



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

# Echtzeit-Monitoring des Metabolismus und Adhäsion/Konfluenz humaner Zellen mit Hilfe eines Biosensors

**Bachelorarbeit im Studiengang Biotechnologie  
Sommersemester 2017**

Adrian Dittberner  
Matrikel-Nr. [REDACTED]

4. August 2017

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Andrä (HAW Hamburg)
2. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)

---

# Inhalt

<b>Abbildungen</b>	<b>III</b>
<b>Tabellen</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1 Verfahren zur Messung der Zytotoxizität . . . . .	3
2.2 Echtzeit-Monitoring zellphysiologischer Parameter . . . . .	4
2.2.1 Zellmetabolismus . . . . .	4
2.2.2 Zelladhäsion . . . . .	6
2.2.3 Bionas Discovery System . . . . .	7
2.3 Messung der Zellmembranintegrität . . . . .	10
2.4 Antimikrobielle Peptide . . . . .	10
2.4.1 Wirkungsweise . . . . .	11
2.4.2 Untersuchte antimikrobielle Peptide . . . . .	15
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1 Material . . . . .	17
3.1.1 Peptide . . . . .	17
3.1.2 Zelllinien und Zellkultur . . . . .	17
3.1.3 Chemikalien . . . . .	19
3.1.4 Verwendetes Verbrauchsmaterial . . . . .	19
3.1.5 Verwendete Geräte . . . . .	20
3.1.6 Verwendete Mikrochips . . . . .	20
3.1.7 Verwendete Software . . . . .	21
3.2 Methoden . . . . .	22
3.2.1 Zellkultur . . . . .	22
3.2.2 Echtzeit-Monitoring von zellphysiologischen Parametern . . . . .	25

---

3.2.3	Messung der Zellmembranintegrität . . . . .	27
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
4.1	Evaluation des Bionas Systems . . . . .	28
4.1.1	Sensorentests . . . . .	28
4.1.2	Wahl des Laufmediums . . . . .	32
4.2	Echtzeit-Monitoring: Einfluss von Melittin auf zellphysiologische Parameter	34
4.2.1	HaCaT-Zellen . . . . .	34
4.2.2	PC-3 Zellen . . . . .	36
4.3	Echtzeit-Monitoring: Einfluss von Aspidasept auf zellphysiologische Parameter . . . . .	38
4.3.1	HaCaT-Zellen . . . . .	38
4.3.2	PC-3 Zellen . . . . .	40
4.4	Messung der Zellmembranintegrität . . . . .	42
4.4.1	HaCaT-Zellen . . . . .	42
4.4.2	PC-3 Zellen . . . . .	43
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
5.1	Evaluation des Bionas Systems . . . . .	44
5.2	Echtzeit-Monitoring: Einfluss von antimikrobiellen Peptiden auf zellphysiologische Parameter . . . . .	45
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
	<b>Literatur</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>57</b>

---

## Abbildungen

1	Phasen der Medikamentenentwicklung . . . . .	3
2	Skizze der Zellatmung . . . . .	5
3	Ein Mikrochip mit Biosensoren . . . . .	7
4	Änderungsraten von pH-Wert und O <sub>2</sub> -Konzentration . . . . .	8
5	Skizze der Messkammer des Bionas Systems . . . . .	9
6	Modell der Peptid-Wirkungsweise . . . . .	13
7	Selektivität von Antimikrobiellen Peptiden . . . . .	14
8	PC-3 Zellen vor und nach Accutase-Behandlung . . . . .	23
9	Evaluation der Impedanz-Sensoren . . . . .	29
10	Evaluation der pH-Sensoren . . . . .	31
11	Einfluss des Laufmediums auf PC-3 Zellen . . . . .	33
12	Einfluss von Melittin auf HaCaT-Zellen . . . . .	35
13	Einfluss von Melittin auf PC-3 Zellen . . . . .	37
14	Einfluss von Aspidasept auf HaCaT-Zellen . . . . .	39
15	Einfluss von Aspidasept auf PC-3 Zellen . . . . .	41
16	Zellmembranintegrität der HaCaT Zellen . . . . .	42
17	Zellmembranintegrität der PC-3 Zellen . . . . .	43



## Tabellen

1	Peptide . . . . .	11
2	Zellkulturmedien . . . . .	18
3	Zellkultur-Lösungen . . . . .	18
4	Chemikalien . . . . .	19
5	Verbrauchsmaterial . . . . .	19
6	Geräte . . . . .	20
7	Mikrochips . . . . .	20
8	Software . . . . .	21



## Abkürzungen

Acetyl-CoA	Acetyl mit gebundenem Coenzym A
AMP	Antimikrobielle Peptide
ATP	Adenosintriphosphat
BRM	Bionas Running Medium
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
FCS	fetal calf serum
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature (menschliche Hautzellen eines Erwachsenen)
IDES	interdigitated electrode structure
ISFET	ion sensitive field effect transistor
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC	Phosphatidylcholin
PG	Phosphatidylglycerol
PS	Phosphatidylserin
TFA	Trifluoressigsäure



# 1 Einleitung

Die Medizin und die Pharmaindustrie sind bestrebt, Wirkstoffe zu finden, mit denen Symptome und Ursachen der vielen Leiden und Krankheiten des Menschen bekämpft werden können. So wird nach Kenntnis des Mechanismus, der zur betrachteten Krankheit führt, nach möglichen Wirkstoffkandidaten gesucht. Bei vielversprechenden Substanzen wird unter anderem die Zytotoxizität getestet, um sicherzustellen, dass der angehende Wirkstoff keine toxische Wirkung auf menschliche Zellen zeigt. Die Zellkultur stellt dabei eine Möglichkeit dar, *in vitro* den Effekt der Substanz auf Zellen zu untersuchen und einen Einblick in die Wirkung der Dosis zu erlangen. Zudem können zellbasierte Tests bereits an früher Stelle in der Medikamentenentwicklung eingesetzt werden, was toxische Substanzen aussortiert und somit Kosten senken kann [1]. Meist handelt es sich um Endpunktbestimmungen, bei denen die Proliferation und/oder der Metabolismus gemessen wird [2]. Unter Endpunktbestimmung versteht man eine Messung zu einem Zeitpunkt, an dem die zu quantifizierende Reaktion bereits abgelaufen ist und erlaubt deshalb kaum eine Aussage über Kinetik, Reaktionsgeschwindigkeit oder Reaktionsdauer im Gegensatz zum Echtzeit-Monitoring. Endpunktbestimmungen geben keinen bis wenig Aufschluss über den Wirkmechanismus [1].

Eine Medikamentenklasse, bei der neue Wirkstoffe zu finden stetig drängender wird, ist die der Antibiotika. Bakterien werden zunehmend resistent gegen gängige Antibiotika, so kommen in vielen Krankenhäusern multiresistente *Staphylococcus aureus* Stämme vor, die eine Behandlung deutlich erschweren [3]. Ein möglicher Ansatz sind sogenannte antimikrobielle Peptide, auch host defence peptides genannt. Sie kommen in nahezu allen Lebewesen vor, auch in Bakterien, was darauf hindeutet, dass sie in einem frühen Zeitpunkt der Evolution entstanden sind [4]. Die Zielstruktur ihrer antimikrobiellen Wirkung ist die bakterielle Zellmembran, die viele negative Ladungsträger beinhaltet [5]. Des Weiteren zeigen viele host defence peptides auch eine Wirkung gegen Tumorzellen, da diese oft ebenfalls anionische Oberflächenstruktur aufweisen [6].



Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Effekt von antimikrobiellen Peptiden auf den Metabolismus und die Morphologie von humanen Zellen in Echtzeit durch die Verwendung eines Biosensors aufzunehmen. Es sollen die Stärken des Echtzeit-Monitorings im Prozess einer Medikamentenentwicklung aufgezeigt werden. Diese Vorteile sind vor Allem in der Aufnahme eines zeitlichen Verlaufes im Gegensatz zu einem einzigen Endergebnis. Der Einfluss auf die Morphologie wird dabei in Form von Adhäsions- und Konfluenzänderungen aufgezeichnet. Der zeitliche Verlauf kann Hinweise auf den Wirkmechanismus und die Kinetik der Peptide aufzeigen. In erster Linie wird ein synthetisches antimikrobielles Peptid mit dem Handelsnamen Aspidasept anhand von zwei etablierten Zellkultursystemen untersucht und mit dem Referenzpeptid Melittin verglichen. Dieses Peptid zeigt zusätzlich antiinflammatorische Wirkung und ist ein vielversprechender Kandidat für klinische Anwendungen, um beispielsweise einer Sepsis vorzubeugen oder diese zu bekämpfen [7]. Das Peptid wird an einer tumorösen und einer nicht tumorösen Zelllinie bei verschiedenen Konzentrationen getestet, um einerseits die Möglichkeit einer Zytotoxizität zu untersuchen und andererseits eine mögliche Selektivität und schädigende Wirkung von Aspidasept bezüglich Tumorzellen festzustellen.

Mithilfe des bei dieser Arbeit verwendeten Bionas Systems, kann ein Echtzeit-Monitoring erreicht werden, ohne die Zellen zu beeinflussen. Durch die Aufnahme von Daten, die Aufschluss über den Metabolismus und die Adhäsion von Zellen geben, kann auf die Kinetik von Zellantwort und Änderungen im Metabolismus geschlossen werden [2]. Eine Schädigung oder Beeinträchtigung der Zellmembran beziehungsweise der Membranintegrität durch Peptide kann Änderungen in der Morphologie und des Metabolismus bewirken. Dies kann zum Beispiel durch partielle Lyse der Membran oder Variation der Membranzusammensetzung zustande kommen. Diese Modifikationen können durch das Bionas Systems in Echtzeit detektiert werden, weshalb es in dieser Arbeit Verwendung findet und mit einer Messung der Membranintegrität verglichen wird. Das System erlaubt die simultane Messung der Zell-Impedanz, der Ansäuerungsrate des Mediums und dem Sauerstoffverbrauch der Zellen. Es eignet sich aus diesem Grund, den Effekt antimikrobieller Peptide auf die verwendeten Zelllinien aufzuzeigen und anhand dieser drei Parameter zu diskutieren.



## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Verfahren zur Messung der Zytotoxizität

Wie schon in der Einleitung beschrieben, kommen Zytotoxizitätstests bei jeder Medikamentenentwicklung zum Einsatz, um toxische Effekte der Wirkstoffkandidaten auf Zellen und Gewebe aufzudecken. Da ein Wirkstoff möglichst selektiv wirken sollte - im Falle eines Antibiotikums also eine effektive Wirkung gegen Bakterien zeigt, während es menschliche Zellen nicht oder nur wenig beeinflusst - sind Zytotoxizitätstests essentiell. Jeder neue Wirkstoffkandidat muss mehrere Stufen überwinden, bevor eine Zulassung als Medikament erfolgen kann (Abbildung 1).



**Abb. 1:** Dargestellt sind die verschiedenen Phasen in der Medikamentenentwicklung. Besonders in der vorklinischen Entwicklung kommen viele Zytotoxizitätstests zum Einsatz, um toxische Effekte der Wirkstoffkandidaten auszuschließen.

Geändert nach J. P. Hughes, „Principles of early drug discovery“[8].

Besonders in der vorklinischen Entwicklung kommen Zellkultursysteme zum Einsatz, um mögliche toxische Effekte aufzuzeigen. Es gibt eine Vielzahl an Assays, die verwendet werden. Einige, wie der MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, abgekürzt MTT) zielen auf die metabolische Aktivität von Zellen ab, indem der Farbumschlag einer von Enzymen katalysierten Reaktion bestimmt wird. Andere Tests wie der LDH (Lactatdehydrogenase) Assay setzen auf die Freisetzung von Zellinhalten durch eine Lyse als Folge eines Kontakts mit toxischen Substanzen. In dieser Arbeit kommen zwei verschiedene Assays zum Einsatz, die beide kinetischer Natur sind. Während die Messung zellphysiologischer Parameter als Echtzeit-Monitoring Aussagen über den Metabolismus und die Morphologie von Zellen erlaubt, wird ein zweiter Assay Aufschluss über die Zellmembranintegrität liefern. Ein deutlicher Unterschied ist in der Dauer der Messungen zu sehen. Während viele Assays sich auf wenige Minuten oder Stunden beschränken, ermöglicht das Echtzeit-Monitoring das Aufnehmen von Daten über die Dauer von 14 Stunden und mehr. So kann der zeitliche Verlauf deutlich gemacht werden.

## 2.2 Echtzeit-Monitoring zellphysiologischer Parameter

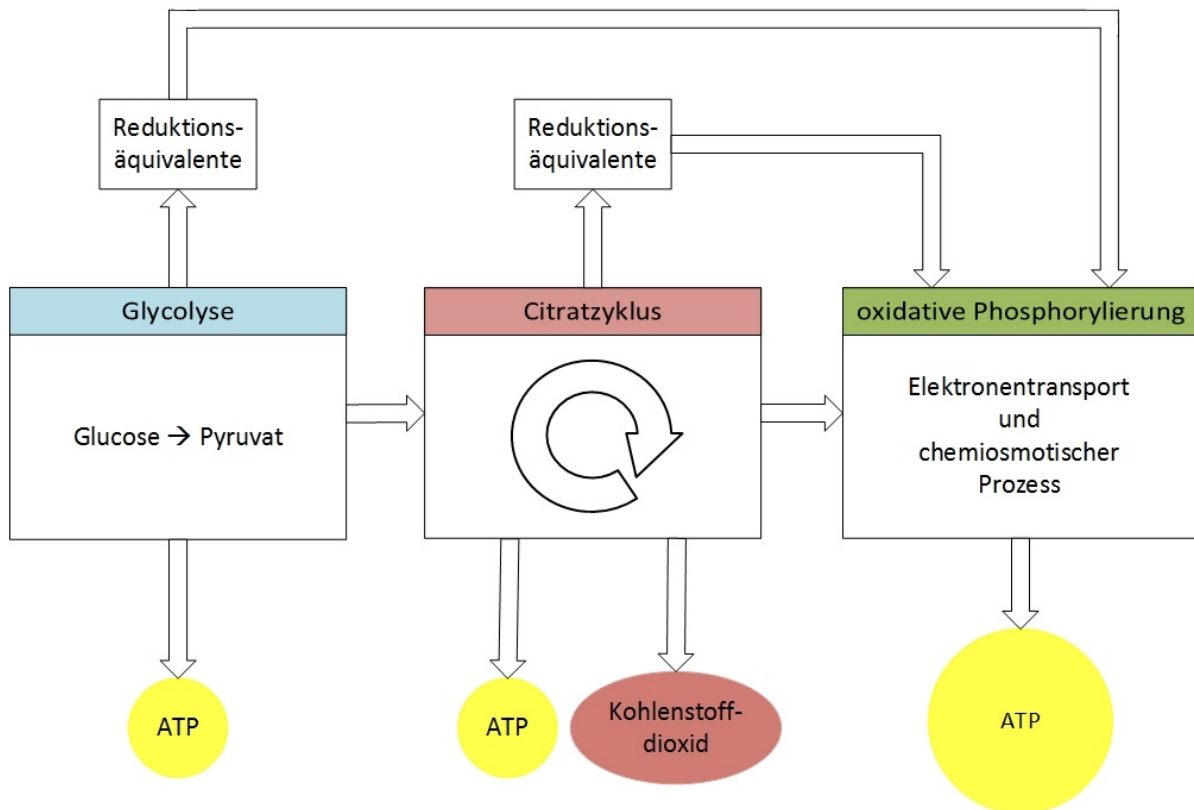
Um einen möglichen Einfluss einer Substanz auf Zellen aufdecken zu können, muss die Messung repräsentativer Parameter möglich sein. Bei dieser Arbeit kommt das Bionas Discovery 1500<sup>2</sup> System zum Einsatz. Es basiert auf mit Zellen bewachsenen Mikrochips, mithilfe derer sich die Änderung des pH-Wertes durch den Metabolismus sowie die Sauerstoffkonzentration im Medium und die Impedanz messen lassen.

### 2.2.1 Zellmetabolismus

Im Zuge ihres Metabolismus nehmen Zellen Energielieferanten unter Anderem in Form von Kohlenhydraten (zum Beispiel Glucose) auf. Diese werden im Cytoplasma und in den Mitochondrien zu Kohlenstoffdioxid und Wasser abgebaut (aerober Metabolismus), wobei Energie frei wird. Abbildung 2 zeigt einen Überblick der beteiligten Mechanismen. Zunächst entstehen bei der Glycolyse aus einem Molekül Glucose zwei Moleküle Pyruvat. Dies geschieht im Cytoplasma und das entstandene Pyruvat passiert durch einen aktiven Transporter die Membran der Mitochondrien. Dort wird es durch oxidative Decarboxylierung zu Acetat. Dieses bindet an Coenzym A, wodurch Acetyl-CoA (Acetyl mit gebundenem Coenzym A) entsteht. Weiterhin in der Mitochondrienmatrix findet das Acetyl-CoA Eingang in den Citratzyklus. Dieser Zyklus oxidiert Acetyl-CoA (und andere Metabolite aus Fetten und Aminosäuren) zu Kohlenstoffdioxid, wobei Energie frei wird (aerober Metabolismus). Steht kein Sauerstoff zur Verfügung, wird Glucose zu Lactat umgesetzt (anaerober Metabolismus). In beiden Fällen (aerob und anaerob) entstehen schwach saure Metabolite, die aktiv oder passiv in das Medium der Zellkultur freigesetzt werden und damit zur Ansäuerung des Mediums beitragen. Die dort messbare Änderungsrate des pH-Wertes stellt demzufolge ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen dar.

Die bei der Glycolyse und dem Citratzyklus gewonnene Energie wird in Form von Reduktionsäquivalenten gespeichert und bei der oxidativen Phosphorylierung für die Gewinnung von ATP (Adenosintriphosphat), des zellinternen Energiespeichers, verwendet. Dieser

Prozess findet in den Mitochondrien statt und liefert den größten Teil der Energie des Glucose-Metabolismus. Die Gewinnung von Energie mittels oxidativer Phosphorylierung steht im direkten Zusammenhang mit dem Verbrauch von Sauerstoff. Die Rate, mit der sich die Sauerstoffkonzentration im Medium ändert, deutet demzufolge auf die Energieerzeugung der Zelle hin.



**Abb. 2:** Übersicht von an der Zellatmung beteiligten Mechanismen. Während der Glycolyse im Cytosol wird Glucose zu Pyruvat umgewandelt, die frei werdende Energie wird in Form von Reduktionsäquivalenten und ATP gespeichert. Nach dem Transport in das Mitochondrium tritt Pyruvat in den Citratzyklus ein und wird zu  $\text{CO}_2$  abgebaut. Schließlich wird bei der oxidativen Phosphorylierung unter Sauerstoffverbrauch und den Reduktionsäquivalenten der Energielieferant ATP erzeugt.

Verändert nach Campbell, 2009 (Pearson Verlag) [9].



### 2.2.2 Zelladhäsion

Die Zelladhäsion stellt ebenfalls einen wichtigen Parameter dar, der die Eigenschaften von Zellen beschreiben kann. Eine Messung der Impedanz erlaubt Rückschlüsse auf die Stärke der Zelladhäsion und damit der Konfluenz der Zellschicht. Die Adhäsion wird von spezifischen Molekülen ausgelöst, meist Proteinen, die nach dem Rezeptor-Ligand-Prinzip Kontakt zu benachbarten Zellen herstellen. Meist sind derartige Moleküle nur zeitlich begrenzt an der Zelloberfläche zu finden. Sie werden über Exocytose in die Umgebung abgegeben, was zu einer Verstärkung der Zell-zu-Zell-Kontakte führt [1]. Die Zelladhäsion ist ein Indikator für die Zellmorphologie, somit ist eine Messung der Impedanz ein Maß für die morphologischen Änderungen. Da die Zellschicht isolierend wirkt, bedeutet das Ansteigen der Impedanz als komplexen Widerstand, dass sich die Zellen dichter aneinander lagern. Runden sich die Zellen ab und verlieren sowohl den Kontakt untereinander als auch zur Oberfläche, nimmt die Impedanz ab.

Das Bionas System erlaubt eine Messung dieser Parameter in Echtzeit und kann somit von zu testenden Substanzen induzierte Einflüsse auf den Metabolismus und die Morphologie der Zellen aufzeigen. Diese Messung zeigt die Reaktionen von Zellen auf für verschiedene Anwendungen interessante Substanzen, aufgeschlüsselt nach Metabolismus und Morphologie. Werden Zellen stark genug beeinträchtigt, können sie ihren Stoffwechsel und die Zellform nicht aufrecht erhalten, was zu einer verminderten Azidifikationsrate, geringeren Sauerstoffverbrauch und niedrigerer Impedanz führt und detektiert werden kann.

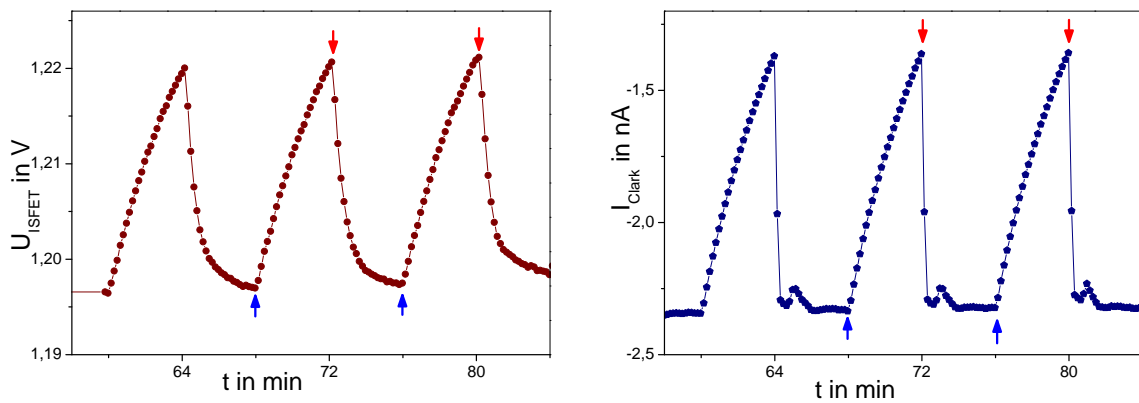
### 2.2.3 Bionas Discovery System

Bei dem Gerät, mit dem das Echtzeit-Monitoring von zellphysiologischen Parametern durchgeführt wird, handelt es sich um das Bionas Discovery 1500<sup>2</sup> System mit zwei Bio-modulen. Grundlage dieses Systems sind Mikrochips aus Silizium, die mit verschiedenen Sensoren ausgestattet sind (Abbildung 3). Gemessen wird die Azidifikation des Mediums (ISFET - *ion sensitive field effect transistor*), der Sauerstoffverbrauch (Clark-Elektrode) und die Impedanz beziehungsweise Adhäsion der Zellen (IDES - *interdigitated electrode structure*) [2].

Die zu testenden Zellen werden direkt auf den Chips ausgesät, sodass sie eine adhärenente Zellschicht ausbilden (Abbildung 3). Die Größe der Chips ist vergleichbar mit einem Well einer 48-well Mikrotiterplatte. Mit Hilfe einer Pumpe werden die Zellen mit frischem Medium versorgt. Die Pumpe wird bei 1% Leistung betrieben, was einer Flussrate von ungefähr  $58 \mu\text{l min}^{-1}$  entspricht. Die Pumpe wird zyklisch an- und ausgeschaltet, wobei jeder Zyklus 4 Minuten andauert. So ergeben sich Stop- und Go-Phasen. Während der Stop-Phase wird die Änderungsrate von pH-Wert und Sauerstoffkonzentration im Medium ermittelt (Abbildung 4). Die Impedanz wird kontinuierlich gemessen, da kein Medien austausch nötig ist. Während der Go-Phase wird neues Medium auf die Zellen gegeben, sodass erneut Änderungsraten aufgenommen werden können. Jeder Mikrochip ist mit jeweils fünf ISFET und Clark-Sensoren sowie einem IDES-System ausgestattet. Während die ISFET eine Spannung (in V) und die Clark-Sensoren eine Stromstärke (in nA) liefern (Abbildung 4), misst das IDES-System die Kapazität (in nF). Da die Impedanz der reziproke Wert der Kapazität ist, verhalten sich diese beiden Parameter umgekehrt proportional zueinander.

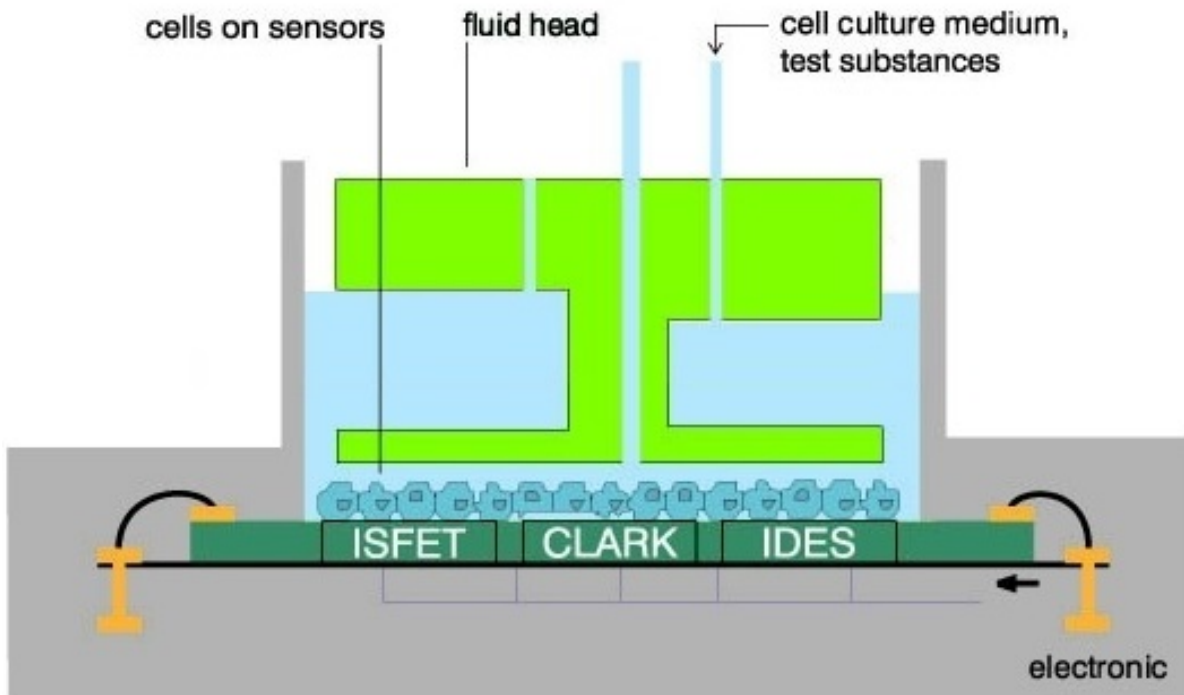


**Abb. 3:** Ein Mikrochip aus Silizium der Firma Micronas. Der Chip besitzt Sensoren für die Messung der Impedanz, des pH-Wertes und der Sauerstoffkonzentration im Medium. Bionas <http://www.bionas-discovery.com/prodservices/>.



**Abb. 4:** Änderungsraten von pH-Wert (links, gemessen wird die Spannung) und  $O_2$ -Konzentration (rechts, gemessen wird die Stromstärke). Die blauen Pfeile zeigen den Pumpstopp an und die roten das Starten der Pumpe. Während der Stop-Phase wird Sauerstoff verbraucht und das Medium durch den Zellmetabolismus angesäuert, sodass bei beiden Kurven ein Anstieg zu verzeichnen ist. Aus dieser Steigung wird die Änderungsrate ermittelt. Während der Go-Phase wird das Medium erneuert und die Kurven sinken auf den Ausgangswert.

Eine Skizze einer Messkammer ist in Abbildung 5 zu sehen. Die untere Begrenzung bildet die Oberfläche der Mikrochips mit den drei Sensorarten für die Messung der pH-Änderung, des Sauerstoffverbrauches und der Zell-Impedanz. Die zu testenden Zellen befinden sich direkt auf der Sensoroberfläche. Die Mikrochips sind in ein Kunststoffgehäuse eingelassen, dass eine nach oben offene Kammer formt. Der Flusskopf wird in die Öffnung hineingeschoben und besitzt einen Zulauf und zwei Abläufe für das Laufmedium.



**Abb. 5:** Skizze des Messkammer des Bionas Systems. Dargestellt ist die Oberfläche der Mikrochips mit den drei Sensorarten für die pH-Messung (ISFET), die  $O_2$ -Messung (Clark) und die Impedanz-Messung (IDES). Auf der Oberfläche befinden sich die zu testenden Zellen. Der Flusskopf (hellgrün) besitzt einen Zulauf und zwei Abläufe für das verwendete Medium. In hellgrau ist das Kunststoffgehäuse des Chips dargestellt, es formt eine nach oben offene Kammer, in die der Flusskopf hineingeschoben wird.  
Bionas Discovery 1500 system, User Manual (Stand 2010).

Für eine übersichtliche Darstellung der erzeugten Daten werden diese standardisiert. Die Raten, die kurz vor der Behandlung mit der zu testenden Substanz gemessen werden, entsprechen 100 % und die Daten nach der Triton Behandlung stehen für 0 %, da alle Zellen von der Oberfläche abgelöst wurden. Die gemessenen Daten werden auf diese beiden Punkte bezogen, stellen also relative Daten dar [2]. Für dieses Verfahren wird das Programm B 1500<sup>2</sup> adv CS V1.04 des Herstellers Bionas verwendet.



## 2.3 Messung der Zellmembranintegrität

Sytox<sup>®</sup> green bindet an Nukleinsäuren, kann aber nur durch eine beschädigte Zellmembran in die Zelle eindringen. Bei der Bindung an Nukleinsäuren steigt die Fluoreszenz um mehr als das fünfhundertfache an, sodass klar unterschieden werden kann, ob eine Bindung vorliegt oder nicht. Sytox<sup>®</sup> green kann mit Wellenlängen im Bereich von 450-490 nm angeregt werden, was zu einer hellgrünen Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 523 nm führt. Dadurch kann eine Unterscheidung zwischen intakter Zellmembran und beschädigter beziehungsweise lysierter Membran erfolgen.

## 2.4 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) kommen als Abwehrmechanismus mit einer hohen Diversität in nahezu allen Lebewesen inklusive einiger Mikroorganismen vor [4, 10]. Der Begriff antimikrobielle Peptide wird dabei üblicherweise für von Eukaryoten produzierten Peptide verwendet, während bakterielle Abwehrpeptide als Bacteriocine bezeichnet werden [11]. Sie sind auch beim Menschen Teil des angeborenen Immunsystems und werden dort als *host defence peptides* bezeichnet. Nahezu alle menschlichen Gewebe und Zellen, die Mikroorganismen ausgesetzt sind, können AMPs bilden, wobei je nach Zellart ein Arsenal unterschiedlicher Peptide produziert wird, um ein möglichst breites Spektrum an Abwehr abzudecken [4, 11]. Die Zusammensetzung des Peptidarsenals kann die Folge einer Anpassung an die mikrobielle Umgebung darstellen [12, 13]. AMPs werden ebenfalls in Immunzellen gebildet und bis zur Freisetzung in Vesikeln gelagert. Einige Peptide besitzen Eigenschaften, die zu direkter Abtötung von Bakterien, Pilzen und Viren führen können [10]. Darüber hinaus wird vermutet, dass AMPs immunmodulierend wirken können und zur Wundheilung beitragen. In Tabelle 1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Peptide aufgeführt.



**Tab. 1:** Die verwendeten Peptide, ihre Aminosäuresequenz und deren Molekulargewicht

Peptid	AS-Sequenz	Molekulargewicht
Aspidasept <sup>®</sup>	GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG	2711
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	2847

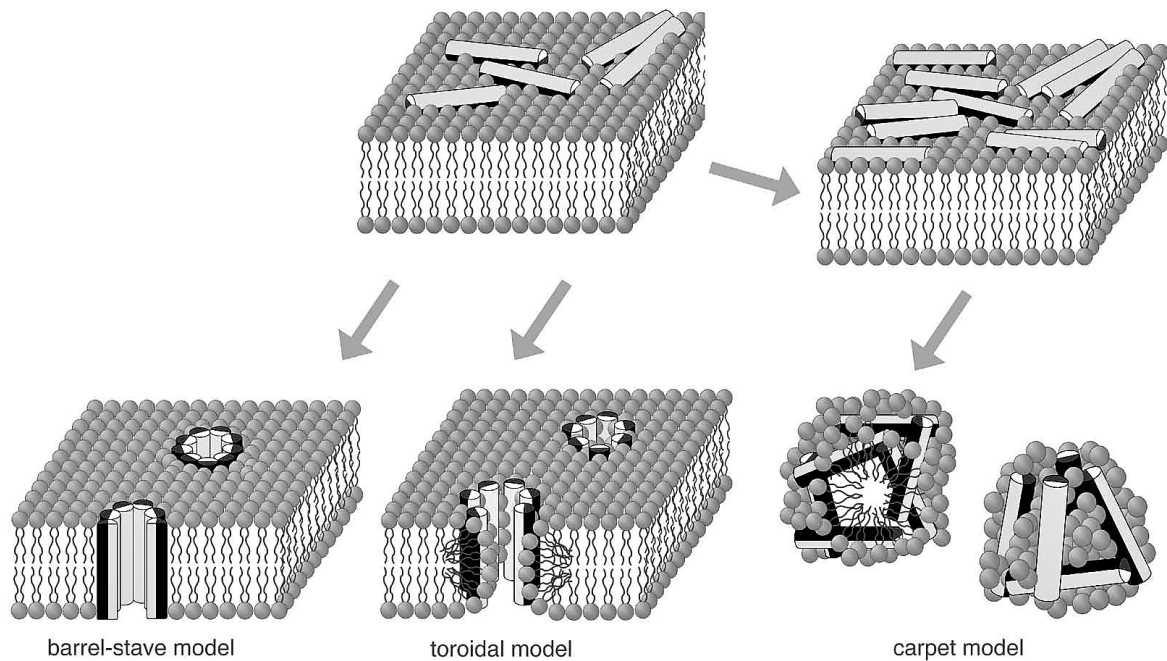
Durch die Tatsache, dass es sehr viele verschiedene Peptide mit antimikrobieller Wirkung gibt, fällt eine Einordnung schwer. Allgemein kann man sie als kleine Peptide mit zwischen 10 und 50 Aminosäuren beschreiben, die eine positive Nettoladung (ungefähr zwischen +2 bis +9) durch einen hohen Lysin- und/oder Argininanteil sowie bis zu 30 % hydrophobe Reste tragen [13]. Durch räumlich getrennte Gruppierung der Ladungsträger und hydrophober Reste entsteht durch die Sekundärstruktur ein amphipathischer Charakter [4].

#### 2.4.1 Wirkungsweise

Die genaue Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Jedoch werden negativ geladene Zellmembranen als Zielstruktur für die kationischen AMPs beschrieben [5, 10, 11]. Die erste Interaktion mit der Membran wird durch elektrostatische Wechselwirkung der komplementären Ladungen hervorgerufen [11]. Der sich daran anschließende Prozess wird durch verschiedene Modelle beschrieben. Eine Variante ist die Zerstörung der Membranintegrität. Mit dem Verlust dieser Integrität kann der elektrochemische Gradient nicht mehr aufrecht erhalten werden, was zu einem Eindringen von Wasser und einer Aufschwemmung der Zelle führt [14]. Wird die Zellmembran durchlässig, kann sie zudem zelluläre Bestandteile verlieren und absterben. Einige Peptide zeigen darüber hinaus Wirkung auf intrazelluläre Bestandteile; so permeabilisiert das Peptid BMAP-28 nicht nur die Zellmembran humaner Krebszellen, sondern auch die Membran der Mitochondrien [15]. Obwohl auch ein „multihit“ Mechanismus beschrieben wird, scheinen die meisten Peptide ihre Wirkung durch Membrandisruption zu entfalten [16].



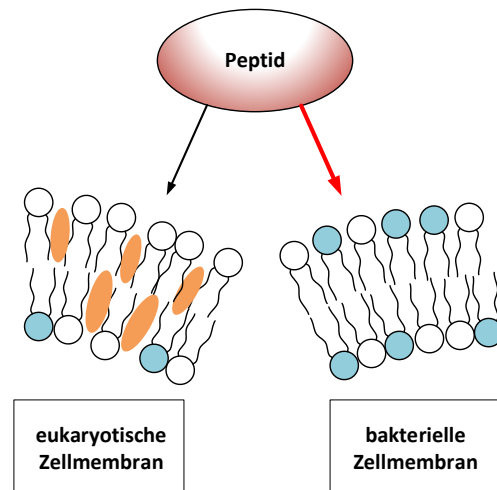
Nach der elektrostatischen Interaktion zwischen Peptid und Membran orientieren sich die Peptide mit den hydrophoben Bereichen der Membran zugewandt. Abhängig von der Hydrophobizität können die Peptide bis zu einem gewissen Grad bereits in die Doppellipidschicht eintauchen, was zu einer Dehnung der äußeren Schicht und damit zu Spannungen innerhalb der Membran führt. In Abbildung 6 sind verschiedene Modelle dargestellt, wie sich die Peptide in Zellmembranen integrieren können. Bei dem „barrel-stave“-Modell bilden die Peptidmoleküle eine fassförmige Pore, indem sich die hydrophoben Regionen nach außen zu den Lipiden richten und die hydrophilen Bereiche einen Tunnel im Inneren der Pore bilden [11]. Das „toroidale“-Modell beschreibt im Unterschied zum „barrel-stave“-Modell eine Wechselwirkung der Peptide mit den Kopfgruppen der Phospholipide über den gesamten Transmembranraum hinweg, sodass sich die Lipidschicht um die Pore herum legt [11]. Die Pore ist dadurch sowohl mit Peptiden, als auch mit den Kopfgruppen von Phospholipiden ausgekleidet [17]. Bei dem „carpet“-Modell orientieren sich die Peptide parallel zur Membranoberfläche wie ein Teppich [11]. Wenn eine kritische Konzentration erreicht wird, dringen Peptide in den hydrophoben Bereich der Membran vor und bewirken eine Auflösung der Membranstruktur mit Mizellenbildung [18].



**Abb. 6:** Darstellung verschiedener Modelle der Peptid-Membran-Interaktion. Nach Erreichen einer kritischen Konzentration bilden sich fassförmige Poren (links, barrel-stave), Poren, die mit Peptiden und Phospholipiden ausgekleidet sind (mitte, toroidal), oder Mizellen durch Auflösung der Membranstruktur (rechts, carpet). Hydrophobe Bereiche der Peptide sind schwarz und hydrophile hellgrau dargestellt.  
Wiesner et al., 2010 [11].

Antimikrobielle Peptide zeigen bei ihrer Wirkung eine Selektivität. So werden gesunde eukaryotische Zellen deutlich weniger bis gar nicht beeinflusst, während Bakterien und auch Krebszellen mit AMPs bekämpft werden können [20]. Wie bereits erwähnt, wird die Interaktion mit einer Membran durch elektrostatische Wechselwirkung initiiert. Da die meisten AMPs kationisch sind, interagieren sie mit negativen Ladungen, was eine Integration in die Membran aufgrund des amphiphilen Charakters der Peptide nach sich ziehen kann. Die Ursache dieser Selektivität liegt in dem unterschiedlichen Aufbau und Zusammensetzung der Membran bei Prokaryoten und Eukaryoten, wie in Abbildung 7 schematisch dargestellt ist.

Prokaryotische Zellmembranen bestehen zu großen Anteilen aus negativ geladenen Phospholipiden, Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin oder Phosphatidylserin (PS) [19, 20]. Auch die äußere Membran gramnegativer Bakterien ist durch anionische Lipopolysaccharide (LPS) negativ geladen. Diese Ladungen ermöglichen eine elektrostatische Interaktion mit positiv geladenen Peptiden. Die eukaryotische Zellmembran hingegen besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit integrierten Proteinen. Die äußere Schicht ist nahezu ungeladen und setzt sich überwiegend aus zwitterionischen Phospholipiden wie Sphingomyelin und Phosphatidylcholin (PC) zusammen. Bei der inneren Schicht hingegen finden sich auch Aminophospholipide wie das anionische PS [21]. Durch die neutrale Nettoladung haben AMPs nur eine geringe Affinität an eukaryotische Zellmembranen zu binden. Zusätzlich sorgt Cholesterin für eine hohe Membranstabilität.



**Abb. 7:** Die Zellmembran als Zielstruktur antimikrobieller Peptide (AMPs) und ihre Selektivität. Kathionische Peptide binden aufgrund elektrostatischer Interaktion (roter Pfeil) bevorzugt an bakterielle Membranen durch den hohen Gehalt an negativ geladenen Bestandteilen (acidic phospholipids, hier blau eingefärbt). Der amphiphile Charakter der AMPs ist durch den Farbverlauf angedeutet. Aufgrund der zwitterionischen Phospholipide eukaryotischer Zellen haben AMPs nur eine geringe Affinität zu eukaryotischen Membranen durch hydrophobe Wechselwirkungen (schwarzer Pfeil). Zusätzlich stabilisiert hier Cholesterin (orange Färbung).  
Verändert nach Matsuzaki et al., 1999 [19].

Einige Antimikrobielle Peptide zeigen zusätzlich auch eine Wirkung gegen Tumorzellen [20]. Dies begründet sich durch Veränderungen in der Zellmembran. So trägt sie durch vermehrte Expression von anionischen Membranbestandteilen wie PS oder O-glykosylierte Mucine (Glykoproteine, die reich an anionischen Sacchariden wie Sialinsäure sind) eine negative Nettoladung [6, 22, 23, 24]. Diese ermöglicht eine elektrostatische Interaktion mit den AMPs. Zusätzlich weisen die Membranen einiger Karzinome durch einen verringerten Cholesterin-Gehalt eine erhöhte Fluidität auf, was eine Membrandisruption erleichtert [25].



Neben antimikrobiellen Eigenschaften, neutralisieren einige Peptide die Endotoxinklasse der LPS gramnegativer Bakterien [26, 27]. Gelangen diese Bestandteile der Zellmembran gramnegativer Bakterien in den Blutkreislauf des Menschen, wird eine überproportionale Immunreaktion ausgelöst und es kann zu einer Sepsis kommen [28]. Eine Sepsis ist sehr schwer zu behandeln und führt häufig zum Tod. Zudem kann ein Einsatz von Antibiotika das Krankheitsbild durch Freisetzung von Endotoxinen, wie zum Beispiel LPS, zusätzlich verschlechtern oder reicht nicht aus, um eine Genesung herbeizuführen [29, 30]. Da die LPS bei der Entwicklung einer Sepsis eine große Rolle spielen kann, stellt der Einsatz von Peptiden, die diese Endotoxine neutralisieren können, einen guten Ansatzpunkt für neue Behandlungsmethoden dar.

#### 2.4.2 Untersuchte antimikrobielle Peptide

Folgende Peptide kommen in dieser Arbeit zum Einsatz. Das synthetische Peptid Aspidasept ist ein vielversprechender Wirkstoffkandidat bei der Bekämpfung von Sepsis und erhöhter Immunantwort [7]. Es wird aus diesem Grund auf Zytotoxizität und mögliche Wirkung gegen Tumorzellen als Erweiterung des Anwendungsgebietes untersucht. Das Peptid Melittin besitzt eine hohe und unspezifische Zytotoxizität und wird deshalb als Positivkontrolle eingesetzt, um nachzuweisen, dass mit dem Bionas System die Effekte auf zellphysiologische Parameter dargestellt werden können.

##### **Aspidasept<sup>®</sup>**

Das Peptid pep19-2.5 mit dem Handelsnamen Aspidasept<sup>®</sup> der Firma Brandenburg Antinfektiva GmbH ist ein synthetisches Peptid mit 20 Aminosäuren. Es hat neutralisierende Wirkung auf LPS und einige pathogene Faktoren von grampositiven Bakterien [27].

##### **Melittin**

Melittin ist ein Peptid mit 26 Aminosäuren und stellt den Hauptbestandteil des Giftes der europäischen Honigbiene *Apis mellifera* dar. Es hat sehr starke hämolytische Wirkung. Die hohe Wirksamkeit kann auf den hohen Gehalt von hydrophoben Seitenketten zurückgeführt werden [31]. Es hat eine Nettoladung von +6 und eine amphiphile Sekun-



---

därstruktur bestehend aus zwei  $\alpha$ -Helices. Es kann als Monomer auftreten oder bildet Aggregate zu Tetrameren. Melittin zeigt je nach Peptidkonzentration, Membranzusammensetzung, pH-Wert und das Vorhandensein von Membranpotentialen verschiedene Wirkungsweisen wie Mizellenbildung und Membranfusion [32].

## 3 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die bei den Experimenten verwendeten Materialien und Methoden dargestellt. Sofern Änderungen in den Methoden oder dem Ablauf während der einzelnen Versuche vorgenommen wurden, wird gesondert darauf hingewiesen.

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Peptide

Das Peptid Aspidasept wurde bei der schweizer Firma Bachem synthetisiert und in gereinigter und lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt. Melittin wurde im Forschungszentrum Borstel, dem Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert. Es liegt ebenfalls in gereinigter und lyophilisierter Form vor.

#### 3.1.2 Zelllinien und Zellkultur

##### PC-3 Zellen

Bei PC-3 Zellen handelt es sich um Adenokarzinome und demzufolge um Tumorzellen. Die Zellen sind menschlichen Ursprungs und wurden 1979 einem zweiundsechzigjährigen Mann entnommen [33]. Es handelt sich um Metastasen eines Prostatakazinoms, die von Knochen stammen [33]. Diese Zellen kommen häufig in der Krebsforschung zum Einsatz und eignen sich deshalb gut für diese Arbeit. Durch eine stabile Zellkultur lassen sich Zusammenhänge *in vitro* aufdecken und Ergebnisse reproduzieren.

##### HaCaT-Zellen

Bei HaCaT handelt es sich um eine humane epitheliale Zelllinie. Ursprünglich wurden die Zellen aus dem Randbereich eines Melanom auf der Haut des oberen Rückens eines 62 Jahre alten Mannes isoliert [34]. In Bezug zu den Bedingungen bei der Etablierung dieser Zelllinie erhielt sie ihren Namen, wobei HaCaT für „**H**uman **a**dult **l**ow **C**alcium **h**igh **T**emperature“ steht. Sie werden als nicht tumorös eingestuft und sind in der Lage, sich



zu Keratinozyten zu differenzieren [34]. Ihre Immortalität (>140 Passagen sind möglich) machen sie zu einer weit verbreiteten Zelllinie.

## Medien und Lösungen

**Tab. 2:** Zellkulturmedien, die für die Kultivierung von den verwendeten Zellen und die Versorgung während der Experimente verwendet werden.

Medium	Menge	Zusammensetzung	Hersteller
Kulturmedium	500 ml	Dulbeccos 's modified eagle 's medium (DMEM)	Biochrom, F0445
	5 ml	L-Glutamin	Biochrom, K0282
	5 ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Biochrom, A2212
	50 ml	FCS, bei 56 °C 30 min. dekomplementiert	Biochrom, S0415
Bionas Running Medium (BRM)	500 ml	1 mM HEPES, pH 7,4 und 4,5 g/l Glucose	Bionas GmbH
	5 ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Biochrom, A2212
	0,5 ml	FCS, bei 56 °C 30 min. dekomplementiert	Biochrom, S0415

**Tab. 3:** Zellkultur-Lösungen, die für eine erfolgreiche Zellkultur benötigt und eingesetzt werden

Lösung	Hersteller
Accutase Cell Detachment Solution	Capricorn Scientific; CP16-1028
Dulbecco's PBS (pH 7,4)	Biochrom, L182
Ethanol (70%)	Carl Roth, T171.4





### 3.1.3 Chemikalien

**Tab. 4:** In dieser Tabelle aufgelistet sind die verwendeten Chemikalien.

Substanz	Hersteller
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck; Lot Nr. F1535286833
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth; Charge: 055220765
Natriumchlorid	Carl Roth; Charge: 065222185
Triton X-100	Carl Roth; Charge: 042177204
Trypan Blau	Sigma-Aldrich; Lot Nr. T6146-25G
Sytox <sup>®</sup> green	Invitrogen; Lot Nr. 1262842
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; Lot Nr. RNBD6044

### 3.1.4 Verwendetes Verbrauchsmaterial

**Tab. 5:** Folgende Verbrauchsmaterialien werden für diese Arbeit benutzt und verbraucht.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf und Sarstedt
Falcontubes	BD
Nitrilhandschuhe	Carl Roth
Parafilm <sup>®</sup> M	Bemis Company
Mullbinde	W. Söhngen GmbH
Pipettenspitzen	Eppendorf und Brand
Serologische Pipetten	TPP und greiner bio-one
Zellkulturflasche T-75	TPP und greiner bio-one
Kryo-Röhrchen (1,2 ml)	TPP
atmungsaktive Verschluss-Folien AeraSeal	EXCEL Scientific
96-well-Platte Nunclon Delta Surface	Thermo Scientific



### 3.1.5 Verwendete Geräte

**Tab. 6:** In dieser Tabelle aufgelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Messgerät für zellphysiologische Parameter	Discovery 1500	Bionas
Brutschrank	CB 150	Binder
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
Luftpolsterpipetten	1000 µl, 100 µl, 10 µl	Brand
Pipettierhilfe	accu-jet	Brand
Sicherheitswerkbank	Klasse II HERAsafe	Heraeus®
Vortex-Mischer	444-1372	VWR
Wasserbad	1003	GFL
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus®
pH-Messgerät	766 Calimatic	Knick
Cell Counter	Countess™	Invitrogen
Waage	770	Kern
Plate reader	infinite M200 pro	Tecan

### 3.1.6 Verwendete Mikrochips

**Tab. 7:** Hier sind die Mikrochips von Micronas aufgeführt, die eingesetzt werden.

Seriennummer	Batchnummer	Wafernummer	Chipnummer
BIS 8001D A1	0081 11 LIN	225918.016 ES	55; 57; 59; 62; 63; 64
BIS 8001D A1	008 111 LIN	225918.014 ES	38; 40
BIS 8001D A1	105 111 LIN	225918.008 ES	49; 50
BIS 8001D A1	210 111 LIN	232052.009 ES	24; 27; 31; 32; 33



### 3.1.7 Verwendete Software

**Tab. 8:** Diese Tabelle zeigt die genutzte Software auf.

Software	Firma
B 1500 <sup>2</sup> adv CS V1.04	Bionas GmbH
B 1500 <sup>2</sup> DA V1.07	Bionas GmbH
Tex (Texlive)	The TeX Users Group
Origin 8	OriginLab Corporation
Visio 2013	Microsoft
Magellan 7.1 SP1	Tecan



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Bei der Arbeit mit Zellen ist eine sterile Arbeitsweise unerlässlich, um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Säugetierzellen wachsen deutlich langsamer als Bakterien oder Pilze, weshalb eine Kontamination zu einer Wachstumshemmung führen kann. Dementsprechend finden alle Arbeiten unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 statt. Vor Beginn und nach Beendigung jeder Tätigkeit werden die Oberflächen der Werkbank mit 70%-igen Ethanol besprüht und abgewischt. Zusätzlich erfolgt eine Desinfektion mittels UV-Exposition durch zwei in die Werkbank integrierte UV-Röhren. Benötigte Materialien sind entweder steril verpackt oder wurden bei 121 °C autoklaviert und werden vor der Überführung unter die Werkbank mit 70%-igen Ethanol besprüht. Der Mensch stellt ein hohes Kontaminationsrisiko dar, weshalb bei den Arbeiten Handschuhe und ein Kittel getragen werden.

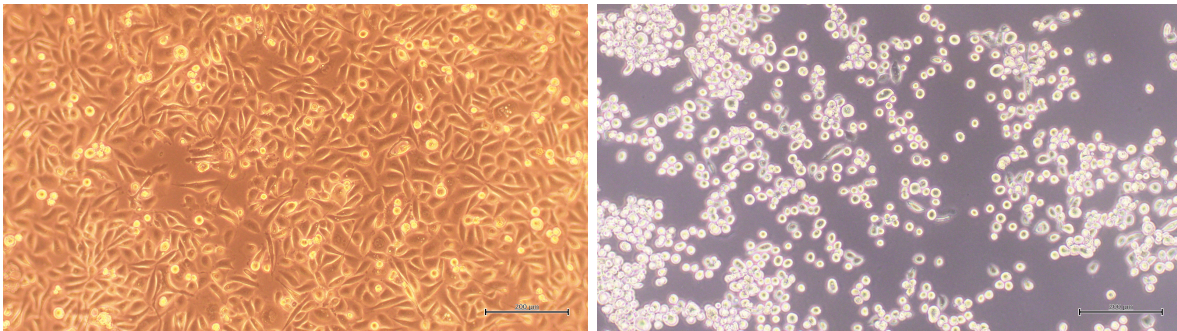
#### Kultivierungsbedingungen

Da die zu kultivierenden Zellen sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen reagieren, werden benötigte Medien und Lösungen vor Benutzung mittels eines Wasserbades auf 37 °C gebracht. Inkubiert werden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub> in der Luft.

Die PC-3 und HaCaT Zellen wachsen adhärent, benötigen demnach eine Oberfläche, an die sie sich anheften können. Die verwendeten Zellkulturflaschen bieten diese Oberfläche und erlauben über den im Deckel integrierten Filter einen sterilen Gasaustausch. Als Medium kommt Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) mit der in Tabelle 2 angegebenen Zusammensetzung zum Einsatz. Nachfolgend wird das Medium mit dem Zusatz von FCS und Penicillin-Streptomycin-Lösung als DMEM<sub>komplett</sub> bezeichnet. Dieses versorgt die Zellen mit den benötigten Nährstoffen.

## Passagieren

Die verwendeten menschlichen Zellen wachsen adhärent. Um eine Wachstumshemmung durch übermäßigen Zellkontakt zu vermeiden, werden sie in regelmäßigen Abständen auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Sobald die Zellen eine Dichte von 90-100% erreichen, werden sie passagiert. Zunächst wird das Medium abgenommen und die Zellen zwei mal mit 10 ml PBS gewaschen, um abgestorbene, abgelöste Zellen und restliche Medienbestandteile wie FCS zu entfernen, da dieses die Accutase hemmt. Um ein Herunterwaschen der Zellen zu vermeiden, sollte nicht direkt auf den Boden der Kulturflasche pipettiert werden. Um die Zellen von der Oberfläche der Flasche zu lösen, kommt Accutase zum Einsatz. Der Handelsname Accutase bezeichnet eine Lösung von proteolytischen und collagenolytischen Enzymen, die für eine sanfte Ablösungen von adhärent wachsenden Zellen sorgen. Um eine Benetzung aller Zellen sicher zu stellen, werden 5 ml Accutase in die Kulturflasche gegeben und nach kurzen Schwenken 4 ml abgenommen. Nach einer Inkubation von 5 bis 10 Minuten bei 37 °C liegen alle Zellen abgelöst im der Lösung vor, was mikroskopisch durch eine kugelige Zellform bestätigt werden kann, wie in Abbildung 8 zu sehen ist.



**Abb. 8:** Links: PC-3 Zellen bei 100-facher Vergrößerung mit typisch länglicher Zellform und vereinzelte abgelöste Zellen (rund) unter dem Phasenkontrastmikroskop  
Rechts: PC-3 Zellen nach Behandlung mit Accutase bei 100-facher Vergrößerung mit abgerundeter Zellform. Diese sind von der Oberfläche abgelöst.  
Der Maßstabsbalken zeigt eine Größe von 200 µm an.

Da die Wirkung der Accutase durch das im Medium enthaltene FCS inhibiert wird, werden der Lösung 9 ml DMEM<sub>komplett</sub> hinzugefügt. Für einen 1:10 Split wird davon ein Zehntel (1 ml) entnommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Bei einem 1:5 Split werden dementsprechend ein Fünftel (2 ml) der enthaltenen Zellen in eine



neue Kulturflasche gebracht. In die neuen Zellkulturflaschen werden vor der Zugabe der Zellsuspension 20 ml Medium vorgelegt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen, wird die Flasche acht-förmig auf dem Tisch bewegt. Die Kulturflasche mit der Art der Zellen, der Passagenzahl, der Angabe zum Splitverhältnis und dem Datum beschriftet und in den 37 °C Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>-Begasung gelegt.

### **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Um Zellen einfrieren zu können, werden sie zunächst mittels Accutase von einer zu 100% bewachsenen Zellkulturflasche abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen. Anschließend werden die Zellen für drei Minuten bei 300 g abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Dieses setzt sich aus dem für die Kultivierung verwendeten Medium (DMEM<sub>komplett</sub>) mit 30% FCS sowie 10% DMSO (Dimethylsulphoxid) zusammen. Je 1 ml Zellsuspension wird in Cryoröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgt in mehreren Schritten. Zunächst werden die Cryoröhrchen in einer Styroporbox in ein Kühlfach bei –20 °C eine Stunde langsam eingefroren, um anschließend für 24 Stunden bei –80 °C gelagert zu werden. Abschließend erfolgt die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen sollte möglichst schnell erfolgen, weshalb das Cryoröhrchen für ungefähr 5 Minuten in den Brutschrank bei 37 °C gestellt wird. Währenddessen werden 19 ml Medium in eine Kulturflasche vorgelegt. Sobald die Zellsuspension aufgetaut ist, wird diese in die Kulturflasche gegeben. Da DMSO toxisch für die Zellen ist, erfolgt ein Medienwechsel, sobald sich die Zellen an die Oberfläche der Kulturflasche angeheftet haben. Dies geschieht nach frühestens 4 Stunden, kann aber auch bis zu 24 Stunden dauern.

### **Zellzählung**

Um zu gewährleisten, dass für jedes Experiment die selbe Zellzahl auf die Mikrochips ausgesät wird, müssen die Zellen gezählt werden. Hierfür wird der Countess™ Automated Cell Counter von Invitrogen verwendet. Als Färbemittel wird Trypan Blau eingesetzt.



Dieser Farbstoff kann die Membran abgestorbener Zellen überwinden und färbt somit die Zelle blau [35]. Bei vitalen Zellen ist die Zellmembran intakt, sodass Trypan Blau nicht eindringen kann und lebendige Zellen somit nicht einfärbt [35]. Zu 10  $\mu\text{l}$  Zellsuspension werden 10  $\mu\text{l}$  Trypan Blau (0,4%) gegeben. Nach vorsichtigem Mischen werden 10  $\mu\text{l}$  in die Zählkammer überführt. Der Schlitten, auf dem sich die Zählkammer befindet, wird in das Gerät hinein geschoben und der Fokus der integrierten Optik eingestellt. Optimaler Weise sind abgestorbene Zellen komplett blau eingefärbt, während vitale Zellen einen blauen Rand mit heller Mitte zeigen. Nach der Zählung wird die Anzahl vitaler und abgestorbener Zellen, die Gesamtzellzahl sowie die Viabilität, also der Rate lebender zu toten Zellen, ausgegeben. Da die HaCaT Zellen zu Klumpenbildung neigen, werden sie vor der Zählung durch eine Mullbinde filtriert, um große Zellklumpen abzutrennen. Diese würden später die Sensoren auf den Mikrochips stören.

### 3.2.2 Echtzeit-Monitoring von zellphysiologischen Parametern

Vor dem Start eines Durchlaufs werden die verwendeten Mikrochips für 10 Minuten mit 70% igen Ethanol desinfiziert und zwei mal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Chips über Nacht im Brutschrank bei 37 °C mit DMEM konditioniert. Es folgt die Zellaussaat. Die PC-3 oder HaCaT Zellen werden mit Accutase von der Zellkulturflasche abgelöst, gezählt und  $2 \cdot 10^5$  Zellen auf die Chipoberfläche pipettiert. Die Kultivierung erfolgt für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Um die Zellen an das Laufmedium zu konditionieren, wird zwei Stunden bevor die Mikrochips auf dem Biomodul montiert werden das Medium gewechselt und die Zellen werden wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Die verwendeten Peptide liegen lyophilisiert vor und werden entsprechend der Konzentration eingewogen und in BRM gelöst.

Jede Messung ist in vier Schritte aufgeteilt. Zunächst müssen sich die Zellen an neue Bedingungen wie den Fluss des Mediums und die andere Zusammensetzung des Mediums adaptieren. Bei den Messungen kommt das Bionas Running Medium (BRM) zum Einsatz, ein Zellkulturmedium ohne Bicarbonatpuffer und ohne L-Glutamin, dafür mit 1 mM HEPES (pH 7,4) und 4,5 g l<sup>-1</sup> Glucose. 0,1% FCS, 100 U ml<sup>-1</sup> Penicillin und 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$



Streptomycin werden zugesetzt. Da dieses Medium nur leicht gepuffert ist, können Änderungen des pH-Wertes gemessen werden. An die Adaption schließt sich die Behandlung mit dem zu testenden Peptid an. Dabei werden entweder beide Biomodule mit in BRM gelösten Peptid in der entsprechenden Konzentration gespült oder nur eins. Zellen, die nur mit BRM versorgt werden, dienen als Kontrolle. Während der Experimente sind die Zellen dem Peptid 14 Stunden lang ausgesetzt. Um sicherzustellen, ob eine Regeneration der Zellen von den durch das Peptid verursachten metabolischen und morphologischen Veränderungen erreicht werden kann, wird eine Phase angeschlossen, in der nur BRM auf die Zellen gegeben wird. Dieser Schritt dauert bis zu vier Stunden lang an. Als letzter Schritt einer Messung erfolgt die Ablösung der Zellen von der Sensoroberfläche mittels Triton X-100, das zu einem Anteil von 0,2% in BRM gelöst wird.

Um eine Desinfektion des Schlauchsystems vom Bionas 1500<sup>2</sup> zu erreichen, wird dieses vor jeden Experiment für 10 Minuten mit 70 %igen Ethanol gespült. Darauf folgen je eine Spülung mit PBS und BRM, um die Schläuche zu konditionieren. Anschließend werden die Mikrochips mit den Zellen in das Biomodul eingespannt und die Messung gestartet. Das Gehäuse des Bionas Systems wird auf einer Temperatur von 37 °C gehalten.

Nach Abschluss des Experimentes wird das Schlauchsystem zuerst mit Reinstwasser gespült und dann leer betrieben, sodass sich keine Flüssigkeit mehr innerhalb der Schläuche befindet. Die Mikrochips werden mit 70 %igen Ethanol besprüht und mit einem weichen Papiertuch trocken gewischt, sodass die Oberfläche wieder glänzt.

Zu Beginn der Experimente werden die einzelnen Sensoren überprüft. Für die Impedanz-Sensoren Überprüfung kommt Phosphatpuffer (10 mM mit pH 7,0) mit Natriumchlorid-Konzentrationen von 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM und 500 mM zum Einsatz. Die IDES-Sensoren liefern Kapazitätsmesswerte. Es kommen vier verschiedene Mikrochips zum Einsatz, die auf jedem der beiden Biomodule vermessen werden, sodass sich eine Anzahl von acht Datenreihen ergibt. Die Messwerte werden normiert, wobei der Wert ohne Salz als 1 und die höchste Salzkonzentration als 0 definiert wird, da die Impedanz der reziproke Wert der Kapazität und als Widerstand anschaulicher ist.





Die normierten Datenreihen werden gemittelt und mit dem Standardfehler über die Salzkonzentration aufgetragen.

Um die pH-Sensoren zu überprüfen wird eine ähnliche Vorgehensweise gewählt. Als Puffer kommt Phosphat (10 mM mit 150 mM Natriumchlorid) zum Einsatz, wobei der pH-Wert von 6,5 über 7,0 auf 7,5 und 8,0 variiert wird. Es kommen zwei Mikrochips zum Einsatz, die wechselseitig auf beiden Biomodulen montiert werden, sodass sich eine Anzahl von 4 Datenreihen ergibt.

### 3.2.3 Messung der Zellmembranintegrität

Zusätzlich zum Monitoring zellphysiologischer Parameter in Echtzeit wird die Wirkung der Peptide Aspidasept und Melittin auf die beiden verwendeten Zelllinien PC-3 und HaCaT mittels Sytox<sup>®</sup> green untersucht.

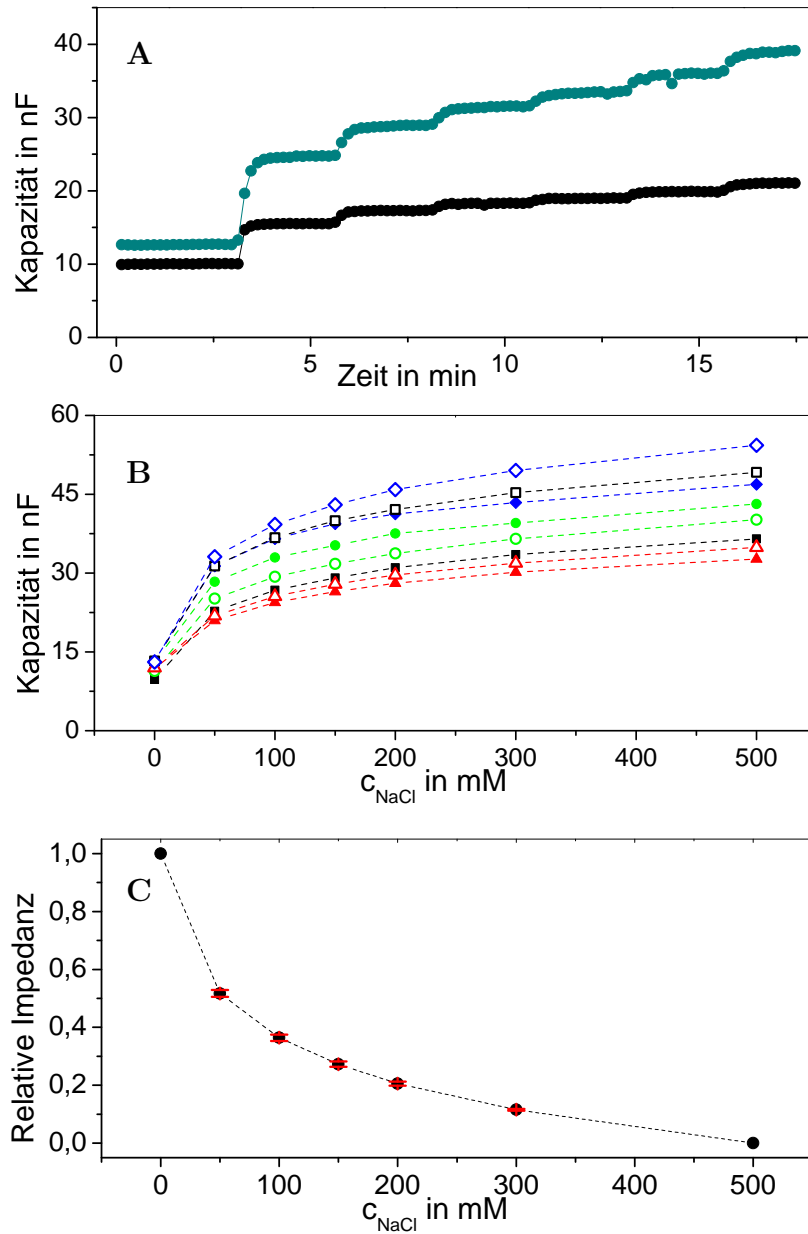
Die PC-3 Zellen werden durch die Accutase Behandlung vereinzelt und gezählt. Anschließend werden  $2,5 \cdot 10^4$  Zellen in jedes Well einer 96-well-Platte ausgesät und DMEM bis zu einem Endvolumen von 100  $\mu$ l hinzu gegeben. Die Zellen werden dann für vierundzwanzig Stunden im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Nachdem die Zellen mit 100  $\mu$ l PBS gewaschen wurden, wird Sytox<sup>®</sup> green aus einer Stocklösung von 5 mM zu den Zellen hinzu gegeben, sodass sich eine Konzentration von 5  $\mu$ M ergibt. Anschließend werden die beiden Peptide Aspidasept und Melittin aus Stammlösungen mit der Konzentration 1 mg mL<sup>-1</sup> in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert, sodass sich die Konzentrationen 3, 10 und 30  $\mu$ M ergeben. Für die Aspidasept-Stammlösung wird 1 mg eingewogen und in einem ml PBS gelöst. Melittin liegt bereits als Lösung in PBS mit 0,1 % TFA vor. Als Positivkontrolle kommt 0,2 % Triton X-100 zum Einsatz, da die membranlyisierende Eigenschaft dieser Substanz bekannt ist. Angeregt wird bei 482 nm und die Emission bei 530 nm gemessen. Der Zyklus einer Messung beträgt eine Minute für einen Zeitraum von einer Stunde, sodass der zeitliche Verlauf aufgenommen werden kann, um eine mögliche Kinetik aufzudecken.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Evaluation des Bionas Systems

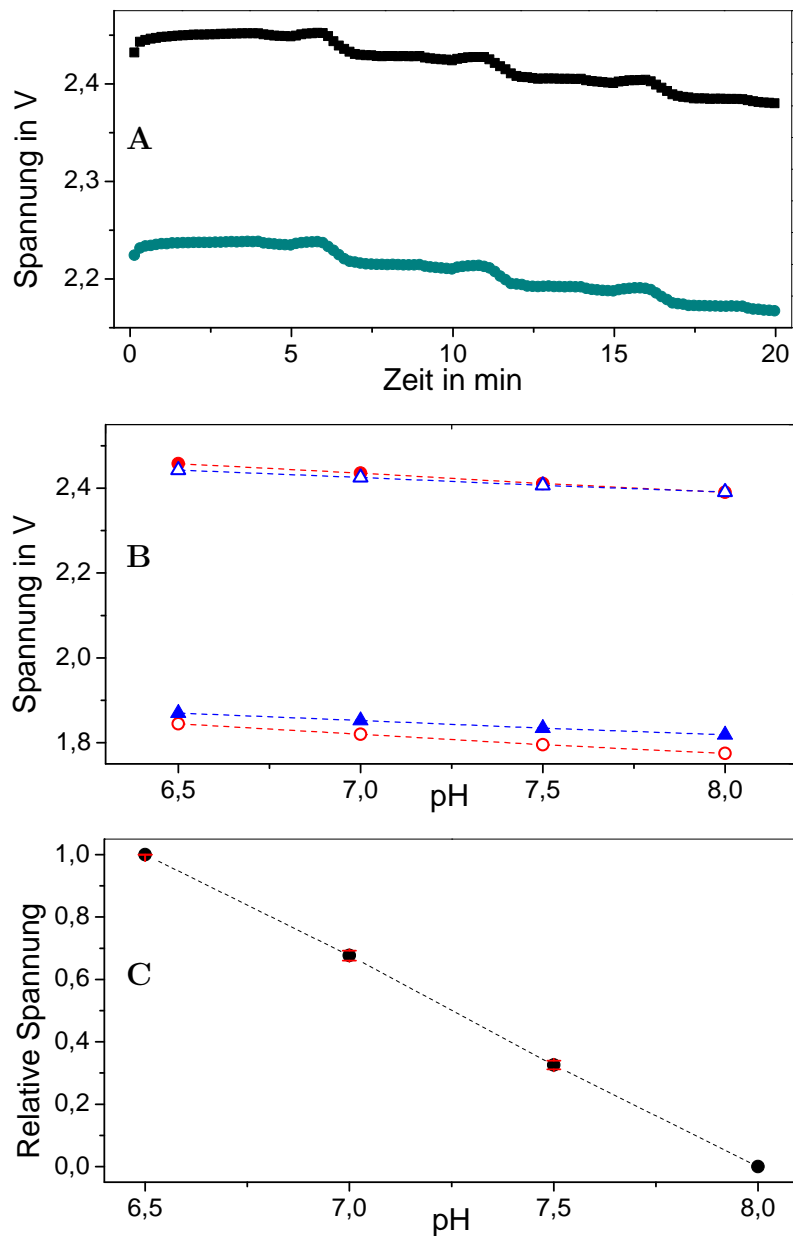
#### 4.1.1 Sensorentests

Zur Evaluation der Sensoren kam Phosphatpuffer wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben zur Anwendung. In Abbildung 9 A sind die gemessenen Kapazitäten der beiden Biomodule 1 (schwarz) und 2 (grün) über der Zeit aufgetragen. Jede Salzkonzentration wurde für 2 Minuten gemessen. Je höher die NaCl-Konzentration war, desto höher stieg auch die gemessene Kapazität, wobei auffällt, dass das Biomodul 1 geringere Messwerte und damit auch einen geringeren Anstieg lieferte. Unter B sind die gemittelten Kapazitätswerte der einzelnen vier Mikrochips auf beiden Biomodulen über der Natriumchloridkonzentration aufgetragen (verwendete Mikrochips siehe Tabelle 7). Wie bereits unter A zu sehen, stieg die Kapazität mit zunehmender Salzkonzentration zunächst steil an, um ab 100 mM Natriumchlorid abzuflachen. Der Anstieg lässt sich mit der zunehmenden Menge an Ladungsträgern erklären, die den Widerstand zwischen den Elektronen senken und damit zu einem Anstieg der Kapazität beitragen. Die absoluten Werte wichen zum Teil um bis zu 20 nF voneinander ab, wobei die Messreihen aller verwendeter Mikrochips einen ähnlichen Verlauf zeigten. Für die Abbildung 9 C wurden die Messkurven jedes Mikrochips normiert, wobei der niedrigste Messwert für die Kapazität als 1 und der höchste Messwert als 0 definiert wurde. So kann von relativer Impedanz gesprochen werden, da sich diese reziprok zur Kapazität verhält. Anschließend wurden die normierten Messkurven gemittelt und mit den Standardfehlern über der NaCl-Konzentration aufgetragen. Die geringen Standardfehler deuten darauf hin, dass die normierten Messreihen für die Salzkonzentrationen kaum voneinander abwichen. Demnach kann jeder Mikrochip auf jedem Biomodul betrieben werden, da die gemessenen Kapazitäten für die spätere Auswertung ebenfalls normiert wurden.



**Abb. 9:** Evaluation der Impedanz-Sensoren. Verwendeter Puffer: 10 mM Phosphat mit pH 7,0 und verschiedenen Natriumchlorid-Konzentrationen. Gemessen wurde die Kapazität als reziproker Wert der Impedanz. Jede Salzkonzentration wurde zwei Minuten lang gemessen (A) auf beiden Biomodulen (BM1: schwarz; BM2: türkis) und die Werte für jede Konzentration gemittelt und über der NaCl-Konzentration aufgetragen (B). Unter C aufgetragen sind die gemittelten normierten Messwerte mit den Standardfehlern über der NaCl-Konzentration. Da der niedrigste Wert der Kapazität als 1 und der höchste gemessene Wert als 0 definiert wurde, kann von relativer Impedanz gesprochen werden.

Da die pH-Wert-Änderung über die Steigung der gemessenen Spannung ermittelt wurde und die absoluten Werte auch bei den fünf Sensoren eines Mikrochips voneinander abwichen, sind in Abbildung 10 die Messwerte von je zwei Sensoren zweier Mikrochips dargestellt (A und B). Unter A ist die gemessene Spannung über der Zeit aufgetragen. Jeder pH-Wert wurde vier Minuten lang gemessen. Die beiden hier von fünf Sensoren pro Biomodul repräsentativ ausgewählten ISFET-Sensoren lieferten einen sehr ähnlichen Verlauf, obwohl die Absolutwerte weit auseinander lagen, bei den dargestellten Sensoren um ungefähr 0,2 V. Je höher der pH-Wert war, desto niedriger fiel die gemessene Spannung aus. Unter B sind die gemittelten Spannungen jedes pH-Wertes von zwei verwendeten Mikrochips auf beiden Biomodulen über dem pH-Wert aufgetragen. Auch hier ist die große Abweichung der Absolutwerte erkennbar, jedoch zeigen die Messwerte einen ähnlichen Verlauf. Mit zunehmendem pH-Wert sank die Spannung. Jede Messreihe wurde normiert, die höchste gemessene Spannung entspricht 1, während die niedrigste als 0 definiert wurde. Die normierten Werte wurden gemittelt und mit den Standardfehlern über dem pH-Wert aufgetragen. Wie an den Fehlerbalken erkennbar ist, fallen diese Fehler gering aus, die normierten Messreihen wichen dementsprechend kaum voneinander ab.

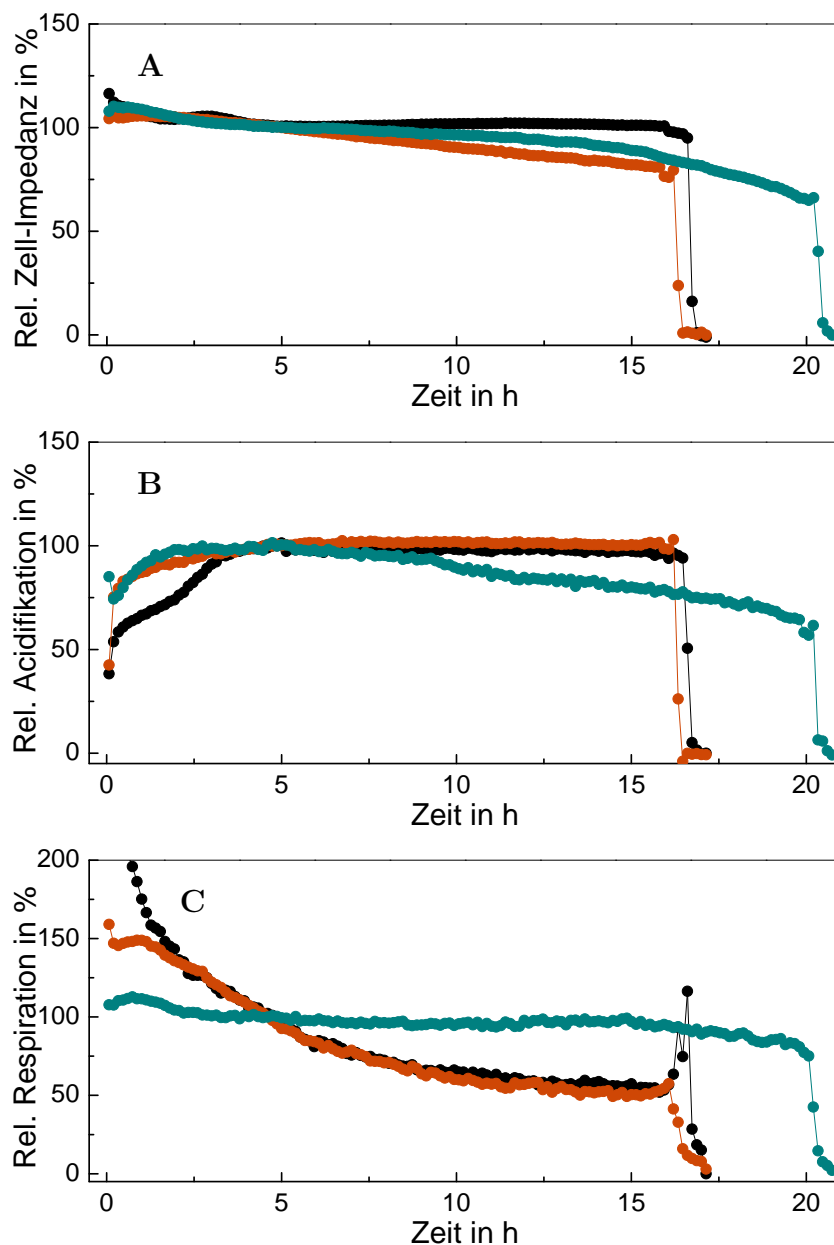


**Abb. 10:** Evaluation der pH-Sensoren. Verwendeter Puffer: 10 mM Phosphat mit 150 mM NaCl und variierenden pH Wert. Da die absoluten Messwerte der fünf Sensoren eines jeden Mikrochips von einander abweichen, sind hier repräsentativ zwei Sensoren zweier Mikrochips auf beiden Biomodulen dargestellt. Jeder pH-Wert wurde vier Minuten lang gemessen (A) und die Werte gemittelt aufgetragen (B). Verwendete Mikrochips: siehe Tabelle 7. Unter C aufgetragen sind die gemittelten normierten Messwerte mit den Standardfehlern über dem pH-Wert.

#### 4.1.2 Wahl des Laufmediums

An das Laufmedium, also das Medium, mit dem die Zellen während der Messung versorgt werden, sind mehrere Bedingungen geknüpft. Um eine reproduzierbare Messung aller drei Parameter ( $O_2$ -Verbrauch, pH-Änderung und Morphologie/Adhäsion) zu ermöglichen, sollte es möglichst wenig gepuffert sein, damit auch kleinste Änderungen des pH detektiert werden können. Des Weiteren muss das Medium die Zellen ausreichend mit Nährstoffen wie Glucose versorgen können, sodass die zu testenden Zellen ihre Stoffwechselaktivität stabil aufrecht erhalten können. Getestet wurden das Medium des Herstellers Bionas, der auch das Messgerät entwickelt hat, mit und ohne den Zusatz von FCS und Antibiotika. Auch das Medium, das die beiden verwendeten Zelllinien HaCaT und PC-3 bei der Kultivierung versorgt hat, wurde auf eine Eignung als Laufmedium getestet. Die Tabelle 2 listet die jeweiligen Medienbestandteile auf. In Abbildung 11 ist die gemessene Impedanz (A), die Acidifikation (B) und die Respiration (C) von PC-3 Zellen bei den verschiedenen Laufmedien über die Zeit aufgetragen. Nach einer Adaption von fünf Stunden wurden die zu diesem Zeitpunkt gemessenen Werte als 100 % definiert, die Werte nach der Zellyse durch Triton X-100 entsprechend als 0%. Die Impedanzen lagen bei den drei Medien zu Beginn sehr nahe beieinander. Während die Impedanz (A) mit BRM ohne FCS (schwarz) über den gesamten Lauf hinweg konstant bei 100% blieb, nahm sie bei den beiden anderen Medien leicht ab. Die Werte der Acidifikation (B) nahmen bei BRM mit FCS (orange) und DMEM (türkis) rasch 100% an, während die Zellen mit BRM ohne FCS etwa zwei Stunden länger brauchten, bis sie ihre maximale Acidifikationsrate erreichten. Die Zellen, die mit BRM versorgt wurden, konnten den Metabolismus über den gesamten Zeitraum komplett aufrecht erhalten, während die Acidifikationsrate mit DMEM leicht abfiel. Die Respiration der PC-3 Zellen mit DMEM lag während der gesamten Laufzeit um 100% herum. Bei Zellen, die BRM erhielten, sank die Respiration zunächst stark ab, um sich dann asymptotisch 50% zu nähern. Hier wurde ab fünf Stunden normiert, das heißt der Wert zur Zeit  $t = 5h$  wurde als 100% definiert. Die Adaption der Zellen die Respiration betreffend war demzufolge nach fünf Stunden mit BRM noch nicht abgeschlossen, erst nach ungefähr zehn Stunden. Bei BRM mit dem Zusatz von FCS fällt auf, dass die Respiration zu Beginn mit 150% deutlich näher an den 100% lag als ohne Zusatz von

FCS (deutlich über 200%).



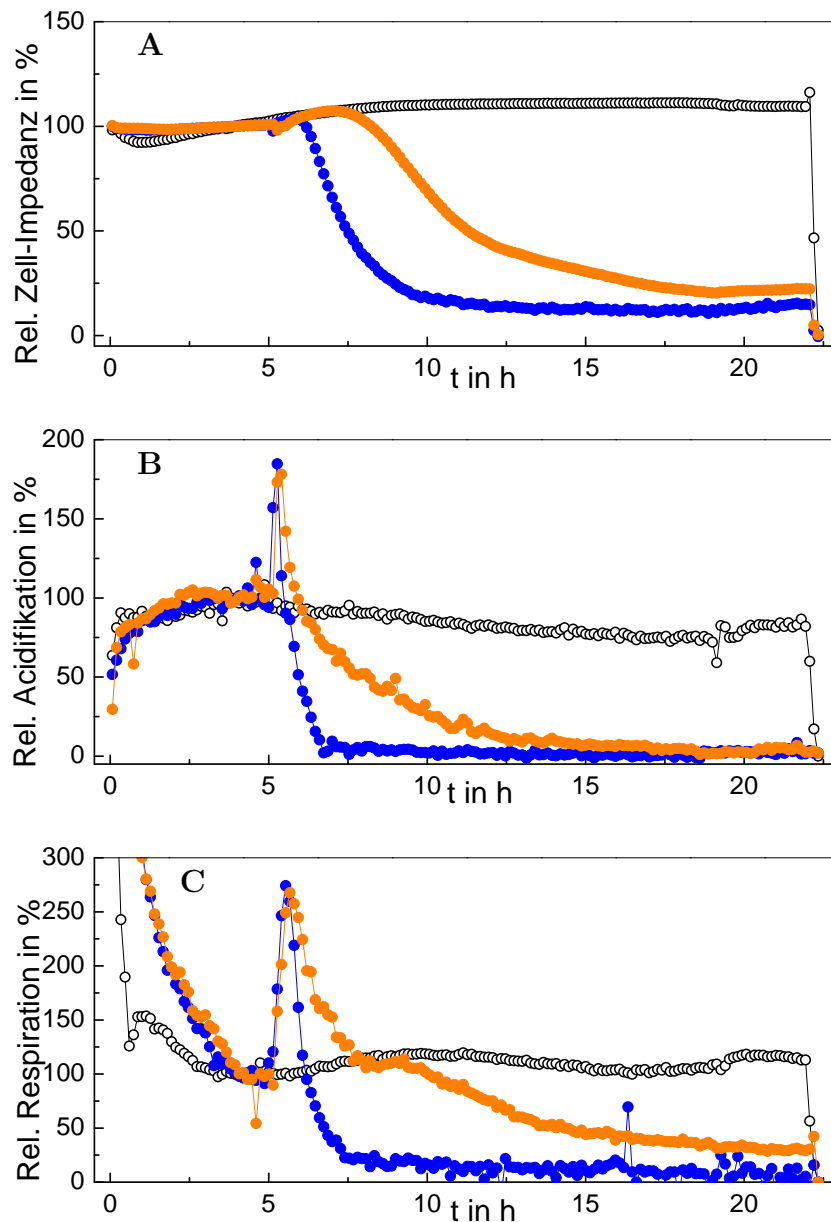
**Abb. 11:** PC-3 Zellen wurden mit verschiedenen Laufmedien behandelt und die metabolische sowie morphologische Zellantwort wurde mittels des Bionas Systems aufgenommen. Die verwendeten Medien waren zum einen Bionas Running Medium (BRM) ohne FCS (schwarz), BRM mit 0,1% FCS (dunkelorange) und das Kultivierungsmedium DMEM mit 10% FCS (türkis). Die Zellyse erfolgte mittels Triton X-100. Aufgetragen sind die arithmetischen Mittelwerte zweier unabhängiger Durchläufe.

## 4.2 Echtzeit-Monitoring: Einfluss von Melittin auf zellphysiologische Parameter

### 4.2.1 HaCaT-Zellen

Bei Melittin handelt es sich um ein Peptid, dessen unspezifische Wirkung als Bienengift gut bekannt und beschrieben ist. Es kam in dieser Arbeit als Referenz zum Einsatz. In Abbildung 12 ist die mit dem Bionas Gerät gemessene Impedanz (A), Acidifikation (B) und Respiration (C) von HaCaT Zellen während der Behandlung mit dem Peptid Melittin im Vergleich mit unbehandelten Zellen über der Zeit aufgetragen. Nach fünf Stunden Adaption wurde das Peptid auf die Zellen gegeben. Ab diesem Zeitpunkt war ein deutlicher Effekt des Melittins auf die Zellen erkennbar. Beide eingesetzten Konzentrationen führten zu einer schnellen Abnahme der Zellimpedanz auf einen sehr niedrigen Wert. Auffällig dabei ist, dass die Impedanz bei 10  $\mu\text{M}$  Melittin (blau) früher und stärker abfiel als bei 3  $\mu\text{M}$  (orange). Besonders bei der geringeren Konzentration des Peptids nahm die Impedanz zunächst sogar etwas zu, um dann schnell abzunehmen. Auch bei der Acidifikation und Respiration zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen. Melittin führte in höherer Konzentration rasch zur Abnahme der Acidifikationsrate sowie der Respiration, während es in geringerer Konzentration zeitverzögert zu einer langsameren Abnahme führte. Sowohl bei der Acidifikation, als auch bei der Respiration zeigte sich direkt zu Beginn der Peptidbehandlung ein sprunghafter Anstieg, der jedoch ebenso rasch wieder absank. Allerdings wirkten sich die Konzentrationsunterschiede nur auf den zeitlichen Verlauf der Interaktion aus. Beide Konzentrationen führten rasch zu Werten nahe der 0% und damit zum Zelltod.

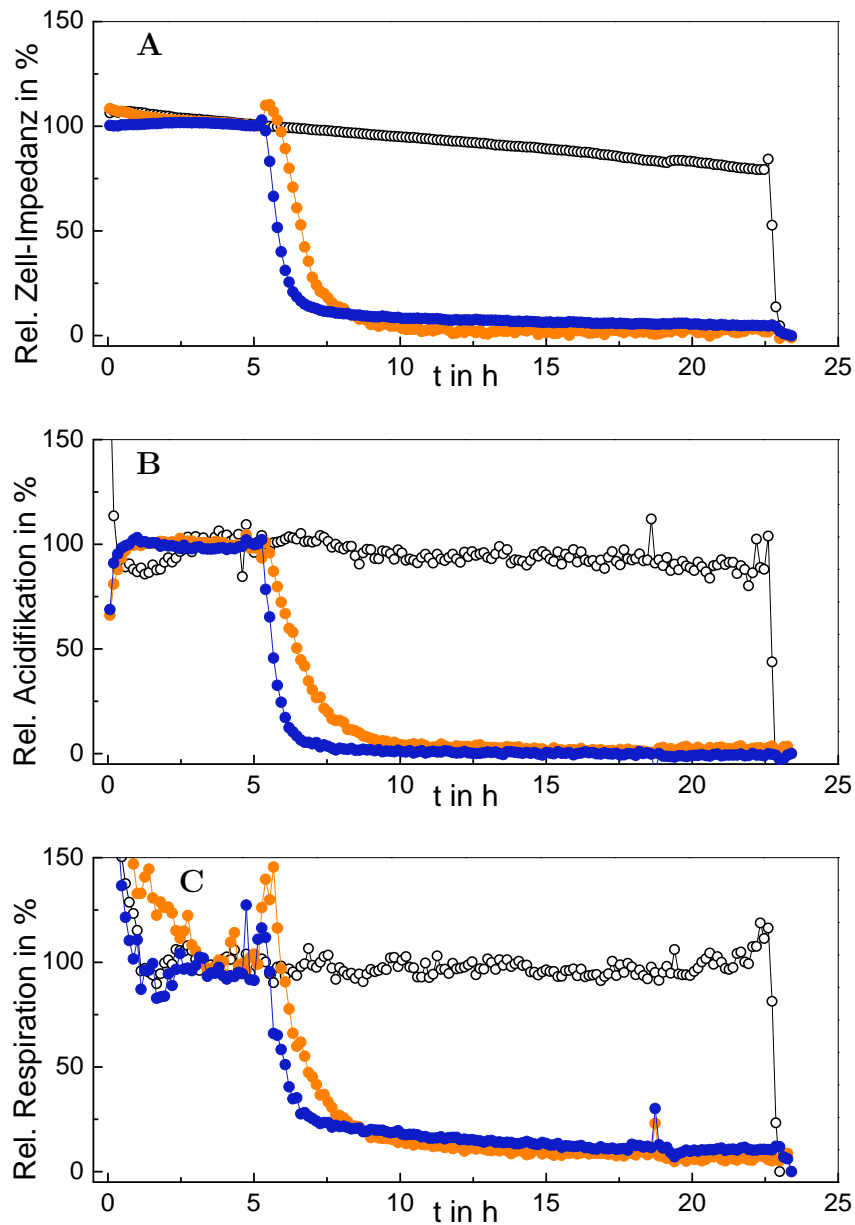




**Abb. 12:** HaCaT-Zellen wurden mit dem Peptid Melittin behandelt und die metabolische sowie morphologische Zellantwort wurde mittels des Bionas Systems aufgenommen. Das Peptid wurde in den Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  (orange) und 10  $\mu\text{M}$  (blau) auf die Zellen gegeben. Die schwarzen nicht gefüllten Kreise stehen für Kontrollzellen, die mit BRM ohne Peptid behandelt wurden. Nach 5h Adaption waren die Zellen dem Peptid 14 h lang ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium ohne Peptid versorgt und schließlich mit Triton X-100 abgelöst. Die Messwerte stammen aus einem Durchlauf, sind somit Einzelbestimmungen ( $n = 1$ ).

#### 4.2.2 PC-3 Zellen

Das Referenzpeptid Melittin wird hinsichtlich der Wirkung auf die tumörose Zelllinie PC-3 getestet. In Abbildung 13 ist die mit dem Bionas Gerät gemessene Impedanz (A), Acidifikation (B) und Respiration (C) von PC-3 Zellen während der Exposition mit dem Peptid Melittin im Vergleich zu unbehandelten Zellen über der Zeit aufgetragen. Nach fünf Stunden Adaption wurde das Peptid auf die Zellen gegeben, was sich in einer unmittelbaren Abnahme aller aufgenommenen Kurven zeigte. Beide eingesetzten Konzentrationen führten zu einer sehr schnellen Abnahme der Zellimpedanz auf fast 0%. Auffällig ist dabei, dass die Impedanz bei 10  $\mu\text{M}$  Melittin (blau) früher und stärker abgesunken ist als bei 3  $\mu\text{M}$  (orange). Bei der geringeren Konzentration des Peptids nahm die Impedanz zunächst sogar etwas zu, um dann schnell abzunehmen. Auch bei der Acidifikation und Respiration zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen. Melittin führte in höherer Konzentration rasch zur Abnahme der Acidifikationsrate sowie der Respiration, während es in geringerer Konzentration zeitverzögert den selben Verlauf zeigte und bei der Acidifikation zu einer langsameren Abnahme führte. Allerdings wirkten sich die Konzentrationsunterschiede nur auf den zeitlichen Verlauf der Interaktion aus. Beide Konzentrationen führten rasch zu Werten nahe der 0% und damit zum Zelltod.

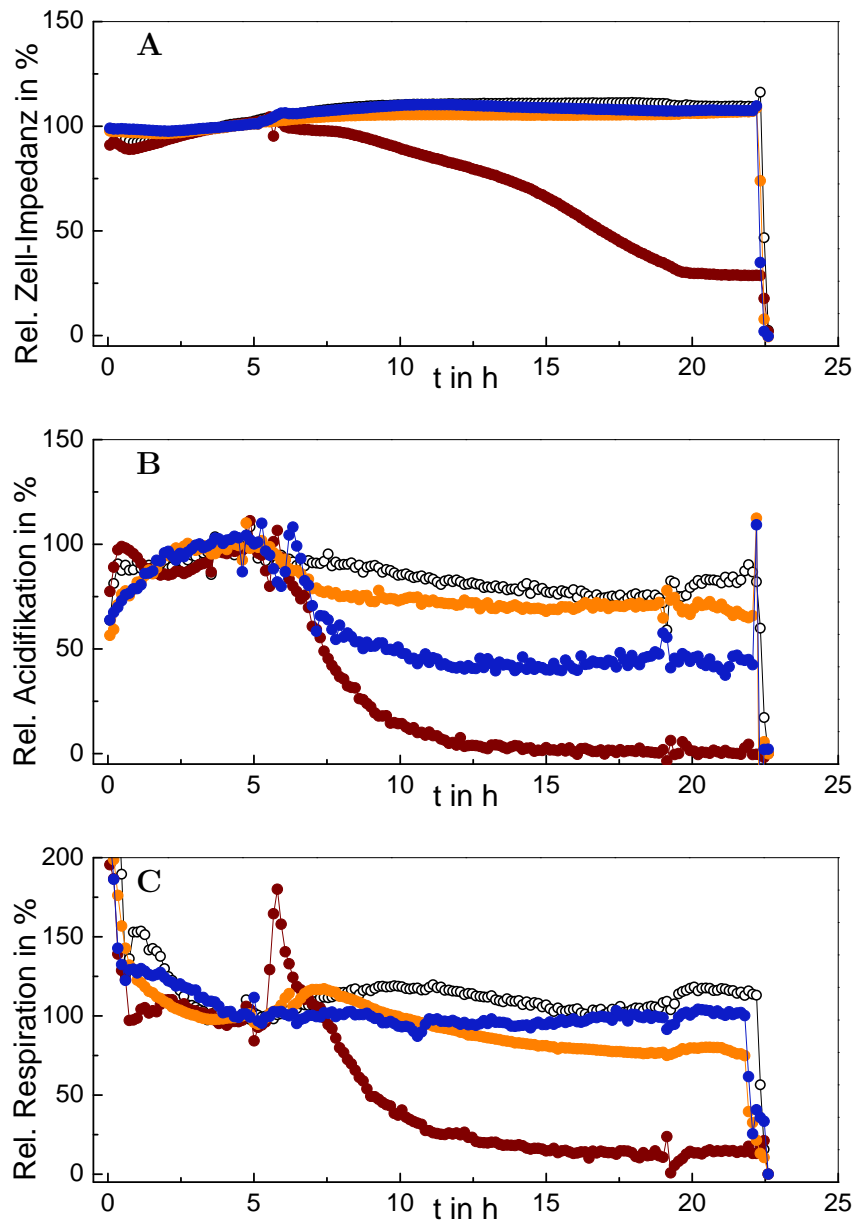


**Abb. 13:** PC-3 Zellen wurden mit dem Peptid Melittin behandelt und die metabolische sowie morphologische Zellantwort wird mittels des Bionas Systems aufgenommen. Das Peptid wurde in den Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  (orange) und 10  $\mu\text{M}$  (blau) auf die Zellen gegeben. Die schwarzen nicht gefüllten Kreise stehen für Kontrollzellen, die mit BRM ohne Peptid behandelt werden. Nach 5h Adaption sind die Zellen dem Peptid für 14 h lang ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium ohne Peptid versorgt und schließlich mit Triton X-100 abgelöst. Die Messwerte stammen aus einem Durchlauf und sind somit Einzelbestimmungen ( $n = 1$ ).

## 4.3 Echtzeit-Monitoring: Einfluss von Aspidasept auf zellphysiologische Parameter

### 4.3.1 HaCaT-Zellen

Da es sich bei den HaCaT-Zellen um eine gut beschriebene nicht tumoröse Zelllinie handelt, eignet sie sich als Referenz, um die Zytotoxizität von Aspidasept zu testen. In Abbildung 14 ist die mit dem Bionas Gerät gemessene Impedanz (A), Acidifikation (B) und Respiration (C) von HaCaT Zellen bei der Exposition mit dem Peptid Aspidasept über der Zeit aufgetragen. Nach einer Adaption von fünf Stunden mit BRM wurde auf Medium mit gelösten Peptid umgestellt. Die Impedanz verhielt sich bei 3 (orange) und 10  $\mu\text{M}$  (blau) Aspidasept analog zur Kontrolle, stieg demnach auch nach der Adaption leicht an, was auf ein weiteres Wachstum der Zellen hindeutet. Lediglich die höchste getestete Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  zeigte einen Einfluss auf die Zellimpedanz. Diese nahm über die gesamte Expositionszeit stetig ab, bis sie den Wert von 30% erreichte. Ab diesem Zeitpunkt wurde auf BRM ohne Peptid umgestellt, woraufhin die Impedanz konstant blieb, bis die Zellyse durch Triton X-100 einsetzte. Bei der Acidifikation zeigten sich Unterschiede zwischen den eingesetzten Konzentrationen. Bei 3  $\mu\text{M}$  lag die Kurve nur leicht unter der Kontrolle, während die Acidifikation bei 10  $\mu\text{M}$  auf etwa 50% nach einer Laufzeit von drei Stunden mit Peptid absank und dort konstant blieb. Bei 30  $\mu\text{M}$  fiel die Kurve am steilsten ab und erreichte nach etwa 12 Stunden Prozesszeit einen Wert nahe 0%, was darauf hin deutet, dass der Stoffwechsel nicht aufrecht erhalten werden konnte. Die Respiration zeigte geringe Unterschiede zwischen der Kontrolle sowie 3 und 10  $\mu\text{M}$  Aspidasept. Allerdings hatten 30  $\mu\text{M}$  Aspidasept einen deutlichen Einfluss auf die Respiration, was sich in einem ähnlich starken Abfall wie bei der Acidifikation äußerte. Auffällig ist zudem, dass die Respiration bei dieser höchsten Konzentration kurz nach Beginn der Exposition mit Peptid zunächst kurz stark anstieg um dann abzunehmen.

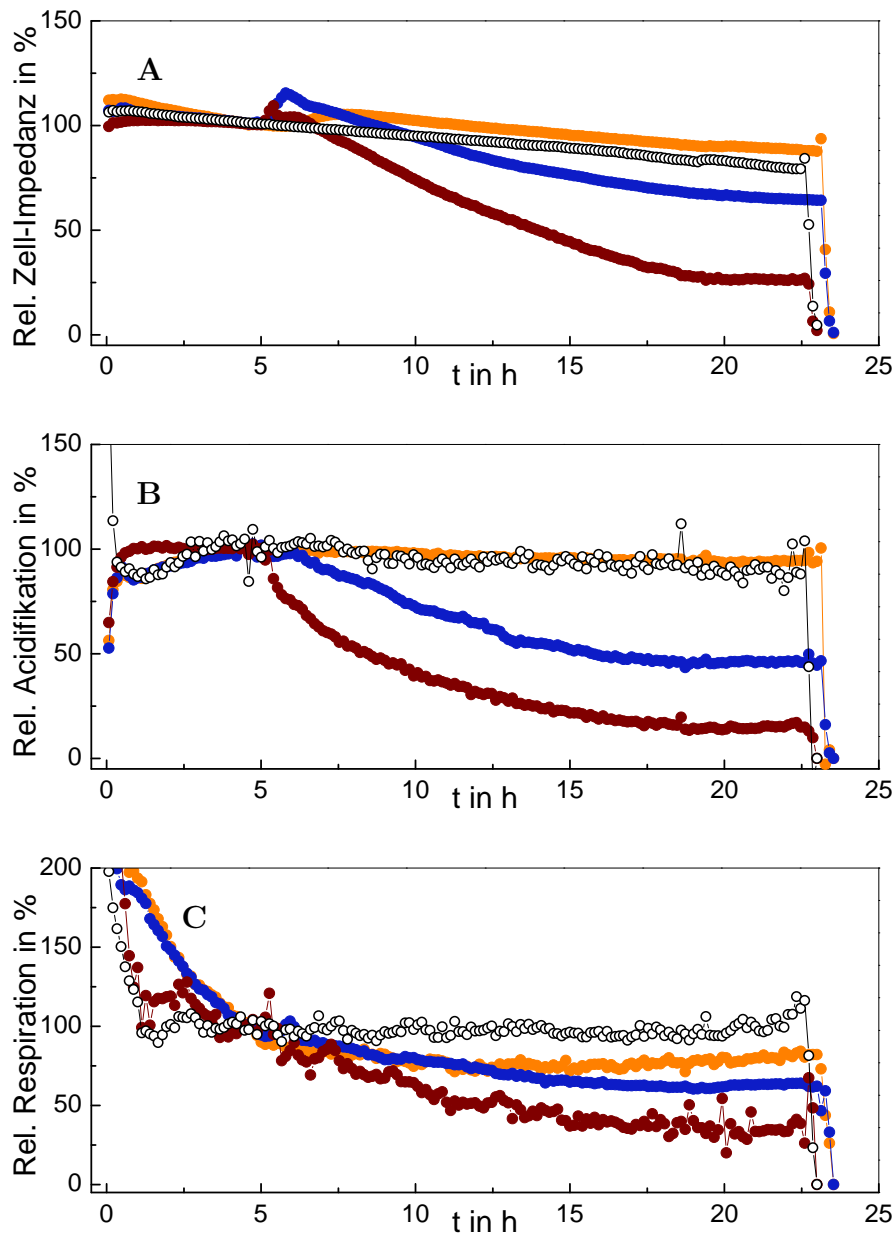


**Abb. 14:** HaCaT-Zellen wurden mit dem Peptid Aspidasept behandelt und die metabolische sowie morphologische Zellantwort wurde mittels des Bionas Systems aufgenommen. Das Peptid wurde in den Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  (orange), 10  $\mu\text{M}$  (blau) und 30  $\mu\text{M}$  (dunkelrot) auf die Zellen gegeben. Die schwarzen nicht gefüllten Kreise stehen für die Kontrollzellen, die mit BRM ohne Peptid behandelt werden. Nach 5 h Adaption waren die Zellen dem Peptid 14 h lang ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium ohne Peptid versorgt und schließlich mit Triton X-100 abgelöst. Aufgetragen sind die arithmetischen Mittelwerte zweier unabhängiger Durchläufe, lediglich die Werte der Aspidaseptkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  sind Einfachbestimmungen.

### 4.3.2 PC-3 Zellen

Die tumoröse Zelllinie PC-3 ist gut bekannt und eignet sich die mögliche erhöhte Wirksamkeit von Aspidasept gegenüber Tumorzellen zu untersuchen. In Abbildung 15 ist die mit dem Bionas Gerät gemessene Impedanz (A), Acidifikation (B) und Respiration (C) von PC-3 Zellen bei der Exposition mit dem Peptid Aspidasept über der Zeit aufgetragen. Nach einer Adaption von fünf Stunden mit BRM wurde auf Medium mit gelösten Peptid umgestellt. Bei geringer Peptidkonzentration zeigte sich kaum ein Einfluss auf die Impedanz. Ab einer Prozesszeit von etwa 6,5 Stunden stieg die Impedanz bei 3  $\mu\text{M}$  leicht an und begann ab 7,5 Stunden abzufallen. Dabei zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie bei den Kontrollzellen ohne Peptidexposition, wobei die Impedanz bei 3  $\mu\text{M}$  oberhalb der von den Kontrollzellen blieb. Auch bei 10  $\mu\text{M}$  lies sich zunächst ein Anstieg der Impedanz feststellen auf etwa 120%. Nach 6 Stunden Prozesszeit begann die Impedanz zu sinken bis sie beim Umstecken auf BRM ohne Peptid einen Wert von ca. 65% erreichte. Im Vergleich zu den Kontrollzellen war ein Effekt von Aspidasept auf die Impedanz bei dieser Konzentration bereits erkennbar. Auch bei 30  $\mu\text{M}$  stieg der Impedanzwert zu Beginn der Exposition an, fiel dann deutlich stärker als bei geringeren Konzentrationen bis zu einem Wert von 25% ab. Nach dem Umstellen auf BRM ohne Peptid blieben die Werte für alle Konzentrationen konstant. Die Messung der Acidifikationsraten offenbarte keinen Unterschied zwischen Kontrolle und 3  $\mu\text{M}$  Aspidasept. Bei beiden lieferten die Sensoren Werte um die 100% bis zum Auslösen der Lyse. Bei 10  $\mu\text{M}$  zeigte sich ein deutlicher Unterschied. So nahm die Acidifikation bei Peptidbehandlung stetig ab, bis auf BRM ohne Peptid umgestellt wurde. Die Acidifikationsrate erreichte zu diesem Zeitpunkt einen Wert von 45%. Die deutlichste Reaktion auf Aspidasept den Stoffwechsel betreffend zeigten die PC-3 Zellen jedoch bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$ . Die Acidifikationsrate fiel schneller und stärker ab als bei 10  $\mu\text{M}$  und erreichte einen Wert von etwa 15 %. Auch hier blieben die Werte nach dem Umstellen auf BRM ohne Peptid konstant. Bei der Respiration ließ sich ebenfalls eine Dosisabhängigkeit erkennen. Mit zunehmender Konzentration des Peptids Aspidasept sank auch die Respirationsrate weiter ab. Der geringste Abfall ließ sich bei 3  $\mu\text{M}$  erkennen, da hier der Wert bei 80% lag, wohingegen 10  $\mu\text{M}$  60% und 30  $\mu\text{M}$  ungefähr 35% erreichten. Wie auch bei der Impedanz und Acidifikation blieben

die Werte für die Respiration nach dem Umstecken auf BRM ohne Peptid konstant.

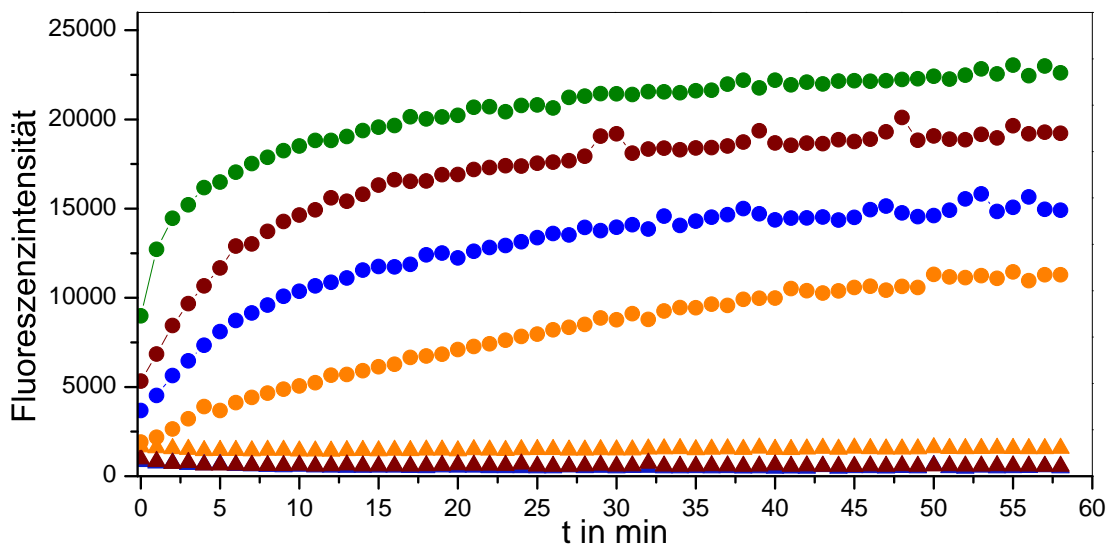


**Abb. 15:** PC-3 Zellen wurden mit dem Peptid Aspibasept behandelt und die metabolische sowie morphologische Zellantwort wird mittels des Bionas Systems aufgenommen. Das Peptid wurde in den Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  (orange), 10  $\mu\text{M}$  (blau) und 30  $\mu\text{M}$  (dunkelrot) auf die Zellen gegeben. Die schwarzen nicht gefüllten Kreise stehen für die Kontrollzellen, die mit BRM ohne Peptid behandelt wurden. Nach 5 h Adaption waren die Zellen dem Peptid 14 h lang ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit Medium ohne Peptid versorgt und schließlich mit Triton X-100 abgelöst. Aufgetragen sind die arithmetischen Mittelwerte zweier unabhängiger Durchläufe, lediglich die Werte der Aspibaseptkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  sind Einfachbestimmungen.

## 4.4 Messung der Zellmembranintegrität

### 4.4.1 HaCaT-Zellen

In Abbildung 16 aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität von Sytox<sup>®</sup> green bei HaCaT-Zellen. Triton X-100 wurde als Referenz eingesetzt, denn die membranlyisierende Wirkung dieses Tensids ist bekannt. Es zeigte eine schnelle Kinetik, erkennbar am zunächst steilen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit einer immer flacher werdenden Kurve bis zu einem Plateau. Triton lysierte die Membran, sodass sich Sytox<sup>®</sup> an die DNA anlagern konnte, was zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führte. Das Peptid Melittin verursachte ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, während Aspidasept in dieser Messreihe keinen Effekt zeigte. Mit steigender Melittinkonzentration nahm auch die gemessene Intensität zu, auch der Anstieg in den ersten Minuten der Messung wurde steiler. Dies zeigte den Einfluss der Peptidkonzentration auf den Grad der Membranlyse und damit der Zugänglichkeit der DNA für Sytox<sup>®</sup> green.

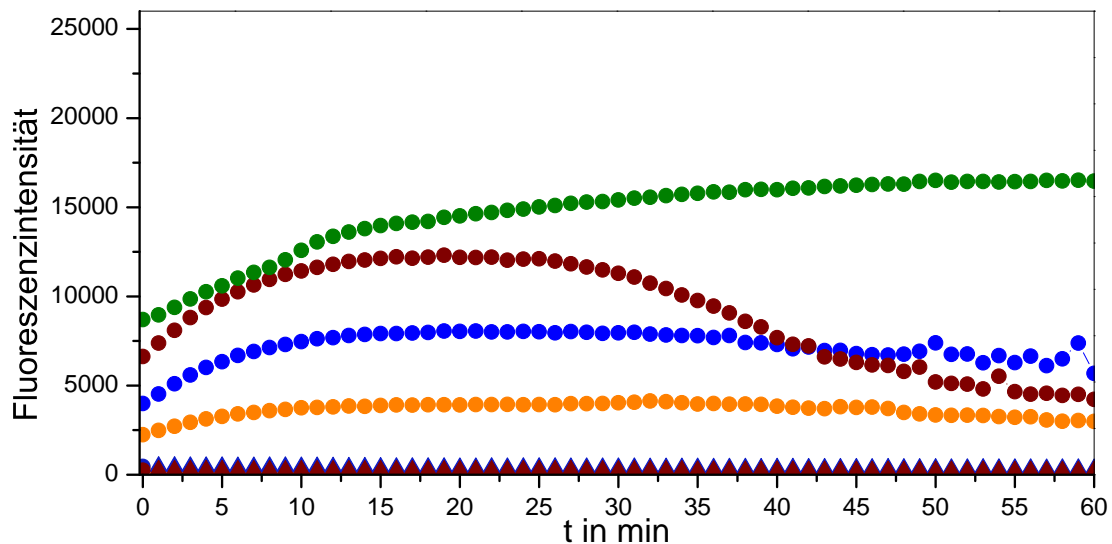


**Abb. 16:** Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität von Sytox<sup>®</sup> green über die Zeit. HaCaT-Zellen wurden mit den Peptiden Aspidasept und Melittin behandelt, Triton X-100 diente als Referenz. Eingesetzt wurden: 0,2 % Triton X-100 (grün); 30 μM Melittin (dunkelrote Kreise); 10 μM Melittin (blaue Kreise); 3 μM Melittin (orangene Kreise); 30 μM Aspidasept (dunkelrote Dreiecke); 10 μM Aspidasept (blaue Dreiecke); 3 μM Aspidasept (orangene Dreiecke). Diese Daten wurden freundlicherweise von M. Sc. Jan Rentel zur Verfügung gestellt.



#### 4.4.2 PC-3 Zellen

In Abbildung 17 aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität von Sytox<sup>®</sup> green mit PC-3 Zellen. Wie auch bei den HaCaT-Zellen zeigte die Behandlung der Zellen mit Triton X-100 und Sytox<sup>®</sup> green die höchste Fluoreszenzintensität. Aspidasept rief bei PC-3 Zellen ebenfalls keine Erhöhung des Messsignals hervor. Melittin führte konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, wobei 30  $\mu\text{M}$  die höchsten und 3  $\mu\text{M}$  die niedrigsten Werte lieferte. Auffällig ist allerdings, dass die Intensität bei 30  $\mu\text{M}$  Melittin nach ungefähr 25 Minuten begann abzufallen. Zudem lieferten sowohl Triton als auch Melittin deutlich niedrigere Intensitäten als die Messung mit HaCaT-Zellen.



**Abb. 17:** Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität von Sytox<sup>®</sup> green über die Zeit. PC-3 Zellen werden mit den Peptiden Aspidasept und Melittin behandelt, Triton X-100 diente als Referenz. Eingesetzt wurden: 0,2 % Triton X-100 (grün); 30  $\mu\text{M}$  Melittin (dunkelrote Kreise); 10  $\mu\text{M}$  Melittin (blaue Kreise); 3  $\mu\text{M}$  Melittin (orangene Kreise); 30  $\mu\text{M}$  Aspidasept (dunkelrote Dreiecke); 10  $\mu\text{M}$  Aspidasept (blaue Dreiecke); 3  $\mu\text{M}$  Aspidasept (orangene Dreiecke). Eine zweite Messung reproduzierte die dargestellten Kurvenverläufe.

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist es den Effekt von antimikrobiellen Peptiden auf den Metabolismus und die Morphologie von humanen Zellen in Echtzeit aufzunehmen. Zu diesem Zweck kommt das Bionas System zum Einsatz, es basiert auf einem Biosensor. In erster Linie wird das synthetische Peptid mit dem Handelsnamen Aspidasept hinsichtlich der Zytotoxizität und einer möglichen Wirkung gegen Tumorzellen untersucht und mit der Referenzzelllinie HaCaT verglichen.

### 5.1 Evaluation des Bionas Systems

Eine Überprüfung des verwendeten Messsystems vor Beginn der Experimente stellt sicher, dass die ermittelten Daten reproduzierbar sind und das Gerät einwandfrei funktioniert. Zu diesem Zweck werden die Sensoren getestet. Da die normierten Messreihen der Impedanzmessung gemittelt nur geringe Standardfehler zeigen (Abbildung 9 C), kann davon ausgegangen werden, dass jeder verwendete Mikrochip auf beiden Biomodulen reproduzierbare Messwerte liefert. Auch bei späteren Experimenten werden die gemessenen Kapazitäten normiert. Die Impedanzmessung funktioniert damit einwandfrei und kann verwendet werden. Auch die Messung der pH-Änderung ist reproduzierbar, was durch den kleinen Standardfehler bei der Auftragung der gemittelten normierten Messreihen (Abbildung 10 C) ersichtlich ist. Eine Überprüfung der Sauerstoffmessung kann nicht durchgeführt werden, da kein Verbraucher verfügbar war, der reproduzierbare Mengen Sauerstoff verbraucht. Da die untersuchten Sensoren einwandfrei arbeiten und auf beiden Biomodulen reproduzierbare Daten liefern, kann das Gerät im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden.

Das Laufmedium, mit dem die Zellen während der Messung versorgt werden, ist ein wichtiger Faktor. Aus diesem Grund werden drei verschiedene Medien getestet. Zum einen wird das Medium des Herstellers des Messgerätes mit und ohne den Zusatz von 0,1% FCS verwendet und zum anderen das Kultivierungsmedium DMEM (10% FCS). Unterschiede zwischen den beiden BRM-Varianten zeigen sich zu Beginn der Messung während der Adaption der Zellen an die neuen Begebenheiten. Da es für die Messungen

von Vorteil ist, wenn die Zellen sich schnell an die Bedingungen adaptieren und die Messwerte dementsprechend konstant sind, wird das BRM mit dem Zusatz von FCS bevorzugt. Obwohl das Kultivierungsmedium DMEM zu einer sehr schnellen Adaption und zu sehr konstanten Messwerten beiträgt, wird es in dieser Arbeit nicht als Laufmittel eingesetzt. Da es mit 10% einen hohen Anteil an FCS hat und es darum geht, mögliche Effekte der Medienbestandteile auf das Peptid zu minimieren, wird BRM mit 0,1% FCS eingesetzt. Des Weiteren wird von Ceriotti et al. beschrieben, dass ein wenig gepuffertes Medium wie das BRM zu weniger Rauschen und höheren Messwerten bei der Acidifikation führt im Vergleich zu stark gepufferten Medien wie DMEM [2]. In Abbildung 11 B liefern die BRM tatsächlich etwas höhere Acidifikationsraten.

## 5.2 Echtzeit-Monitoring: Einfluss von antimikrobiellen Peptiden auf zellphysiologische Parameter

Die in dieser Arbeit verwendete Messmethode ist eine Auswahl aus vielen verschiedenen Testmethoden, um die Zytotoxizität zu ermitteln. Im Gegensatz zu klassischen Endpunktbestimmungen, bei denen das Messergebnis erst am Ende der Reaktion ausgewertet werden kann, erlaubt das Bionas System ein permanentes Monitoring und damit Aussagen über die Zellantwort während der gesamten Messzeit. Es liefert damit den Vorteil statt einem Messergebnis den gesamten zeitlichen Verlauf aufzeichnen zu können. Es bildet dementsprechend in vivo Verhältnisse besser ab als Endpunktbestimmungen [1].

Das Referenzpeptid Melittin zeigt sowohl bei HaCaT als auch bei PC-3 Zellen einen starken Effekt in beiden getesteten Konzentrationen (3 und 10  $\mu\text{M}$ ), was sich mit ähnlichen Versuchen mithilfe des Bionas Systems aus der Literatur deckt [36, 37]. Im Gegensatz zu der Publikation von Drechsler und André aus dem Jahr 2011, zeigt sich auch bei der Acidifikation von HaCaT Zellen ein starkes Absinken der Werte [36]. Es ist somit ein sehr effektives Peptid, das unspezifisch einen starken Effekt auf tumoröse und nicht tumoröse Zelllinien zeigt. Der starke Abfall der Impedanz spricht für einen Verlust des Kontaktes der Zellen untereinander und zur Oberfläche des Chips bis hin zum Zelltod. Die Tatsache, dass nach Zugabe von Triton X-100 die Impedanz kaum noch sinkt, macht

deutlich, dass bereits die Mehrzahl der Zellen durch Melittin abgetötet wurden und sich von der Oberfläche des Mikrochips abgelöst haben. Die Zellen sind so stark beschädigt, dass sie ihren Metabolismus nicht aufrecht erhalten können, was sich durch ein starkes Absinken von Acidifikationsrate und Respiration zeigt. Dass die Ergebnisse denen wie bei Drechsler und André 2011 sowie Stefanie Gross 2015 beschrieben entsprechen, weist auf eine gute Reproduzierbarkeit dieser Methode hin. Außerdem macht es deutlich, dass Effekte und Zellantworten auf toxische Substanzen, in diesem Fall Peptide, detektiert werden können. Der toxische Effekt von Melittin auf die Integrität oder Permeabilität der Zellmembran lässt sich zusätzlich bei der Messung mittels Sytox green (Abbildungen 16 und 17) erkennen. Der Anstieg von den Fluoreszenzintensitäten bei Behandlung mit Melittin zeugt von einer Interaktion von Sytox green mit DNA, was nur durch eine teilweise oder komplette Zerstörung der Barrierenfunktion der Zellmembran ermöglicht werden kann. Dies zeigt sich bei beiden verwendeten Zelllinien, wobei der Verlauf von 30  $\mu\text{M}$  Melittin mit PC-3 Zellen von dem entsprechenden mit HaCaT Zellen abweicht.

Da das synthetische Peptid Aspidasept als vielversprechender Kandidat für eine Behandlung von Sepsis gilt, wurden bereits verschiedene Tests auf Zytotoxizität durchgeführt [27]. Als Beispiel wurde ein Assay mit Annexin V bei THP-1 Zellen (Leukozyten) durchgeführt [27]. Annexin färbt Phosphatidylserine an, die bei einer intakten Zellmembran auf der dem Cytosol zugewandten Seite liegen. Wird eine Fluoreszenz von Annexin gemessen, liegt also eine Zerstörung der Membranintegrität oder eine Apoptose vor. Bei Pfalzgraff et al. aus dem Jahr 2017 zeigt sich erst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  eine geringe Zytotoxizität, wobei nach 10  $\mu\text{M}$  30  $\mu\text{M}$  die höchste getestete Konzentration war [27]. Dies wird durch die Impedanzmessung von mit Aspidasept behandelten HaCaT Zellen als nicht tumoröse Zelllinie bestätigt (Abbildung 14). Während die Peptidkonzentrationen 3 und 10  $\mu\text{M}$  nahe der Kontrolle bleiben, fällt die Impedanzkurve bei 30  $\mu\text{M}$  deutlich ab, was eine Änderung der Zellmorphologie und teilweises Ablösen der Zellen von der Chipoberfläche anzeigt. Der leichte Anstieg der Impedanz bei den geringeren Konzentrationen kann entweder als ein weiteres Zellwachstum oder als eine Zellantwort auf den durch das Peptid ausgelösten Stress verstanden werden, indem die Zell-zu-Zell-Kontakte verstärkt und die Zellschicht kompakter wird [37]. Allerdings offenbart das Bionas System einen



Effekt von Aspidasept in geringeren Konzentrationen auf den Metabolismus von HaCaT Zellen. So ist der katabolische Stoffwechsel durch 3  $\mu\text{M}$  Aspidasept leicht und durch 10  $\mu\text{M}$  stärker eingeschränkt, was sich in der verringerten Acidifikationsrate zeigt. Auch die Respiration, also der Sauerstoffverbrauch ist eingeschränkt. Daraus lässt sich schließen, dass Aspidasept in geringen Konzentrationen zwar einen Effekt auf den Metabolismus von HaCaT Zellen hat und diese in ihrer Morphologie zwar Anzeichen von Stress zeigen, jedoch kein Abrunden oder Ablösen der Zellen ausgelöst wird. Dies geschieht erst bei 30  $\mu\text{M}$  Aspidasept. Interessanterweise zeigt die Messung der Membranintegrität mittels Sytox green keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei Aspidasept mit HaCaT Zellen, auch bei der Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  nicht (Abbildung 16). Da ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nur durch eine Interaktion von Sytox green mit DNA zustande kommt, reicht die Störung der Membranintegrität durch Aspidasept nicht aus, um Sytox in die Zelle gelangen zu lassen. Das kann entweder daran liegen, dass die Effekte von Aspidasept nicht auf einer Lyse beruhen oder dass die Konzentration nicht ausreicht, um eine solche auszulösen. Im Unterschied zum Sytox-Test wird beim Bionas System kontinuierlich frisches Medium nachgeliefert, in dem das Peptid gelöst ist. Aspidasept kann sich demnach an der Oberfläche der Zellmembran akkumulieren bis eine kritische Konzentration erreicht wird und sich ein Effekt zeigen kann.

Die PC-3 Zellen scheinen insgesamt empfindlicher auf die Behandlung mit Aspidasept zu reagieren. Denn auch wenn die geringe Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  eine Stressreaktion in Form von einer dichteren Zellschicht auslöst. Dies ist erkennbar an der leicht steigenden Impedanz zu Beginn der Exposition mit Aspidasept und die Respiration ist etwas beeinträchtigt (Abbildung 15). Die Zellen können ihren Stoffwechsel (Glycolyse und Citratzyklus) aufrecht erhalten, lediglich der Sauerstoffverbrauch ist etwas geringer. Da einige AMPs auch die Membran der Mitochondrien permeabilisieren können, sodass die Oxidative Phosphorylierung gestört wird, könnte dies auch bei Aspidasept der Fall sein [15]. Im Unterschied zu den HaCaT Zellen beginnt die Impedanz jedoch schon bei 10  $\mu\text{M}$  Aspidasept zu sinken, was auf ein teilweises Absterben der Zellen hindeutet. Auch Acidifikation und Respiration werden deutlich beeinflusst, was die Acidifikationsrate betrifft, in ähnlicher Weise wie es bei den HaCaT Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  der Fall ist. Während



die HaCaT Zellen bei dieser Konzentration lediglich hinsichtlich ihres Metabolismus beeinflusst werden, kommt es bei PC-3 Zellen bereits deutlich sichtbar zum Zelltod. Auch bei 10  $\mu\text{M}$  wird zunächst ein Anstieg der Impedanz beobachtet. Die höchste getestete Peptidkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  führt auch bei PC-3 Zellen zum Absterben des größten Teils der Zellschicht mit gleichzeitigen Einbruch der metabolischen Aktivität. Auffällig ist die Tatsache, dass obwohl beide Zelllinien ein ähnliches Verhalten bezüglich der Impedanz zeigen, wenn sie mit 30  $\mu\text{M}$  Aspidasept behandelt werden, der Metabolismus von HaCaT Zellen schneller beeinträchtigt zu werden scheint. Da es sich bei dieser Konzentration jedoch um Einzelbestimmungen handelt, kann hier keine endgültige Aussage getroffen werden. Analog zu dem Sytox-Test mit HaCaT zeigen auch PC-3 Zellen keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei der Behandlung mit Aspidasept. Da mit dem Bionas Gerät jedoch deutlich gezeigt werden konnte, dass Aspidasept in höheren Konzentrationen durchaus in der Lage ist den Zelltod bei beiden verwendeten Zelllinien herbei zu führen, gehe ich davon aus, dass sich das Peptid bei der Messung mit dem Bionas System an der Zellmembran akkumulieren kann und die kritische Konzentration höher liegt als bei 30  $\mu\text{M}$ . Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Fluoreszenzintensität nach 3 Stunden nicht weiter angestiegen ist (Werte hier nicht dargestellt). Eine Interaktion der kationischen Peptide mit der negativ geladenen DNA wäre ebenfalls möglich. Zusätzlich fällt beim Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von HaCaT und PC-3 Zellen auf, dass letztere geringere Werte liefern. Das kann daran liegen, dass die HaCaT Zellen sich schneller teilen und wachsen, sich somit mehr Zellen in den Wells befinden. Für diese Vermutung spricht der leichte Anstieg der Impedanz bei den Kontrollzellen, was für weiteres Zellwachstum und damit eine dichtere Zellschicht spricht und ebenfalls in den Ergebnissen von Stefanie Groß zu finden ist (Abbildung 14) [37]. Bei PC-3 Zellen ist dies nicht der Fall (Abbildung 15). Bei keiner der beiden Zelllinien konnte eine Regeneration während der Behandlung mit BRM ohne Peptid festgestellt werden.

Schlussfolgernd ist festzustellen, dass die PC-3 Zellen während des Echtzeit-Monitorings sensibler auf die Exposition mit Aspidasept zu reagieren scheinen, besonders bei der mittleren untersuchten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Bei HaCaT Zellen führt erst eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  zum Zelltod, während der Metabolismus bereits bei den geringeren



Konzentrationen beeinflusst wird. Dieses Ergebnis erweitert die bisherigen Zytotoxizitätsversuche von Pfalzgraff et al. um eine Unterscheidung zwischen Membrandisruption und Einfluss auf den Metabolismus. Das Ziel dieser Arbeit Endpunktbestimmungen den zeitlichen Verlauf hinzuzufügen und damit Unterschiede herausarbeiten zu können. Als zusätzliches Anwendungsgebiet über eine Behandlung von Sepsis hinaus, zeigt Aspidasept eine erhöhte Wirkung gegenüber Krebszellen, zumindest gegenüber der eingesetzten PC-3 Zelllinie. Diese Antikrebswirkung ist bereits von anderen Peptiden bekannt wie dem NK-2 [20, 36]. Allerdings zeigt NK-2 eine deutlich höhere Wirkung auf die tumoröse Zelllinie L-A-N-1 als Aspidasept auf PC-3 Zellen. So ist die Wirkung von 3  $\mu\text{M}$  NK-2 vergleichbar mit der von 30  $\mu\text{M}$  Aspidasept [36]. NK-2 ist hingegen weniger effektiv gegenüber PC-3 Zellen als Aspidasept, was deutlich macht, dass Zellarten sehr unterschiedlich reagieren können [37].



## 6 Ausblick

Um gesicherte Aussagen treffen zu können, müssen alle Werte mindestens als Doppelbestimmungen vorliegen. Dies ist ein Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten, um die in dieser Arbeit ermittelten Daten reproduzieren zu können. Des Weiteren kann der Einfluss des Mediums eine wichtige Rolle spielen. In der Literatur wird beschrieben, dass Peptide eine andere Wirkung zeigen, wenn statt purem BRM PBS mit 10% BRM verwendet wird [37]. Außerdem scheinen einige Peptide ihre Aktivität in Komplettmedium zu verlieren, weshalb hier auch BRM mit 0,1% FCS und nicht das Kultivierungsmedium DMEM verwendet wird, obwohl es sehr stabile Messwerte liefert [37]. Eine weiterführende Untersuchung hinsichtlich des Einflusses des Mediums auf die Aktivität der Peptide bietet sich demzufolge an. Dies kann auch ein Grund sein, warum Aspidasept bei der Membranintegritätsmessung keine Aktivität zeigt, denn im Gegensatz zum Bionas System wird das Peptid dort in PBS gelöst und auf die Zellen gegeben. Des Weiteren kann die Messung der Membranpermeabilität mittels Sytox green auch mit höheren Peptidkonzentrationen wiederholt werden, um die Theorie, dass sich Aspidasept beim Bionas System an der Zellmembran akkumuliert und höhere Konzentration zur Beeinträchtigung der Membran führen zu bestätigen. Weitere Versuche müssen durchgeführt werden, um diese Messungen mit Aspidasept zu validieren. Dabei müssen auch andere Zelllinien zum Einsatz kommen, da gezeigt wurde, dass sich Peptide hinsichtlich ihrer Wirkungsweise unterscheiden, je nachdem welcher Zelltyp untersucht wird [37]. Des Weiteren sollte eine Anwendung des Bionas Systems bei der Medikamentenentwicklung in Betracht gezogen werden, da es mithilfe des aufgenommenen zeitlichen Verlaufs eine Erweiterung zu klassischen Zytotoxizitätsmessungen darstellt und eine sehr feine Auflösung bietet. So kann wirklich sichergestellt werden, dass eine mögliche toxische Wirkung einer Substanz detektiert werden kann.



## 7 Zusammenfassung

In den letzten Jahren sind antimikrobielle Peptide stärker in den Fokus für Medikamentenentwicklung geraten. AMPs stellen nicht nur interessante Alternativen auf dem Gebiet der Antibiotika dar, sondern sind auch in anderen Feldern wie der Immunmodulation beziehungsweise bei der Bekämpfung von Sepsis und in der Krebsforschung. Es ist bekannt, dass einige AMPs neben ihrer Aktivität gegen verschiedene Bakterien auch eine Wirkung gegen Krebszellen zeigen. Als Zielstruktur werden negativ geladene Zellmembranen beschrieben, mit denen die kationischen Peptide interagieren können. Dabei wird die Integrität der Membran zerstört.

In dieser Arbeit wurde in erster Linie das synthetische Peptid Aspidasept mittels Echtzeit-Monitoring von zellphysiologischen Parametern hinsichtlich der Zytotoxizität gegenüber humaner Zellen untersucht. Es ist ein vielversprechender Wirkstoffkandidat für die Behandlung von Sepsis und insofern sind weitergehende Untersuchungen dieses Peptids interessant. Getestet wurden die nicht tumoröse Zelllinie HaCaT sowie die tumoröse Linie der PC-3 Zellen. Anhand von Referenzmessungen mit dem bekanntermaßen wirksamen Peptid Melittin, konnte die Funktion des Bionas Systems bestätigt werden. Auch bei der Messung der Membranintegrität mit Hilfe der Substanz Sytox green konnte die hohe Aktivität von Melittin dargestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Aspidasept insgesamt eine etwas höhere Aktivität gegen PC-3 Zellen als gegen HaCaT Zellen zeigt, was sich durch einen stärkeren Einfluss auf die Impedanz und damit Morphologie zeigt. Allerdings wird auch der Metabolismus der beiden Zelllinien beeinflusst. Aspidasept führt bei HaCaT Zellen erst mit höherer Konzentration zum Zelltod, obwohl bereits der Metabolismus vermindert ist. Dies erweitert die im Vorfeld von Pfalzgraff et al. durchgeführten Zytotoxizitätsmessungen. Das Ziel dieser Arbeit konnte mit den Stärken des Bionas Systems, also der Aufnahme eines zeitlichen Verlaufs, erfüllt werden. Das zeigt sich an dieser Erweiterung der Zytotoxizitätsdaten. Die erhöhte Aktivität gegenüber der tumorösen Zelllinie PC-3 ergänzt die Anwendungsmöglichkeiten von Aspidasept um einen weiteren Aspekt.

## Literatur

- [1] Elke Thedinga, Axel Kob, Heiko Holst, Andreas Keuer, Sabine Drechsler, Ricarda Niendorf, Werner Baumann, Ingo Freund, Mirko Lehmann und Ralf Ehret. „Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects“. In: *Toxicology and applied pharmacology* 220.1 (2007), S. 33–44.
- [2] L Ceriotti, A Kob, S Drechsler, J Ponti, E Thedinga, P Colpo, R Ehret und F Rossi. „Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system“. In: *Analytical biochemistry* 371.1 (2007), S. 92–104.
- [3] M Aires de Sousa und H De Lencastre. „Evolution of sporadic isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA“. In: *Journal of clinical microbiology* 41.8 (2003), S. 3806–3815.
- [4] Michael Zasloff. „Antimicrobial peptides of multicellular organisms“. In: *nature* 415.6870 (2002), S. 389–395.
- [5] A Giuliani, G Pirri, A Bozzi, A Di Giulio, M Aschi und AC Rinaldi. „Antimicrobial peptides: natural templates for synthetic membrane-active compounds“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 65.16 (2008), S. 2450–2460.
- [6] Teruhiro Utsugi, Alan J Schroit, Jerome Connor, Corazon D Bucana und Isaiah J Fidler. „Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes“. In: *Cancer research* 51.11 (1991), S. 3062–3066.
- [7] Guillermo Martinez De Tejada, Lena Heinbockel, Raquel Ferrer-Espada, Holger Heine, Christian Alexander, Sergio Bárcena-Varela, Torsten Goldmann, Wilmar Correa, Karl-Heinz Wiesmüller, Nicolas Gisch u. a. „Lipoproteins/peptides are sepsis-inducing toxins from bacteria that can be neutralized by synthetic anti-endotoxin peptides“. In: *Scientific reports* 5 (2015).
- [8] James P Hughes, Stephen Rees, S Barrett Kalindjian und Karen L Philpott. „Principles of early drug discovery“. In: *British journal of pharmacology* 162.6 (2011), S. 1239–1249.



- [9] Neil A Campbell, Jane B Reece und Lisa A Urry. *Biologie. 8., aktual. Aufl.* München: Pearson Studium, 2009.
- [10] Håvard Jenssen, Pamela Hamill und Robert EW Hancock. „Peptide antimicrobial agents“. In: *Clinical microbiology reviews* 19.3 (2006), S. 491–511.
- [11] Jochen Wiesner und Andreas Vilcinskis. „Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system“. In: *Virulence* 1.5 (2010), S. 440–464.
- [12] Maurizio Simmaco, Giuseppina Mignogna und Donatella Barra. „Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us?“ In: *Peptide Science* 47.6 (1998), S. 435–450.
- [13] Robert EW Hancock und Hans-Georg Sahl. „Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies“. In: *Nature biotechnology* 24.12 (2006), S. 1551–1557.
- [14] Burkhard Bechinger und Karl Lohner. „Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1758.9 (2006), S. 1529–1539.
- [15] Angela Risso, Enrico Braidot, Maria Concetta Sordano, Angelo Vianello, Francesco Macri, Barbara Skerlavaj, Margherita Zanetti, Renato Gennaro und Paolo Bernardi. „BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore“. In: *Molecular and cellular biology* 22.6 (2002), S. 1926–1935.
- [16] Michael R Yeaman und Nannette Y Yount. „Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance“. In: *Pharmacological reviews* 55.1 (2003), S. 27–55.
- [17] Lin Yang, Thad A Harroun, Thomas M Weiss, Lai Ding und Huey W Huang. „Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores“. In: *Biophysical journal* 81.3 (2001), S. 1475–1485.
- [18] Yechiel Shai. „Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1462.1 (1999), S. 55–70.

- [19] Katsumi Matsuzaki. „Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1462.1 (1999), S. 1–10.
- [20] David W Hoskin und Ayyalusamy Ramamoorthy. „Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778.2 (2008), S. 357–375.
- [21] JAF Op den Kamp. „Lipid asymmetry in membranes“. In: *Annual review of biochemistry* 48.1 (1979), S. 47–71.
- [22] Izabela Dobrzyńska, Barbara Szachowicz-Petelska, Stanisław Sulkowski und Zbigniew Figaszewski. „Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells“. In: *Molecular and cellular biochemistry* 276.1 (2005), S. 113–119.
- [23] Wan-Hee Yoon, Hae-Duck Park, Kyu Lim und Byung-Doo Hwang. „Effect of O-glycosylated mucin on invasion and metastasis of HM7 human colon cancer cells“. In: *Biochemical and biophysical research communications* 222.3 (1996), S. 694–699.
- [24] Michael D Burdick, Ann Harris, Colm J Reid, Takeshi Iwamura und Michael A Hollingsworth. „Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines“. In: *Journal of Biological Chemistry* 272.39 (1997), S. 24198–24202.
- [25] Miha Sok, Marjeta Šentjura und Milan Schara. „Membrane fluidity characteristics of human lung cancer“. In: *Cancer letters* 139.2 (1999), S. 215–220.
- [26] Klaus Brandenburg, Jörg Andrä, Patrick Garidel und Thomas Gutschmann. „Peptide-based treatment of sepsis“. In: *Applied microbiology and biotechnology* 90.3 (2011), S. 799–808.
- [27] Anja Pfalzgraff, Lena Heinbockel, Qi Su, Klaus Brandenburg und Günther Weindl. „Synthetic anti-endotoxin peptides inhibit cytoplasmic LPS-mediated responses“. In: *Biochemical Pharmacology* (2017).

- [28] Christian Alexander und Ernst Th Rietschel. „Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity“. In: *Journal of endotoxin research* 7.3 (2001), S. 167–202.
- [29] David C Morrison. „Antibiotic-mediated release of endotoxin and the pathogenesis of gram-negative sepsis.“ In: *Progress in clinical and biological research* 397 (1997), S. 199–207.
- [30] Dawn ME Bowdish und Robert EW Hancock. „Anti-endotoxin properties of cationic host defence peptides and proteins“. In: *Journal of endotoxin research* 11.4 (2005), S. 230–236.
- [31] Jörg Andrä und Matthias Leippe. „Candidacidal activity of shortened synthetic analogs of amoebapores and NK-lysin“. In: *Medical microbiology and immunology* 188.3 (1999), S. 117–124.
- [32] Christopher E Dempsey. „The actions of melittin on membranes“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1031.2 (1990), S. 143–161.
- [33] ME Kaighn, K Shankar Narayan, Y Ohnuki, JF Lechner und LW Jones. „Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3).“ In: *Investigative urology* 17.1 (1979), S. 16–23.
- [34] Petra Boukamp, Rule T Petrussevska, Dirk Breitkreutz, Jurgen Hornung, Alex Markham und Norbert E Fusenig. „Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.“ In: *The Journal of cell biology* 106.3 (1988), S. 761–771.
- [35] Kristine S Louis und Andre C Siegel. „Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods“. In: *Mammalian cell viability: methods and protocols* (2011), S. 7–12.
- [36] Sabine Drechsler und Jörg Andrä. „Online monitoring of metabolism and morphology of peptide-treated neuroblastoma cancer cells and keratinocytes“. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 43.3 (2011), S. 275–285.



- 
- [37] Stephanie Groß. „Evaluation of Antimicrobial Peptides as Anti-Cancer Agents against Equine Sarcoid and Human Prostate Adenocarcinoma Cells“. Diss. Freie Universität Berlin, 2015.



## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine Dankbarkeit Prof. Dr. Jörg Andrä gegenüber für die Gelegenheit diese Bachelor Thesis innerhalb des spannenden Themenbereichs der antimikrobiellen Peptide ansiedeln zu können zum Ausdruck bringen. Ebenso für die konstruktiven wöchentlichen Besprechungen und die wertvollen Ratschläge während der Entstehung dieser Arbeit bin ich dankbar.

Prof. Dr. Oliver Ullrich bin ich für die Möglichkeit im Labor für Zellkultur arbeiten zu können und für die Zustimmung diese Thesis als Gutachter zu lesen dankbar.

Ein herzlicher Dank gebührt auch Frau Schäfer für die vielen hilfreichen Hinweise und Tipps die Zellkultur betreffend.

Ebenfalls danken möchte ich Jan Rentel für die Unterstützung und Bereitstellung der Fluoreszenzdaten.

Auch Prof. Dr. Klaus Brandenburg möchte ich für die Bereitstellung des Peptids Aspida-sept danken.

Dem Forschungszentrum Borstel, Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften, danke ich für die Versorgung mit dem Peptid Melittin.

Da Teile dieser Arbeit bereits bei dem diesjährigen Glycolipid-Meeting in Hamburg präsentiert wurden, danke ich den Organisatoren Prof. Dr. Klaus Brandenburg und Prof. Dr. Volkmar Vill für diese Gelegenheit.