

5. årsoppgave i Stadium IV
medisinstudiet ved Universitetet i Tromsø

Anita Kristin Kjuul
Kull-00

”Anticancer effekt fra marine antimikrobiellepeptider
på neuroblastomcellelinjer”

Veileder: Professor Trond Flægstad, Barneavdelingen UiTø/UNN

Utført ved Barneavdelingens forskningslaboratorium ved
Universitetet i Tromsø, 2004-2005

INNHOLDSFORTEGNELSE

1. SAMMENDRAG	3
2. INTRODUKSJON.....	4
2.1 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDER.....	4
Generelt og inndeling i grupper	4
Mekanismer for aktivitet	5
Lytiske peptider og cancerceller	7
Py- peptidet	9
2.2 NEVROBLASTOM	9
Spredning og symptomer	10
Stadier og risikogrupper	11
Behandling	12
Barn og kreft. Det å leve etter kreftbehandling.....	12
3. MATERIAL OG METODER.....	14
3.1 CELLELINJER OG MEDIER	14
3.2 PEPTIDER	14
3.3 AKTIVITETSMÅLINGER	15
4. RESULTAT	16
4.1 Py-11 (N17).....	16
4.2 Py-11 (20 mer)	16
4.3 Py-21 (23 mer)	17
5. DISKUSJON.....	18
REFERANSER:.....	21
APPENDIX:	25
Figurer og tabeller kapittel 2	25
Figurer kapittel 4.....	30

1. SAMMENDRAG

Stadig flere barn som har fått diagnosen kreft overlever. Særlig små barn som er under vekst og utvikling er sårbare overfor bivirkninger og senvirkninger av mange av de konvensjonelle kreftbehandlings regimene. Det er derfor viktig å finne bedre og mer skånsomme behandlingsmetoder for å behandle kreft. Antimikrobielle peptider har i de siste årene vist en lovende tumorcellespesifikk aktivitet. Det isoleres og identifiseres stadig nye antimikrobielle peptider fra en rekke organismer, og det er et omfattende arbeid å kartlegge aktiviteten til alle disse peptidene.

I dette prosjektet har vi studert om antimikrobielle peptider isolert og identifisert fra pyntekrabbe (*Hyas araneus*), Py-11 og Py-21 kan ha en selektiv aktivitet på celler fra nevroblastom sammenlignet med normale celler. Resultatene antyder at peptidene P-11 og Py-21 fra hemocytter i pyntekrabbe har en selektiv aktivitet på nevroblastomceller sammenlignet med normalceller MRC-5. Denne aktiviteten syntes å være mest tydelig hos Py-11, mens Py-21 også har en aktivitet mot normalceller i de forsøkene som er utført her. Resultatene viser også at det har betydning for aktiviteten hvilket medium man dyrker cellene i. Dette kan være et resultat som følge av cellenes preferanse til ulike medier, men også en følge av at mediene påvirker peptidene direkte.

2. INTRODUKSJON

2.1 ANTIMIKROBIELLE PEPTIDER

Generelt og inndeling i grupper

Antimikrobielle peptider er genkodede polypeptider med varierende lengde og strukturer.

Man har funnet antimikrobielle peptider i alle typer levende organismer, inkludert mennesker, insekter, bakterier, vertebrater, invertebrater og planter (1-3). De har en funksjon i det uspesifikke immunforsvaret i disse artene og er med på å bekjempe mikrober. Disse beskyttelsesmekanismene er svært gamle og godt konserverte i alle organismer. Mobilisering av antimikrobielle peptider blir trolig raskt induisert av infeksjoner og skade, og er en del av den aller første responsen. I f.eks. insekter blir peptid frigjort som sekret fra immunologiske organ ("fat-body") over i hemolymfe. Innen få sekunder kan konsentrasjonen av antimikrobielle peptider i hemolymfe øke fra 1 til 100 μM .

Det er etter hvert mange peptider som er kjent og et klassifiseringssystem har blitt utarbeidet for å dele dem inn i grupper. Disse gruppene er vist i figur 2.1. Gruppeinndelingen er basert på kjemiske karakteristika til peptidene. De fleste antimikrobielle peptider er mindre enn 10 kDa, er kationske, amfipatiske og membranaktive. Antimikrobielle peptider har ofte vist seg å ha en aktivitet som er både antibakteriell, antifungal, antiviral og i noen tilfeller også antitumor(4). Det blir også forsket på den spermicide aktiviteten enkelte antimikrobiellepeptider har (bl.a. magainin-A), og mulig utnyttelse av denne effekten til prevensjonsmiddel (5).

Mekanismer for aktivitet

Lytiske peptid ødelegger membranens bi-layer integritet enten ved disruptjon eller ved å danne porer. Når bilaget er forstyrret vil det elektrokjemiske transmembran-potensialet kollapse, en influx av vann og ioner vil føre til at cellen sveller opp og dør. Denne ødeleggelsen av membraner skjer innen minutter etter at de lytiske peptidene interagerer med målmembranen (6,7).

Mange studier har blitt gjort for å forsøke å forklare *hvordan* peptidene ødelegger membraner i bakterier, men det er få entydige resultat. Man har forøvrig kommet frem til fem ulike modeller for å forklare den lytiske peptidmembran aktiviteten. Disse fem modellene er: "Barrel-stave" eller "helical bundle"modellen, teppemodellen, "toroidal"modellen, "detergent-like effect"modellen og "in-plane diffusion"modellen.

"Barrel-stave" modellen:

"Barrel-stave" modellen kjennetegnes av at de amfipatiske peptidene settet inn i den hydrofobe kjernen av bilaget i membranen og danner porer (fig 2.2) (4).

Denne modellen inkluderer flere individuelle steg: a) binding av monomere av peptidene på membranen, b) aggregering av peptidene til bunter, c) insersjon av buntene inn i membranen, og d) rekruttering av nye peptider for å gjøre pore diameteren større.

For at dette skal kunne skje må peptidet miste være 22 aminosyrer langt dersom det er α -heliks og minst 8 aminosyrer dersom det er β -sheet, ellers vil det ikke kunne nå igjennom hele membranen. Mellitin ødelegger trolig membraner ved "Barrel-stave" mekanismen. (4)

Teppemodellen:

Ifølge teppemodellen (fig 2.2) vil peptidene feste seg på membranen og dekke membranen som et teppe. Peptidene vil da interagere med de lipide hodegruppene på membranen. Orienteringen til peptidene vil gi lokale forstyrrelser i membran stabiliteten, og gi deformasjoner i form av store sprekker, lekkasje av cytoplasma komponenter, ødelagt membranpotensiale, og til slutt, disintegrasjon av cella (8).

"Toroidal"modellen:

Toroidalmodellen (smultringmodellen) er en videreføring av "Barrel-stave"modellen og teppemodellen. Magainin følger trolig denne modellen (9). Ifølge denne modellen vil peptidet først binde til membranen i en inaktiv form. Ved en viss ratio av peptid/lipid hodegrupper i membran vil toroidale porer oppstå(9). Figur 2.3 viser toroidamodellen og Barrel-stave-modellen. Hovedforskjellen på disse to modellene er at istedet for at peptider borer seg ned i membranen som i Barrel-stave-modellen, vil peptidene forbli integrerte med hodegruppene i membranlipidene, og peptidene bøyer membranen slik at det oppstår en pore(9).

Detergentmodellen:

Ifølge denne modellen vil bilaget bli ødelagt som en følge at det blir dannet miceller fra membranregioner med høy peptid tetthet(10).

"In-plane-diffusion"modellen:

De modellene som er beskrevet til nå krever relativt høye konsentrasjoner av kationske, amfipatiske α -heliks peptider. "In-plane-diffusion" modellen er foreslått for peptider som også viser aktivitet ved lave peptid/lipid ratio. Modellen tar utgangspunkt i et drag på

kurvaturen i membranen. Midlertidige porer kan bli dannet av peptider som beveger seg plant med membranen inne i bilaget, og forstyrrer pakkinga av bilaget(10).

Andre mekanismer for aktivitet:

Utenom det å kunne danne porer finnes det også andre mekanismer antimikrobielle peptider kan benytte for å drepe patogene mikroorganismer. Seminalplamin f.eks. dreper trolig bakterier ved å aktivere molekyler i autolysekaskaden inne i bakterie cellene. Peptidet PP-39 inhiberer proteinsyntese og vil induserer degradering av proteiner som trengs til DNA replikasjon i bakterier. Human neutrophil defensin-1 har trolig sin baktericide aktivitet ved å inhibere både proteinsyntese og DNA syntese(5).

Lytiske peptider og cancerceller

Man har i flere studie observert at naturlig forekommende peptid som f.eks. cecropin, magainin og dermaseptin er celleselektive(10). De binder og lyserer bakterier og tumorceller, og ikke normale mammalske celler. Andre peptider, som f.esk. melittin lyserer både bakterier, tumorceller og hemocytter (10).

Disse observasjonene antyder at peptidene er membranspesifikke. De er selektive for celler med spesifikke, gjenkjennelige membrankarakteristika. Man tror at ladningen i membran bilaget er viktig for peptid bindingen til membranen, mens hydrofobe interaksjoner mellom peptid og hodegruppene i lipidmembranen er avgjørende for omfanget av lyseringen. Andre faktorer som også bestemmer følsomheten til cellen er membranfluiditeten og transmembranpotensialet(10).

Antimikrobielle peptider er kjent for sin evne til å ødelegge bakterieceller. Bakterieceller og cancerceller har en del fellestrekk. De er begge negativt ladet, og har derfor stor evne til å binde kationske amfipatiske peptid. De har begge høye transmembran potensialer. Dette potensialet kan bli forstyrret ved destabilisering av membranen, noe som igjen gir lekkasje av elektrolytter og ender i celledød (10).

Normale nonmaligne mammalske celler fremstår som nøytrale i ladning og har som oftest lavt transmembran potensiale. Eukaryote celler inneholder også endel kolesterol. Kolesterol virker å beskytte cellene ved å endre membranfluiditeten og aktiviteten til membran assosierte lytiske peptider. Forsøk har vist en forsinkelse av cecropinaktivitet med økende andel kolesterol i membranen (11). Forsinkelsen gir cellen sjansen til å fjerne cecropin v.h.j.a. proteaser, og gir derfor økt resistens mot peptidet.

Humane tumorceller inneholder 3-7 ganger så mye fosfatidylserin i overflaten sammenlignet med normale celler (12). Fosfatidylserin sitter i den ytre delen av membranen og bidrar sterkt til den negativt ladede overflaten på den ytre membranen. Fosfatidylserin i normale human celler sitter primært på innsiden av membranen (12).

Disse forskjellene i membran komposisjon, fluiditet og membranpotensiale kan kanskje forklare den observerte preferansen enkelte kationske lytiske peptider viser for tumorceller fremfor normale eukaryote celler(10).

Py- peptidet

Py-11 og Py-21 er begge isolert fra hemocytter i pyntekrabbe (*Hyas araneus*) (13-15) Delvis aminosyresekvens er vist i tabell 2.1. Fullstendig sekvens er ikke kjent derfor er også dette prosjektet utført med syntetisk fremstilt peptider fra den kjente delsekvensen. Py-11 og Py-21 inneholder trolig modifiserte aminosyrer eller substitusjoner på C-terminalende som gjør aminosyresekvensering vanskelig (13). Videre arbeid har vist mer av sekvensen av Py-21 enn det som er vist her, og det viser seg at i den C-terminaleenden består av bl.a. 2 disulfidbruer(13).

Begge disse peptidene er rike på prolin og arginin. De inngår derfor trolig i gruppe 2 av klassifiseringen av antimirorbiellepeptider som er vist i figur 2.1. N-terminal del av begge peptidene har vist antibakteriell aktivitet mot både gram positive og gram negative bakterier(13). Generelt tror man at prolin-arginin rike peptider utøver sin antibakterielleaktivitet via intracellulære mekanismer og ikke ved å perforere membranen (16). Om dette også gjelder disse peptidene er ennå ikke kjent.

2.2 NEVROBLASTOM

Nevroblastoma utgår fra primitive celler, neuroblaster, i det sympatiske nervesystemet. De produserer derfor en rekke katekolaminer. Nevroblastoma er den mest vanlige ekstrakraniale solide tumor typen hos barn under 15 år (17). I Norden har nevroblastom en insidens på ca 1 per 100 000 barn (18). I USA er ca 90% av de ~600 nye tilfellene som blir diagnostisert hvert år, funnet hos barn under 5 år, med høyest insidens blant barn mellom 1-2 år (19).

Spredning og symptomer

I over 50% av tilfellene av nevroblastom finner man primærtumor i binyre. Resten oppstår i paraspinale sympatiske ganglier i toraks eller abdomen, eller i ganglier lokalisert i bekken (17). Nevroblastom spres i hovedsak til regionale lymfeknuter, skjelett og beinmarg. Hos veldig små barn (<1 år) med tumor i stadium 4S kan man av og til se et unikt spredningsmønster der man får spredning til lever og hud (17).

Symptomer hos barn med nevroblastom er i stor grad avhengig av hvor primærtumor og evt. metastase er lokalisert. Ca 60% av de primære tumorer er i abdomen og de kan ofte bli assosiert med palpable oppfyllninger, fordøyelsesproblemer, ubehag og smerte. Nevroblastom i toraks (ca 20%) blir ofte diagnostisert ved røntgen toraks. Man kan da ofte se symptomer som f.eks. respirasjons besvær, dysfagi og sirkulasjonsproblemer. Cervicale nevroblastoma (ca 5%) viser ofte palpable kuler og Horners syndrom. Tumorer i bekkenet (ca 5%) kan gi konstipasjon, resturin og ødemer. I ca 10% av tilfellene er ikke lokalisasjonen til primærtumor kjent (20).

Kliniske symptomer etter metastase varierer også bredt. I små barn under 1 år med metastase i lever (Pepper syndrom) kan få icterus og sirkulatoriske og respiratoriske problem. I denne aldersgruppen kan man også få blålige, små kuler subcutant som første symptom. Eldre barn har andre typiske metastaser og derfor også andre typiske symptomer. Diffuse beinsmerter, proptosis og periorbitale ecchymoser (Hutchinson syndrom) kan være symptomer ved metastase til beinmarg, skjelett og orbital tumor lokalisasjon. Generelle symptomer kan være dårlig tilvekst, feber, hypertensjon, takycardi og svette (20).

Forskning har ennå ikke kunnet finne noen utenforliggende årsak til nevroblastom. Det er heller ennå ikke bevist at nevroblastom er en del av noen utviklingsforstyrrelser, medfødte eller arvet syndrom, og det er heller ikke assosiert med annen malign sykdom (21). Knudson og Strong (22) har vist at opptil 22% av alle nevroblastom kan være et resultat av germcellemutasjon. Det virker som om denne gruppa følger en autosomalt dominant arverekke. De barna som er arvelig predisponert får tidligere diagnose (median alder for diagnose ca 9 mnd mot normal median alder for diagnose 18 mnd) og oftere mer omfattende sykdom med multifokale primære tumorer. Dette er i tråd med Knudsons "two hit hypotese".

Selv om noen altså har en medfødt predisposisjon for å utvikle nevroblastom er de fleste tilfellene spontant oppstått. Somatiske endringer som f.eks. tilførte alleler og aktivering av onkogener, tap av alleler eller endringer i tumorcelle ploiditet her blitt vist å ha en viktig rolle i utviklingen av sporadiske nevroblastomtilfeller (17).

Nevroblastompasienter blir delt inn i lav-, intermediat- og høyrisiko kategorier og blir behandlet etter hvilken gruppe de tilhører. Det "International Risk Grouping system" er basert på alder, tumor stadium, og ulike biologiske faktorer som blir brukt som prognostiske faktorer (bl.a. grad av MYCN amplifikasjon har vist seg å si noe om risiko) (tab 2.3) (20).

Stadier og risikogrupper

Nevroblastom blir delt inn i stadier etter et internasjonalt system; "International Neuroblastoma Staging System" (INSS) (Tab 2.2) (20)

Behandling

Ulike stadier krever ulike regime for behandling. Alder ved diagnosetidspunkt og prognostiske faktorer er også avgjørende for hvilken behandling man velger å gi. Kort sagt kan man si at kirurgi blir brukt som primærbehandling dersom det er en lokalisert tumor (stadium 1 og 2). Dersom det er dårlige prognostiske faktorer kan man velge å gi kjemoterapi i tillegg. Preoperativ kjemoterapi blir anbefalt ved stadium 3 nevroblastom. Megaterapi (høydose cellegift og/eller total stråling av hele kroppen) etterfulgt av autolog stamcelletransplantasjon blir anbefalt ved MYCN amplifiserte tumorer. Lokal stråleterapi kan være indisert ved aggressive tumorer, eller ufullstendig fjerning av primær tumor (20).

Metastatisk, stadium 4 nevroblastom, behandles med kjemoterapi, som følges av kirurgi dersom det er mulig og hensiktsmessig. Megaterapi etterfulgt av autolog stamcelleterapi kan være indisert for noen pasienter. Behandlingsstrategier hos barn under 1 år er tilsvarende de som man bruker på større barn, men man er ikke sikker på om megaterapi er indisert (20).

Behandlingen av det spesielle stadiet 4S kan variere veldig. Rundt 50% av klinisk "stille" tumorer, kan ofte komme best ut ved en "vent og se" strategi. Noen av dem vil gå tilbake spontant uten noen form for behandling, mens andre igjen vil utvikle seg i negativ retning og trenge behandling. Dersom det er en rask utvikling kan man benytte seg av kjemoterapi og/eller stråling. Dersom nødvendig kan man også benytte seg av kirurgi (20).

Barn og kreft. Det å leve etter kreftbehandling.

Behandlingen av kreft, også hos barn, blir stadig bedre og stadig flere barn overlever kreften. Av barn som får kreft i dag vil 75% overleve 5 år eller lenger, en økning på over 45% siden tidlig 1960 tallet (23). Når barn som har blitt behandlet for kreft lever lenger, ser man også

langtidseffekten av behandlingen bedre. Både kirurgi, stråling, noen typer kjemoterapi, og beinmargstransplantasjon kan gi sen virkninger. Den psykiske påkjennelsen det medfører å overleve en alvorlig sykdom vil også sette spor hos barnet og i måten foreldrene forholder seg til barnet.

Sen virkningene man har sett til nå viser at særlig kjemoterapi og stråling kan gi uheldige resultat over lang tid. Graden av ettervirkning avhengig av dovestørrelse og hyppighet, og er også avhengig av hvilke områder av kroppen behandlingen er rettet mot. Man ser en rekke utviklingsforstyrrelser inne hjernefunksjon, noe som gir seg utslag i redusert IQ (10-20 poeng), konsentrasjonsvansker, reduserte motoriske ferdigheter og nedsatt hukommelse. Svekket syn og hørsel, vekstreduksjon, hypotyreoidisme, nedsatt fertilitet, nedsatt hjerte/karfunksjon, respiratoriske problemer er sen effekter som er dokumentert. I tillegg har barn som har overlevd kreft en økt sjans for å utvikle en sekundær cancer senere i livet, dette gjelder særlig de som er behandlet med stråling (23).

På grunn av alle disse senvirkningene av kreftbehandling er det viktig å lete etter nye, gode og forhåpentligvis mer skånsomme for resten av barnet, behandlingsmetoder og midler. Her kan kanskje tumorcellespesifikke antimikrobielle peptider komme inn.

3. MATERIAL OG METODER

3.1 CELLELINJER OG MEDIER

Cellelinjene som ble benyttet var Kelly, en human nevroblastom cellelinje og som normalkotroll ble den humane embryofibroblastcellelinjen MRC-5 benyttet. Cellene ble dyrket i RPMI-1640 eller MEM vekstmedium, begge supplimert med 10% varmeinaktivert føtalt kalveserum. Cellene ble dyrket ved 37°C i en fuktet atmosfære med 5% CO₂. Før forsøk ble cellene dyrket i ønsket konsentrasjon i en 96 brønners mikrotiterplate i 16-24 timer for at de skulle få festet seg på platen før stimulering. Cellene ble så vasket med 100 µl medium uten serum før tilsetning av medium og peptid.

3.2 PEPTIDER

Peptidene som ble brukt i dette forsøket er isolert fra hemocytter fra pyntekrabbe (*Hyas araneus*) (13-15). Delvis aminosyresekvensen er kjent (tabell 2.1).

Peptidene benyttet i dette prosjektet er blitt syntetisk fremstilt ved en Fmoc prosedyre som beskrevet av Haug (13). Peptidene ble donert prosjektet fra Dr. Styrvold ved Institutt for Marin Bioteknologi, Norges Fiskerihøgskole.

Peptidene ble fortynnet i PBS- buffer til ønsket konsentrasjon, og oppbevart ved -20°C.

3.3 AKTIVITETSMÅLINGER

100 µl friske celler i medium tilsatt Alamar blue (1:10) ble sådd ut per brønn i et 96 brønners brett. Peptid ble fortynnet i PBS til ønsket konsentrasjon og tilsatt hver enkelt brønn. 6 paralleller for hver peptid konsentrasjon. I kontrollbrønnene ble det tilsatt PBS uten peptid i samme mengde. Det ble tilsatt peptid til en sluttkonsentrasjon i brønnen på 0, 10, 25, 50, 75 og 100 µg/ml. Platene ble satt til dyrkning ved 37 grader. Platene ble lest av spektrofotometrisk ved 570 nm etter 2 og 4 timer.

Ved endetidspunkt 24 timer ble metabolisme i levende celler målt ved mikrotetrazolium (MTT) basert calorimetrisk assay.

Medie og Alamar blue ble sugd av, og cellene vasket med PBS-. MTT løsning (5 ml/ml MTT i PBS) ble fortynnet 1:10 i 0,5% føtalt kalveserum. Celle fikk stå ved rom tempertur i minst 3 timer. 50 µl av supernatanten ble tatt av og 150 µl sur propanol (isopropanol med 0.33% HCl) tilsatt. Sto på risting i ca 20 min, og leser så av spektrofotometrisk ved OD 570 nm i en mikrotiterplateleser.

4. RESULTAT

4.1 Py-11 (N17)

Figur 4.1, 4.2 og 4.3 viser avlest absorbans ved 2 timer og 4 timer etter tilsats peptidet Py-11 i ulike konsentrasjoner, og avlest absorbans etter MTT 24 timer etter tilsats av peptid Py-11 (N 17). I Figur 4.1 er Py-11 (N 17) tilsatt nevroblastomacellelinjen Kelly, og man kan se at resultatene antyder en nedgang i celleaktivitet med økende konsentrasjon av peptid. resultatene er ikke entydige, særlig ikke ved 24 timer, men generelt kan man se en lavere celleaktivitet i cellekulturer som er tilsatt peptidet, sammenlignet med kontroll som ikke er tilsatt peptid. Når peptidet bli tilsatt normalcellelinjen MRC-5 kan man ikke se en slik effekt. Der antyder resultatene heller en økning i celleaktivitet ved økende konsentrasjon tilsatt Py 11 (N 17) peptid. Et unntak er 100 µg/ml peptid etter 24 timer og MTT.

Forsøket i figur 4.1 ble også utført med et annet cellemedium, MEM. Dette er fremstilt i figur 4.3. resultatene der viser ikke samme tendensen som i figur 4.1 der cellemediet RPMI ble benyttet. I figur 4.3 ser man i stedet resultater som ligner mer på de man ser med MRC-5 og Py 11 (N 17).

4.2 Py-11 (20 mer)

For peptidet Py 11 (20 mer) ble det dessverre kun gjort forsøk med Kelly celler i RPMI medie. Dette pga. en fryser som ble ødelagt, og påfølgende mangel på materiale. For Py-11 (20 mer) mot Kelly celler i RPMI medie er det som med Py-11 (N 17) en økende aktivitet med økende konsentrasjon

4.3 Py-21 (23 mer)

Samme forsøk ble utført med Py-21 som med Py 11 (N 17). Mot Kelly celler i RPMI medium, figur 4.5, kan det se ut som det er en viss økende aktivitet med økende konsentrasjon. Parallellene varierte en del i dette forsøket, noe som har gitt seg utslag i store standardavvik som man kan se i figuren.

Mot MRC-5 normalcellelinjen i RPMI medium, vist i figur 4.6, kan man også se en økende aktivitet med økende konsentrasjon av peptid. I figur 4.7 Kan man se at også i MEM medie har Py 21 en økende aktivitet mot Kelly celler med økende konsentrasjon. Denne aktiviteten er særlig synlig etter 2 timer.

5. DISKUSJON

I dette prosjektet ble to forskjellige antimikrobielle peptider isolert fra pyntekrabbe testet for aktivitet på neuroblastomcellelinjen Kelly. Denne aktiviteten ble sammenlignet med aktiviteten mot normalcellelinjen MRC-5, og det ble også gjort forsøk for å se om cellemediet brukt under forsøket hadde noen innvirkning på aktiviteten. Resultatene antyder at Py-11 og Py-21 har en aktivitet mot Kelly neuroblastomceller. Denne aktiviteten virker å være mer tumorspesifikk for Py-11 (N 17) enn for Py-21 som også virker å ha en aktivitet mot MRC-5 normalceller. Det er forskjell på aktiviteten mot Kelly celler i ulike medier, særlig tydelig er det med Py-11 (N 17) som gir en synlig lavere aktivitet mot Kelly celler i MEM medium enn i RPMI medium i de forsøkene som er gjort her.

Py-11 og Py-21 har antibakteriell aktivitet i lave konsentrasjoner mot en rekke ulike bakterier. Peptidene er rensset fra hemolymfe i pyntekrabbe. Etter rensing får man kun små mengder rent peptid. Sannsynligvis inneholder peptidet i N-terminalende noen modifiserte aminosyrer. Derfor er det vanskelig å få en full sekvens av peptidene. Etter å ha syntetisert deler av peptidet har man vist at også disse ufullstendige peptidene har god antibakteriell aktivitet (13). Det er forøvrig mulig at fullsekvens peptider ville gitt et annet resultat i dette prosjektet. Det er vanskelig og forutsi, og man må evt. gjøre nye forsøk med fullsekvens peptider for å finne det ut.

Den antibakterielle aktiviteten til mange prolinrike antimikrobielle peptider skyldes trolig intracellulær aktivitet (16). Både Py-11 og Py-21 er prolinrike. Det er ikke ennå klart mekanismene for den antibakterielle aktiviteten til disse to peptidene, men det er en god sjanse for at de har likhetstrekk med andre peptider i samme gruppe. Tumorspesifikk aktivitet fra

antimikrobiellepeptider har trolig et grunnlag i endringer i membranen til cancerceller(10-12). Dersom Py-11 og Py-21 har intracellulær aktivitet kan kanskje det forklare hvorfor de ikke viser klarere cancercellespesifikk aktivitet i forsøkene som er utført her. Andre marine antimikrobiellepeptider med en mer membranspesifikk aktivitet kan kanskje være bedre kandidater til eventuelle videre forsøk.

Resultatene i figur 4.1-4.7 er alle vist med standardavvik. Til tider er dette standardavviket stort, som f.eks. i figur 4.1 og 4.5. Dette antyder at det er store feilkilder i forsøkene. Den viktigste feilkilden er nok at en som ikke er så erfaren med celloarbeid har utført forsøkene. Sterilteknikk og celloarbeid krever trening og resultatene blir mer konsekvente når man har tilegnet seg en viss erfaring innefor området. Det var vanskelig å få likt antall celler i hver brønn. Sannsynligvis ville dette også ha blitt lettere med trening. Ulikt celleantall i brønnene vil selvfølgelig gi store forskjeller i målt aktivitet i de ulike brønnene. Peptidene skal fortynnes i stor grad. Dette er også en kilde til feil. Fortynningene er gjort trinnvis for å unngå de største feilene, men det er likevel vanskelig å sammenligne ulike forsøksoppsett grunnet denne feilkilden.

De målemetodene som er valgt er Alamar Blue og MTT farging. Begge metodene måler metabolismen i cellene. Døde celler vil selvfølgelig ikke ha noen metabolisme, men også levende celler kan ha redusert metabolisme under forskjellige omstendigheter. Andre forsøk må derfor til for å vise hvilken effekt peptidene virkelig har på cellene. Mekanismen for aktiviteten må det selvfølgelig også gjøres mye arbeid på dersom man skal kunne bestemme f.eks. om aktivitetene kommer på grunn av påvirkning av membran eller intracellulært.

Det er fra disse forsøkene en klar indikasjon på at valg av cellemedium påvirker den målte aktiviteten. Dette er et kjent fenomen innen forskning på antimikrobielle peptider. Bl.a har Kjuul et al (24) vist at aktiviteten til cecropin overfor fiskepatogene bakterier blir betydelig redusert ved økende saltkonsentrasjon. Dette kan skyldes både peptid spesifikke ting, men også cellespesifikke ting kan her virke inn. Ulike medier kan gjøre cellene mer eller mindre følsomme for peptid av en rekke ulike årsaker, bl.a. veksthastighet, osmoregulering, induksjon av ulike systemer intracellulært, uttrykk av ulike overflate proteiner kan variere i ulike medier for ulike celler. Derfor må man også sammenligne aktiviteten for ulike celletyper med stor forsiktighet.

Det hadde vært av interesse å videre utforske denne aktiviteten som man ser fra Py-11 og Py-21 på nevroblastomcellelinjen Kelly. Særlig Py-11 (N 17) som virker å være mer selektiv for hvilke celler de har aktivitet mot. Andre cellelinjer, kanskje andre cancercellelinjer, kan kanskje vise seg å være mer følsomme for peptidene, og det er også mulig at dersom man får større mengder av peptidet og kan teste ut aktiviteten ved høyere konsentrasjoner at man da kan se tydeligere effekt. Det er også identifisert flere peptider fra pyntekrabbe og andre marine organismer som også kan testes ut. Det er uansett et poeng at peptidene viser å ha en effekt på humane cellelinjer. Det innebærer at videre testing må til før man kan bruke peptidene f.eks. antibakterielt i mennesker. Celletoksisiteten må videre utredes. I alle fall dersom terapeutisk dose ligger i konsentrasjonsområdet som er testet her eller høyere.

REFERANSER:

1. Boman HG, Faye I, Gudmundsson GH, Lee JY & Lindholm DA. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *Cell* 1991;201:23-31
2. Lehrer RI & Ganz T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Current Opinions in Immunology* 1999;11:23-7
3. Hoffman JA, Kafatos FC, Janeway CA & Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313-18
4. Shai Y. From innate immunity to de-Novo designed antimicrobial peptides. *Current Pharmaceutical Design* 2002;8:715-25
5. Reddy KVR, Yedery RD & Aranha. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004;24:536-47
6. Chen HM, Clayton A, Wang W & Sawyer WH. Kineticss of membrane lysis by custom lytic peptides and peptide orientation in membrane. *European Journal of Biochemistry* 2001;268:1659-69
7. Chen HM, Leung KW, Thakur NN, Tan A & Jack RW. Distinguishing between different pathways of bilayer disruption by the related antimicrobial peptides cecropin B, B1 and B3. *European Journal of Biochemistry* 2003;270:911-20

8. Powers JP & Hancock REW. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* 2003;24:1681-91

9. Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L & Huang HHW. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 1996;35:13723-8

10. Leuschner C & Hansel W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. *Current Pharmaceutical Design*. 2004;10:2299-310

11. Silvestro L, Gupt K, Weiser JN & Axelson PH. The concentration dependent membran activity of cecropin A. *Biochemistry* 1997;36:11452-60

12. Utsigi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD & Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membran leaflet of human tumor celled and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Research* 1991;51:3062-6

13. Haug T. Marine bioprospecting: Marine invertebrae and algae- a potential source fo the discovery of novel antibiotics. [Dr. Scient. Thesis.] Norwegian College of Fishery Science, University of Tromsø (ISBN: 82-91086-33-8) 2004

14. Haug T, Kjuul AK, Stensvåg K, Sandsdalen E & Styrvold OB. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology* 2002;12:371-85

15. Haug T, Stenssvåg K, Styrvold OB, Sandsdalen E & Sperstad S. Novel crustacean proline-rich peptides. International Patent Application, No. PCT/NO2005/000151, filed 06.05.2005
16. Kragol G, Hoffman R, Chattergoon MA, Lovas S, Cudic M, Bulet P, Condie BA, Rosengren KJ, Montaner LJ & Otvos L. Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrolicorin. European Journal of Biochemistry 2002;269:4226-37
17. Brodeur GM. Neuroblastoma: Biological insight into a clinical enigma. Nature Reviews 2003;3:203-16
18. Lie SO. Barn med kreft-store fremskritt, mange gleder og noen skuffelser. Tidsskrift for Norsk Lægeforening 2001;8:951-5
19. Grovas A, Fremgen A, Rauck A, Ruymann FB, Hutchinson CL, Winchester DP & Mench HR. The national cancer data base report on patterns of childhood cancers in the United States. Cancer 1997;80:2321-32
20. Schell M & Bergeron. Neuroblastoma. Orphanet Encyclopedia.
<http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-neuroblastoma.pdf> 2003, okt
21. Kushner BH. Neuroblastoma: a disease requiring a multitude of imaging studies. The Journal of Nuclear Medicine 2004;45:1172-88

22. Knudson AG & Strong LC. Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. American Journal of Human Genetics 1972; 24:514-22

23. National Cancer institute. Late effect of childhood cancer therapies.
www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/lateeffects/HealthProfessional 2005, mai

24. Kjuul AK, Büllsbach EE, Espelid S, Dunham R, Jørgensen TØ, Warr GW & Styrvoid OB. Effects of cecropin peptides on bacteria pathogenic to fish. Journal of Fish Diseases 1999;22:387-94

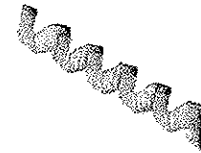
APPENDIX:

Figurer og tabeller kapittel 2

Classification of Cytolytic Antimicrobial Peptides Based on their Chemical Characteristics

1. Linear helical peptides without Cys. with or without a hinge

Cecropin B	KWKIFKKIEKVGRNIRNGIHKAGPAVAVLGEAKAL
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS
LL 37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVORIKDFLRNLVPRTES



2. Peptide without Cys. and enriched with one or two amino acids (Pro-Arg, Trp or His)

PR-39	RRRPRPPYLPRPAPPPPEFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF
Indolicidin	ILPWKWPWWPWR
Histatin 1	DSHEERHHGRHGHKHYGRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN

3. Peptides with one disulfide bond

Bovine dodecapeptide	RLCRIVVIRVCR
Esculentin 1A	GIFSKLAGKKIKNLLISGLKNVGKEVGMVVRTGIDIAGCKIKGEC

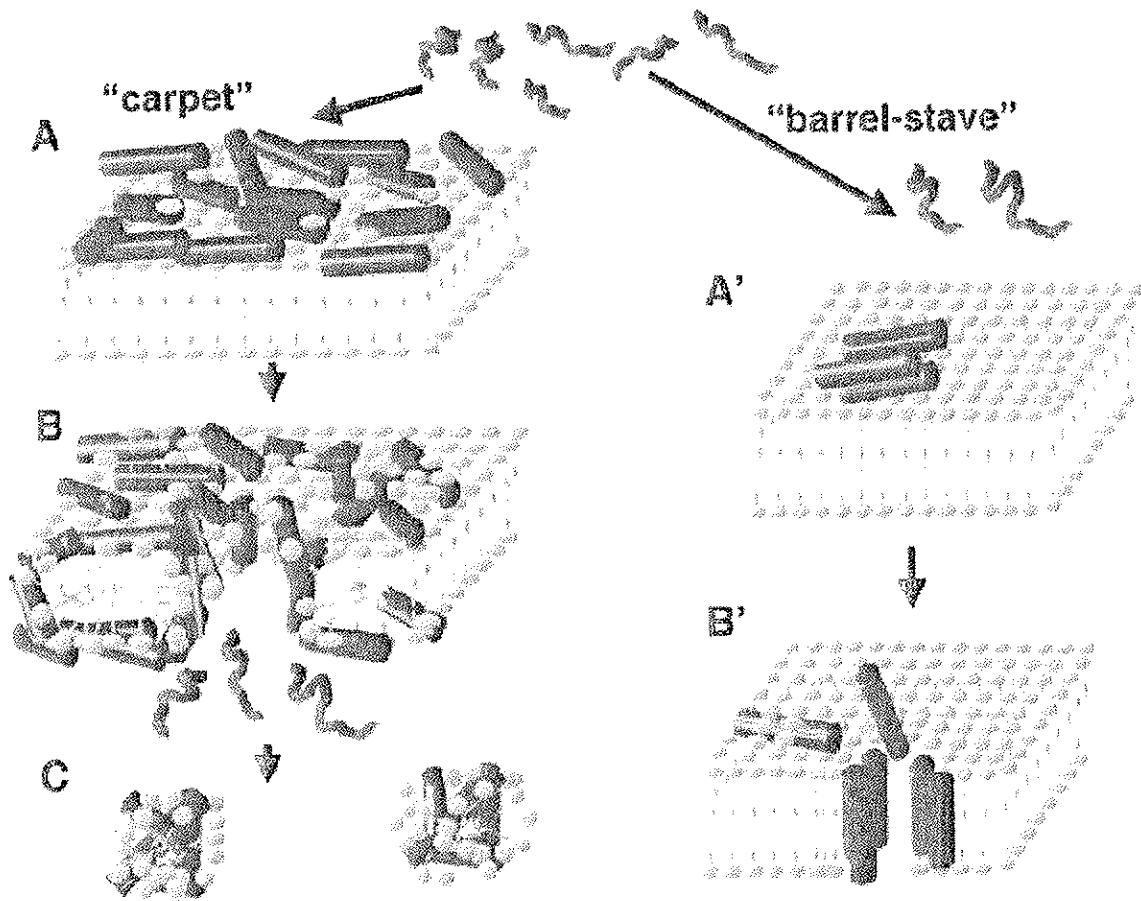
4. Peptides with two or more S-S bonds. Mainly or exclusively β -sheet

Tachyplesin 1	KWCFFVGYRGICYRRCR
Protegrin 1	RGGRLCYCRRFVGVGR
Human defensin 4	VCSCRLVFCRRETELRYGNCLIGGVSFTYCCTRY

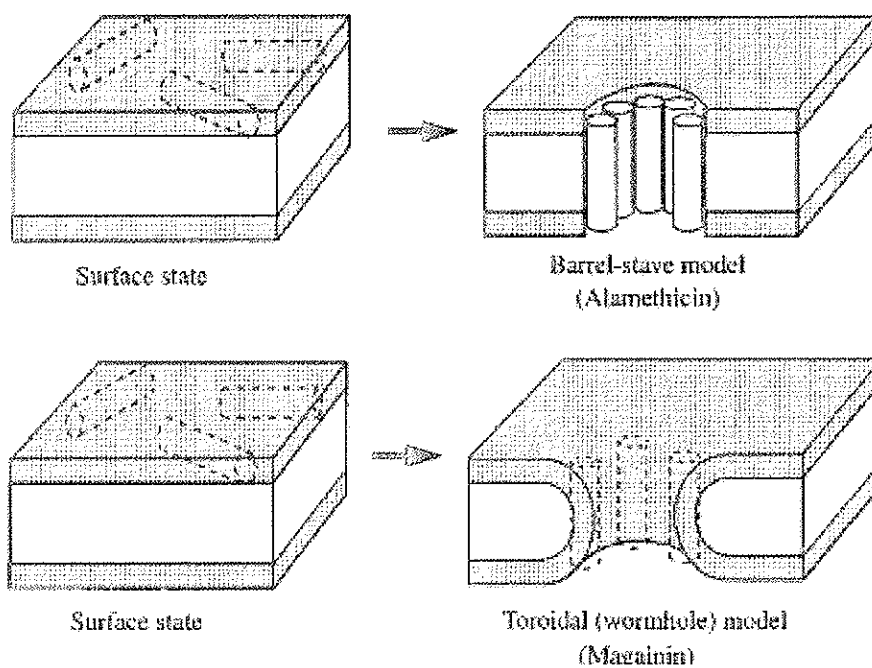
HUMAN DEFENIN



Figur 2.1 Gruppeinndeling av antimikrobielle peptider basert på kjemiske egenskaper, med eksepler på peptider som tilhører de ulike gruppene (4).



Figur 2.2 Teppemodellen og "barrel -stave"modellen for membranaktivitet til antimikrobiellepeptider (4).



Figur 2.3 Toroidalmodellene (smultring) vs Barrel-stavemodellene (9).

Tabell 2.1 Peptidsekvenser (13, 15).

Navn	Aminosyresekvens	Molekylvekt	Renhet
Py-11 20 mer	WQRPL TRPRP FSRPR PYRPN	2577,97	97,7%
Py-11 N17	PL TRPRP FSRPR PYRPN	2107,43	95,1%
Py-21 23 mer	SRWPS PGRPR PFPGR PKPIF RRR	2801,27	100%

Tabell 2.2 The International Neuroblastom Staging System (INSS) (20).

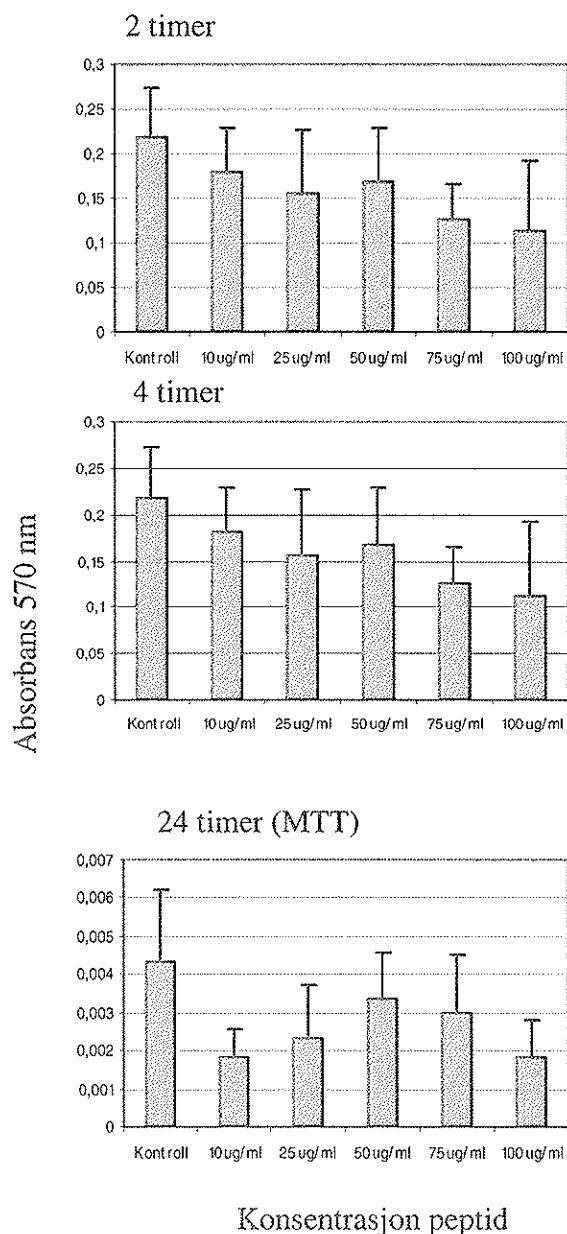
Stadium 1	lokalisert tumor som kan fjernes totalt med eller uten mikroskopisk residual sykdom; representative ipsilaterale lymfeknuter er negative for tumor mikroskopisk (lymfeknuter festet på tumor og fjerna med tumor kan være positive)
Stadium 2A	Lokalisert tumor som ikke kan fjernes totalt; representative ipsilaterale nonadherente lymfeknuter negative for tumor mikroskopisk.
Stadium 2B	Lokalisert tumor som kan eller ikke kan fjernes totalt; ipsilaterale nonadherente lymfeknuter positive for tumor. Forstørrede kontralaterale lymfeknuter må være negative for tumor mikroskopisk.
Stadium 3	Unilateral tumor som ikke kan fjernes totalt som infiltrerer over midtlinjen med eller uten regional lymfeknute affeksjon; eller lokalisert unilateral tumor med kontralateral regional lymfeknute affeksjon; eller midtlinjetumor med bilateral utbredelse med infiltrasjon eller bilateral lymfeknute affeksjon.
Stadium 4	Alle typer primære tumorer som har gitt spredning til fjerne lymfeknuter, skjelett, beinmarg, lever, hud og/eller andre organ
Stadium 4S	Lokalisert primær tumor (som definert for stadium 1, 2A eller 2B) med spredning begrensa til hud, lever og/eller beinmarg. Kun barn < 1 år.

Tabell 2.3 Risikogruppe inndeling av nevroblastoma basert på kliniske og biologiske egenskaper (20).

Stadium	Lav risiko	Middels risiko	Høy risiko
1	alle	ingen	ingen
2A og 2B	alder <1 år, eller alder 1-21 år og MYCN non-AMP, eller alder 1-21 år og MYCN AMP + FH	ingen	alder 1-21 år og MYCN AMP + UH
3	ingen	Alder <1 år og MYCN non-AMP, eller alder 1-21 år og MYCN non-AMP + FH	alder 0-21 år og MYCN AMP, eller alder 1-21 år and MYCN non-AMP + UH
4	ingen	alder <1 år og MYCN non-AMP	alder < 1 år og MYC AMP, eller alder 1-21 år
4S	MYCN non-AMP + FH + DI>1	MYCN non-AMP + UH + DI=1	MYCN AMP

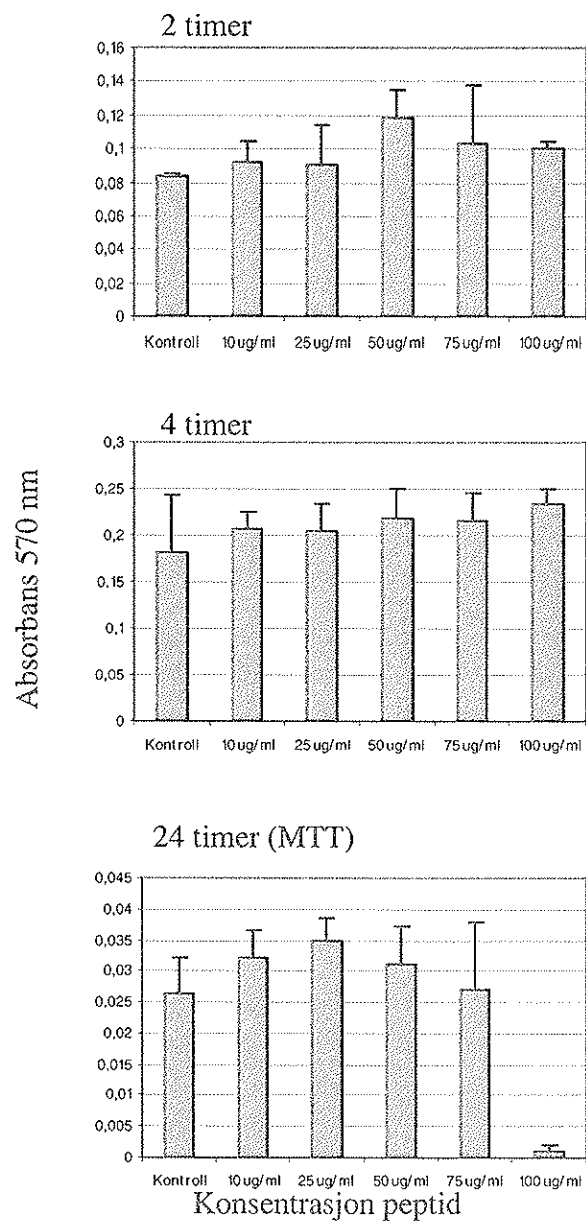
AMP= amplifisert; non-AMP= ikke amplifisert; DI= DNA indeks (ploiditet); FH= favorabel histologi; UH= ufavorabel histologi

Figurer kapittel 4



Figur 4.1. Py-11 (N 17) behandlede Kelly celler i RPMI medie.

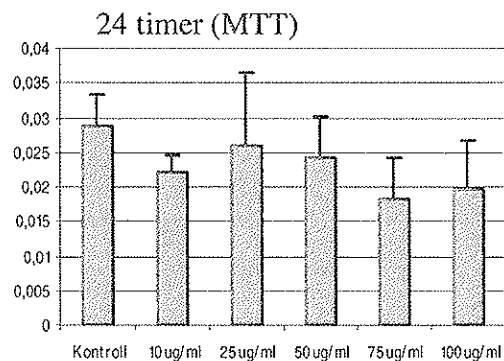
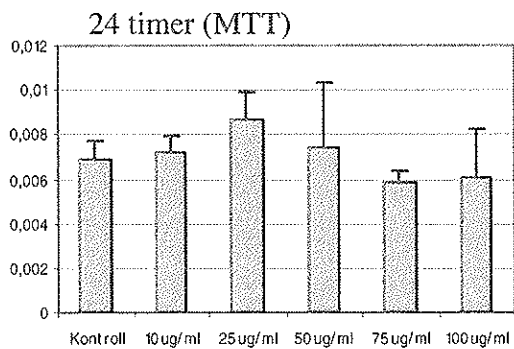
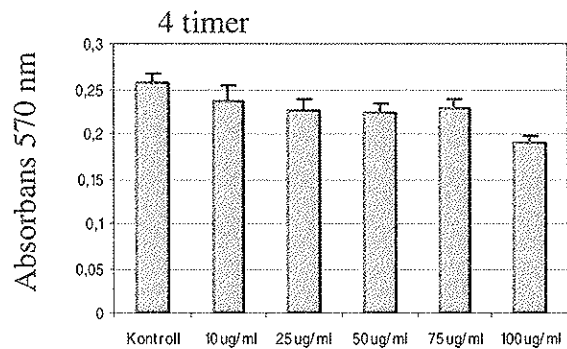
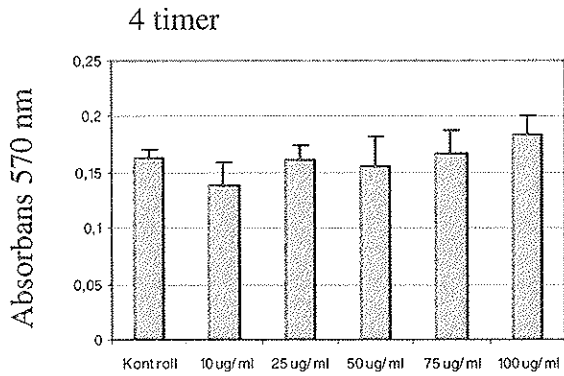
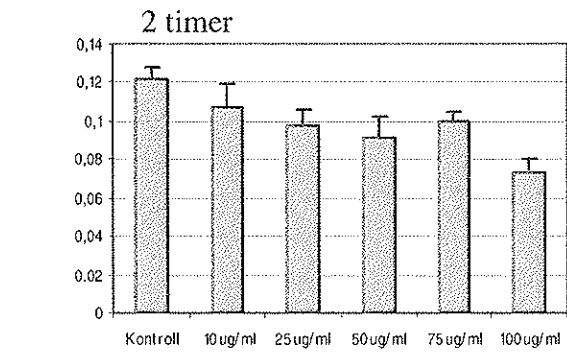
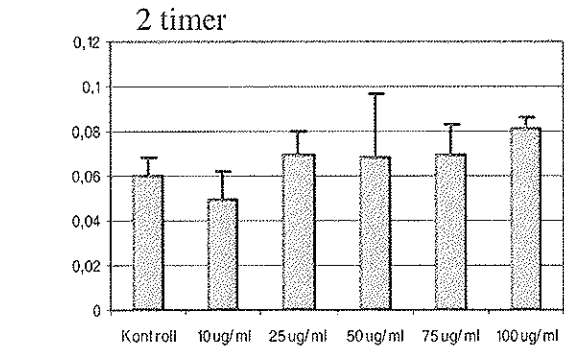
Absorbans målt ved 570 nm etter 2 og 4 timer med Alamar Blue, og etter 24 timer etter MTT assay.



Figur 4.2 Py-11 (N 17) behandlede

MRC-5 celler i RPMI medie.

Absorbans målt ved 570 nm etter 2 og 4 timer med Alamar Blue, og etter 24 timer etter MTT assay.

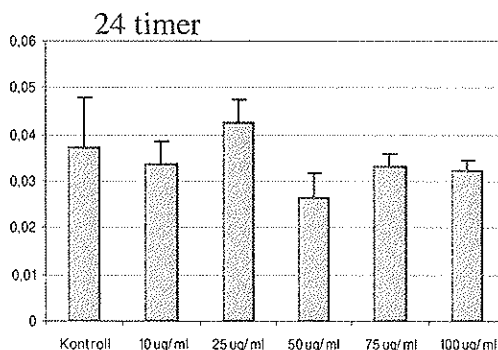
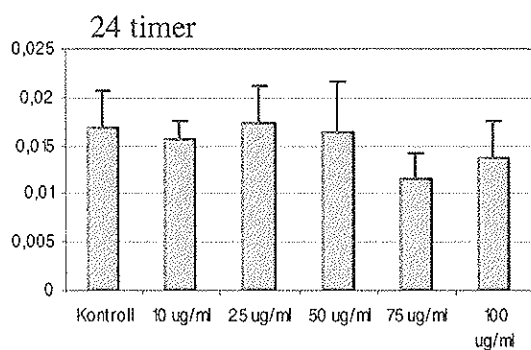
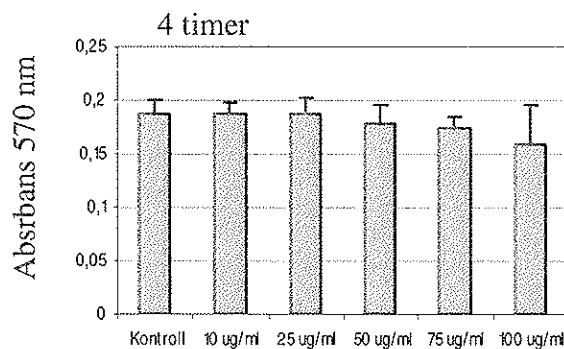
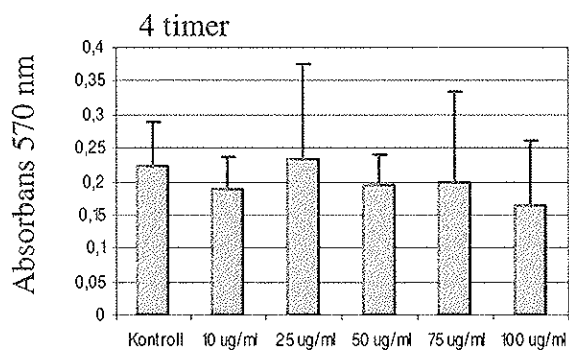
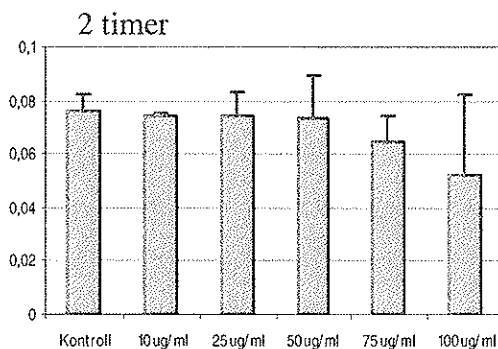
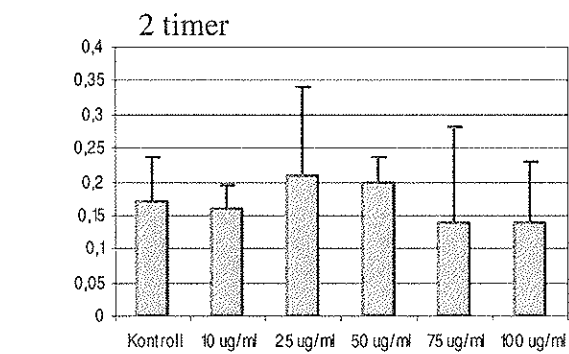


Konsentrasjon peptid

Konsentrasjon peptid

Figur 4.3 Py-11 (N 17) behandlede Kelly celler i MEM medie
Absorbans målt ved 570 nm etter 2 og 4 timer med Alamar Blue, og etter 24 timer etter MTT assay.

Figur 4.4 Py-11 (20 mer) behandlede Kelly celler i RPMI medie
Absorbans målt ved 570 nm etter 2 og 4 timer med Alamar Blue, og etter 24 timer etter MTT assay.



Konsentrasjon peptid

Konsentrasjon peptid

Figur 4.5 Py-21 (23 mer) behandlede

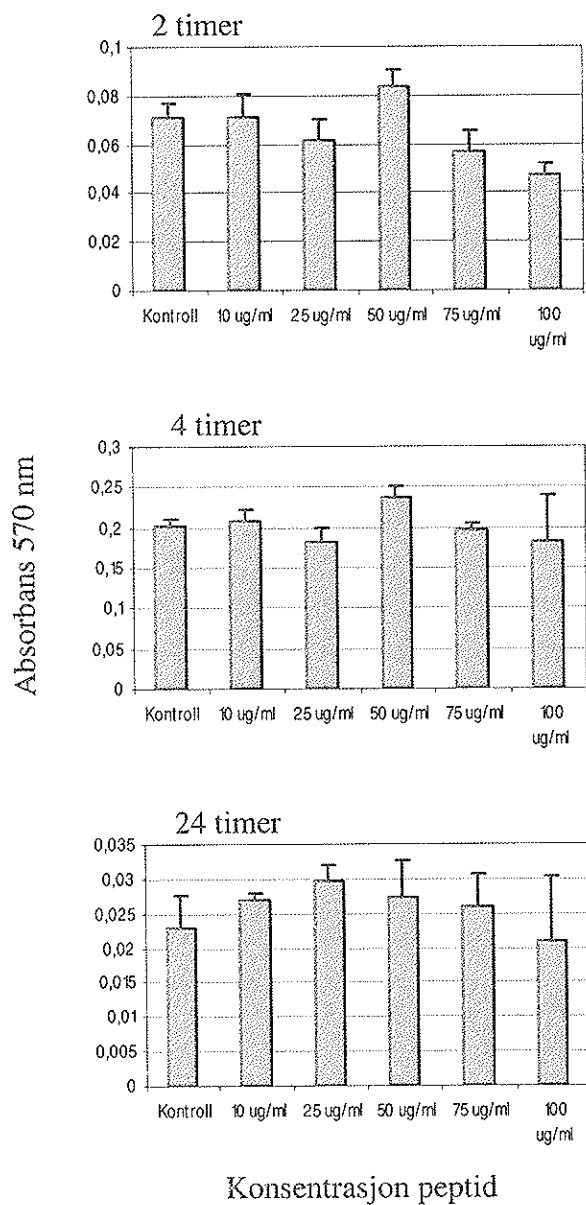
Kelly celler i RPMI medie

Absorbans målt ved 570 nm etter 2 og 4 timer med Alamar Blue, og etter 24 timer etter MTT assay.

Figur 4.6 Py-21 (23 mer) behandlede

Kelly celler i MEM medie

Absorbans målt ved 570 nm etter 2 og 4 timer med Alamar Blue, og etter 24 timer etter MTT assay.



Figur 4.7 Py-21 (23 mer) behandlede MRC-5 celler i RPMI medie
Absorbans målt ved 570 nm etter 2 og 4 timer med Alamar Blue, og etter 24 timer etter MTT assay.