell sollte die Wirkung von C7A, C7A-D21K sowie NK11 auf den in Mäusen wachsenden soliden Tumor der Linie HROC24 im speziellen, als auch auf den lebenden Organismus im Allgemeinen untersucht werden. Eine weitere Gruppe von Tieren wurde ausschließlich mit PBS behandelt. Jede der vier Gruppen wurde mit n=5 Tieren festgelegt.

Tumorimplantation und Behandlung

Die zur Transplantation in die Maus benötigten Tumorzellen wurden wie eingangs beschrieben kultiviert, trypsinisiert und gezählt. Je 5×10^6 HROC24 Zellen wurden in

50 µl PBS suspendiert und mithilfe einer 300 µl Insulinspritze in das Subkutangewebe der rechten Flanke jeder Maus appliziert.

Unter Kontrolle des Wachstums ließ man die Mäuse für 14 Tage unbehandelt, bis die Tumoren einen mittleren Durchmesser von 5,0 mm erreicht hatten.

Am 15. Tag nach Injektion der Tumorzellen wurde mit der Therapie begonnen. Es wurden dreimal wöchentlich über eine Dauer von drei Wochen insgesamt neun intratumorale Applikationen durchgeführt. Dabei wurde von einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht, also näherungsweise 20 µg Peptid pro Maus und Gabe ausgegangen. Bei jeder Applikation wurde der Tumor Quer- und Längsdurchmesser mithilfe eines digitalen Messschiebers ermittelt. Daraus errechnete sich unter Verwendung der nachstehenden Formel das näherungsweise Tumolvolumen.

$$V = \text{Breite}^2 * \text{Länge} * 0,52$$

Im Verlauf konnte so für jedes der drei HDPs sowie für die unbehandelte Kontrolle eine spezifische Wachstumskurve erstellt werden.

Blut- und Gewebeentnahme

Nach Abschluss der neunten Peptidgabe wurden die Mäuse getötet und die zu untersuchenden Gewebe entnommen. Alle Mäuse erhielten eine Injektionsnarkose aus Ketamin 10 % und Rompun® 2 % im Verhältnis 5:1. Hierzu wurden jeder Maus zwischen 50 und 100 µl intraperitoneal appliziert. Nach Erlöschen der Fußreflexe wurde das Blut unter Verwendung einer Glaskapillare aus dem retrobulbären Venenplexus in ein EDTA-Röhrchen ausgeleitet. Nachfolgend wurde der Tumor freigelegt und zwei Stücke daraus entnommen. Eines wurde mittels Tissue Tek® in einem Cryomold® Einbettschälchen, das andere trocken in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gefroren und zur späteren Aufbereitung bei -80 °C nativ kryokonserviert. Anschließend wurde das Abdomen über einen Medianschnitt eröffnet und die Milz entnommen. Diese wurde in sterilem PBS auf Eis transportiert und am selben Tag aufbereitet. Ein Teil der Leber wurde entnommen und ebenfalls mit Tissue Tek® in einem Cryomold® Einbettschälchen in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C zur späteren Aufbereitung gefroren.

Aufbereitung - Immunfluoreszenz

Um apoptotische Zellen *in vivo* nachzuweisen, wurden 4 µm dicke Schnitte von HDP-behandelten Tumoren und unbehandelten Kontrolltumoren auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgetragen. Nach Fixierung in eiskaltem Methanol und Blockieren mittels 2 % BSA für 1h, wurden die Zellen mit Anti-M30-CytoDeath Antikörper entsprechend der Herstellerbeschreibung inkubiert. Ein FITC-markierter Anti-Maus IgG Antikörper wurde als sekundärer Antikörper verwendet. Die Zellnuklei wurden mit DAPI gefärbt und die Objektträger in Eindeckmedium gebettet. Apoptotische Zellen wurden anschließend mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektiert.

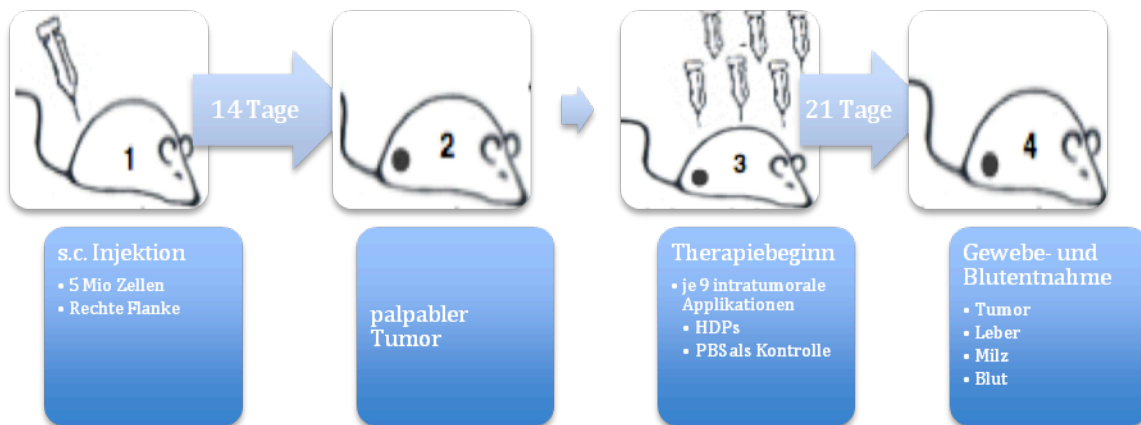


Abbildung 6: Versuchsaufbau subkutanen Xenograftmodell.

3.5 Statistik

Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen und mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die statistische Signifikanz wurde bei normalverteilten Werten mit dem Student's t-Test und bei keiner Normalverteilung mit dem Mann-Whitney U-Test berechnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SigmaStat (Jandel Cooperation, St. Rafael, CA, USA). Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 erreicht. Ein p-Wert < 0,01 wurde als hoch signifikant beurteilt.

4 Resultate

4.1 Mykoplasmen PCR

Mykoplasmen-spezifische PCRs wurden regelmäßig mit allen kultivierten Zelllinien durchgeführt, um eine etwaige Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen. Als Positivkontrolle diente eine mit Mykoplasmen kontaminierte Zelllinie und als Negativkontrolle PBS. Die Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.



Abbildung 7: Mykoplasmen-PCR. Repräsentative gelelektrophoretische Auftrennung von PCR Produkten zum Nachweis von Mykoplasmen in den untersuchten CRC-Zelllinien.

Abbildung 7 zeigt, dass mykoplasmenspezifische Genabschnitt für die untersuchten Zelllinien nicht amplifiziert wurden, wohingegen die Positivkontrolle (PK) ein positives Ergebnis aufweist. Damit sind die Proben als mykoplasmenfrei einzustufen und eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Kontamination mit den Bakterien ist auszuschließen.

4.2 *In vitro* Versuche

4.2.1 Durchflusszytometrischer Nachweis von PS auf der Tumorzelloberfläche

Um einen Überblick darüber zu gewinnen, wie zugänglich die untersuchten CRC-Zelllinien einer Behandlung mit HDP sein würden, wurde die Menge von an der Zelloberfläche präsentem PS bestimmt.

Die untersuchten Zellen wurden hierzu mit AnnexinV-APC gefärbt. Vor der Messung wurde zu jeder Probe PI hinzugegeben, um tote Zellen anzufärben und um diese somit anschließend von vitalen Zellen unterscheiden zu können.

Um die hierbei ermittelten Werte besser beurteilen zu können, wurden normale Lymphozyten (PBL) sowie Standard CRC Zelllinien (HCT 116, SW48, TC71, HDC114) ebenfalls in die Analysen eingeschlossen.

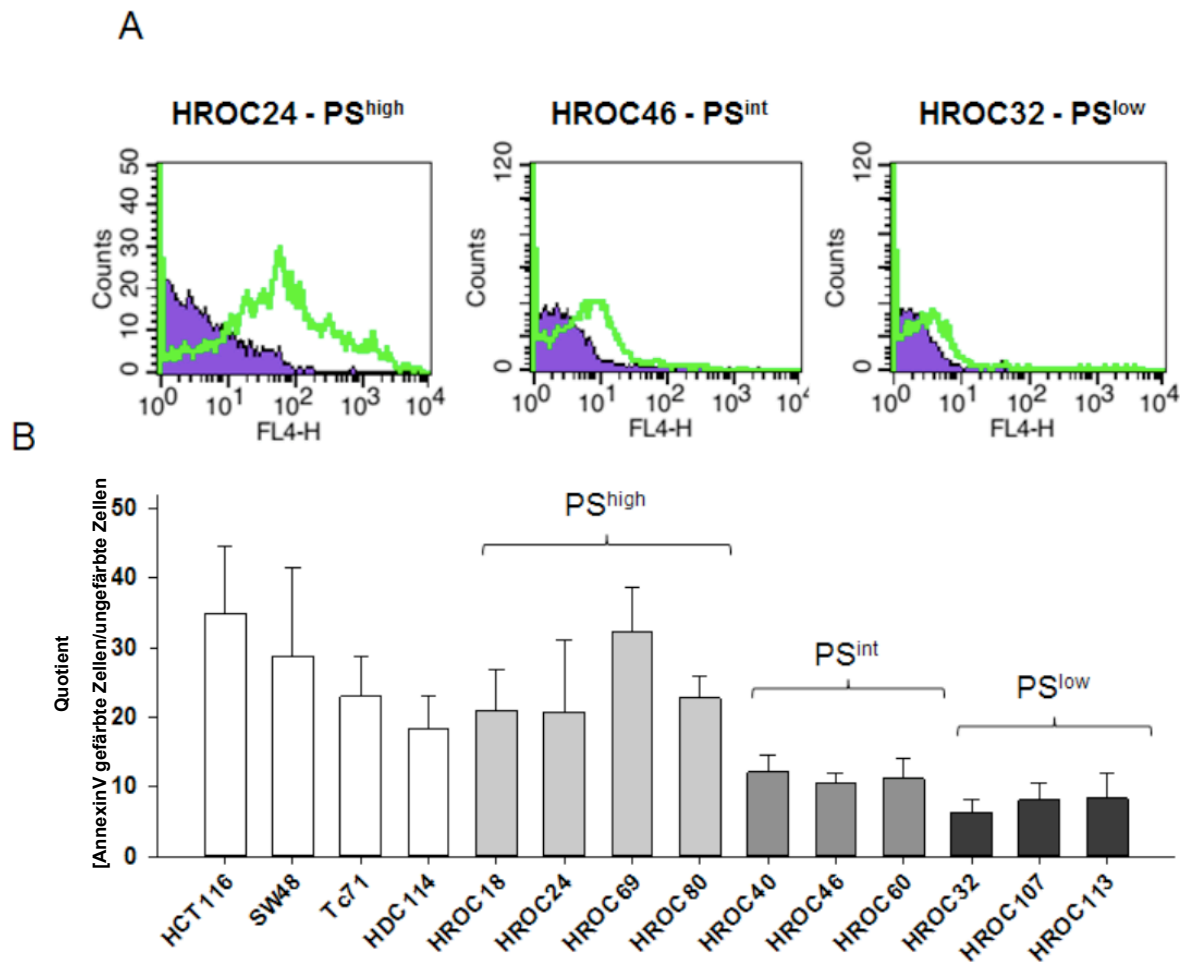


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse. Mittels APC gebundenem AnnexinV wurde an den Zelloberflächen exprimiertes PS angefärbt und anschließend gemessen. (A) Die repräsentativen Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse dreier CRC Linien der unterschiedlichen Kategorien (hoch, mittel, niedrig), zeigt die AnnexinV gefärbten Tumorzellen (grüne Linie) sowie die jeweilige ungefärbte Kontrolle (lila Fläche). (B) Die Menge von oberflächenpräsentiertem PS wurde als Quotient, aus der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von AnnexinV gefärbten zu ungefärbten Zellen, berechnet. Die Ergebnisse zeigen die Daten von je drei unabhängigen Experimenten [Mittelwert (MW) + Standardabweichung (Stabw)].

Im Rahmen der Versuche (s. Abbildung 8) zeigten sich hinsichtlich der Menge an oberflächenpräsentiertem PS große inter-individuelle Unterschiede zwischen den HROC-Zelllinien. Der Anteil an membranständigem PS reichte von niedrig (z.B.

HROC32, HROC107 und HROC113), über mittel (z.B. HROC40, HROC46 und HROC60) bis hoch (z.B. HROC24, HROC69 und HROC80). Verglichen mit Standard CRC Zelllinien waren die ermittelten Werte tendenziell etwas geringer. Im Vergleich jedoch zu den untersuchten Lymphozyten, welche nur eine sehr geringe Menge von oberflächenständigem PS aufwiesen, war die ermittelte Fluoreszenzintensität bei allen Tumorzelllinien deutlich höher.

Anhand der gewonnenen Daten wurden die Zelllinien in drei Kategorien eingeteilt: PS^{low} , $PS^{intermediate}$ und PS^{high} . Anhand dieser Einteilung sollte im Weiteren verglichen werden, ob etwaige zytotoxische Effekte der HDPs in Relation zu oberflächenpräsentiertem PS stehen.

4.2.2 Vitalitäts- /Viabilitäts-Assay

4.2.2.1 MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT-Assays wurde die antiproliferative Wirkung der fünf untersuchten Peptide an neun CRC Zelllinien, welche die unterschiedlichen molekularen Subklassen dieser Erkrankung repräsentieren, untersucht. Die Zellproliferation wurde nach 24-Stündiger Behandlung mit den HDPs bestimmt. Gemäß der Einteilung nach der Menge von an der Oberfläche präsentiertem PS, wurden drei CRC-Zelllinien PS^{low} (HROC32, HROC107 und HROC114) zwei Zelllinien $PS^{intermediate}$ (HROC40 und HROC60) sowie drei Zelllinien PS^{high} (HCT116, HROC24 und HROC18) untersucht. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe.

Von allen untersuchten Zelllinien zeigte HROC24 die größte Suszeptibilität für eine Behandlung mit den NK-2 Derivaten. Ab der höchsten hier verwendeten Konzentration von 12,5 μM erzielten alle drei NK-2 Analoga eine mit der Positivkontrolle Melittin vergleichbare Wirkung. Hervorzuheben ist, dass C7A-D21K auch bei niedrigeren Konzentrationen, im Vergleich zu den anderen beiden Derivaten, zu einer deutlichen Reduktion der Zellvitalität führte. HROC18 wies das zweitbeste Ansprechen auf die NK-2 Derivate C7A und C7A-D21K auf. C7A- Δ war hier hingegen deutlich weniger effektiv, als bei den meisten anderen untersuchten Zelllinien. Die beiden $PS^{intermediate}$ Zelllinien HROC40 und HROC60 zeigten eine Reduktion der Zellvitalität auf ungefähr 60 % im Vergleich zur Kontrolle. Demzufolge wurde hier ein mittleres Ansprechen auf alle drei NK-2 Analoga nachgewiesen.

Die drei Zelllinien der Kategorie PS^{low} wiesen heterogene Ergebnisse auf. HROC32 sprachen gut auf eine Behandlung mit allen drei HDPs an. Die Zelllinien HROC107 und HROC113 hingegen zeigten nur eine geringe, dosisabhängige Wirkung, mit der stärksten Reduktion der Zellvitalität durch C7A-D21K.

Von allen drei NK-2 Derivaten vermittelte C7A-D21K die stärkste antimetabolische Aktivität. Die gewonnenen Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass die onkolytische Wirkung der HDPs zumindest partiell mit der Menge von PS an der Zelloberfläche korreliert. Die Beobachtung, dass jedoch auch die PS^{low} Zelllinie HROC32 suszeptibel gegenüber der HDP-vermittelten Wachstumshemmung ist, lässt vermuten, dass auch andere Mechanismen beteiligt sind.

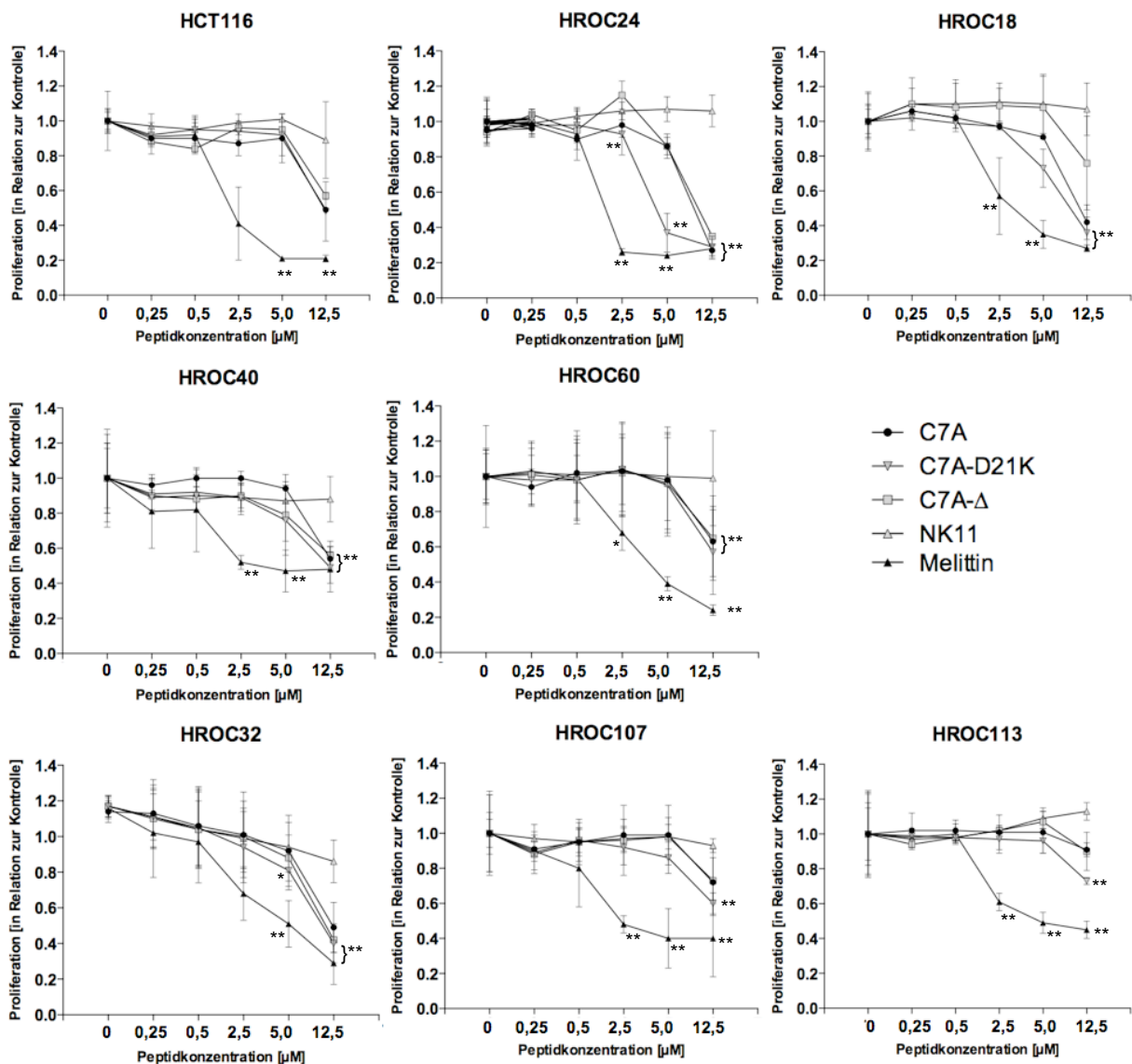


Abbildung 9: MTT-Assay; Einfluss der untersuchten HDPs auf die Zellvitalität. Quantitative Analyse der Veränderung der Zellstoffwechselaktivität von Tumorzellen nach 24-stündiger Inkubation mit ansteigenden HDP-Konzentrationen. Die Auswirkung der HDPs auf den Zellmetabolismus wurde über eine MTT Färbung bestimmt. Verbliebene, lebensfähige Tumorzellen wurden im Vergleich zu

unbehandelten Kontrollen quantifiziert, welche als =1 gesetzt wurden. Die oberste Reihe zeigt drei Zelllinien der Kategorie PS^{high}, die mittlere Reihe zwei Zelllinien der Kategorie PS^{intermediate} und die unterste Reihe drei PS^{low} Zelllinien. Die Ergebnisse zeigen die Messwerte von je drei separaten Experimenten. Die Werte sind als mittlere x-fache Zunahme \pm Stabw angegeben. *p<0.05 vs. NK11; **p<0.01 vs. NK11.

4.2.2.2 Calcein-Assay

Um nachfolgend den Einfluss der HDPs auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurde ergänzend ein Calcein-Assay durchgeführt. Die Behandlung mit den HDPs erfolgte analog zu den Proliferationsuntersuchungen für 24h.

Die Zelllinien HCT116 und HROC24, beide PS^{high}, zeigten das beste Ansprechen auf eine Therapie mit allen HDPs(s. Abbildung 10). Hervorzuheben ist hierbei, dass die Peptide C7A, C7A-D21K und C7A- Δ genauso effektiv waren, wie die Positivkontrolle Melittin. HROC18, die dritte Zelllinie der Kategorie PS^{high}, zeigte ein heterogeneres Ergebnis, bei insgesamt niedrigerem Ansprechen. C7A und C7A-D21K führten zu einer 40-prozentigen Abnahme der Zellvitalität, C7A- Δ war deutlich ineffektiver.

HROC60 (PS^{intermediate}) zeigte ebenfalls eine geringere Suszeptibilität. Eine deutliche Zelltötung konnte hier für C71-D21K festgestellt werden (>40 % Lyse im Vergleich zur Kontrolle). Im Gegensatz dazu war die Zelllinie HROC40, als zweiter Vertreter der Gruppe PS^{intermediate}, selbst bei hohen Peptidkonzentrationen relativ resistent gegenüber einer HDP-vermittelten Lyse.

Als PS^{low} Vertreter zeigten HROC107 und HROC113 ein insgesamt geringes, dosisabhängiges Ansprechen. HROC32, die dritte Zelllinie dieser Kategorie, reagierte kaum auf eine Behandlung mit HDPs – obgleich die Zellproliferation, wie zuvor mittels MTT ermittelt, deutlich gehemmt wurde.

Insgesamt zeigte C7A-D21K, wie bereits zuvor im MTT-Proliferationsassay, die stärkste Aktivität und induzierte eine effektive Zelllyse. Des Weiteren untermauern die Ergebnisse die Beobachtung, dass die onkolytische Aktivität der HDPs zumindest teilweise mit der Menge an oberflächen-präsentiertem PS korreliert.

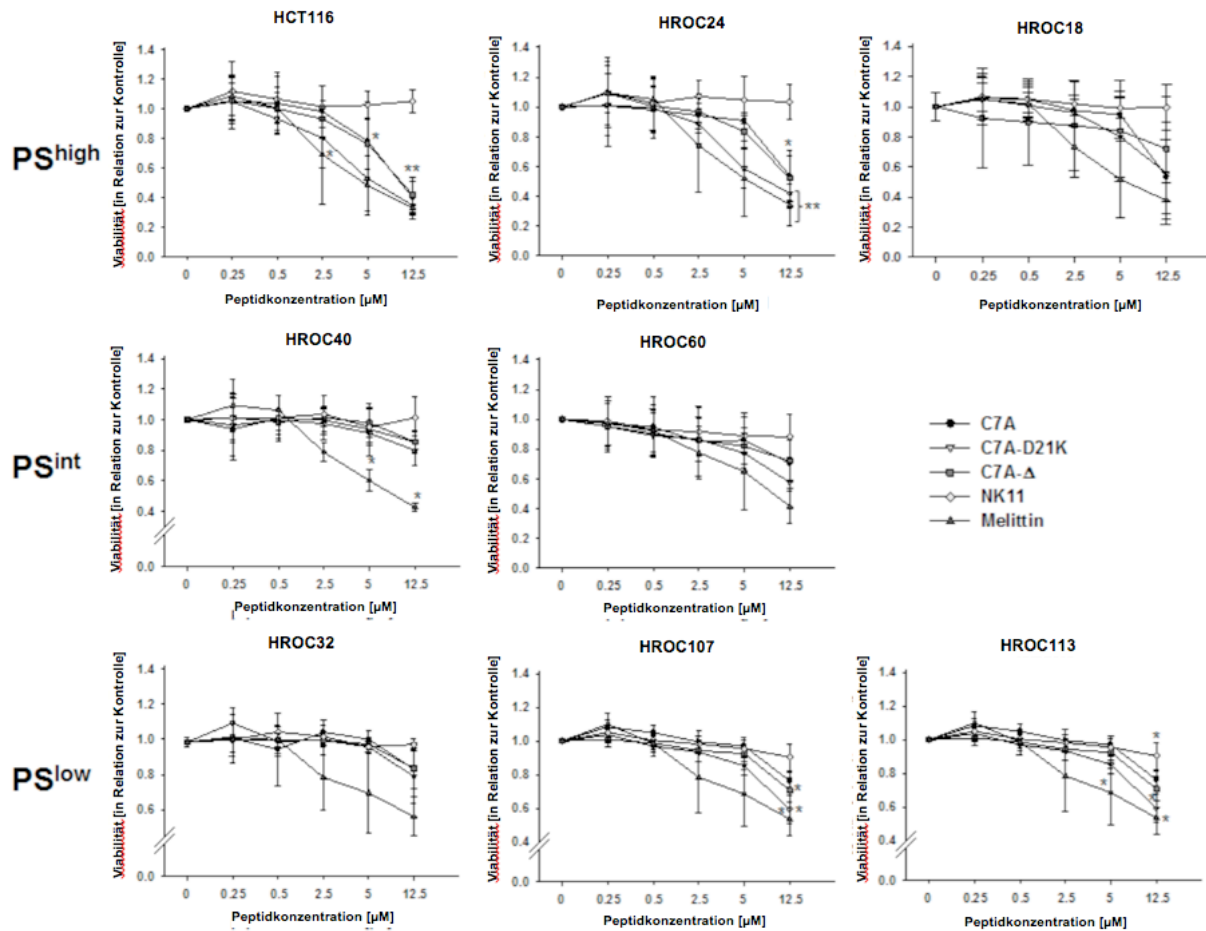


Abbildung 10: HDP-vermittelte Zytotoxizität von CRC-Zellen. Quantitative Analyse der direkten Zytotoxizität von Tumorzellen nach 24-stündiger Inkubation mit ansteigenden HDP-Konzentrationen. Die Viabilität wurde über eine Calcein-AM Färbung bestimmt. Verbliebene, lebensfähige Tumorzellen wurden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen quantifiziert, welche als =1 gesetzt wurden. Die Ergebnisse zeigen die Messwerte von je drei separaten Experimenten. Die Werte sind als mittlere x-fache Zunahme \pm Stabw angegeben. *p<0.05 vs. NK11; **p<0.01 vs NK11.

4.2.3 Kurzzeittest

Gegenstand weiterführender Analyse war der Nachweis der HDP-vermittelten Zelllyse bereits nach kurzer Expositionszeit und der damit einhergehenden schnellen Tötungskinetik. Das experimentelle Vorgehen erfolgte grundsätzlich in Analogie zu dem Calcein-Assay, jedoch wurden die Tumorzellen in diesem Versuch nur 1h mit ausgewählten Peptiden und mit einer höheren Konzentration behandelt.

In diese Analysen wurden ausschließlich die Zelllinien eingeschlossen, welche bei den vorangegangenen Untersuchungen responsiv gegenüber einer HDP-vermittelten Wachstumshemmung waren. Untersucht wurden insgesamt fünf Zelllinien: PS^{high} (HCT116 und HROC24), $PS^{intermediate}$ (HROC40 und HROC60) sowie PS^{low} (HROC32).

Die Kurzzeit-Behandlung zeigte im Allgemeinen ein starkes Ansprechen gegenüber allen Peptiden, wenn auch mit unterschiedlicher, zelllinienspezifischer Suszeptibilität (s. Abbildung 11). Eine annähernd gleiche Effektivität aller HDPs konnte für HROC24 registriert werden. Ähnliche Werte wurden auch für HCT116 und HROC60 verzeichnet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem vorangegangenen Calcein-Assay nach 24h Peptidexposition wurde die Zellviabilität der HROC60 und HCT116 Zellen hier noch stärker gesenkt, als die von HROC24, welche bei Konzentrationen bis 12,5 μM das beste Ansprechen zeigte. HROC40 und HROC32 zeigten eine heterogenere Suszeptibilität, mit einer deutlicheren Senkung der Zellviabilität durch C7A-D21K und C7A- Δ als durch C7A. Hervorzuheben ist, dass HROC32, welche im vorangegangenen Calcein-Assay bis zu einer Peptidkonzentration von 12,5 μM eine relative Resistenz aufwies, hier bei einer Peptidkonzentration von 25 μM ein deutliches Ansprechen zeigte.

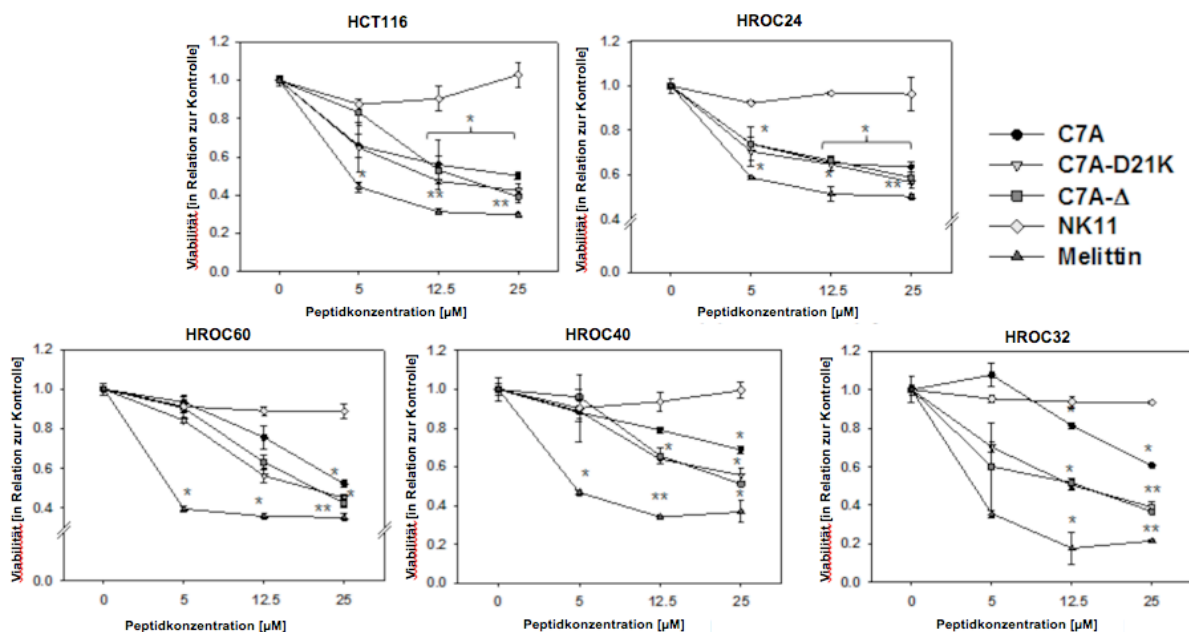


Abbildung 11: Kurzzeit Exposition von HDPs gegen CRC-Zellen. Quantitative Analyse der direkten Zytotoxizität. CRC-Zellen wurden für 1h mit ansteigenden HDP-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde die Viabilität mittels einer Calcein-AM Färbung ermittelt. Verbliebene, lebensfähige Tumorzellen wurden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen quantifiziert, welche als =1 gesetzt wurden. Die Ergebnisse zeigen die Messwerte von je drei separaten Experimenten. Die Werte sind als mittlere x-fache Zunahme \pm Stabw angegeben. * $p < 0.05$ vs. NK11; ** $p < 0.01$ vs. NK11.

4.2.4 Live Cell Imaging

Mit Hilfe des Live Cell Imaging sollte der Einfluss von HDPs auf die Integrität und Morphologie von HROC24 Zellen, wie auch der zeitliche Aspekt der Reaktion der Zelle auf das Einwirken des Peptids dargestellt werden. Hierzu wurde ein zehn minütiges Video erstellt, welches die Zellen unter lichtmikroskopischer Vergrößerung vor und nach Hinzufügen von C7A-D21K bzw. NK11 zeigt. Repräsentativ sollen hier je drei Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Hinzufügen des Peptides den schnellen und direkten Einfluss von C7A-D21K auf die CRC-Zellen visualisieren (s. Abbildung 12). Deutliche morphologische Zellveränderungen konnten hier bereits nach einer zehn minütigen Inkubation mit C7A-D21K festgestellt werden. Eine unspezifische Zelltötung konnte ausgeschlossen werden, da es bei einer Inkubation mit NK11 zu keiner nachweisbaren Zellyse kam.

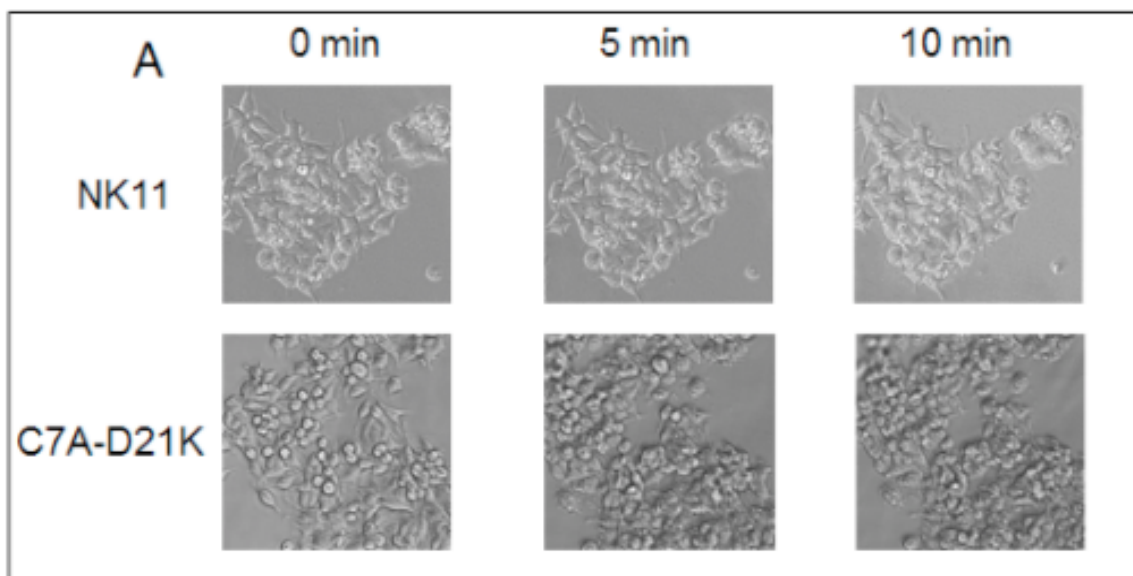


Abbildung 12: Kurzzeitige HDP Exposition gegenüber Tumorzellen. Die repräsentativen Aufnahmen in der unteren Reihe zeigen die morphologischen Veränderungen von HROC24 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hinzugeben von C71-D21K (25 μ M). Die obere Reihe zeigt als Kontrolle, mit NK11 (25 μ M) exponierte HROC24 Zellen ohne Zellyse während desselben Beobachtungszeitraums.

4.2.5 Apoptose/Nekrose Assay

Um einen tieferen Einblick in den Wirkungsmechanismus der verwendeten HDPs zu gewinnen, wurden ausgewählte Zelllinien (HROC18 und HROC24; beide HDP^{high}) einer durchflusszytometrischen Apoptose-/Nekrosebestimmung unterzogen. Das Ziel

war es hierdurch festzustellen, welcher der beiden membranabhängigen Zelltötungsmechanismen – Nekrose oder Apoptose – vorrangig ausgelöst wird.

Die Analysen zeigten, dass die NK-2 Derivate überwiegend eine Nekrose in den untersuchten Zellen auslösten. Frühe apoptotische Zellen (YO-PRO-1⁺/PI⁻) wurden zwar auch nachgewiesen (alle Konzentrationen: 0,25-2,5 μ M), die ermittelten Werte lagen jedoch stets unter 20 % (Abbildung 13 A, B). Bei höheren Peptidkonzentrationen stieg die Zahl spät-apoptotischer (YO-PRO-1⁺/PI⁺) und nekrotischer (YO-PRO-1⁻/PI⁺) Zellen.

Der Anteil lebensfähiger HROC24 Zellen fiel bis auf 17 % (C7A-D21K und C7A- Δ) und 25 % (C7A). C7A-D21K und C7A- Δ wiesen hierbei eine mit der Positivkontrolle Melittin vergleichbare Effektivität auf.

Die HROC18 Zellen zeigten ein insgesamt niedrigeres Ansprechen. Bei dieser Zelllinie wies C7A-D21K die größte Wirksamkeit auf. Die onkolytische Aktivität war für C7A-D21K vergleichbar mit der für Melittin (74 vs. 71 % Zelltötung, Abbildung 13B). Die Peptide C7A und C7A- Δ konnten bei jeweils bis zu 60 % aller Tumorzellen eine Tumorlyse induzieren.

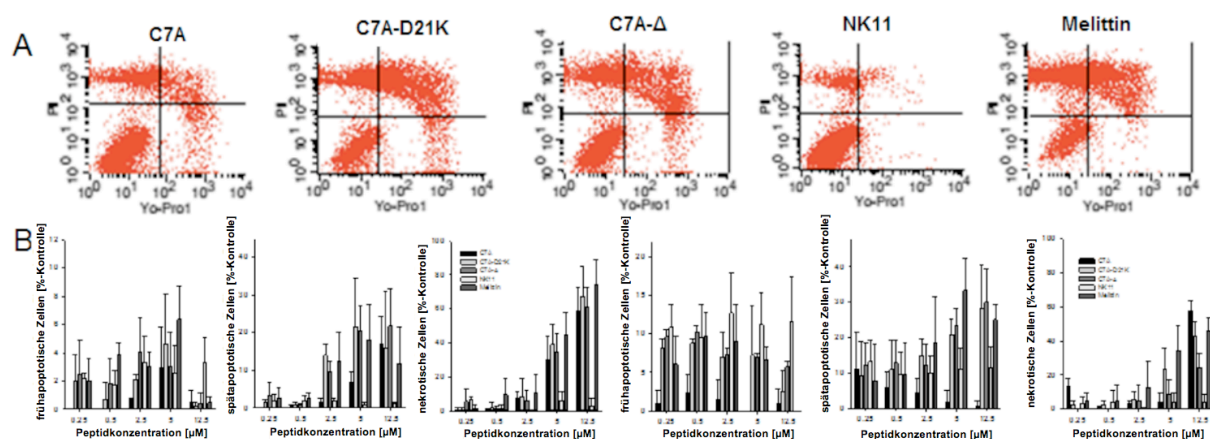


Abbildung 13: Apoptose/Nekrose-Assay: (A, B) HROC18 und HROC24 Zellen wurden ansteigenden Konzentrationen der untersuchten HDPs für 24h ausgesetzt. Anschließend wurden die Tumorzellen mit YO-PRO-1 gefärbt, um früh- und spätapoptotische Zellen zu detektieren. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Analyse wurde PI hinzugefügt, um auch nekrotische Zellen registrieren zu können. (A) Repräsentativer Dotplot, welcher die mit HDPs behandelten HROC24 Zellen bei einer Konzentration von jeweils 5 μ M zeigt. Unterer rechter Quadrant: frühapoptotische Zellen; oberer rechter Quadrant: spätapoptotische Zellen; oberer linker Quadrant: nekrotische Zellen. (B) Zur Quantifizierung des Zelltodes wurden die Werte des Hintergrund Zelltodes (=unbehandelte Kontrollen) von den Werten, die für die mit HDP behandelten Zellen ermittelt wurden, abgezogen. Die linken drei Diagramme zeigen die für HROC24 ermittelten Werte, die rechten drei Diagramme die für HROC18. Die Ergebnisse repräsentieren die Daten von drei unterschiedlichen Experimenten. Die Daten sind als MW \pm Stabw angegeben.

4.2.6 Western Blot Analyse

Eine sich anschließende Western Blot Analyse bestätigte die Nekrose als Hauptursache für den HDP-vermittelten Zelltod. Protein-Expressions-Level für BAX und HSP90 blieben bei HDP-responsiven Zelllinien weitestgehend unverändert (z.B. HROC24, HROC40 und HROC113). Bax ist ein pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Genfamilie, welches im Rahmen der Apoptose vermehrt nachweisbar ist. Die Abbildungen 14A und B zeigen repräsentative Blots für HROC24. Es zeigen sich unveränderte BAX und HSP90 Werte für die drei NK-2 Analoga C7A, C7A-D21K und C7A-Δ sowie NK11. Melittin stellte diesbezüglich die einzige Ausnahme dar, da es eine dosisabhängige HSP90 Expression induzierte (Abbildung 14D). Gespaltenes PARP, welches nur in apoptotischen Zellen auftritt, konnte mittels Western Blot nicht registriert werden.

Diese Resultate stehen im Einklang mit den Beobachtungen aus der Kurzzeit-Exposition und dem Live-Cell-Imaging. Die schnelle Wirkungskinetik deutete dort die Nekrose als Hauptmechanismus der membranvermittelten Zytotoxizität an.

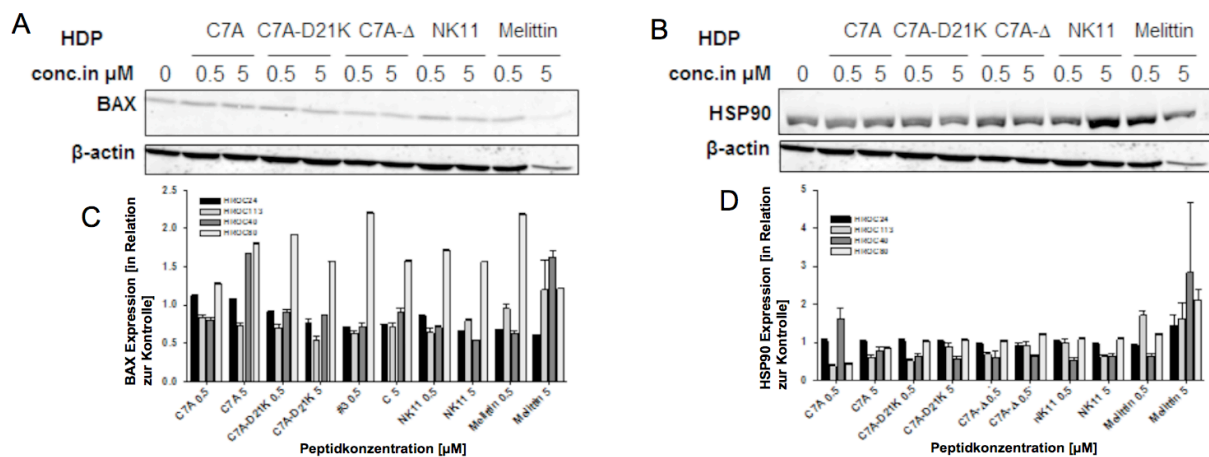


Abbildung 14: Western Blot Analyse (A, B) Repräsentative Western Blot Ergebnisse für mit HDP behandelten HROC24 Zellen (20 μg Gesamtprotein pro Bande). (C,D) Die Quantitative Analyse der Expression von BAX und HSP90 auf den mit HDP behandelten Zellen wurde wie im Material und Methoden Teil beschrieben durchgeführt. Expressionslevel der unbehandelten Zellen wurden als =1 gesetzt und der x-fache Anstieg der HDP exponierten Zellen wurde berechnet. Die Ergebnisse zeigen die Daten von drei unterschiedlichen Experimenten. Die Daten sind als MW ± Stabw angegeben.

4.2.7 Hämolyse- und Lymphotoxizitäts-Assay

Mittels Hämolyse- und Lymphotoxizitätsassay sollte untersucht werden, ob die zuvor beobachtete HDP-vermittelte Lyse tumorspezifisch ist, oder ob die HDPs auch eine unspezifische Zytotoxizität gegen humanen Erythrozyten und Lymphozyten ausüben.

Hierfür wurden für den Hämolyseassay Vollblutproben in der Anwesenheit von steigenden HDP-Konzentrationen für 24h inkubiert. Anschließend wurde der Anteil an freigesetztem Hämoglobin aus zellfreiem Zellkulturüberstand bestimmt. Das Experiment zeigte ein Ausbleiben von -, oder das nur geringe Auftreten von Hämolyse, mit Werten unter 20 % selbst bei hohen Konzentrationen (z.B. Melittin, Dosis 12,5 μ M; s. Abbildung 15A).

In starkem Kontrast dazu stand die Beobachtung, dass alle Peptide die Viabilität von Lymphozyten dosisabhängig reduzierten (s. Abbildung 15B). Hierzu wurde ein Calcein-Assay, analog zu den zuvor beschriebenen Versuchen an Tumorzelllinien, an peripheren Blutlymphozyten unterschiedlicher Probanden durchgeführt. Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Zellviabilität für alle drei NK-2 Derivate. Bei der höchsten Peptiddosis von 12,5 μ M wurde diese gar auf einen ähnlich niedrigen Wert wie für die Positivkontrolle Melittin gesenkt. Die aufgetretenen Effekte waren hierbei vermutlich HDP-spezifisch, da NK11 die Viabilität der Lymphozyten nicht beeinflusste. Die Lymphotoxizität gegen humane Lymphozyten trat unabhängig von Spender und Geschlecht auf.

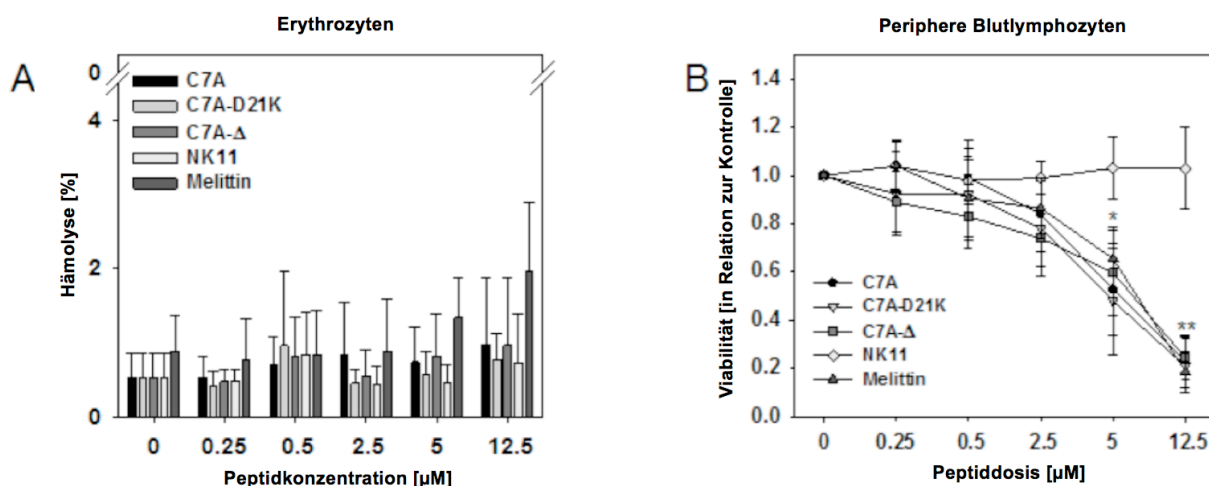


Abbildung 15: Hämolyse- und Lymphotoxizitäts-Assay. (A) Die hämolytische Aktivität der HDPs wurde über die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten aus Vollblutproben nach einer Inkubation von 120 min ermittelt. Die Negativkontrollen blieben unbehandelt, wohingegen die Positivkontrollen (maximale Hämolyse) mit 1 % SDS behandelt wurden. Die hämolytische Aktivität wurde wie im Material und Methoden Teil beschrieben bestimmt. (B) PBLs wurden für 24h mit steigenden HDP-Konzentrationen inkubiert. Die Viabilität wurde über Calcein-AM bestimmt und im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen quantifiziert, welche als =1 gesetzt wurden. Die Abbildung

zeigt die resultierenden Werte von sechs unterschiedlichen, gesunden Spendern. Alle Experimente wurden als Triplikat durchgeführt. Die Werte sind als x-facher MW der Zunahme \pm Stabw angegeben.

4.3 *In vivo* Versuche

4.3.1 Subkutanes Xenograftmodell

Mit diesem Tumormodell sollte die Wirkung der Peptide C7A, C7A-D21K sowie NK11 an den in Mäusen wachsenden soliden Tumor der Linie HROC24 im speziellen, als auch auf den lebenden Organismus im Allgemeinen untersucht werden. Kontrolltiere erhielten ausschließlich die Trägersubstanz (DMSO/PBS). Jede der vier Gruppen wurde mit n=5 Tieren festgelegt. Melittin, was *in vitro* als Positivkontrolle diente, wurde aufgrund einer zu erwartenden hohen Toxizität von diesem Versuch ausgeschlossen.

Nach Auswachsen eines soliden Tumors in der jeweils rechten Flanke der Versuchstiere wurde mit der Therapie begonnen. Es wurden alle drei Tage über eine Dauer von vier Wochen insgesamt neun Applikationen durchgeführt.

Alle Therapieregime wurden von den Versuchstieren gut toleriert, ohne dass unerwünschte Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust, Anämie oder Ataxie auftraten. Die Behandlung mit C7A wies die höchste Effektivität auf (s. Abbildung 16A). Die Tumoren wuchsen unmittelbar nach Therapiebeginn weniger schnell und begannen makroskopisch sichtbar aufzubrechen (in 4/5 Fällen). Hervorzuheben ist, dass diese Tumorstillstandshemmung bis zum Ende des Experimentes anhielt. Eine vergleichbare initiale Wachstumsverzögerung wurde bei der Behandlung mit C7A-D21K erreicht. Initial zeigten die HROC24 PDX eine deutliche, wenn auch nicht vollständige Wachstumsverzögerung, welche zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 17) wieder abnahm. Im Gegensatz zu den mit C7A therapierten Tieren zeigte sich beim Einsatz von C7A-D21K keine Ulzeration der Tumoren. Bis zum Ende des Experimentes erreichte die Tumorstillstandshemmung ein 3,4-faches ihres Ausgangswertes (vs. PBS-Kontrolle: 10,3-fach). Dennoch stellten sich die beschriebenen Effekte als eher unabhängig von einer spezifischen Wirkung der NK-2 Therapie heraus, da auch eine Behandlung mit dem Kontrollpeptid NK11 zu einer Tumorstillstandshemmung führte. Diese Wachstumsverzögerung stellte sich zwar im Vergleich zur Therapie mit C7A und C7A-D21K als weniger stark dar, der Effekt war aber dennoch signifikant

(NK11: 4-fach vs. PBS-Kontrolle: 10,3-fach). Diese Beobachtung trat unerwartet auf, da *in vitro* für NK11 keine wachstumshemmenden Effekte festgestellt wurden.

In Übereinstimmung mit der gezeigten Wachstumshemmung zeigten alle mit HDP behandelten Tumoren erhöhte Level apoptotischer Tumorzellen (s. Abbildung 16B). Wie mittels positiver M30 CytoDeath Färbung nachgewiesen, wurde die Apoptose am stärksten in mit C7A und C7A-D21K behandelten Tumoren induziert. Die mit NK11 therapierten HROC24 Xenografts zeigten ebenfalls erhöhte Level an gespaltenem Cytokeratin 18. Darüber hinaus wiesen HE gefärbte Tumorschnitte aller mit HDP therapierten Tumoren mehr Nekrosen auf, als ihre unbehandelten Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

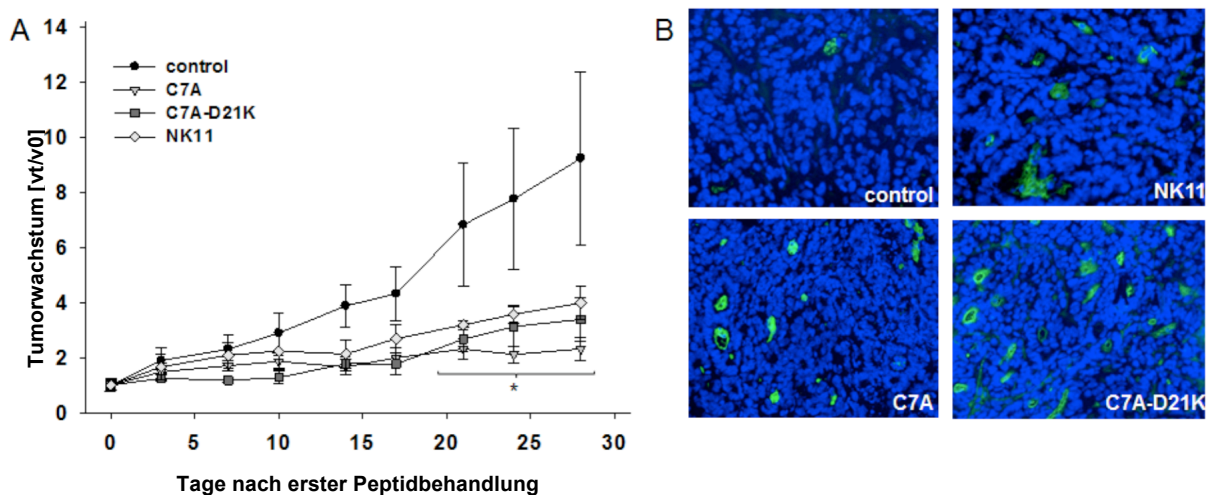


Abbildung 16: *In vivo* Wachstumskinetik und Tumorzellapoptose von HROC24 Xenografts in NMRI Foxn1^{nu} Mäusen, mit und ohne lokaler Behandlung. (A) Die Therapie umfasste wiederholte intratumorale Injektionen der HDPs C7A oder C7A-D21K (1 mg/kg Körpergewicht) an jedem dritten Tag mit insgesamt 9 Applikationen (n=5 pro Gruppe). Tumortragende Kontrolltiere erhielten gleiche Volumina des Peptids NK11 oder der Trägersubstanz (DMSO/PBS). Tumorzustand ist als x-fache Zunahme angegeben, bezogen auf das Tumorzustand am Tag 0 (Vt/V0) (Beginn der Behandlung) ± Stabw. *p<0.05 vs. PBS. (B) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung apoptotischer Zellen innerhalb von HROC24 Xenografts. Kryokonservierte Tumorschnitte wurden mit anti-M30 CytoDeath Antikörpern gefärbt, gefolgt von anti-mouse IgG FITC Antikörpern und DAPI Kernfärbung.

5 Diskussion

5.1 Onkolytische Effekte von HDPs und deren Derivaten

Die HDP Forschung erreicht zunehmend mehr Aufmerksamkeit, das Verständnis über ihre Rolle im Menschen und deren molekularen Wirkmechanismen sind gegenwärtig jedoch nur unzureichend verstanden [56]. Von den Beobachtungen im Rahmen ihres ursprünglichen Einsatzes als antibakterielle Wirkstoffe ausgehend, werden sie heute zunehmend als Alternative zu konventionellen Zytostatika in der Tumorforschung präklinisch erprobt. Gegenüber diesen weisen sie viele Vorteile auf, wie eine schnelle Wirkweise, eine selektive Zytotoxizität, die Fähigkeit, Resistenzmechanismen zu umgehen und additive onkolytische Effekte in bestimmten Kombinationstherapien zu vermitteln [11, 56, 106]. Vor diesem Hintergrund erfolgten in dieser Arbeit eine Reihe von *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen, die zum besseren Verständnis der antitumoralen Effizienz verschiedener HDP – Derivate beitragen sollten. In ersten *in vitro* Analysen wurden zunächst direkte Effekte der HDP-Derivate auf CRC Zelllinien untersucht und deren Wirkungsweise mit potentiellen molekularen Markern korreliert. Ausgehend von den gewonnenen Daten wurde ein *in vivo* Therapieversuch im subkutanen Xenograftmodell durchgeführt. Die erhobenen Befunde werden im Folgenden diskutiert.

5.2 NK-2-Derivate *in vitro*

Aufgrund der begrenzten Anzahl existierender präklinischer experimenteller Studien, untersuchten wir in dieser Arbeit die Wirkung von HDPs an einer Reihe von aus Patienten etablierten CRC-Zelllinien, in niedriger Zellpassage (<50). Diese Zellen stellen ideale Modelle für die Erprobung neuer Wirkstoffe dar, da sie der molekularen und biologischen Signatur des Originaltumors sehr ähnlich sind [45, 107].

5.2.1 NK-Lysin, NK-2 und seine Derivate

In dieser Studie wurden verschiedene Derivate des HDPs NK-2 eingesetzt. NK-2 ist aus der kationischen Kernregion von NK-Lysin abgeleitet [108], welches wiederum ein von NK- und T-Zellen im Schwein produziertes antibakterielles Effektorprotein darstellt [109, 110]. NK-2 wirkt selektiv gegen verschiedene humane Tumorentitäten (Neuroblastom, CRC, Lymphom, Leukämie) [53]. Darüber hinaus ist dieses Peptid hoch wirksam gegen gram-negative und gram-positive Bakterien, klinische Isolate von *Candida albicans* [108], den intrazellulären Parasiten *Trypanosoma cruzi* [111]

sowie in der Neutralisierung von bakteriellen Endotoxinen [112]. Auf der anderen Seite wurde auch gezeigt, dass humane Erythrozyten, Keratinozyten [108] und Glioblastomzellen [111], vor den zytotoxischen Effekten von NK-2 geschützt sind. Die in dieser Arbeit verwendeten NK-2 Derivate zeichnen sich im Vergleich zur Ausgangssubstanz durch eine geringere Sensitivität bezüglich Oxidation, eine verbesserte antibakterielle Wirkung und eine gesteigerte onkolytische Aktivität aus [113].

5.2.2 Molekulare Wirkmechanismen von HDPs – Korrelation mit membran-gebundenem Phosphatidylserin

In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise, dass die antitumoralen Effekte von HDPs – zumindest partiell – auf oberflächenpräsentiertes PS zurückzuführen sind, welches auf Tumorzellen deutlich stärker nachweisbar ist, als auf normalen Zellen [10, 11, 53, 67-69, 105, 114-117]. Folglich wurde der Anteil an membrangebundenem PS im Vergleich zu normalen sowie langzeitkultivierten Tumorzellen bestimmt. Es zeigten sich deutlich zellspezifische Unterschiede. Der Anteil von oberflächenexponiertem PS reichte von hoch (z.B. HROC24) bis niedrig (z.B. HROC32). Zelllinien mit niedrigem PS Gehalt zeigten vergleichbare Werte wie humane Lymphozyten, welche als Normwerte für benigne Zellen fungierten. Der Anteil an membrangebundenen PS war unabhängig von klinisch-molekularen Parametern, wie:

1. dem molekularen CRC-Typ, d.h. CIN vs. MSI vs. CIMP, welcher das Ansprechen auf bestimmte Arzneimitteltherapien beeinflussen kann [118, 119]
2. dem korrespondierenden Mutationsprofil, d.h. KRAS, BRAF, p53, APC Status
3. klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, TNM-Stadium

Darüber hinaus wurden keine Veränderungen durch die serielle Zellpassage der untersuchten PDX, zumindest von Passage 10-50, nachgewiesen (Daten nicht dargestellt). Dies lässt darauf schließen, dass jede Tumورlinie ihr eigenes, individuelles PS-Profil aufweist. Interessanterweise wurden jedoch Unterschiede zwischen den hier eingehender untersuchten frisch etablierten PDX und langzeitkultivierten Zellen nachgewiesen, welche in deutlich höherer Passage vorliegen, mit tendenziell höheren PS-Werten bei letzteren. Die in der Literatur beschriebenen hohen PS-Level auf Tumorzellen als Erklärung für die Wirksamkeit von HDPs könnten folglich auch eine Konsequenz der Langzeitkultivierung

repräsentieren. Vor diesem Hintergrund stellt sich auch die Frage nach dem Anteil an oberflächenständigem PS *in situ*. Hierzu liegen noch keine Daten vor. Bislang in der Literatur beschriebene Effekte wurden exklusiv an langzeitkultivierten Zellen erhoben. Bei jeder der untersuchten Zelllinien konnte eine eindeutige Korrelation zwischen dem PS-Level und der onkolytischen Aktivität von HDPs nachgewiesen werden [10-12, 53, 68, 78, 105, 114]. Auf der Grundlage dieser ersten Erkenntnisse folgten funktionelle Analysen, um die HDP-Sensitivität zu definieren und um herauszufinden, ob die o.g. Mechanismen auch für die Lyse von CRC-Zellen in niedriger Passage zutreffen. Hervorzuheben ist, dass alle drei untersuchten NK-2 Derivate (C7A, C7A-D21K und C7A-Δ), selbst bei kurzzeitiger Exposition (1h) eine antitumorale Aktivität ausübten. Hierbei zeigte sich ein Trend, hin zu höherer Suszeptibilität, für Zellen mit höheren oberflächenexponierten PS-Werten (z.B. HROC24). Dies steht im Einklang mit Beobachtungen, die Schröder-Borm et al. 2005 mit NK-2 machten. So konnten sie *in vitro* eine starke Korrelation zwischen der durch NK-2 induzierten Zelltötung und der Menge von an der Zelloberfläche exponierten PS für verschiedene Tumorzelltypen wie die Neuroblastomzellen NB LA-N-1 und SH-SY5Y, die CRC-Zelllinie SW480, die Lymphomzelllinie U-937 sowie die Leukämie-Linien K562, Jurkat und MOLT-4, feststellen [53]. Dennoch scheint das Ansprechen auf eine HDP-Behandlung auch zelllinien- und peptid-spezifisch und nicht allein durch die An- oder Abwesenheit von PS bestimmt. Von den hier untersuchten neun Zelllinien waren zwei vollständig resistent gegenüber einer HDP-vermittelten Lyse (PS^{low}: HROC32 und PS^{intermediate}: HROC40). Als effektivstes Derivat stellte sich C7A-D21K heraus. Daraus lässt sich folgern, dass die Substitution von Asparagin²¹ mit einem Lysin-Rest zu einem höheren antitumoralen Potential führt. Auch C7A-Δ, ein im Vergleich zu C7A-D21K um vier Aminosäuren gekürztes Peptid, induzierte *in vitro* eine effektive Lyse der Tumorzellen. Trotz Entfernen der vier Aminosäuren (darunter das anionische Asparagin²¹ und das kationische Lysin²⁰) blieb das onkolytische Potential des Peptids erhalten. Hieraus lässt sich folgern, dass die für die Zellyse verantwortliche Aminosäuresequenz in der verbliebenen Region zu finden ist.

Zusammenfassend deuteten diese Ergebnisse darauf hin, dass die antitumorale Wirksamkeit von HDPs zumindest teilweise auf membrangebundenes PS zurückzuführen ist, vermutlich aber auch andere, bislang noch nicht bekannte molekulare Mechanismen, verantwortlich sind.

5.2.3 Direkte membranolytische Effekte

Nekrose oder Apoptose der Zielzelle gelten im Allgemeinen als die zwei Hauptmechanismen der membranabhängigen Zelltötung durch HDPs [11, 61, 85, 117]. Im Einklang damit konnten auch wir in unseren Untersuchungen beide Mechanismen nachweisen; wobei die Nekrose dominierte. Die schnelle Tötungskinetik ($<1h$), welche auch lichtmikroskopisch verifiziert wurde, untermauert diese Erkenntnis noch weiter. HDP-exponierte Zellen zeigten innerhalb weniger Minuten klassische Merkmale eines nekrotischen Zelltodes, wie Zellschwellung und Zerstörung der Zellstruktur, mit Auflösung der Membran und nachfolgender Lyse. Zu einem vergleichbaren Schluss kamen Schröder-Born et al. für das Ausgangspeptid NK-2. Auch sie beobachteten lichtmikroskopisch deutliche morphologische Zellveränderungen nach einer 30-minütigen Inkubation. Als ursächlich erachteten sie eine mechanische Destruktion oder Perforation der zellulären Plasmamembran, was mit einem vollständigen Verlust der strukturellen Integrität mancher Zellen einherging. Unter Berücksichtigung der schnellen Reaktionskinetik (Zelltötung in wenigen Minuten) kam man ebenfalls zu der Annahme, dass die Nekrose der Hauptmechanismus der NK-2 vermittelten Zelltötung ist [53]. Aufgrund des ausgeprägten und schnellen membranolytischen Effektes der hier verwendeten HDPs lässt sich zusätzlich schlussfolgern, dass Resistenzmechanismen von Tumorzellen keine Relevanz für potentielle Therapiestudien darstellen. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn man berücksichtigt, dass die erworbene Resistenz von Tumoren auf (gezielte) Therapien in der Klinik ein zunehmendes Problem darstellt und die Entwicklung von (Lokal-) Rezidiven bzw. Fernmetastasen begünstigt [120].

5.2.4 Zytotoxizität gegen humane Zellen

Die selektive Zytotoxizität der HDPs gegen Tumorzellen ist, wie oben beschrieben, zumindest teilweise, Folge der kovalenten Bindung an membranexponiertes PS. Bei normalen Zellen hingegen befindet sich PS an der Innenseite der zytoplasmatischen Membran. Dieses wird ausschließlich nach Einleiten eines apoptotischen Zelltodes und damit einhergehendem Verlust der Membranasymmetrie an die Außenseite transloziert [79]. Um die selektive antitumorale Aktivität abschließend beurteilen zu können, wurden in dieser Arbeit neben Tumorzellen, auch normale Lymphozyten sowie Erythrozyten mit den HDP-Derivaten ko-kultiviert. Überraschenderweise und

im Gegensatz zur beschriebenen Literatur zeigte sich allerdings, dass die HDPs eine massive Zytotoxizität gegen humane Lymphozyten ausübten. Die Viabilität der Lymphozyten reduzierte sich drastisch unter der Behandlung mit allen untersuchten wirksamen NK-2 Derivaten. Erythrozyten blieben hingegen unbeeinflusst (max. Hämolyse <20 %). Diese Feststellung steht in deutlichem Kontrast zu vorhergehenden Studien, in denen NK-2 keine oder nur eine geringe Lymphotoxizität bewirkte [53]. Die molekularen Ursachen hierfür sind bis dato unklar. In der Literatur finden sich jedoch viele Hinweise auf eine Hämatotoxizität verschiedener HDPs. So sind bspw. vergleichbare Ergebnisse für BMAP-27 und BMAP-28 beschrieben. Diese antimikrobiell und antitumoral wirksamen HDPs lösen bei Leukämiezellen eine Apoptose aus, lysieren aber auch Erythrozyten [121]. Auch Cathelicidin (=LL-37), ein HDP welches von Leukozyten, Epithel- und Mukosazellen produziert wird und bei oralen Plattenepithelkarzinomzellen eine Apoptose auslöst, ist zytotoxisch gegen eine Vielzahl weiterer eukaryotischer Zellen. So tötet es sowohl humane PBLs als auch Endothelzellen [122, 123]. Partiiell geringe Selektivität wiesen auch Steinsträsser et al. für das synthetische Designer-HDP [D]-K₃H₃L₉ nach. So übte dieses bei niedrigen Peptidkonzentrationen auf die Kontrollzellen (primäre humane Fibroblasten) teilweise eine stärkere Proliferationshemmung aus, als auf die eigentlichen Zielzellen (Liposarkomzellen). Als ursächlich wurde hier ein möglicherweise zu geringer Unterschied in der Nettoladung bei den phylogenetisch nahe verwandten Fibroblasten und Liposarkomzellen diskutiert. Die Autoren folgerten, dass aufgrund niedriger Selektivität, bei niedrigeren Konzentrationen nicht ausreichend Peptidmoleküle an Liposarkomzellen binden und daher die Peptidmenge erhöht werden muss, um eine vergleichbare Wirksamkeit zu erreichen [116, 117]. Die hier erhobenen Befunde gehen mit den beschriebenen Beobachtungen partiell einher.

Nach dem guten Ansprechen einiger CRC Zelllinien (insb. HROC24) auf eine Behandlung mit den HDPs *in vitro*, sollte der Frage nachgegangen werden, ob die NK-2 basierten Analoga auch das Potential aufweisen, um *in vivo* eine Kontrolle des Tumorwachstums ausüben zu können. Wegen der *in vitro* beobachteten Lymphotoxizität galt dem etwaigen Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen eine besondere Aufmerksamkeit.

5.3 NK-2-Derivate *in vivo* im murinen Xenograftmodell

Bislang sind nur wenige Studien beschrieben, in welchen HDPs erfolgreich *in vivo* gegen Xenografttumoren eingesetzt wurden und keine beinhalten NK-2 oder seine Derivate [12, 78, 116, 117]. In dieser Studie wurden immunkompromittierten Nacktmäusen HROC24 Zellen subkutan in beide Flanken injiziert. Diese Zelllinie wurde wegen ihres guten Ansprechens auf die Behandlung mit NK-2 Derivaten *in vitro* sowie bereits erfolgreich durchgeführten Tumortransplantationen in anderen Tierexperimenten ausgewählt [45].

5.3.1 Spezifische *in vivo* Effekte

Die neunmalige intratumorale Injektion von C7A oder C7A-D21K führte zu einer deutlichen Verzögerung des Tumorwachstums. Das Tumorwachstum konnte dabei für einige Tage sogar vollständig gestoppt werden. Insgesamt blieben die mit C7A oder C7A-D21K behandelten Tumoren signifikant kleiner, als die Kontrolltumoren. Die Wachstumshemmung ging mit einer erhöhten Anzahl von Apoptosen im Tumorgewebe einher. Ebenfalls hervorzuheben ist, dass über den Zeitraum der Behandlung keine unerwünschten Nebenwirkungen wie Hämolyse oder Lymphotoxizität beobachtet wurden – damit scheinen *in vivo* andere Mechanismen eine Rolle zu spielen, als *in vitro*. Diese HDPs können daher als wirksame und gut tolerable antitumorale Wirkstoffe angesehen werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn man berücksichtigt, dass die hier applizierten Dosen im Vergleich zu anderen HDP *in vivo* Studien deutlich niedriger sind [116, 117]. So wurde in dieser Arbeit eine Peptiddosis von 1 mg/kg alle drei Tage intratumoral injiziert. Papo et al. hingegen applizierten 2005 das diasteromere [D]-K₆-L₉ mit einer Dosierung von 9 mg/kg alle zwei Tage lokal in solide Prostatatumoren in Nacktmäusen [115]. In einem vergleichbaren Tumormodell mit Liposarkomzellen, verwendeten Steinsträßer et al. 2011 das auf [D]-K₆-L₉ basierende [D]-K₃H₃L₉ mit einer Dosis von 8,5 mg/kg. Das Therapieregime umfasste hier, wie auch in der vorliegenden Studie, eine intratumorale Injektion alle drei Tage, über einen Zeitraum von drei Wochen. Dadurch konnte eine signifikante Inhibition der Tumorprogression erreicht werden [116].

Für die in dieser Arbeit beobachtete Kontrolle des Tumorwachstums könnten verschiedene Vorgänge, einzeln oder im Zusammenspiel, verantwortlich sein. Als gesichert ist dabei anzunehmen, dass eine HDP-vermittelte Zellnekrose eine zentrale

Rolle spielt. Dafür sprechen die Ergebnisse aus *in vitro* und *in vivo* Analysen. So konnte durch Apoptose/Nekrose Assays und Western Blot Analysen die Nekrose als Hauptmechanismus der membranvermittelten Zytotoxizität durch NK-2-Analoga identifiziert werden. Auch die immunhistochemische Untersuchung der Tumoren ergab, dass diese nach Behandlung mit HDPs mehr Nekrosen aufwiesen, als die unbehandelten Kontrolltumoren. Darüber hinaus wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine durch die HDPs induzierte Apoptose registriert. Diese trat zwar seltener auf als die Nekrose, aber dennoch häufiger als in unbehandelten Kontrollen. Damit dürfte auch die Apoptose zur lokalen Tumorstwachstumskontrolle beitragen.

Es ist davon auszugehen, dass neben diesen beiden Mechanismen der direkten Tumorzelltötung auch andere Faktoren eine Rolle spielen. Steinsträsser et al. wiesen eine antiproliferative Wirkung des HDP [D]-K₃H₃L₉ nach. So war die Anzahl proliferierender Ki-67 positiver Zellen um 87 % und damit hochsignifikant unter der Kontrollgruppe. Des Weiteren wurde in HE gefärbten Tumorschnitten, der nicht-nekrotischen Areale behandelter Tumoren, eine im Vergleich zur Kontrollgruppe um 39 % reduzierte Mitoserate registriert. Hervorzuheben ist ebenfalls, dass das HDP eine signifikante anti-angiogenetische Wirkung ausübte, was sich *in vivo* in einer um mehr als 50 % reduzierten Gefäßdichte im Vergleich zu Kontrolltumoren widerspiegelte [116]. Vergleichbare Ergebnisse für dasselbe HDP erzielten Makovitzki et al. 2009 im murinen Modell mit Prostatakarzinomzellen, sowohl nach intratumoraler als auch systemischer Applikation. So wiesen histologische und immunhistochemische Untersuchungen der behandelten Tumoren Nekrosen, Rückgang der Mitoserate und eine Unterdrückung der tumor-assoziierten Angiogenese nach [96].

Zusammenfassend könnte die beobachtete Tumorstwachstumskontrolle das Resultat folgender Vorgänge sein, wobei insbesondere die Punkte zwei und drei für NK-2-Derivate noch eingehender untersucht werden sollten:

1. direkte Tumorzelltötung (am wahrscheinlichsten durch Nekrose > Apoptose)
2. Unterdrückung der Tumorzellproliferation
3. Inhibition der Angiogenese

5.3.2 Unspezifische *in vivo* Effekte

Entgegen unserer Erwartungen beeinflusste auch die Applikation von NK11 das Wachstum der HROC24 Xenografts *in vivo*. NK11 ist ein inaktives Derivat von NK-2 und wurde daher eigentlich als nicht-toxische Kontrolle eingesetzt. Nichtsdestotrotz wurde das Wachstum der Tumoren durch dieses Peptid deutlich beeinträchtigt. Neben der Tatsache, dass vorangegangene *in vivo* Studien zu HDPs keine Kontrollpeptide beinhalteten, gibt es eine Reihe möglicher Ursachen die diese Beobachtungen erklären können:

1. Die *in vitro* applizierte Dosis unterschied sich von den *in vivo* gegebenen Dosen.
2. NK11 wurde *in vivo* wiederholt injiziert, wohingegen es zur Zellkultur nur einmal hinzugefügt wurde.
3. HDPs sind als potente Stimulatoren des Immunsystems bekannt. Unspezifische Immunreaktionen sind daher wahrscheinlich.

5.3.3 Folgerungen

Es ist davon auszugehen, dass die intratumorale Injektion von NK-2 Derivaten eine Vielzahl lokaler und systemischer Vorgängen induziert, welche einzeln und/oder gemeinsam zu einer lokalen Tumorkontrolle führen können. Nach der Bindung an die Oberfläche der Tumorzelle bewirken die HDPs eine membranvermittelte Zytotoxizität. Dadurch lösen sie durch Nekrose > Apoptose eine direkte Zelltötung mit einer schnellen Tötungskinetik aus. Dennoch bewahrt das Tumormikromilieu (inklusive Stromazellen) manche Anteile des Tumors vor einer Lyse und verhindert somit die komplette Tumorremission. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass lokal injiziertes Peptid nicht alle Tumoreareale in gleichem Ausmaß erreicht und somit keine gleichmäßige Nekrose der gesamten Tumormasse erreicht wird. Es ist davon auszugehen, dass HDPs im Rahmen der intratumoralen Injektion auch in den Blutkreislauf des Wirtes gelangen und zu systemischen Effekten führen. Als mögliche Folge kommt es neben einer Seruminaktivierung bspw. durch Proteolyse, zu einer Detektion der HDPs durch das Immunsystem des Wirts, allen voran Makrophagen und NK-Zellen. In Folge dessen infiltrieren Zellen des angeborenen Immunsystems den Tumor. Dieses lokale, proinflammatorische Milieu unterstützt die Kontrolle des Tumorstwachstums temporär. Da die in dieser Studie untersuchten Nacktmäuse über kein funktionelles adaptives Immunsystem verfügen (insbesondere keine T-Zellen),

können keine spezifischen Immunreaktionen induziert werden. Es ist daher vorstellbar, dass NK-2 und seine Derivate einen stärkeren antitumoralen Effekt in immunkompetenten Wirten ausüben.

Designer HDPs stellen daher einen vielversprechenden Wirkstoff als Teil einer multimodalen (Chemotherapie-basierten) Kombinationstherapie dar. Ein potentielles Einsatzgebiet der NK-2 Derivate ist die adjuvante Therapie von großen, primär nicht resektablen Rektumkarzinomen und Lebermetastasen, mit dem Ziel des Downsizing und sekundär, potenziell kurativer Resektion. Auch Mai et al. diskutierten 2001 diese Indikationsoption für onkolytische HDPs. So vermuteten sie, dass adjuvant appliziertes HDP in Kombination mit existierenden Behandlungskonzepten wie (Radio-)Chemotherapie zu einem Downsizing des Primärtumors führen und daraus resultierend eine chirurgische Resektion ermöglicht werden kann [86].

5.4 Weitere *in vivo* Studien mit HDPs

5.4.1 Melittin

Melittin, ein aus der europäischen Honigbiene *Apis mellifera* isoliertes Peptid, besitzt zum größten Teil eine α -helikale Struktur. Es wird angenommen, dass es an Zielzellen durch Porenbildung in der Zellmembran eine Lyse auslöst [124, 125]. Da Melittin hoch toxisch gegen Erythrozyten und untransformierte Zellen ist [12], wurde es in unserer Studie nicht *in vivo* eingesetzt. Holle et al. jedoch konjugierten 2003 Melittin mit Avidin um ein gegen gesunde Zellen inaktives Peptidkonjugat zu erhalten, was sich gezielt gegen Krebszellen mit einer hohen Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) Aktivität richtet [126]. MMP2 ist in einer Vielzahl von Krebszellen und assoziierter Endothelzellen überexprimiert [127]. Daher spaltet MMP2 das Konjugat Melittin/Avidin und aktiviert Melittin somit gezielt im Tumor. Im Rahmen der *in vivo* Studie wurde das Konjugat intratumoral appliziert. Infolge dieser Applikation konnte eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums beobachtet werden. Auch *in vitro* zeigte Melittin/Avidin eine starke zytolytische Aktivität gegen Krebszellen mit einer hohen MMP2 Aktivität, wie DU145 Prostatakrebszellen und SK-OV-3 Ovarialkrebszellen. Dabei übte das Konjugat nur eine geringe zytolytische Aktivität gegen normale T-Zellen aus, welche eine niedrigere MMP2 Aktivität aufwiesen [126].

5.4.2 Magainin

Magainin wurde ursprünglich 1987 von Zasloff von der Haut des afrikanischen Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, isoliert und gehörte zu den ersten Peptiden, die *in vivo* bezüglich ihrer Wirkung gegen Tumorzellen untersucht wurden [128]. Magainin 2, ein synthetisches Analogon, weist eine amphiphile α -helikale Struktur auf. In der Zellmembran der Zielzelle führt es zur Bildung Ionen-durchlässiger Poren; daraus resultieren Depolarisation und Zytolyse [129].

Das Magainin Derivat MSI-511 wurde von Soballe et al. *in vivo* erfolgreich zur lokalen Behandlung subkutaner Melanom-Xenografts in Nacktmäusen eingesetzt. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnte der Tumor hier in sechs von neun Tieren, nach einmaliger intratumoraler HDP Injektion, vollständig eliminiert werden, bei nur geringen, temporären Schäden des umliegenden Gewebes [130]. Als Erklärung hierfür sind jedoch einige Unterschiede zwischen beiden Arbeiten hervorzuheben. So handelte es sich bei den von Soballe et al. untersuchten Zellen um etablierte Zelllinien in höherer Passage einer anderen Tumorentität, wohingegen hier frisch etablierte individuelle Tumorzelllinien in niedriger Zellpassage verwendet wurden. Außerdem wurde bei Soballe mit der Therapie bei einem mittleren Tumolvolumen von 75 mm^3 begonnen, wohingegen in dieser Arbeit ein mittleres Tumolvolumen von bis zu 180 mm^3 für die mit C7A behandelte Gruppe bei Therapiebeginn vorlag. Des Weiteren injizierten Soballe et al. mit 2,5 mg MSI-511 eine deutlich größere Peptidmenge als die in die in dieser Arbeit applizierten 0,02 mg Peptid pro Einzelinjektion [130].

Für andere Magainin Analoga (MSI-136 und MSI-238) konnte gezeigt werden, dass sie bei intraperitonealer Applikation das Überleben von Mäusen mit peritonealen Aszitestumoren (zwei hochinvasive Leukämiezelllinien L210 und P388; eine Aszitesform eines Sarkoms S180; ein mausspezifisches ovariales Teratom SOT) nach ein- oder zweimaliger Applikation deutlich verlängern können [131].

5.4.3 Bovines Lactoferricin

Ein wichtiges und in mehreren *in vivo* Studien untersuchtes onkolytisches HDP ist das bovine Lactoferricin (LfcinB), welches durch Proteolyse mittels Pepsin aus Lactoferrin (LFB) gewonnen wird [132]. Im Gegensatz zu NK-2, Melittin und Magainin weist LfcinB als Sekundärstruktur keine α -Helix auf, sondern, aufgrund von zwei Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten, ein β -Faltblatt [133]. Systematische

Studien mit LfcinB Derivaten konnten einige, für einen erfolgreichen Einsatz gegen Tumorzellen wichtige Charakteristika aufzeigen. So werden für eine Antitumoraktivität eine hohe positive Nettoladung (+7 für antitumorale im Vergleich zu +4 für antimikrobielle Aktivität) sowie rein kationische und anionische Bereiche (Amphiphilität zur Interkalation in die Zellmembran) benötigt [134, 135]. Darüber hinaus kann man die Notwendigkeit einer stabilen Sekundärstruktur aus der höheren Aktivität von zyklischen Peptiden ableiten [104], welche eine deutlichere Trennung von kationischen und hydrophoben Anteilen aufweisen [136].

In Tumorzellen induziert LfcinB über mehrere unterschiedliche Mechanismen Apoptose. Dies geschieht einerseits durch einen Signalweg, welcher durch die Produktion von intrazellulären reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) vermittelt und durch eine $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -abhängige Endonuklease aktiviert wird [137], durch die Auslösung des oben beschriebenen mitochondrialen Signalweges der Apoptose [15] sowie über einen Caspase-unabhängigen Apoptoseweg [138].

In vivo wurde LfcinB von unterschiedlichen Arbeitsgruppen bereits gegen eine Vielzahl von Tumorentitäten und sowohl lokal, als auch systemisch appliziert, untersucht. Eliassen et al. zeigten 2002 an Kolonkarzinomen, Fibrosarkomen und Melanomen, dass bereits einen Tag nach Exposition mit LfcinB hämorrhagische Nekrosen im Tumorgewebe auftreten [104]. 2006 konnten sie nach wiederholter Injektion von LfcinB eine signifikante Tumorstillstandverzögerung von Neuroblastom Xenografts in Nacktmäusen nachweisen [103]. Yoo et al. untersuchten 1997 das Potential von LFB und LfcinB bezüglich einer Unterdrückung der Metastasierung. Hierbei verwendeten sie hochmetastatische B16-B6 Melanomzellen und L5178Y-ML25 Lymphomzellen im experimentellen und spontanen Metastase-Modell an gen-identischen Mäusen. Die subkutane Applikation von Apo-Lactoferrin und LfcinB, einen Tag nach Tumorinokulation, konnte die Metastasen in Leber und Lunge für beide Tumorentitäten erfolgreich verhindern. Darüber hinaus zeigte eine *in vivo* Untersuchung der tumor-induzierten Angiogenese, dass beide Peptide die Anzahl tumor-induzierter neuer Blutgefäße senken und das Tumorstillstand bis zum achten Tag nach Inokulation unterdrücken können [137].

5.4.4 Designer-HDP [D]-K₃H₃L₉

[D]-K₃H₃L₉, ein synthetisches Designer-HDP wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen *in vivo* getestet. Shai et al. untersuchten 2009 [D]-K₃H₃L₉ im

subkutanen Xenograft-Mausmodell gegen 22RV1 Prostatakarzinomzellen und LLC Lungenkarzinomzellen. Hier wurde sowohl nach intratumoraler, als auch nach systemischer Peptid-Applikation eine signifikante Reduktion des Tumorgewichts des Prostatakarzinom-Xenografts um 81 % bzw. 75 % im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen [96]. In einem Xenograft-Mausmodell mit SW-872 Liposarkomzellen zeigten Steinsträsser et al., nach ebenfalls neunmaliger intratumoraler Injektion von [D]-K₃H₃L₉, eine vollständige Tumorstilllegung über einen Zeitraum von vier Wochen, wohingegen sich das Tumorgewicht der Kontrollgruppe über denselben Zeitraum versiebenfachte. Bei 43 % der behandelten Tiere konnte eine komplette Remission, bei wiederum 43 % eine partielle Remission erreicht werden. Histologisch konnte eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte um 52 % festgestellt werden. Ergänzende durchflusszytometrische und histomorphologische Analysen des Tumors deuteten auf eine Nekrose-bedingte Zelltötung hin [117].

5.5 Optimierung therapeutischer *in vivo* Ansätze

Derzeit konzentrieren sich viele Studien darauf, eine zweite Generation von onkolytischen HDPs herzustellen, mit einer verbesserten Selektivität und Toxizität gegen Tumorzellen. In vielen Fällen konnte festgestellt werden, dass die erste Generation von Designer-HDPs oder natürlich vorkommenden onkolytischen HDPs ihre Wirkung zwar *in vitro* und *ex vivo* ausüben konnten, ihre unspezifische *in vivo* Toxizität jedoch ein Problem hinsichtlich reduzierter Selektivität und unerwünschten Nebenwirkungsprofilen darstellte [65, 139]. Dies hat sowohl eine systemische Anwendung, als auch das therapeutische Potential der ersten Generation von onkolytischen HDPs limitiert [69]. Derzeit ist der einzige Vertreter dieser Peptidklasse mit Aussicht auf eine medizinische Anwendung Lactoferrin, welches 2011 als onkologischer Wirkstoff patentiert wurde [140]. In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass *per os* gegebenes Lactoferrin das Risiko der Kolonkarzinogenese reduziert [141]. 2011 wurde in einer klinischen Phase-II Studie das rekombinante Talactoferrin Alfa an 100 Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom mit den Stadien IIIB bis IV getestet, bei denen zuvor eine Erst- oder auch Zweitlinientherapie versagt hatte. Dadurch konnte das Gesamtüberleben verlängert werden, ohne dass es dabei zu nennenswerten Nebenwirkungen kam [142-144].

5.5.1 Verbesserung der Serumstabilität

Ein sowohl unter *in vivo* als auch *in vitro* Bedingungen beschriebenes Problem ist die Proteolyse der HDPs, durch im Serum vorhandene Proteasen. Dies verhindert aktuell oftmals noch eine effiziente systemische Applikation vieler dieser onkolytischen Peptide, da die Halbwertszeit im Serum und damit einhergehend die Bioverfügbarkeit reduziert werden [12].

Einen wichtigen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der HDPs hat die Chiralität der einzelnen Aminosäuren [10, 11, 115-117, 131]. Man unterscheidet die L-Aminosäuren von ihren D-Isomeren, den D-Aminosäuren, welche in der Natur weitaus seltener vorkommen [145]. Verschiedene Studien zeigten, dass HDPs welche nur aus L-Aminosäuren aufgebaut sind, *in vitro* zwar onkolytisch wirksam sind, nicht jedoch unter *in vivo* Bedingungen [10, 11, 78, 96, 131]. Ursächlich hierfür sind sowohl der Abbau der HDPs durch Serumproteasen als auch die unspezifische Bindung von Serumkomponenten [105, 131]. Dies kann durch die Verwendung von HDPs verhindert werden, welche entweder nur aus D-Aminosäuren, oder aus einer Mischung von L- und D-Aminosäuren (Diastereomere) bestehen [96].

Eine einfache und effiziente Modifikation zur Überwindung der Inaktivierung durch Serum ist daher das Einbringen von D-Aminosäuren oder der Austausch von vorhandenen natürlich vorkommenden L-Aminosäuren, durch ihre Diastereomere [10, 11]. Diesen Ansatz verfolgten auch Baker et al. mit den oben beschriebenen Magainin 2 Analoga. Dabei handelte es sich um MSI-238 welches nur aus D-Aminosäuren besteht und MSI-136, das nur aus L-Aminosäuren aufgebaut ist. Die analogen Aminosäuresequenzen dieser HDPs wurden konzipiert, um die amphiphile α -Helix-Struktur zu verbessern und um die Peptide weniger anfällig für einen Abbau durch Proteolyse zu machen. Beide Peptide zeigten sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im murinen Metastasierungsmodell nach intraperitonealer Applikation aktiv, wobei das aus D-Aminosäuren bestehende MSI-238 eine höhere Aktivität und Effektivität aufwies und resistent gegenüber einer Serumaktivierung durch Proteasen war [131].

Eine ähnliche Herangehensweise nutzten auch Papo und Shai in einer Reihe von systematisch *de novo* designten Peptiden, welche sowohl aus D-, als auch aus L-Aminosäuren aufgebaut sind und die lytische Aktivität von HDPs nachahmen. Die daraus resultierenden diastereomeren Peptide verloren ihre Zytotoxizität gegen

normale Zellen, zeigten weiterhin eine onkolytische Aktivität und eine reduzierte Seruminaktivierung *in vivo* durch enzymatischen Abbau. So zeigte das diastereomere [D]-K₆-L₉ nach systemischer Applikation eine selektive Zytotoxizität gegen Primärtumoren sowie Metastasen von Xenografts humaner sowohl Prostata- (CL1, 22RV1 und LN- CaP) als auch Mammakarzinome (RFP-MDA-MB-231). Das nur aus L-Aminosäuren bestehende Ausgangspeptid hingegen wies keine *in vivo* Wirksamkeit auf. Die histopathologische Untersuchung zeigte, dass das diastereomere Peptid keine Schäden an den Organen der behandelten Mäuse verursachte. Darüber hinaus zeigte es eine synergistische Wirkung in der Kombination mit klassischen Chemotherapeutika. Dies untermauert das Potential dieser Peptide für einen therapeutischen Einsatz [78, 105].

5.5.2 Verbesserung der Selektivität

Diastereomere und D-Isomere

Der oben beschriebene Einsatz von HDPs aus D-Aminosäuren oder aus Mischungen von L- und D-Aminosäuren verbessert nicht nur deren Serumstabilität, sondern auch deren Zellselektivität. So konnte das nur aus L-Aminosäuren bestehende HDP *in vitro* nicht zwischen Tumor- und Normalzellen diskriminieren. Das Diastereomer [D]-K₆-L₉ hingegen wies eine selektive onkolytische Aktivität gegen verschiedene Prostata- und Brustkrebszellen auf [78, 105].

Erhöhung der positiven Nettoladung

Eine weitere Möglichkeit, die Selektivität von Designer-HDPs gegen Tumorzellen zu verbessern, besteht in der Erhöhung der positiven Nettoladung. Das kann z.B. durch das Hinzufügen zusätzlicher kationischer Aminosäuren (wie Histidin oder Lysin) geschehen. Diese Modifikation nutzten auch Andrä et al. bei der Herstellung der hier verwendeten HDPs. So wurde ausgehend von C7A ein neues HDP (C7A-D21K) mit höherer Nettoladung geschaffen, indem Aspargin²¹ durch Lysin ersetzt wurde [146]. Diese Vorgehensweise basiert auf Erfahrungen auf dem Gebiet der antimikrobiell wirksamen HDPs [147]. So beobachteten Peschel et al., dass *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* und andere pathogene Keime Abwehrmechanismen gegen antibakterielle HDPs entwickelten. So reduzierten diese Bakterien die negative Nettoladung ihrer Zellmembran, durch die kovalente Modifikation

anionischer Moleküle (Teichonsäure, Phospholipide und Lipid A) und den Einbau kationischer Moleküle [148]. Dieser bakterielle Resistenzmechanismus konnte hingegen durch die Erhöhung der positiven Nettoladung der verwendeten antibakteriellen HDPs umgangen werden. So zeigten Untersuchungen an dem natürlich vorkommenden humanen HDP β -Defensin 3 (hBD3), dass es in der Gruppe der Defensine die höchste antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. aureus* bei gleichzeitig höchster kationischer Nettoladung von +11 aufweist [149]. Der Ansatz, schwächer anionische Zielstrukturen durch stärker kationische HDPs zu erreichen, könnte auch auf solche Zellen angewendet werden, welche von derzeitigen HDPs noch nicht oder nur wenig selektiv angegriffen werden. Diese Hypothese wird durch die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtung gestützt, dass das HDP mit der höchsten Nettoladung von +12, C7A-D21K, sowohl eine Wirkung gegen die meisten der untersuchten CRC-Zelllinien hatte, als auch das Derivat mit der jeweils höchsten onkolytischen Aktivität war. Die höhere Nettoladung von C7A-D21K könnte hier also zu einer verbesserten Selektivität und damit einhergehend, verbesserten Effektivität des Derivates geführt haben, da eine größere Menge des Peptides an die Zielzelle binden konnte und so etwaige Schwellenwerte zur Auslösung von membranabhängigen Tötungsmechanismen, wie oben beschrieben, erreicht wurden.

Nutzung von tumorständigen Rezeptoren

Einen anderen Ansatz verfolgten manche Studien, indem sie zellspezifische Designer-HDPs herstellten, welche die Fähigkeit von Peptiden wie HNP-1 nachahmen und Tumorzellen über spezifische Rezeptoren angreifen [13, 61, 85]. Diese Herangehensweise beruht auf der Beobachtung, dass manche Tumorarten spezifische Rezeptoren an ihrer Oberfläche überexprimieren. Daher wurden neue *de novo* HDPs designt, welche „homing domains“ beinhalten, die spezifisch für solche Rezeptoren sind. Ihre Wirksamkeit konnte in präklinischen Studien bereits demonstriert werden [150-153]. So konjugierten bspw. Cai et al. 2010 sowie Liu et al. 2011 das Peptid Bombesin mit Magainin II und anderen HDPs [152, 153]. Bombesin ist ein aus der Rotbauchunke isoliertes Peptidhormon [154]. Sein Rezeptor ist auf einer Vielzahl von menschlichen Tumorentitäten wie gastrointestinalen Tumoren, Neuroblastom, kleinzelligem Bronchialkarzinom, Prostata-, Nieren, Uterus-, Ovarial-, Mamma-, Pankreas- und Ösophaguskarzinom überexprimiert [155, 156]. Bombesin kann daher aufgrund seiner hohen Affinität für diese Rezeptoren radioaktive Stoffe [157], Chemotherapeutika [158] sowie HDPs effektiv zur Zielzelle bringen. Liu et al.

konnten durch die Konjugation von Magainin II mit Bombesin eine verbesserte Selektivität und Effektivität mit erhöhter Zytotoxizität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen [152].

5.5.3 Ausblick

Derzeit sind die entscheidenden Faktoren, welche die Effizienz und Selektivität von onkolytischen HDPs determinieren noch nicht ausreichend verstanden. Dies limitiert die Möglichkeit für einen therapeutischen Einsatz in der Onkologie [13, 159].

Als allgemein gesichert gilt jedoch, dass die drei Faktoren: positive Nettoladung, Hydrophobizität und Amphiphilität eine Hauptrolle für die onkolytische Aktivität von HDPs spielen [13, 67, 69]. 2010 führten Dennison et al. eine Clusteranalyse mit 158 gegen Tumorzellen aktive, α -Helix HDPs durch, anhand welcher das Aktivitätsspektrum bestimmt wurde [67]. Dies enthüllte strukturelle Charakteristika von onkolytischen HDPs. In einer umfangreichen Datenbank von α -Helix HDPs wurden zusätzlich Informationen über Aminosäuresequenz und onkolytische Aktivität gegen verschiedene Tumorzelllinien zusammengefasst [160]. Um eine Vergleichbarkeit von Peptiden unterschiedlicher Toxizität zu ermöglichen, wurden die drei oben genannten Parameter für jedes Peptid bestimmt. Anhand dieser Parameter sollte eruiert werden, ob ein bestimmtes Arrangement mit einer hohen oder niedrigen Toxizität verbunden ist. Dazu wurden die Peptide in insgesamt 21 Cluster eingeteilt. Die Analyse zeigte, dass die Mehrheit aller Cluster eine ähnliche mittlere Zytotoxizität ausübte und keine einzelne Kombination der drei Haupteigenschaften die Gesamteffektivität erhöhte. Die Tatsache, dass inaktive Peptide auf sieben unterschiedliche Cluster verteilt waren, zeigte, dass die Parameter positive Nettoladung, Hydrophobizität und Amphiphilität alleine nicht ausreichen, um eine mögliche antitumorale Aktivität vorherzusagen. Zusammenfassend kamen Dennison et al. jedoch zu dem Schluss, dass die Amphiphilität eine der Haupttriebkkräfte für die meisten tumorselektiven HDPs und für die Hälfte der unspezifischen HDPs darstellt. Insgesamt schlugen sie vor, dass die antitumorale Aktivität von HDPs eher durch das Zusammenspiel einer Vielzahl physiochemischer Eigenschaften determiniert wird, als durch einen einzelnen, alles bestimmenden Faktor [67, 68].

Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Harris et al. 2011 in ihrer Arbeit über die potentiellen Determinanten für die antitumorale Wirksamkeit von HDPs. Sie

unterteilten diese Determinanten in membranbasierte Faktoren wie Rezeptoren, PS, N-Acetyneuraminsäurereste und sulfatierte Glykosaminoglykane sowie in peptidbasierte Faktoren wie Aminosäurezusammensetzung, Länge der Aminosäuresequenz, Nettoladung, Größe des hydrophoben Bogens, Hydrophobizität und Amphiphilität. Auch sie kamen zu dem Schluss, dass nicht ein einzelner membran- oder peptidbasierter Faktor alleine für die onkolytische Aktivität von HDPs verantwortlich ist. Dabei nahmen sie ebenfalls Bezug auf die von Dennison et al. gemachte und o.g. statistische Untersuchung. Sie legten nahe, dass die antitumorale Aktivität der Peptide, dem für die Enzymaktivität postulierten „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ ähnelt [161]. Hiernach unterstützt die molekulare Architektur des Peptides seine Bindung und Integration in eine Membran mit einer bestimmten Zusammensetzung. Bindung und Integration sind dabei nicht ausschließlich von Form und physiochemischen Eigenschaften der Peptide abhängig, sondern auch von der spezifischen Zusammensetzung der jeweiligen Zellmembran. Die Autoren schlugen daher vor, dass die effizientesten Strategien zur Generierung therapeutisch wirksamer HDPs, nicht nur die Charakteristika der verwendeten HDPs sondern auch die der jeweiligen Zellmembran der zu tötenden Zelle berücksichtigen sollten. Wegen der großen Unterschiede in der Zusammensetzung der Tumorzellmembran sollte die Herstellung neuer *de novo* Designer-HDPs eher von einer zellspezifischen, als von einer allgemeinen (bzw. HDP-spezifischen) Herangehensweise geleitet werden [69].

6 Thesen

1. Das kolorektale Karzinom (CRC) ist eine der Hauptursachen für krebisbedingte Todesfälle weltweit. Neben der chirurgischen Resektion und Radiotherapie werden vor allem Chemotherapeutika zur Behandlung eingesetzt. Aufgrund starker Nebenwirkungen, der i.d.R. geringen Selektivität der angewandten Therapieregime sowie der Entwicklung von Resistenzen, besteht die Notwendigkeit, neue, selektivere und effektivere Therapieansätze zu entwickeln.
2. Host Defense Peptide (HDP) sind Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, welche – im Gegensatz zu herkömmlichen Zytostatika – eine direkte onkolytische Aktivität ausüben ohne dabei einen spezifischen Rezeptor zu involvieren. Sie stellen dadurch eine vielversprechende Option neben der konventionellen Therapie des CRC dar.
3. In der vorliegenden *in vitro* und *in vivo* Studie wurden Analoga des natürlich vorkommenden HDPs NK-Lysin, auf ihr (selektives) onkolytisches Potenzial gegen CRC-Zellen hin untersucht.
4. Vorangegangene Studien zeigten, dass die onkolytische Aktivität von HDPs ursächlich auf oberflächenständiges Phosphatidylserin (PS) zurückzuführen ist. Daher wurden durchflusszytometrische Analysen zum Nachweis von PS auf 14 patienten-individuellen CRC Zelllinien durchgeführt. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die analysierten Zelllinien in drei Kategorien unterteilt: PS^{high}, PS^{intermediate} und PS^{low}.
5. Vitalitäts- und Viabilitäts-Assays zeigten die onkolytische Wirksamkeit der untersuchten NK-2 Derivate, welche zwar teilweise in Relation zu den zuvor ermittelten PS-Werten stand, jedoch auch zelllinienspezifisch war.
6. Die in der Literatur beschriebene schnelle Wirkweise der HDPs, konnte mittels Viabilitätstests nach kurzer Exposition sowie Live-Cell-Imaging Analysen bestätigt werden.
7. Mittels Apoptose/Nekrose-Assay und Western Blot Analyse wurde die Nekrose – vor der Apoptose – als Hauptmechanismus der direkten Zelltötung registriert.
8. Ein Hämolyseassay an Vollblutproben verschiedener Probanden wies keine unerwünschte Lyse nach. Eine Viabilitätsuntersuchung von humanen

Lymphozyten zeigte jedoch einen dosisabhängigen Rückgang der Viabilität und eine damit verbundene unerwünschte und unselektive Wirkung der HDPs.

9. Die *in vitro* nachgewiesene onkolytische Wirksamkeit konnte auch *in vivo* bestätigt werden. Im murinen Xenograftmodell zeigte sich eine deutliche Verzögerung des Tumorwachstums.
10. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass onkolytische HDPs aufgrund ihrer selektiven Zytotoxizität und schnellen Wirkweise eine wichtige Rolle in zukünftigen Behandlungskonzepten des CRC spielen könnten.

Literaturverzeichnis

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. 61(2): p. 69-90.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012*. Eur J Cancer, 2013. 49(6): p. 1374-403.
3. Urruticoechea, A., et al., *Recent advances in cancer therapy: an overview*. Curr Pharm Des, 2010. 16(1): p. 3-10.
4. Mallick, I. and J.N. Waldron, *Radiation therapy for head and neck cancers*. Semin Oncol Nurs, 2009. 25(3): p. 193-202.
5. Verweij, J. and M.J. de Jonge, *Achievements and future of chemotherapy*. Eur J Cancer, 2000. 36(12): p. 1479-87.
6. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *S3-Leitlinien Kolorektales Karzinom*. 2014.
7. Herold, G., *Innere Medizin*. 2011, Köln: Herold, G. 480-486.
8. Müller, M., et al., *Chirurgie - Für Studium und Praxis* Vol. 10. Auflage 2010, Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste. 195-202.
9. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. Nature, 2002. 415(6870): p. 389-95.
10. Papo, N., et al., *A novel lytic peptide composed of DL-amino acids selectively kills cancer cells in culture and in mice*. J Biol Chem, 2003. 278(23): p. 21018-23.
11. Papo, N. and Y. Shai, *Host defense peptides as new weapons in cancer treatment*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(7-8): p. 784-90.
12. Riedl, S., D. Zweytick, and K. Lohner, *Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs*. Chem Phys Lipids, 2011. 164(8): p. 766-81.
13. Hoskin, D.W. and A. Ramamoorthy, *Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides*. Biochim Biophys Acta, 2008. 1778(2): p. 357-75.
14. Mader, J.S. and D.W. Hoskin, *Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment*. Expert Opin Investig Drugs, 2006. 15(8): p. 933-46.
15. Mader, J.S., et al., *Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines*. Mol Cancer Ther, 2005. 4(4): p. 612-24.
16. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Zentrum für Krebsregisterdaten, 2013.
17. Bertz, J., et al., *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland; Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010*. 2010.
18. Institut, Z.f.K.-R.K. *Darmkrebs: Rückläufige Trends setzen sich fort*. 2014; Aufgerufen am 31.03.2015; Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/Aktuelles/darmkrebsmonat_2014.html.

19. Bundesamt, S. 2013; Aufgerufen am 06.04.2015; Available from: https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Sterbefaelle_KrebsInsgesamt.html.
20. Cunningham, D., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2010. 375(9719): p. 1030-47.
21. Böcker, W., H. Denk, and U. Heitz, *Pathologie*. 1997, München, Wien, Baltimore Urban & Schwarzenberg. 653-655.
22. Siewert, J.R., R. Bumm, and F. Harder, *Chirurgie*. Vol. 8. Auflage. 2010, Berlin Heidelberg New York: Springer Medizin Verlag. 612-634.
23. Stolte, M., et al., *Pathologie - Verdauungstrakt und Peritoneum*. Vol. 3. Auflage. 2013, Berlin Heidelberg New York: Springer Medizin Verlag. 646-650.
24. Muto, T., H.J. Bussey, and B.C. Morson, *The evolution of cancer of the colon and rectum*. Cancer, 1975. 36(6): p. 2251-70.
25. Cho, K.R. and B. Vogelstein, *Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence*. J Cell Biochem Suppl, 1992. 16g: p. 137-41.
26. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. 319(9): p. 525-32.
27. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. 61(5): p. 759-67.
28. Bühling, K.J., J. Lepenies, and K. Witt, *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*. 3. Auflage. 2004, München, Jena: Urban und Fischer. 230-243.
29. Li, F.Y. and M.D. Lai, *Colorectal cancer, one entity or three*. J Zhejiang Univ Sci B, 2009. 10(3): p. 219-29.
30. Hadziavdic, V., N. Pavlovic-Calic, and I. Eminovic, *Molecular analysis: microsatellity instability and loss of heterozygosity of tumor suppressor gene in hereditary non-polyposis colorectal cancers (HNPCC)*. Bosn J Basic Med Sci, 2009. 9(1): p. 10-8.
31. Wittekind, C. and H.J. Meyer, *TNM: Klassifikation maligner Tumoren* Vol. 7. Auflage. 2010, Weinheim: Wiley-VCH.
32. Brenner, H., et al., *Prevention, early detection, and overdiagnosis of colorectal cancer within 10 years of screening colonoscopy in Germany*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2015. 13(4): p. 717-23.
33. Hsu, L., et al., *A Model to Determine Colorectal Cancer Risk Using Common Genetic Susceptibility Loci*. Gastroenterology, 2015.
34. Berchtold, R., L. Mirow, and T.H.K. Schiedeck, *Chirurgie*. Vol. 6., aktualisierte Auflage. 2008, München, Jena: Elsevier Urban&Fischer. 833-867.
35. Arnold, D. and A. Stein, *Kolorektales Karzinom: Innovationen bei den multimodalen Therapien*. Dtsch Arztebl International, 2014. 111(6): p. -12-.
36. Kim, K.J., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. Nature, 1993. 362(6423): p. 841-4.
37. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(6): p. 401-10.

38. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. 376(6535): p. 62-6.
39. Willett, C.G., et al., *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer*. Nat Med, 2004. 10(2): p. 145-7.
40. Caraglia, M., et al., *Predicting efficacy and toxicity in the era of targeted therapy: focus on anti-EGFR and anti-VEGF molecules*. Curr Drug Metab, 2011. 12(10): p. 944-55.
41. Poole, E.M., et al., *Genetic variability in EGFR, Src and HER2 and risk of colorectal adenoma and cancer*. Int J Mol Epidemiol Genet, 2011. 2(4): p. 300-15.
42. Ciombor, K.K., C. Wu, and R.M. Goldberg, *Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer*. Annu Rev Med, 2015. 66: p. 83-95.
43. Andreyev, H.J., et al., *Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study*. Br J Cancer, 2001. 85(5): p. 692-6.
44. Normanno, N., et al., *KRAS mutations testing in colorectal carcinoma patients in Italy: from guidelines to external quality assessment*. PLoS One, 2011. 6(12): p. e29146.
45. Maletzki, C., et al., *Establishment, characterization and chemosensitivity of three mismatch repair deficient cell lines from sporadic and inherited colorectal carcinomas*. PLoS One, 2012. 7(12): p. e52485.
46. Marangoni, E., et al., *A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays*. Clin Cancer Res, 2007. 13(13): p. 3989-98.
47. Ku, J.L., et al., *Establishment and characterization of 13 human colorectal carcinoma cell lines: mutations of genes and expressions of drug-sensitivity genes and cancer stem cell markers*. Carcinogenesis, 2010. 31(6): p. 1003-9.
48. Danes, B.S., et al., *Demonstration of altered cellular DNA content distribution in long-term colon epithelial cell lines with colon cancer genotypes*. Scand J Gastroenterol, 1988. 23(7): p. 840-6.
49. Bocsi, J. and A. Zalatnai, *Establishment and long-term xenografting of human pancreatic carcinomas in immunosuppressed mice: changes and stability in morphology, DNA ploidy and proliferation activity*. J Cancer Res Clin Oncol, 1999. 125(1): p. 9-19.
50. Linnebacher, M., et al., *Cryopreservation of human colorectal carcinomas prior to xenografting*. BMC Cancer, 2010. 10: p. 362.
51. Maletzki, C., et al., *Establishment and characterization of cell lines from chromosomal instable colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2015. 21(1): p. 164-76.
52. Gagos, S., et al., *Cell senescence and a mechanism of clonal evolution leading to continuous cell proliferation, loss of heterozygosity, and tumor heterogeneity: studies on two immortal colon cancer cell lines*. Cancer Genet Cytogenet, 1996. 90(2): p. 157-65.
53. Schroder-Born, H., R. Bakalova, and J. Andra, *The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine*. FEBS Lett, 2005. 579(27): p. 6128-34.

54. Andreu, D. and L. Rivas, *Animal antimicrobial peptides: an overview*. Biopolymers, 1998. 47(6): p. 415-33.
55. Matsuzaki, K., et al., *Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2*. Biochemistry, 1998. 37(34): p. 11856-63.
56. Al-Benna, S., et al., *Oncolytic activities of host defense peptides*. Int J Mol Sci, 2011. 12(11): p. 8027-51.
57. Shai, Y., *Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell-non selective membrane-lytic peptides*. Biochim. Biophys. Acta 1999: p. 55-70.
58. Lohner, K., Latal, A., Lehrer, R.I., Ganz, T., , *Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems*. Biochemistry 1997. 36: p. 1525-1531.
59. Krishna, R. and L.D. Mayer, *Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs*. Eur J Pharm Sci, 2000. 11(4): p. 265-83.
60. Perez-Tomas, R., *Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment*. Curr Med Chem, 2006. 13(16): p. 1859-76.
61. Schweizer, F., *Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity*. Eur J Pharmacol, 2009. 625(1-3): p. 190-4.
62. Rodrigues, C.M., et al., *Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis*. J Lipid Res, 2002. 43(6): p. 885-94.
63. Rodrigues, E.G., et al., *Antifungal and antitumor models of bioactive protective peptides*. An Acad Bras Cienc, 2009. 81(3): p. 503-20.
64. Wang, G., X. Li, and Z. Wang, *APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(Database issue): p. D933-7.
65. Droin, N., et al., *Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules*. J Proteomics, 2009. 72(6): p. 918-27.
66. Cerovsky, V., et al., *Lasioglossins: three novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee Lasioglossum laticeps (Hymenoptera: Halictidae)*. Chembiochem, 2009. 10(12): p. 2089-99.
67. Dennison, S.R., et al., *A theoretical analysis of secondary structural characteristics of anticancer peptides*. Mol Cell Biochem, 2010. 333(1-2): p. 129-35.
68. Dennison, S.R., et al., *Anticancer alpha-helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes*. Curr Protein Pept Sci, 2006. 7(6): p. 487-99.
69. Harris, F., et al., *On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells*. Med Res Rev, 2013. 33(1): p. 190-234.
70. Phoenix, D.A. and F. Harris, *The hydrophobic moment and its use in the classification of amphiphilic structures (review)*. Mol Membr Biol, 2002. 19(1): p. 1-10.
71. Phoenix, D.A., et al., *The prediction of amphiphilic alpha-helices*. Curr Protein Pept Sci, 2002. 3(2): p. 201-21.

72. Roberts, M.G., D.A. Phoenix, and A.R. Pewsey, *An algorithm for the detection of surface-active alpha helices with the potential to anchor proteins at the membrane interface*. Comput Appl Biosci, 1997. 13(1): p. 99-106.
73. Bevers, E.M., Comfurius, P., Zwaal, R.F., , *Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications*. Lupus 5,, 1996: p. 480-487.
74. Bevers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W., Harmsma, M., Zwaal, R.F., *Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling*. Lupus 7 (suppl. 2), 1998: p. 126-131.
75. Dobrzynska, I., Kotynska, J., Figaszewski, Z., *Changes in electrical charge of phosphatidylcholine and phosphatidylserine liposomal membranes caused by adsorption of monovalent ions*. Chem Analityczna 2007: p. 931-944.
76. Utsugi, T., Schroit, A.J., Connor, J., Bucana, C.D., Fidler, I.J., *Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes*. Cancer Research, 1991. 51: p. 3062-3066.
77. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J. Immunol., 1992. 148: p. 2207-2216.
78. Papo, N., Seger, D., Makovitzki, A., Kalchenko, V., Eshhar, Z., Degani, H., Shai, Y., *Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide*. Cancer Research, 2006. 66: p. 5371-5378.
79. Zwaal, R.F. and A.J. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells*. Blood, 1997. 89(4): p. 1121-32.
80. Chan, S.C., L. Hui, and H.M. Chen, *Enhancement of the cytolytic effect of anti-bacterial cecropin by the microvilli of cancer cells*. Anticancer Res, 1998. 18(6a): p. 4467-74.
81. Sherbet, G.V., *Membrane fluidity and cancer metastasis*. Exp Cell Biol, 1989. 57(4): p. 198-205.
82. Campanella, R., *Membrane lipids modifications in human gliomas of different degree of malignancy*. J Neurosurg Sci, 1992. 36(1): p. 11-25.
83. Sok, M., et al., *Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer*. Ann Thorac Surg, 2002. 73(5): p. 1567-71.
84. Blitterswijk, W.J., Shinitzky, M. , *Alteration in lipid fluidity in the plasma membrane of tumor cells*. Physiology of Membrane Fluidity. 1984, Boca Raton: CRC Press. 53-84.
85. Bhutia, S.K. and T.K. Maiti, *Targeting tumors with peptides from natural sources*. Trends Biotechnol, 2008. 26(4): p. 210-7.
86. Mai, J.C., et al., *A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors*. Cancer Res, 2001. 61(21): p. 7709-12.
87. Ellerby, H.M., et al., *Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides*. Nat Med, 1999. 5(9): p. 1032-8.

88. Takeshima, K., et al., *Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes*. J Biol Chem, 2003. 278(2): p. 1310-5.
89. Risso, A., et al., *BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore*. Mol Cell Biol, 2002. 22(6): p. 1926-35.
90. Matsuzaki, K., et al., *An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation*. Biochemistry, 1996. 35(35): p. 11361-8.
91. Ludtke, S.J., et al., *Membrane pores induced by magainin*. Biochemistry, 1996. 35(43): p. 13723-8.
92. Shai, Y., *Mode of action of membrane active antimicrobial peptides*. Biopolymers, 2002. 66(4): p. 236-48.
93. Huang, H.W., *Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity*. Biochim Biophys Acta, 2006. 1758(9): p. 1292-302.
94. Wimley, W.C., *Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model*. ACS Chem Biol, 2010. 5(10): p. 905-17.
95. Griffiths, J.R., *Are cancer cells acidic?* Br J Cancer, 1991. 64(3): p. 425-7.
96. Makovitzki, A., A. Fink, and Y. Shai, *Suppression of human solid tumor growth in mice by intratumor and systemic inoculation of histidine-rich and pH-dependent host defense-like lytic peptides*. Cancer Res, 2009. 69(8): p. 3458-63.
97. Easton, D.M., et al., *Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives*. Trends Biotechnol, 2009. 27(10): p. 582-90.
98. Hancock, R.E. and H.G. Sahl, *Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies*. Nat Biotechnol, 2006. 24(12): p. 1551-7.
99. Wieczorek, M., et al., *Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity*. Chem Biol, 2010. 17(9): p. 970-80.
100. Chernysh, S., et al., *Antiviral and antitumor peptides from insects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(20): p. 12628-32.
101. Winder, D., et al., *Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. 242(3): p. 608-12.
102. Sharma, S.V., *Melittin resistance: a counterselection for ras transformation*. Oncogene, 1992. 7(2): p. 193-201.
103. Eliassen, L.T., et al., *The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and inhibits xenograft growth in vivo*. Int J Cancer, 2006. 119(3): p. 493-500.
104. Eliassen, L.T., et al., *Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin*. Anticancer Res, 2002. 22(5): p. 2703-10.
105. Papo, N., et al., *Suppression of human prostate tumor growth in mice by a cytolytic D-, L-amino Acid Peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion*. Cancer Res, 2004. 64(16): p. 5779-86.

106. Bankovic, J., et al., *The elimination of P-glycoprotein over-expressing cancer cells by antimicrobial cationic peptide NK-2: the unique way of multi-drug resistance modulation*. Exp Cell Res, 2013. 319(7): p. 1013-27.
107. Ray, S., et al., *Establishment of human ultra-low passage colorectal cancer cell lines using spheroids from fresh surgical specimens suitable for in vitro and in vivo studies*. J Cancer, 2012. 3: p. 196-206.
108. Andra, J. and M. Leippe, *Candidacidal activity of shortened synthetic analogs of amoebapores and NK-lysin*. Med Microbiol Immunol, 1999. 188(3): p. 117-24.
109. Andersson, M., et al., *NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity*. Embo j, 1995. 14(8): p. 1615-25.
110. Liepinsh, E., et al., *Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin*. Nat Struct Biol, 1997. 4(10): p. 793-5.
111. Jacobs, T., et al., *NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(2): p. 607-13.
112. Andra, J., et al., *Biophysical Characterization of Endotoxin Inactivation by NK-2, an Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004. 48(5): p. 1593-1599.
113. Gross, S., et al., *Design of NK-2-derived peptides with improved activity against equine sarcoid cells*. J Pept Sci, 2013. 19(10): p. 619-28.
114. Dennison, S.R., F. Harris, and D.A. Phoenix, *The interactions of aurein 1.2 with cancer cell membranes*. Biophys Chem, 2007. 127(1-2): p. 78-83.
115. Papo, N., et al., *Inhibition of tumor growth and elimination of multiple metastases in human prostate and breast xenografts by systemic inoculation of a host defense-like lytic peptide*. Cancer Res, 2006. 66(10): p. 5371-8.
116. Steinstraesser, L., et al., *Suppression of soft tissue sarcoma growth by a host defense-like lytic peptide*. PLoS One, 2011. 6(3): p. e18321.
117. Steinstraesser, L., et al., *Oncolytic designer host defense peptide suppresses growth of human liposarcoma*. Int J Cancer, 2011. 128(12): p. 2994-3004.
118. Jass, J.R., *Molecular heterogeneity of colorectal cancer: Implications for cancer control*. Surg Oncol, 2007. 16 Suppl 1: p. S7-9.
119. Ostwald, C., et al., *Chromosomally and microsatellite stable colorectal carcinomas without the CpG island methylator phenotype in a molecular classification*. Int J Oncol, 2009. 35(2): p. 321-7.
120. Lackner, M.R., T.R. Wilson, and J. Settleman, *Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies*. Future Oncol, 2012. 8(8): p. 999-1014.
121. Risso, A., M. Zanetti, and R. Gennaro, *Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity*. Cell Immunol, 1998. 189(2): p. 107-15.
122. Oren, Z., et al., *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, 1999. 341 (Pt 3): p. 501-13.

123. Johansson, J., et al., *Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37*. J Biol Chem, 1998. 273(6): p. 3718-24.
124. Tosteson, M.T. and D.C. Tosteson, *The sting. Melittin forms channels in lipid bilayers*. Biophys J, 1981. 36(1): p. 109-16.
125. Matsuzaki, K., S. Yoneyama, and K. Miyajima, *Pore formation and translocation of melittin*. Biophys J, 1997. 73(2): p. 831-8.
126. Holle, L., et al., *A matrix metalloproteinase 2 cleavable melittin/avidin conjugate specifically targets tumor cells in vitro and in vivo*. Int J Oncol, 2003. 22(1): p. 93-8.
127. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(3): p. 161-74.
128. Zasloff, M., *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, 1987. 84(15): p. 5449-53.
129. Cruciani, R.A., et al., *Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(9): p. 3792-6.
130. Soballe, P.W., et al., *Experimental local therapy of human melanoma with lytic magainin peptides*. Int J Cancer, 1995. 60(2): p. 280-4.
131. Baker, M.A., et al., *Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides*. Cancer Res, 1993. 53(13): p. 3052-7.
132. Gifford, J.L., H.N. Hunter, and H.J. Vogel, *Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties*. Cell Mol Life Sci, 2005. 62(22): p. 2588-98.
133. Vogel, H.J., et al., *Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides*. Biochem Cell Biol, 2002. 80(1): p. 49-63.
134. Yang, N., T. Lejon, and O. Rekdal, *Antitumour activity and specificity as a function of substitutions in the lipophilic sector of helical lactoferrin-derived peptide*. J Pept Sci, 2003. 9(5): p. 300-11.
135. Yang, N., et al., *The effects of shortening lactoferrin derived peptides against tumour cells, bacteria and normal human cells*. J Pept Sci, 2004. 10(1): p. 37-46.
136. Nguyen, L.T., D.J. Schibli, and H.J. Vogel, *Structural studies and model membrane interactions of two peptides derived from bovine lactoferricin*. J Pept Sci, 2005. 11(7): p. 379-89.
137. Yoo, Y.C., et al., *Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice*. Jpn J Cancer Res, 1997. 88(2): p. 184-90.
138. Furlong, S.J., J.S. Mader, and D.W. Hoskin, *Bovine lactoferricin induces caspase-independent apoptosis in human B-lymphoma cells and extends the survival of immune-deficient mice bearing B-lymphoma xenografts*. Exp Mol Pathol, 2010. 88(3): p. 371-5.
139. Wu, W.K., et al., *Emerging roles of the host defense peptide LL-37 in human cancer and its potential therapeutic applications*. Int J Cancer, 2010. 127(8): p. 1741-7.

140. Varadhachary A, B.R., Pericle F, Petrak K, Wang Y., *Lactoferrin in the treatment of malignant neoplasms and other hyperproliferative diseases*, a. Agennix Incorporated, Editor. 2011.
141. Tsuda, H., et al., *Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial*. Biometals, 2010. 23(3): p. 399-409.
142. Kelly, R.J. and G. Giaccone, *The role of talactoferrin alpha in the treatment of non-small cell lung cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2010. 10(9): p. 1379-86.
143. de Mejia, E.G. and V.P. Dia, *The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells*. Cancer Metastasis Rev, 2010. 29(3): p. 511-28.
144. Parikh, P.M., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of single-agent oral talactoferrin in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer that progressed after chemotherapy*. J Clin Oncol, 2011. 29(31): p. 4129-36.
145. Meierhenrich, U., *Amino acids and the asymmetry of life: caught in the act of formation*. 2008, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
146. Maletzki, C., et al., *Host defense peptides for treatment of colorectal carcinoma - a comparative in vitro and in vivo analysis*. Oncotarget, 2014. 5(12): p. 4467-79.
147. Peschel, A. and H.G. Sahl, *The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance*. Nat Rev Microbiol, 2006. 4(7): p. 529-36.
148. Peschel, A., *How do bacteria resist human antimicrobial peptides?* Trends Microbiol, 2002. 10(4): p. 179-86.
149. Harder, J., et al., *Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic*. J Biol Chem, 2001. 276(8): p. 5707-13.
150. Shadidi, M. and M. Sioud, *Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides*. Drug Resist Updat, 2003. 6(6): p. 363-71.
151. Soman, N.R., et al., *Molecularly targeted nanocarriers deliver the cytolytic peptide melittin specifically to tumor cells in mice, reducing tumor growth*. J Clin Invest, 2009. 119(9): p. 2830-42.
152. Liu, S., et al., *Enhancement of cytotoxicity of antimicrobial peptide magainin II in tumor cells by bombesin-targeted delivery*. Acta Pharmacol Sin, 2011. 32(1): p. 79-88.
153. Cai, H., et al., *Selective apoptotic killing of solid and hematologic tumor cells by bombesin-targeted delivery of mitochondria-disrupting peptides*. Mol Pharm, 2010. 7(2): p. 586-96.
154. Anastasi, A., V. Erspamer, and M. Bucci, *Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombina and Alytes*. Experientia, 1971. 27(2): p. 166-7.
155. Reubi, J.C., et al., *Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14)*. Clin Cancer Res, 2002. 8(4): p. 1139-46.

156. Cornelio, D.B., R. Roesler, and G. Schwartzmann, *Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy*. Ann Oncol, 2007. 18(9): p. 1457-66.
157. de Visser, M., S.M. Verwijnen, and M. de Jong, *Update: improvement strategies for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy*. Cancer Biother Radiopharm, 2008. 23(2): p. 137-57.
158. Engel, J.B., et al., *Effective inhibition of experimental human ovarian cancers with a targeted cytotoxic bombesin analogue AN-215*. Clin Cancer Res, 2005. 11(6): p. 2408-15.
159. Leuschner, C. and W. Hansel, *Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments*. Curr Pharm Des, 2004. 10(19): p. 2299-310.
160. Owen, D.R., *Short bioactive peptides*. Helix BioMedix. Inc., 2001: p. United States Patent 6875744.
161. Fischer, E., *Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme*. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1894. 27(3): p. 2985-2993.