



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Etablierung eines Protokolls zur Gewinnung von FT-IR-
Fingerprints glatter Gefäßmuskelzellen“

verfasst von / submitted by

Alexander Franz Perhal

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ. Prof. Dr. Johannes Saukel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Einleitung.....	4
Arteriosklerose	4
Definition	4
Aufbau von Blutgefäßen.....	4
Aufgaben der Blutgefäßwand	5
Ätiologie und Pathogenese der Arteriosklerose	7
Komplikationen und Bedeutung der Arteriosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen	9
Prävention und Behandlungsoptionen der Arteriosklerose	10
Metabolom-Analysen	21
Definition	21
Metabolomic-Fingerprints.....	22
FT-IR-Spektroskopie zur Gewinnung von Metabolom-Fingerprints.....	22
Zielsetzung.....	27
Material und Methoden	28
Chemikalien und Reagenzien	28
Zellkultur.....	29
Subkultivierung (Passagierung) der Zellen	29
Aussäen der Zellen auf Mikrotiterplatten	31
Lyophilisation (Gefriertrocknung)	32
Infrarot-Spektroskopie	34
Grundlagen	34
Fourier Transformation IR-Spektroskopie (FT-IR)	36
Attenuated Total Reflection (ATR) Technik	36
Messbedingungen und Spektrenbearbeitung.....	37
Statische Analyse der Daten.....	38
Korrelationsanalyse	38
Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA)	40
Resultate.....	42
Erstellung und Optimierung eines robusten Protokolls für VSMC.....	42
Messung intakter Zellen in Suspension (Suspensionsmessungen)	43

Messung lyophilisierter Zellen (Lyophilisationsmessungen)	55
Gegenüberstellung der Suspensions- und Lyophilisationsmessungen	67
Diskussion und Ausblick	69
Extraktion der Zellen	69
Ausblick: Anwendung des Protokolls zum Screening antiproliferativer Naturstoffe.....	70
Zusammenfassung.....	72
Abstract	73
Literaturverzeichnis	74
Abbildungsverzeichnis.....	79
Tabellenverzeichnis	82
Danksagung	83
Curriculum Vitae.....	84
Persönliche Daten	84
Akademische Ausbildung	84
Präsenzdienst	84
Schulische Ausbildung	84

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A.U.	Arbitrary Unit(s)
ATR	Attenued total reflection
FT-IR	Fourier Transformation Infrared Spectroscopy
GC	Gaschromatographie
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells (glatte Gefäßmuskelzellen)
WHO	World Health Organization

Einleitung

Arteriosklerose

Definition

Der Begriff Arteriosklerose beschreibt einen chronischen-entzündlichen, langsam progredienten Prozess, bei dem es infolge von Lipid- und Bindegewebsablagerungen, als auch der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen letztendlich zu einer Plaquebildung an der Arterienwand kommt. Als Konsequenz kann es zu einer Einschränkung des Lumens der betroffenen Blutgefäße und zu einer Minderperfusion von Geweben, die normalerweise durch dieses Gefäß versorgt werden, kommen. Neben der Gefäßverengung resultiert auch ein Elastizitätsverlust der entsprechenden Gefäße. Der Prozess der Verhärtung und Verdickung der Intima wird durch den Begriff Atherosklerose betont (griech. Atherom: Grützbeutel; als Bezeichnung für den entstandenen Plaque [1]). Der Überbegriff Arteriosklerose hingegen schließt auch die auftretenden Veränderungen der Media, d.h. der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, mit ein. [2]

Aufbau von Blutgefäßen

Die Gefäßwand besteht prinzipiell aus drei anatomischen Schichten: luminal gelegen ist die *Tunica interna* oder *Intima*, die aus einer einzelligen Schicht aus Endothelzellen mit darunter liegendem (subendothelialen) Bindegewebe und einer elastischen Membran (*Elastica interna*) besteht. Die zweite Schicht darunter wird als *Tunica media (Media)* bezeichnet und besteht aus glatten Gefäßmuskelzellen mit dazwischen liegenden Bindegewebsfasern. Die äußerste Schicht oder *Tunica externa (Adventitia)* besteht aus elastischen und kollagenen Fasern, worin auch glatte Muskelzellen eingebettet sind und dient der Verbindung des Gefäßes mit dem umliegenden Gewebe. [3]

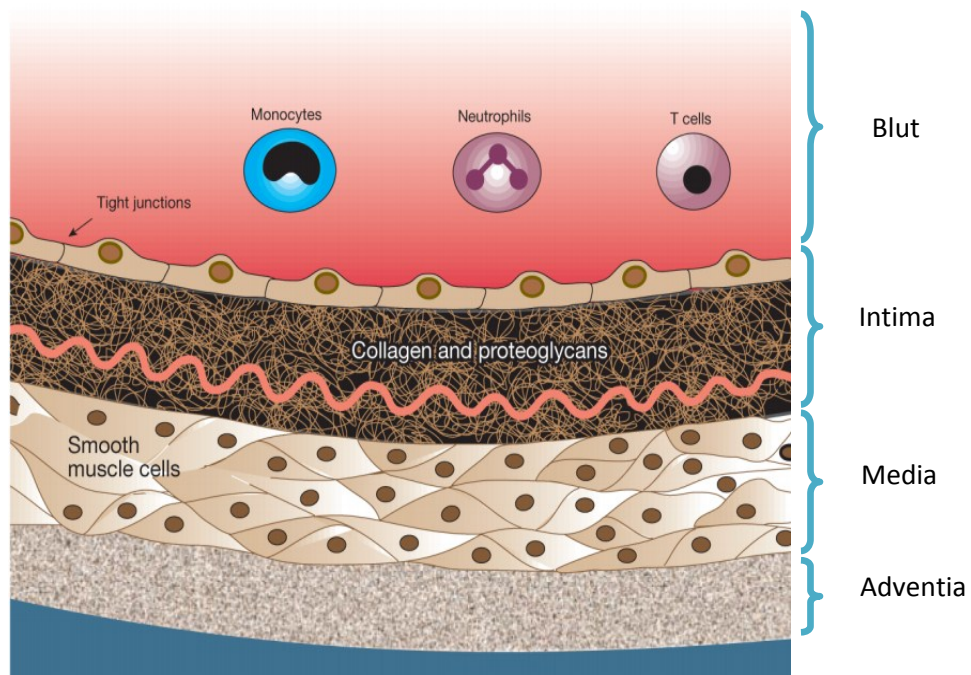


Abbildung 1: Aufbau einer arteriellen Gefäßwand. Grafik modifiziert nach [4], Figure 1.

Aufgaben der Blutgefäßwand

Die Endothelzellen, denen eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose zukommt, erfüllen physiologisch die Aufgabe einer Barriere zwischen dem strömenden Blut und dem subendothelialen Raum. Sie entfalten damit eine Schutzwirkung für die tiefer gelegenen Wandschichten gegenüber dem Blut und darin enthaltenen Blutbestandteilen. Zusätzlich zu diesem mechanischen Schutz produzieren sie zahlreiche Faktoren, die ihrerseits wiederum eine indirekt schützende Wirkung auf das subendotheliale Gewebe entfalten. Den wichtigsten Faktor hierbei stellt das Stickstoffmonoxid (NO) dar, dessen kontinuierliche Produktion durch die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) einen wesentlichen Beitrag zur Schutzwirkung des Endothels leistet. Die wichtigsten Wirkungen von NO sind eine starke Vasodilatation, vermittelt über einen relaxierenden Effekt auf die darunterliegenden glatten Gefäßmuskelzellen der Media und eine Verminderung der Anheftung von Blutzellen an das Endothel (antiadhäsiver Effekt). Bei Verlust dieser endothelialen NO-Produktion kommt es zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Blut und Blutbestandteile, wodurch diese dann direkt auf die darunter liegenden Schichten wirken können. [5]

Die glatten Gefäßmuskelzellen, die vorrangig in der Media vorkommen, regulieren durch eine aktive Spannungsentwicklung (Tonus) die Gefäßweite und damit den Blutdruck. Durch ihre Kontraktion kommt es zu einer Einengung des Gefäßlumens (siehe Abbildung 2) und damit zu einem Anstieg des totalen peripheren Widerstandes, der neben dem Herzzeitvolumen den wesentlichen Beitrag zur Regulation des Blutdruckes leistet. [6]

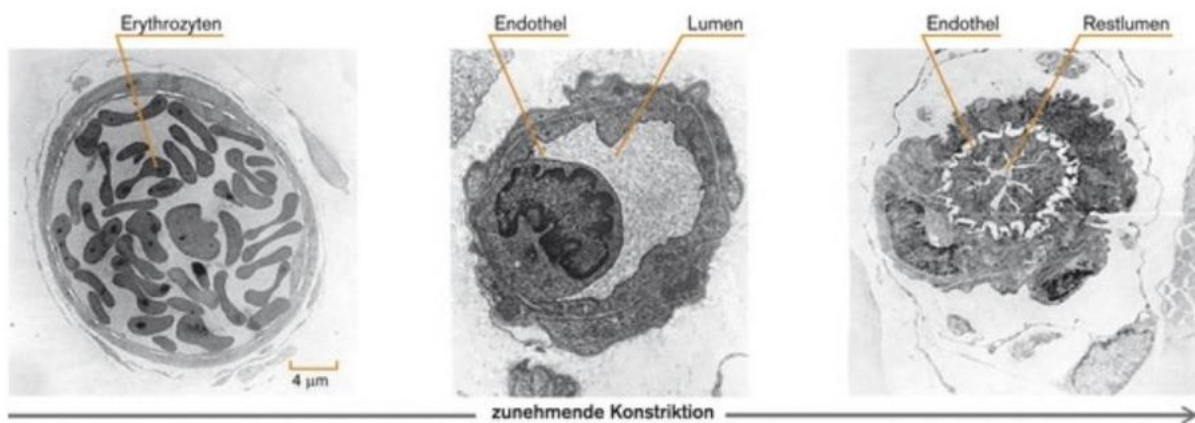


Abbildung 2: Eine Arteriole des Skelettmuskels in verschiedenen Stadien der Vasokonstriktion (zunehmende Konstriktion von links nach rechts). Die Einengung des Gefäßlumens kommt insbesondere durch eine Vorwölbung des Endothels nach innen zustande. Grafik nach [7].

Ätiologie und Pathogenese der Arteriosklerose

Auch wenn die genauen Ursachen und Hergänge, die letztendlich zur Bildung der arteriosklerotischen Plaques führen, noch nicht vollständig geklärt sind, so gibt es doch einige Prozesse und Risikofaktoren, deren Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose eindeutig nachgewiesen werden konnte. Als primäre Ursache gelten lokale mechanische Belastungen der Gefäßwand, die, insbesondere beim Vorliegen weiterer Risikofaktoren (siehe Tabelle 1), letztendlich zu Läsionen des Endothels führen.

Tabelle 1: Risikofaktoren der Arteriosklerose für entsprechende Gefäßregionen in der Reihenfolge ihres epidemiologischen Auftretens. Modifiziert nach [2].

Gefäßregion	Risikofaktoren	
Koronargefäße	Hyperlipoproteinämie	Absteigende epidemiologische Bedeutung als Risikofaktor
	Rauchen	
	Hypertonie	
	Diabetes mellitus	
Hirngefäße	Hyperurikämie	Absteigende epidemiologische Bedeutung als Risikofaktor
	Hypertonie	
	Diabetes mellitus	
Periphere Arterien	Hyperlipoproteinämie	Absteigende epidemiologische Bedeutung als Risikofaktor
	Rauchen	
	Diabetes mellitus	

Durch die entstehenden Läsionen kommt es zu einer Hyperpermeabilität und Funktionsverlust des Endothels und in weiterer Folge zur Ablagerung von zirkulierenden Lipoproteinen in die Intima und zur oxidativen Veränderung der Lipoproteine. Durch diese oxidierten Formen wird einerseits durch Komplementaktivierung eine entzündliche Reaktion ausgelöst, die eine weitere Entwicklung von

Läsionen begünstigt, und andererseits werden diese durch zuvor in die Gefäßwand eingewanderte und differenzierte Makrophagen phagozytiert. Die Aufnahme erfolgt dabei durch sogenannte *scavenger-Rezeptoren*, die eine besonders hohe Affinität für oxidiertes LDL (oxLDL) besitzen. Durch Aufnahme von oxLDL verändern sich die Makrophagen zu sog. *Schaumzellen*, die dann zusammen mit Lymphocyten und extrazellulärem Cholesterin die sog. *fatty streaks* bilden, die den Lipidkern der späteren Plaques darstellen. Auch wenn diese fatty streaks selbst von keiner klinischen Relevanz zu sein scheinen, so sind sie dennoch als Vorstufe von größeren und gefährlicheren Plaques zu betrachten. Sie bilden sich bei Menschen üblicherweise schon sehr bald aus, so sind sie in der Aorta meist schon nach der ersten Lebensdekade, in den Koronararterien im Laufe der zweiten Lebensdekade und in zerebralen Arterien zwischen der dritten und vierten Lebensdekade nachweisbar. [4]

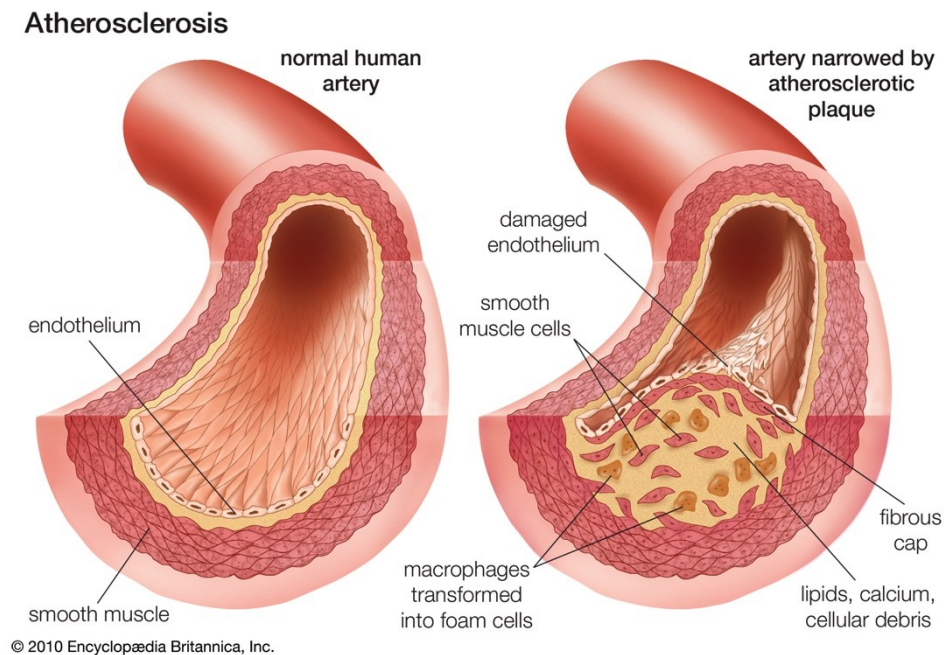
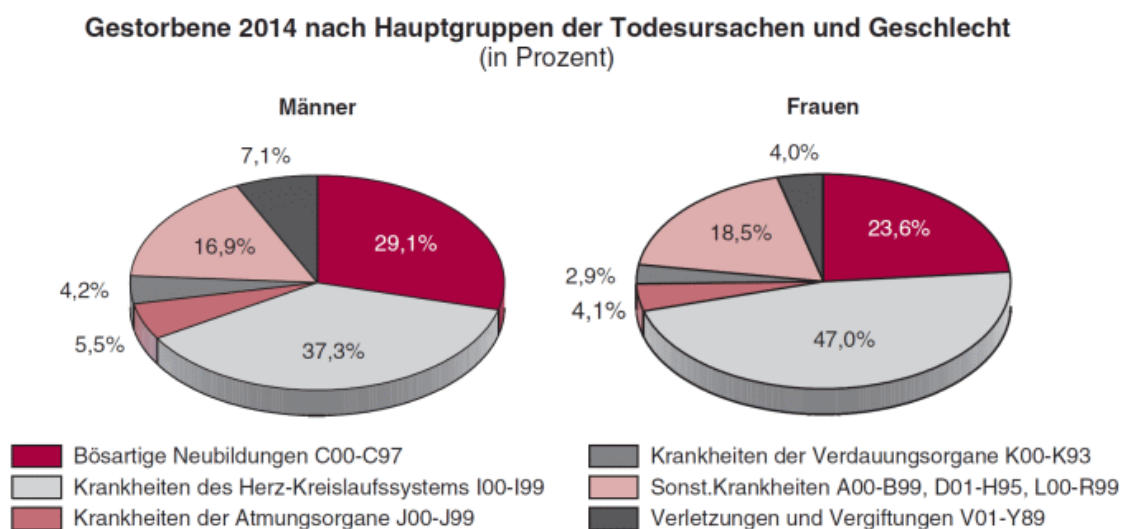


Abbildung 3: Arteriosklerotische Gefäßveränderungen. Links: normale Arterie, rechts: arteriosklerotisch veränderte Arterie. Grafik nach [17].

Komplikationen und Bedeutung der Arteriosklerose und kardiovaskulärer Erkrankungen

Die Manifestation von arteriellen Durchblutungsstörungen ist überwiegend auf arteriosklerotische Prozesse zurückzuführen und stellt in den Industriestaaten die häufigste Todesursache dar (ca. 50%). [2]

So führen „Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems“ (klassifiziert nach der WHO International Classification of Diseases, I00 bis I99) auch in Österreich mit 37,3% bei Männer und 47% bei Frauen die Liste der häufigsten Todesursachen 2014 an. (siehe Abbildung 4).



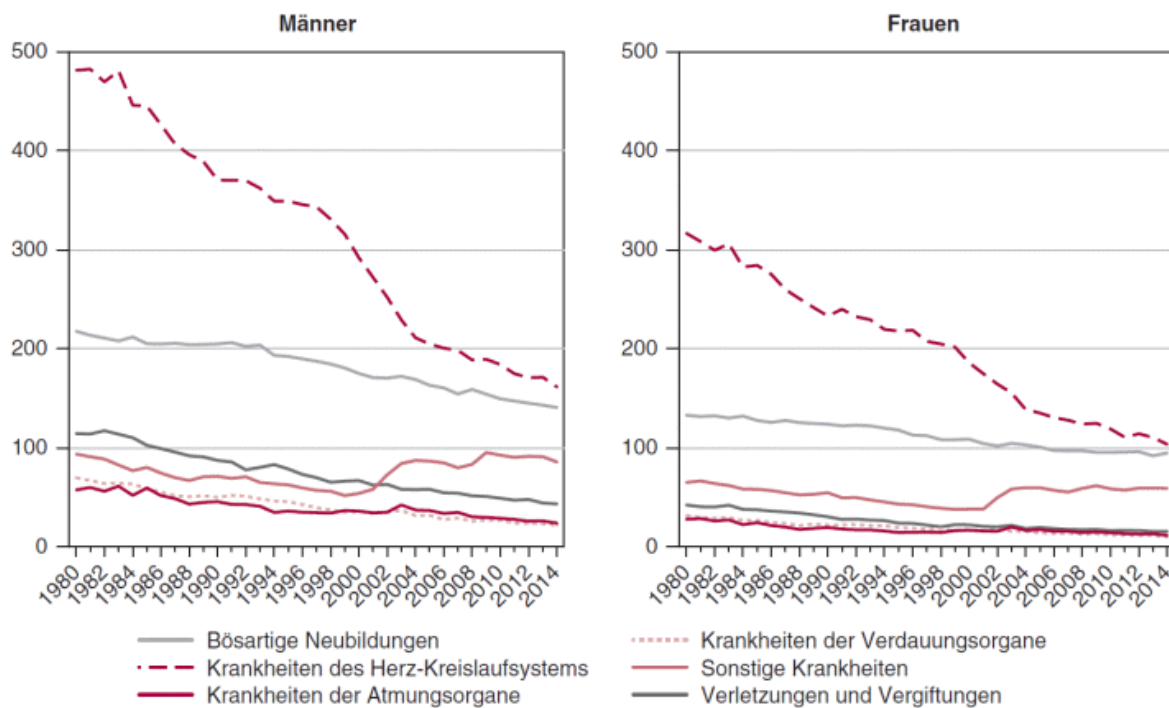
Q: STATISTIK AUSTRIA, Todesursachenstatistik. Erstellt am 12.06.2015.

Abbildung 4: Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems als führende Todesursache beider Geschlechter im Jahre 2014 in Österreich.

(http://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/todesursachen/todesursachen_ausgewaehlte/index.html, abgerufen am 05.10.2015)

Trotz eines massiven Rückgangs, welcher über die letzten Jahrzehnte zu verzeichnen ist (siehe Abbildung 5) und zweifelsohne auf die verbesserte medizinische Behandlung und Prävention eben jener Erkrankungen zurückgeführt werden kann, spielt die Suche nach neuen Therapieoptionen weiterhin eine herausragende Rolle.

Sterblichkeit nach Todesursachen 1980-2014
(altersstandardisierte Sterbeziffern auf 100.000 Personen)



Q: STATISTIK AUSTRIA, Todesursachenstatistik. Erstellt am 12.06.2015. Ab 2009 Zeitreihenbruch durch verbesserte Vollzähligkeit (im Ausland Gestorbene).

Abbildung 5: Deutlicher Rückgang der Haupttodesursache "Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems" seit 1980 in Österreich

(http://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/todesursachen/todesursachen_ausgewahlte/index.html, abgerufen am 05.10.2015)

Prävention und Behandlungsoptionen der Arteriosklerose

Durch die eindeutige positive Korrelation zwischen dem Auftreten von Arteriosklerose und den zahlreichen Risikofaktoren, kommt der Vermeidung und Minderung eben jener Risikofaktoren eine zentrale Bedeutung in der Prävention der Arteriosklerose zu. Für die Entscheidung, welche Intervention angebracht ist, wird gemäß verschiedener, möglichst aktueller Richtlinien eine Risikobewertung für kardiovaskuläre Ereignisse durchgeführt. Gemäß der Richtlinie der European Society of Cardiology (ESC) und der European Atherosclerosis Society (EAS) von 2011 [8], wird Patienten mit bereits diagnostizierten kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes Typ 1 oder Typ 2 mit Mikroalbuminurie, chronischer Niereninsuffizienz oder individuellen Risikofaktoren von sehr großem Umfang, automatisch ein sehr hohes kardiovaskuläres Risiko zugeschrieben. Für alle anderen Patienten sollte eine Risikobewertung nach dem *SCORE*-System (Systemic Coronary Risk Estimation) stattfinden, bei dem vor allem auch die Kombination von mehreren vorhandenen Risikofaktoren miteinbezogen wird. Dies ist von besonderer klinischer Relevanz, da zumeist mehr als nur ein isolierter Risikofaktor vorliegt.

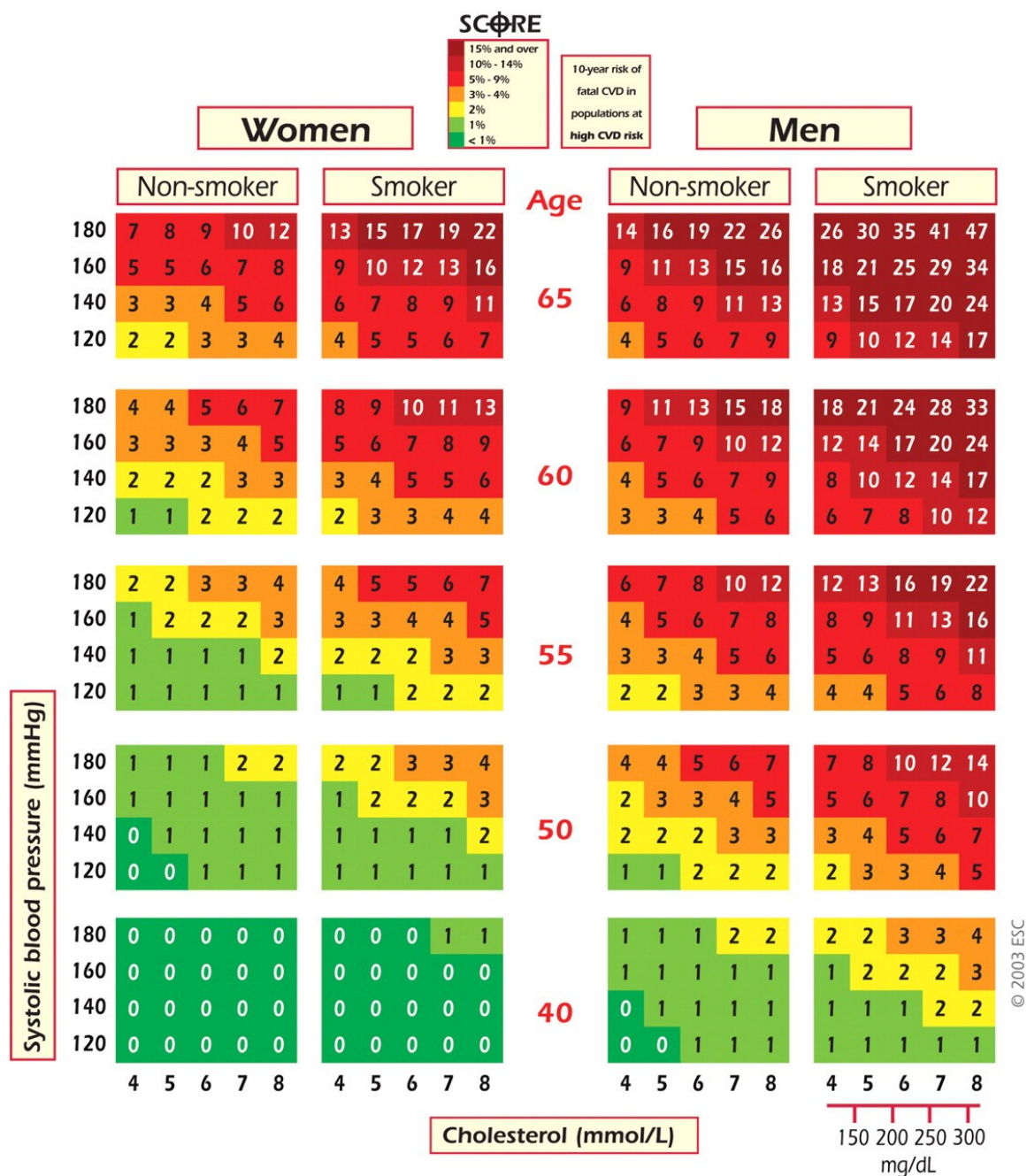


Abbildung 6: SCORE-System zur Abschätzung des 10-Jahres-Risikos für ein erstmaliges schwerwiegendes kardiovaskuläres Ereignis (in einer Hochrisiko-Region in Europa). Zur Abschätzung werden mehrere Risikofaktoren herangezogen: Alter, Geschlecht, Raucher/Nichtraucher, Hypertonie (systolischer Blutdruck) und die totale Serum-Cholesterin-Konzentration. Grafik nach [8].

Die Reduktion der Risikofaktoren kann und sollte bis zu einem gewissen Grade durch Änderung des Lebensstils erreicht werden. So wurde unter anderem gezeigt, dass regelmäßige körperliche Betätigung (dreimal täglich für 10 Minuten am Ruderergometer und Radergometer über 4 Wochen) bei stabiler koronarer Herzerkrankung zu einer Erhöhung der Expression an eNOS in den Endothelzellen und damit zu einer Verbesserung der über NO vermittelten Vasodilatation führt. [9]

Medikamentöse Interventionen

Da die Hyperlipoproteinämie einen der wichtigsten Risikofaktoren darstellt, kommt der Senkung der Blutlipide, und hierbei besonders des LDL-Cholesterins, in der Prophylaxe der Arteriosklerose ein besonderer Stellenwert zu. Zu diesem Zweck haben kompetitive Hemmstoffe der 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), dem Schlüsselenzym der endogenen Cholesterin-Synthese, einen festen Platz in der Prävention und Therapie der Arteriosklerose gefunden. Die Wirksamkeit dieser Hemmstoffe, kurz „Statine“, in der Therapie der Arteriosklerose, der Senkung des Serum-Cholesterins, als auch in der Senkung der Gesamtmortalität gilt als gesichert. [10]

Chirurgische Interventionen

In schweren Fällen, bei denen infolge der Gefäßverengung bereits Symptome der Minderversorgung in Erscheinung treten, sind oftmals chirurgische Interventionen angezeigt, um eine ausreichende Durchblutung der entsprechenden Gefäße wiederherzustellen.

1. Bypass-Operation (Coronary Artery Bypass Grafting, CABG)

Dies kann durch eine Überbrückung der verengten Stelle mithilfe eines sog. Bypasses erfolgen (siehe Abbildung 7). Hierbei werden Arterien oder Venen von anderen Körperregionen (Brustwandarterie, hand-versorgende Arterien oder Beinvenen) entfernt und als künstliche Anastomose an Aorta und distal der verengten Stelle am betroffenen Gefäß angenäht. Zumeist wird dieser operative Eingriff unter Anhaltung des Herzschlages und der Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine durchgeführt, seltener auch am schlagenden Herzen („Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting“). [11]

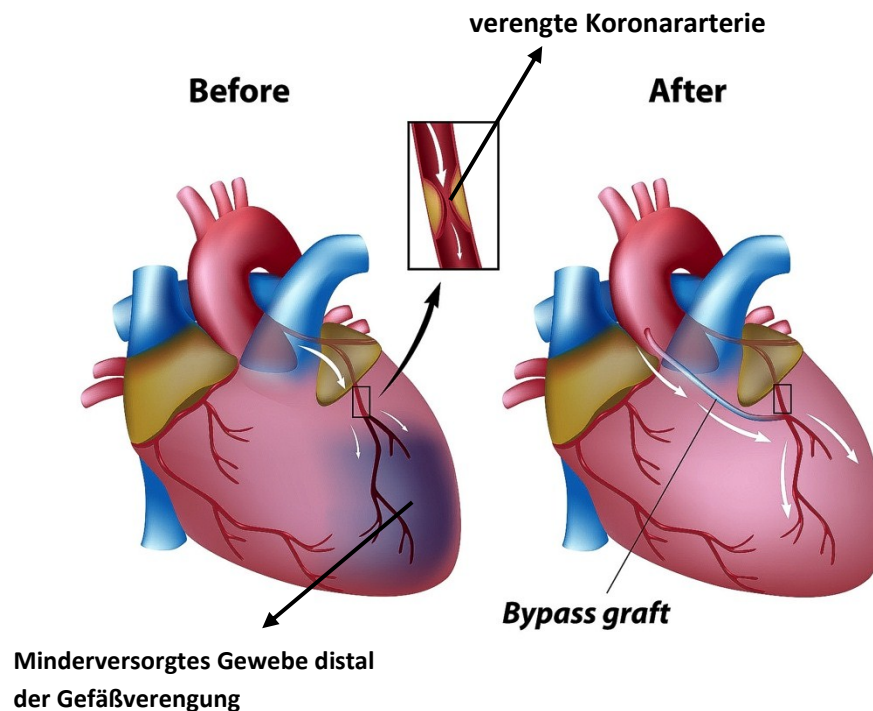


Abbildung 7: Überbrückung eines arteriosklerotisch verengten Gefäßbereiches durch einen Bypass. Grafik modifiziert nach [11].

2. Perkutane transluminale koronare Angioplastie

Eine weitere Möglichkeit der chirurgischen Intervention stellt die Erweiterung eines arteriosklerotisch verengten Gefäßes mithilfe eines Ballonkatheters dar. 1978 führte der deutsche Kardiologie Andreas Grüntzig zum ersten Mal eine solche perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) durch, eine Technik, die heute zu den weltweit am häufigsten durchgeführten Interventionen überhaupt zählt. [12] Dabei handelt es sich um eine minimal invasive Methode, bei der ein Ballonkatheter über eine periphere Arterie (häufig der Femoral-Arterie) eingeführt und zur verengten Stelle manövriert wird. Dort angekommen wird das verengte Gefäß durch Dilatation des Ballons wieder erweitert. Ein großer Nachteil dieser Technik besteht darin, dass es bei mehr als einem Drittel der Patienten, die sich einer PTCA unterzogen haben, nach 6 Monaten zu einer Restenose (Wiederverengung) des betroffenen Gefäßes kommen kann. Um diesem Problem weitestgehend entgegen zu wirken, befindet sich zumeist ein metallischer Stent um den Ballonkatheter herum, der durch die Dilatation des Ballons an der verengten Stelle selbst auch erweitert wird. Nach der Erschlaffung des Ballons und der Entfernung des Katheters aus dem Gefäß bleibt der Stent in seiner expandierten Form an der Gefäßinnenwand zurück und dient der mechanischen Stabilisierung und Offenhaltung des Gefäßes (siehe Abbildung 8). [13]

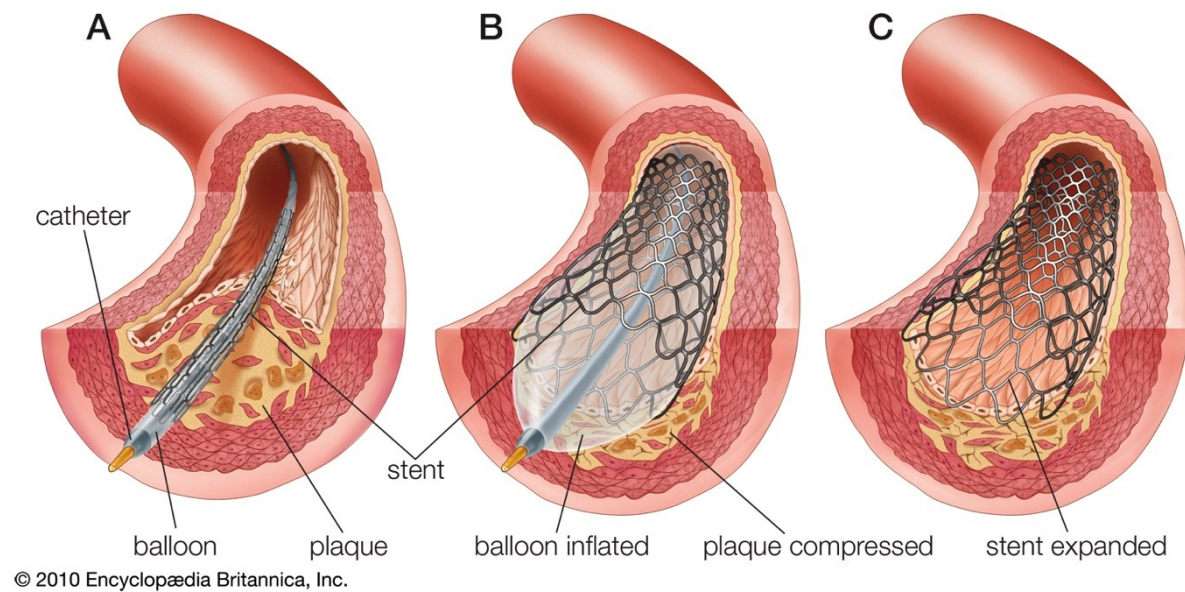


Abbildung 8: Schritte bei der Durchführung einer Ballon-Angioplastie mit Stent-Platzierung. (A) Der Ballonkatheter mit Stent wird durch das Gefäßlumen (transluminal) zur verengten Stelle geführt. (B) Durch Dilatation des Ballons wird sowohl die verengte Stelle aufgeweitet, als auch der Stent erweitert. (C) Nach Erschlaffung des Ballons wird der Katheter wieder aus dem Gefäß entfernt und der expandierte Stent bleibt an der Gefäßwand zurück. Grafik nach [17].

Da die Gefäße, in denen ein Stent eingebracht wurde, eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer akuten Wiederverengung im Vergleich zur alleinigen Erweiterung mittels eines Ballons zeigen, wird dieses Verfahren heute im Großteil der Fälle (ungefähr 80-90%) durchgeführt. [12] Allerdings zeigte eine Metaanalyse von klinischen Studien auch, dass das Einsetzen von Stents keinen positiven Einfluss auf die Mortalität oder die Häufigkeit von nicht-tödlich verlaufenden Myokardinfarkten zeigt. [14]

Stenting

Auch wenn die Wahrscheinlichkeit einer Restenose durch Einbringen eines Stents deutlich verringert wird, so stellt sie weiterhin eine der gravierendsten Komplikationen dieses Verfahrens dar. So kann es auch bei gesetztem Stent sehr häufig zu einer sogenannten „in-stent Restenose“ kommen. Die Häufigkeit des Auftretens dafür liegt bei mehr als einem von fünf Patienten. [13] Diese in-stent Restenosen sind das Resultat einer sog. *Neointimalen Hyperplasie*, der Proliferation und Migration von subendothelialelem Gewebe, insbesondere glatter Gefäßmuskelzellen der Media. Durch die Aufweitung des Gefäßes mithilfe des Ballons kommt es unvermeidlich zur Verletzung des schützenden Endothels und der Freilegung darunterliegender glatter Gefäßmuskelzellen. Dies hat zur Folge, dass es an der verletzten Stelle zu einer Thrombozyten-Aggregation und der Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe kommt. Weiters können im Blut zirkulierende Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise PDGF, nun direkt auf die glatten Gefäßmuskelzellen der Media einwirken und deren Proliferation, sowie eine Migration in die Schicht der Intima begünstigen. [15]

Der Begriff „Neo-Intima“ bezeichnet hierbei, dass als Resultat dieses Prozesses eine neue innerste Gefäßschicht entsteht, die histologisch einer kombinierten Intima und Media entspricht. [16]

Drug Eluting Stents

Um dieser unerwünschten neointimalen Hyperplasie entgegen zu wirken, wurden sogenannte Drug-Eluting Stents (DES) entwickelt. Diese Stents sind mit Substanzen beschichtet, die langsam und kontrolliert an das anliegende Gewebe der Gefäßwand abgegeben werden und einen antiproliferativen Effekt auf die glatten Gefäßmuskelzellen ausüben sollen. Der Einsatz dieser DES führt zu einer signifikanten Senkung des Auftretens von in-stent Restenosen im Vergleich zu unbeschichteten, rein metallischen Stents (bare metal stents, BMS). So liegt die Häufigkeit des Auftretens einer Restenose bei Verwendung von DES ungefähr bei einem von 10 Patienten, was einer Reduktion der Häufigkeit auf ca. die Hälfte von BMS entspricht. [13]

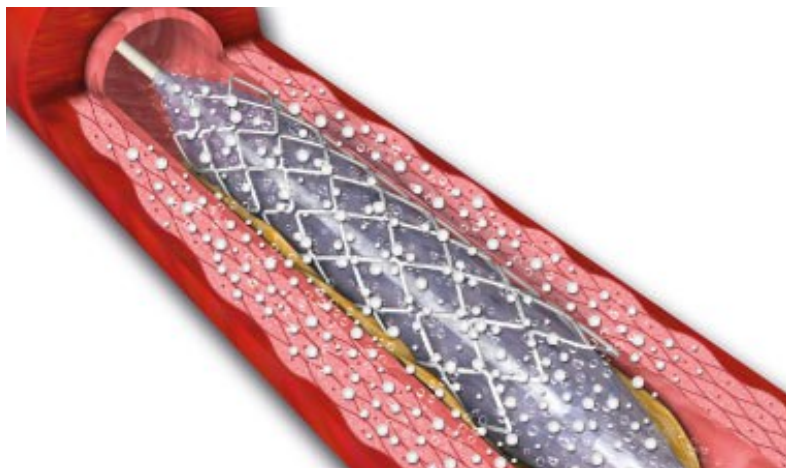


Abbildung 9: Drug-Eluting Stent, schematisch. Grafik nach [18].

Auch wenn DES bezüglich dem Auftreten von Restenosen und damit der Notwendigkeit von erneuten Eingriffen einen deutlichen Vorteil gegenüber BMS zeigen, so stellen auch sie nach wie vor körperfremdes Material innerhalb der Gefäße dar und es kann zur Thrombenbildung an der Oberfläche des Stents kommen. Das Risiko für thromboembolische Ereignisse wie Herzinfarkt oder Schlaganfall ist dadurch stark erhöht und eine antikoagulatorische Zusatztherapie (üblicherweise eine Kombination aus Aspirin und Clopidogrel oder Ticlopidin) wird unerlässlich. Es wurde sogar gezeigt, dass DES ein deutlich höheres Risiko für thromboembolische Ereignisse aufweisen als BMS, was auf eine stark verzögerte Wundheilung und Endothelialisierung (Überdeckung der Stent-Oberfläche mit Endothelzellen) bei Verwendung von DES zurückgeführt wird (siehe Abbildung 10). [19]

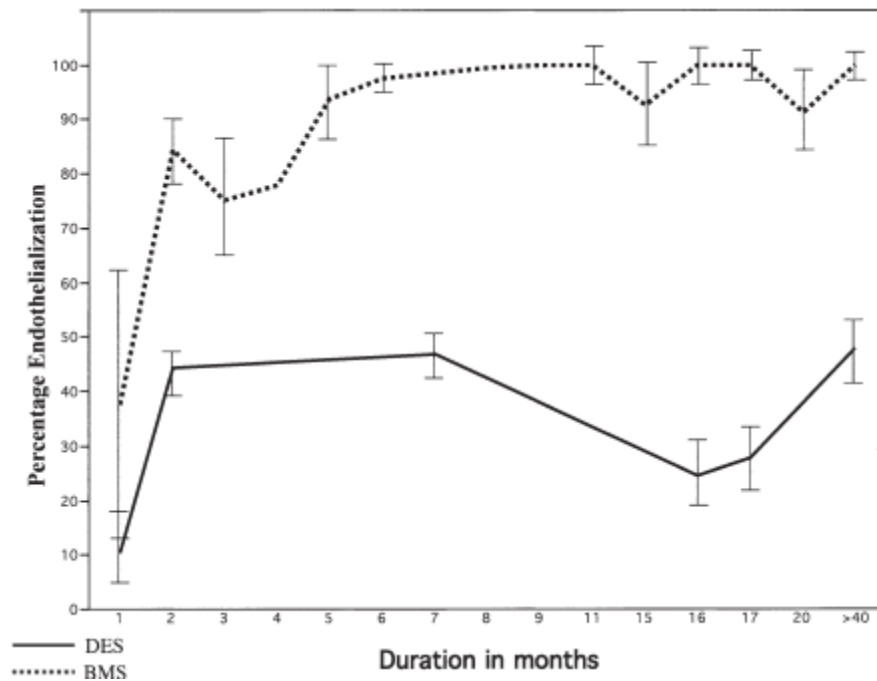
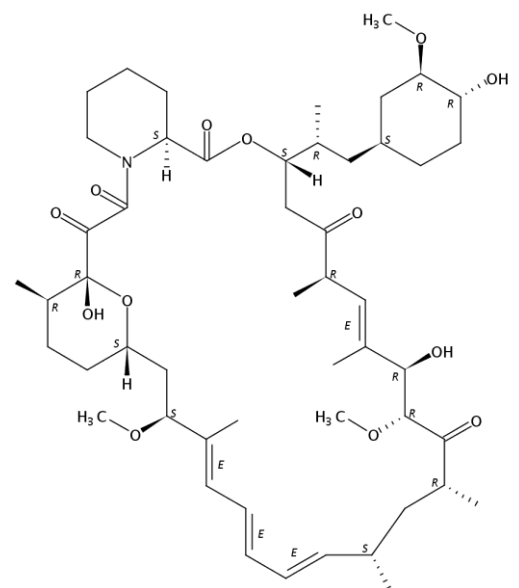


Abbildung 10: Vergleich der Endothelialisierungs-Rate von bare metal stents (BMS) mit der von drug-eluting stents (DES) als Funktion der Zeit. Über den gesamten betrachteten Zeitraum ist das Ausmaß der Endothelialisierung bei BMS höher als bei DES. Während BMS schon nach 6-7 Monaten vollständig mit Endothelzellen bedeckt sind, wird dies bei DES nicht mal nach 40 Monaten erreicht. Grafik nach [19], Figure 2.

Die beiden ersten und wichtigsten, von der FDA zur Beschichtung von Stents zugelassenen Wirkstoffe stellen dabei Sirolimus und Paclitaxel dar:

Sirolimus (Rapamycin)

Sirolimus (synonym: Rapamycin) ist ein Makrolid, das erstmals aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* Jensen (Streptomycetaceae) isoliert wurde. Sirolimus ist ein Hemmstoff des Proteins mTOR (mammalian target of rapamycin), das als Serin-/Threonin-Kinase eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von mitogenen Signalen in Zellen einnimmt. So führt die Stimulation von mTOR, beispielsweise unter Einwirkung von Wachstumsfaktoren, zu einer Steigerung des Zellwachstums und der Proliferation. Die Unterbindung dieses Signalweges durch Sirolimus hat daher einen antiproliferativen Effekt auf Zellen zur Folge. Dieser antiproliferative Effekt betrifft bei systemischer Verabreichung von Sirolimus vor allem sich rasch teilende Zellen, wie B- und T-Lymphozyten des spezifischen Immunsystems.

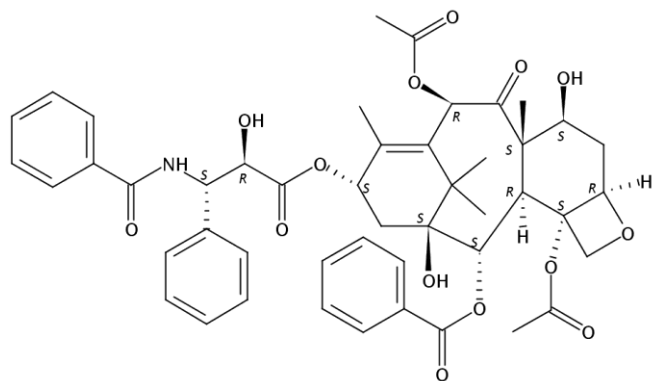


chemische Struktur von Sirolimus
(CAS Registry Number 53123-88-9)

Durch Hemmung der Proliferation dieser Immunzellen resultiert ein stark immunsuppressiver Effekt von Sirolimus, der therapeutisch zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach allogenen Transplantationen ausgenutzt wird. [20] Neben diesem Einsatz als Immunsuppressivum wird Sirolimus auch als Beschichtungssubstanz für koronare DES eingesetzt (CYPHER™ Sirolimus-eluting Coronary Stent, zugelassen 2003 [21]), wobei hier ein weitgehend lokaler Effekt auf die Gefäßwand besteht und somit der antiproliferative Effekt vor allem die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen hemmt. Neben dem Einsatz von Sirolimus selbst, kommen auch Derivate wie Zotarolimus oder Everolimus, die den gleichen Wirkmechanismus wie Sirolimus besitzen, zur Beschichtung koronarer Stents zum Einsatz.

Paclitaxel (Taxol)

Paclitaxel ist ein Diterpen-Alkaloid (Gruppe der Taxane), das ursprünglich aus der Rinde der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) isoliert wurde. Da aber durch die Entfernung der Rinde die Bäume absterben, kann über diese Methode zur Isolierung der enorme weltweite Bedarf an Taxol als Zytostatikum nicht gedeckt werden. Auf der Suche nach alternativen Quellen und Verfahren wurde dann 10-Desacetylbaccatin-



chemische Struktur von Paclitaxel
(CAS Registry Number 33069-62-4)

III in den nachwachsenden Nadeln der europäischen Eibe, *Taxus baccata* L. (Taxaceae) gefunden und davon ausgehend eine halbsynthetische Methode zur Herstellung von Taxol entwickelt. Diese Methode stellt neben der fermentativen Produktion durch Eibenzellkulturen (*T. brevifolia* oder *T. chinensis* Roxb.) heute die wichtigste Methode zur Gewinnung von Taxol dar. Es wurden auch endophytische Pilze von Taxus-Arten gefunden, die Taxan-Derivate bilden können, es gilt allerdings noch zu überprüfen, ob sich diese auch zur Produktion von Taxol eignen. Auch Totalsynthesen für Taxol wurden entwickelt, spielen aber aufgrund ihres großen Aufwandes keine Rolle bei der Gewinnung von Taxol. [22]

Der zytostatische Effekt von Taxol kommt durch eine Bindung an die β -Tubulin-Untereinheiten der Mikrotubuli zustande. Dadurch wird die wichtige Dynamik zwischen Auf- und Abbau der Mikrotubuli zugunsten von besonders stabilen Mikrotubuli verschoben (Begünstigung der Polymerisation). Die Ausbildung eines voll funktionstüchtigen Spindelapparates während der Metaphase der Mitose ist somit nicht mehr möglich und es resultiert eine Blockierung der Zellteilung in der G2- und M-Phase

des Zellzyklus mit anschließender Induktion der Apoptose in den betroffenen Zellen. Therapeutische Verwendung findet Taxol als Zytostatikum bei metastasierendem Ovarial- und Mammakarzinom und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, als auch zur Beschichtung von koronaren DES [22] (z.B. TAXUS™ Express2™ Paclitaxel-Eluting Coronary Stent System, zugelassen 2004 [23] und TAXUS® Liberte™ Paclitaxel-Eluting Coronary Stent System, zugelassen 2009 [24]).

Auch wenn sich diese, derzeit in Verwendung befindlichen Substanzen als wirkungsvoll bei der Verhinderung von in-stent Restenosen erwiesen haben, so bestehen dennoch weiterhin Wirkstoff-bezogene Bedenken bezüglich der Selektivität ihrer Wirkung. Dies kommt daher, dass ihr antiproliferativer Effekt neben der erwünschten Hemmung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen auch die Proliferation der Endothelzellen hemmt. Da aber die Regeneration des vasoprotektiven Endothels nach der Gefäßverletzung durch Einsetzen eines Stents einen durchaus erwünschten und wichtigen Prozess der Wundheilung darstellt, kommt der Suche nach neuen Wirkstoffen, die ihrerseits einen selektiven antiproliferativen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen zeigen, ohne dabei die Proliferation und Viabilität von Endothelzellen zu beeinträchtigen, ein besonderer Stellenwert in der Entwicklung neuer DES zu.

Suche nach neuen Substanzen - Naturstoffe als Leitstrukturen

In diesem Zusammenhang haben sich schon einige Naturstoffe, wie beispielsweise Piperin und synthetische Piperin-Analoga [25], Capsaicin [26] oder [6]-Shogaol [27], als vielversprechende Leitstrukturen für die Entwicklung solcher neuen Beschichtungssubstanzen herausgestellt.

Als Beispiel hierzu sind die Arbeiten zu [6]-Shogaol angeführt, einem Inhaltsstoff von getrockneten Rhizomen des Echten Ingwers, *Zingiber officinale* Rosc. (Zingiberaceae). Es wurde gefunden, dass [6]-Shogaol einen ausgeprägten antiproliferativen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen zeigt, während die Endothelzellen-Viabilität davon weitestgehend unberührt bleibt (siehe Abbildung 11). Die Zellviabilität wurde dabei mithilfe des Resazurin-Konversions-Assays bestimmt. Bei dieser Methode wird die Zellviabilität über die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt und zwar im Speziellen ihrer Fähigkeit NAD(P)H-abhängig den Farbstoff Resazurin zum stark rot fluoreszierenden Resorufin zu reduzieren, das dann anschließend photometrisch quantifiziert wird. [27]

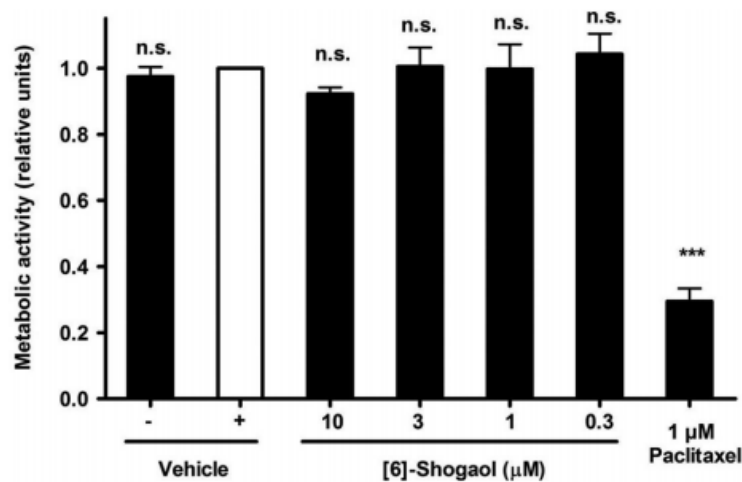


Abbildung 11: Durch Resazurin-Konversions-Assay bestimmte Viabilität von Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) nach Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an [6]-Shogaol im Vergleich zu Paclitaxel oder reinem Lösungsmittel (0,1% DMSO, Vehikel). Zwischen Vehikel und [6]-Shogaol sind kaum Unterschiede zu beobachten, während die Viabilität der Zellen bei Behandlung mit Taxol stark beeinträchtigt wird. Grafik nach [27], Figure 4.

Der antiproliferative Effekt auf die glatten Gefäßmuskelzellen wurde ebenfalls mithilfe des Resazurin-Konversions-Assays bestimmt. Da diese Methode allerdings naturgemäß auch durch andere reduzierende Einflüsse (z.B. durch reduzierende Eigenschaften der verwendeten Substanzen selbst oder Modulierung der metabolischen Kapazität infolge der Behandlungen) verfälscht werden kann, ist es nötig den beobachteten antiproliferativen Effekt durch eine andere Methode zu verifizieren. Hierzu wurde eine Bestimmung der gesamten Biomasse durch Färbung mit Kristallviolett durchgeführt, die zum selben Ergebnis wie das Resazurin-Konversions-Assay führte. In weiterer Folge war es nötig auszuschließen, dass die Reduktion der Zellanzahl durch einen rein zytotoxischen Effekt von [6]-Shogaol auf die glatten Gefäßmuskelzellen zustande kommt. Dazu wurde der Verlust der Zellmembran-Integrität als Marker für einen etwaigen zytotoxischen Effekt herangezogen. Die Integrität der Membran wurde indirekt über das extrazelluläre Vorliegen des Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH), eines normalerweise zytosolisch vorliegenden Proteins, bestimmt.

Um ein konsequentes Experiment durchzuführen, wurden abschließend noch Untersuchungen bezüglich des genauen molekularen Wirkmechanismus von [6]-Shogaol unternommen. Hierzu wurde ein „5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) Inkorporations-Assay“ durchgeführt, um einen Einfluss von [6]-Shogaol auf die de-novo DNA-Synthese der VSMC zu untersuchen. Hierbei wird die Menge des synthetischen Nucleosids BrdU, das während der Replikation in der S-Phase in den neu entstehenden DNA-Strang eingebaut wird, quantifiziert. Darüber wurde eine deutliche Hemmung der DNA-Synthese durch Zusatz von [6]-Shogaol beobachtet. Diese dosisabhängige Hemmung der DNA-

Synthese zeigte ähnliche IC_{50} -Werte wie das Resazurin-Konversions-Assay und die Bestimmung der Biomasse durch Kristallviolett-Färbung. Auch die weitere Zellzyklus-Analyse mittels Flow-Cytometrie von Propidium-Iodid (PI) gefärbten Zellen zeigte eine Akkumulierung der VSMC in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus. Damit wurde gezeigt, dass der antiproliferative Effekt von [6]-Shogaol durch eine Hemmung der DNA-Synthese und folglich einer Hemmung des Übergangs von der G_0/G_1 -Phase zur G_2/M -Phase des Zellzyklus gehemmt wird, allerdings sind dadurch noch keine Informationen über ein konkretes molekulares Target des Wirkstoffes erhalten und daher weitere Untersuchungen nötig. Ausgehend von literarischen Hinweisen, dass der antiproliferative Effekt ein Resultat der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2) durch [6]-Shogaol und folglich einer gesteigerten Expression des entsprechenden Genproduktes HO-1 (Hämoxygenase-1) sein könnte, wurde nachgegangen. Es stellte sich dabei heraus, dass sich in [6]-Shogaol-behandelten VSMC tatsächlich erhöhte Mengen an HO-1 nachweisen lassen und der antiproliferative Effekt von [6]-Shogaol in Nrf2-defizienten Fibroblasten (Nrf2 $-/-$) nicht mehr zu beobachten ist. Um die Kausalität zwischen der [6]-Shogaol-induzierten HO-1-Upregulation und der Proliferationshemmung weiter zu untermauern, wurde abschließend noch der selektive HO-1-Inhibitor „tin protoporphyrin IX“ verwendet, woraufhin kein antiproliferativer Effekt mehr zu beobachten war. Die Ergebnisse dieser aller Untersuchungen legen nahe, dass der antiproliferative Effekt auf VSMC von [6]-Shogaol tatsächlich durch eine Induktion von HO-1 zustande kommt. [27]

Wie dieses Beispiel sehr gut aufzeigt, stellt der gesamte Prozess, angefangen von der grundlegenden Feststellung eines antiproliferativen Effekts einer potenziellen Substanz auf die glatte Gefäßmuskulzellen bis hin zur endgültigen Aufklärung eines konkreten Wirkmechanismus (Identifizierung eines molekularen Targets), der für diese Wirkung (mit-)verantwortlich zu sein scheint, einen komplexen und sehr aufwendigen Vorgang dar. Da dieser zeitliche und finanzielle Aufwand im Zuge eines groß angelegten Screening-Prozesses mit der Anzahl der zu testenden Substanzen nochmals weiter ansteigt, sind Methoden, die eine Vorauswahl der vielversprechenden Substanzen darunter erlauben, dringend gesucht. Darüber hinaus müssen zur Aufklärung des Wirkmechanismus zumindest Hinweise (z.B. aus Literatur oder in-silico Vorhersagen) bestehen, um gezielt bei dessen Verifizierung vorgehen zu können, anstatt alle möglichen Targets nur mittels „Trial and Error“ zu testen. Zu diesem Zweck wäre also eine Methode wünschenswert, die zusätzlich zur Vorhersage der wahrscheinlichen Aktivität oder Inaktivität einer neuen Substanz, auch erste Hinweise bezüglich des Wirkungsmechanismus liefern kann. Damit dieses Ziel erreicht werden kann, ist eine Screening-Methode notwendig, die nicht einzelne Targets isoliert betrachtet, sondern viel

eher den Einfluss einer Substanz auf die Gesamtheit der Zellen und allen enthaltenen Bestandteilen erfasst. Eine Möglichkeit einer solchen holistischen Methode stellen sog. Metabolom-Analysen dar.

Metabolom-Analysen

Definition

Der Begriff Metabolomics ist eine der aktuellsten Bezeichnungen aus der Reihe der „-omics“-Technologien und bezeichnet die Untersuchungen der Gesamtheit aller niedermolekularen Bestandteile eines biologischen Systems (Metabolom) zu einem gegebenen Zeitpunkt. Es steht dabei sehr stark unter dem Einfluss bzw. in Wechselwirkung mit dem Genom, der Gesamtheit der genetischen Informationen eines biologischen Systems, und dem Proteom, der Gesamtheit der Proteine eines biologischen Systems. Das Metabolom kann weiter in ein Endometabolom (Gesamtheit aller intrazellulär vorliegender Metabolite) und ein Exometabolom (sezernierte Metabolite) eingeteilt werden (siehe Abbildung 12). [28]

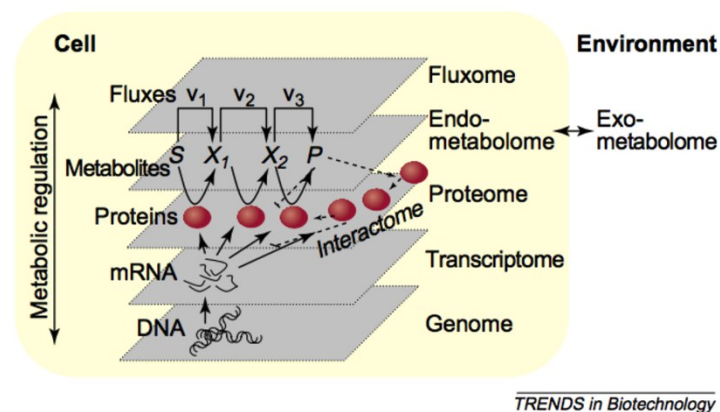


Abbildung 12: Darstellung der Wechselwirkung zwischen den verschiedenen “-omen” einer Zelle. Hierbei stellt jedes “-om” (mit Ausnahme des Genoms) eine komplexe Funktion der zugrunde liegenden “-ome” dar, wodurch die Komplexität mit jeder Ebene von unten nach oben zunimmt. Wechselwirkungen mit der Umgebung des biologischen Systems finden hauptsächlich über das Metabolom statt (Einteilung in Endo- und Exometabolom). Grafik nach [28], Figure 1.

Metabolomic-Fingerprints

Durch die enge Verknüpfung des Metaboloms mit dem Genom bzw. dem Proteom einer Zelle, werden bei Metabolom-Analysen auch Veränderungen auf diesen beiden zugrundeliegenden zellulären Ebenen mit erfasst, was zum einen den großen Vorteil einer gesamtheitlichen Untersuchung der Zellen erlaubt, andererseits aber durch die enorme Komplexität der Zusammensetzung aus verschiedensten Substanzen (Substanzklassen) auch hohe Anforderungen an die verwendeten analytischen Methoden stellt. Aus diesem Grund gibt es derzeit eigentlich kein analytisches Verfahren, durch dessen alleinige Anwendung wirklich alle Substanzen des Metaboloms erfasst werden könnten. Viel mehr spielt daher die Erfassung eines möglichst aussagekräftigen Ausschnittes des gesamten Metaboloms zum Zeitpunkt der Messung, eines sog. *metabolischen Fingerprints*, eine besondere Rolle bei den Metabolom-Analysen. Diese so erhaltenen Fingerprints können dann zur Untersuchung von Veränderung des Metaboloms durch verschiedene äußere Einflüsse, wie beispielsweise dem eines Wirkstoffes, herangezogen werden. Zu den derzeit etablierten Methoden zur Gewinnung solcher Metabolom-Fingerprints zählen insbesondere die Massenspektrometrie (MS), entweder als alleinstehende Methode oder in Kombination mit chromatographischen (Flüssig- oder Gaschromatographie) oder elektrophoretischen (Kapillarelektrophorese) Verfahren zur Vortrennung. Auch die Analyse mittels NMR-Spektroskopie ist üblich. Die erhaltenen MS- oder NMR-Spektren dienen dann als Fingerprint und stellen eine Momentaufnahme des Metaboloms zum Zeitpunkt der Messung dar. [28]

FT-IR-Spektroskopie zur Gewinnung von Metabolom-Fingerprints

Eine neuere Methode im Bereich der Metabolom-Analysen von biologischem Material stellt die Fourier-Transformations-Infrarot (FT-IR) Spektroskopie dar. Diese bietet, insbesondere unter Einsatz der ATR-Technik (siehe unter Material und Methoden), viele Vorteile gegenüber den anderen verwendeten Methoden: Die Messungen sind sehr rasch und unkompliziert möglich, die Technik ist billig in der Anwendung und stellt ein nicht-destruktives Messverfahren dar. Dadurch erscheint sie auch für die Durchführung groß angelegter Screening-Verfahren als eine geeignete Methode.

Die IR-Spektren resultieren hierbei aus einer Überlagerung aller wichtigen Inhaltsstoffgruppen (Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinsäuren) der untersuchten Zellen und sind daher zur Verwendung als Fingerprint ausgezeichnet geeignet (siehe Abbildung 13). [29]

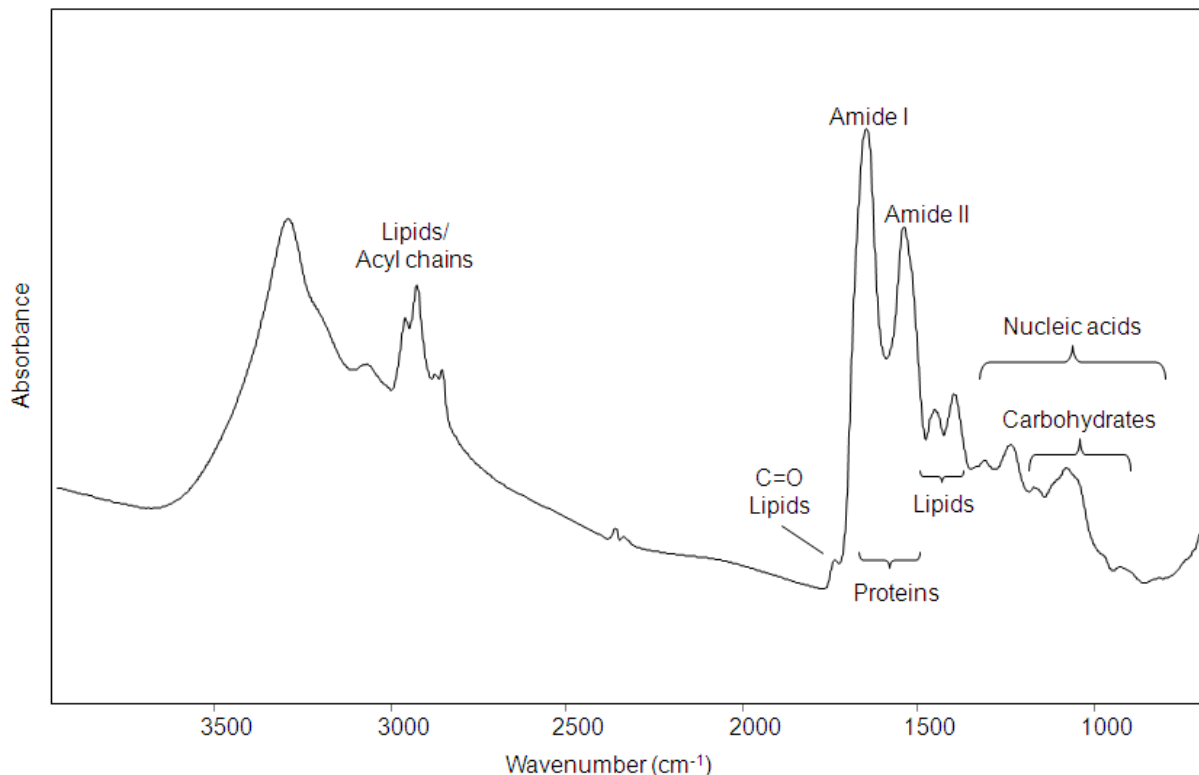


Abbildung 13: FT-IR-Absorptionsspektrum einer intakten murinen Oozyte. Jene Bereiche des Spektrums, in denen wichtige Biomoleküle eine Absorption zeigen, sind beschriftet. Grafik nach [29].

Da die so gewonnenen IR-Spektren sehr komplexe Daten darstellen, sind für weitere Aussagen Verfahren der Chemometrie unerlässlich (siehe unter Material und Methoden).

derzeitige Anwendungsgebiete - Stand der Literatur

Die generelle Eignung der FT-IR-Spektroskopie in Kombination mit entsprechenden chemometrischen Verfahren zur Analyse und Charakterisierung von biologischem Material wurde schon an mehreren Stellen gezeigt. So stellt sie beispielsweise im Bereich der Mikrobiologie zur Identifikation und Charakterisierung von Mikroorganismen schon seit längerer Zeit eine etablierte Routinemethode dar, mit deren Hilfe es möglich ist, Bakterien taxonomisch anhand ihrer IR-Fingerprints sogar bis hin zur Subspezies-Ebene (Linie; engl. *strain*) zu klassifizieren. [30] In diesem Zusammenhang wurde anhand verschiedener Arten und Linien der Gattung *Lactobacillus* weiters auch gezeigt, dass sich die FT-IR-Spektroskopie selbst bei nie völlig vermeidbaren biologischen Variabilitäten, induziert durch geringfügige Abweichungen in den Kulturbedingungen (minimale Unterschiede in der Temperatur, atmosphärische Bedingungen oder Dauer der Inkubation) noch als eine robuste Methode erweist. Allerdings führten diese Variationen in den Kulturbedingungen

erwartungsgemäß dennoch zu einer deutlich erhöhten Variabilität in den Daten, was dafür spricht, dass nichtsdestotrotz eine standardisierte und protokollierte Vorgehensweise nötig ist, um ausreichend reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. [31]

Aber auch zur Untersuchung von höheren Zellen und Geweben hat sich die FT-IR-Spektroskopie bereits bei mehreren Fragestellungen als eine sehr effiziente Methode herausgestellt. So wurden beispielsweise Anwendungsmöglichkeiten der FT-IR-Spektroskopie im Bereich der Diagnostik gefunden. Hierbei konnte unter anderem gezeigt werden, dass sich die auftretenden biochemischen Veränderungen in malignem Brustgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe mittels der IR-Spektroskopie gut erfassen lassen und damit eine rasche Bestimmung der Malignität von Gewebeproben erlaubt. [32] Gleiches konnte auch für ovariale Gewebeproben gezeigt werden [33], wodurch in Kombination mit anderen Tumor-Markern eine Eignung der Methode in der Diagnose von Brust- bzw. Ovarialkrebs möglich erscheint. In diesem Zusammenhang wurde weiters auch gezeigt, dass eine rasche Unterscheidung zwischen Daunorubicin-sensitiven und multiresistenten Leukämie-K562-Zellen mithilfe der FT-IR-Spektroskopie möglich ist, was eine bedeutende Rolle für Abschätzung des Erfolges einer entsprechenden Chemotherapie bedeutet. [34]

Neben diesen diagnostischen Anwendungen finden sich in der Literatur auch zahlreiche Arbeiten, die sich mit den Untersuchungen der Effekte verschiedenster Substanzen auf Zellen mittels FT-IR-Spektroskopie beschäftigten. So war es beispielsweise möglich mithilfe von IR-Fingerprints, die gesamtheitlichen Effekte verschiedener, potenziell antiproliferativer Polyphenole auf Glioblastom-Krebszellen zu erfassen und zu klassifizieren. Da die Wirkungen von Polyphenole bekanntermaßen durch Interaktionen mit vielen verschiedenen molekularen Targets in den Zellen zustande kommen, und nicht nur auf die Wechselwirkung mit einem konkreten Target zurückgeführt werden können, kommt einer solchen gesamtheitlichen Erfassung aller Zellinhaltsstoffe hierbei ein besonderer Stellenwert zu. [35]

Viele weitere Arbeiten konzentrierten sich auf Untersuchungen des Zellzyklus, da eine Vielzahl der antiproliferativ wirksamen Substanzen über eine direkte Beeinflussung des Zellzyklus wirksam ist [36]. Es wurde deshalb vermutet, dass die beobachteten Veränderungen in den IR-Fingerprints der Zellen nach Behandlung mit solchen Substanzen hauptsächlich auf die zugrundeliegenden Zellzyklus-Veränderungen zurückgeführt werden könnten, und nicht unbedingt durch die gesamtheitlichen Veränderungen des Metaboloms hervorgerufen werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden weitere Untersuchungen mit Paclitaxel, welches den Zellzyklus nachweislich in der G₂/M-Phase arretiert, an Prostata-Krebszellen durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten aber deutlich, dass die beobachteten Unterschiede in den Spektren zum Großteil auf die Behandlung selbst

zurückgeführt werden kann und nicht auf den Unterschieden der Zellzyklus-Phasen basiert (siehe Abbildung 14). [37]

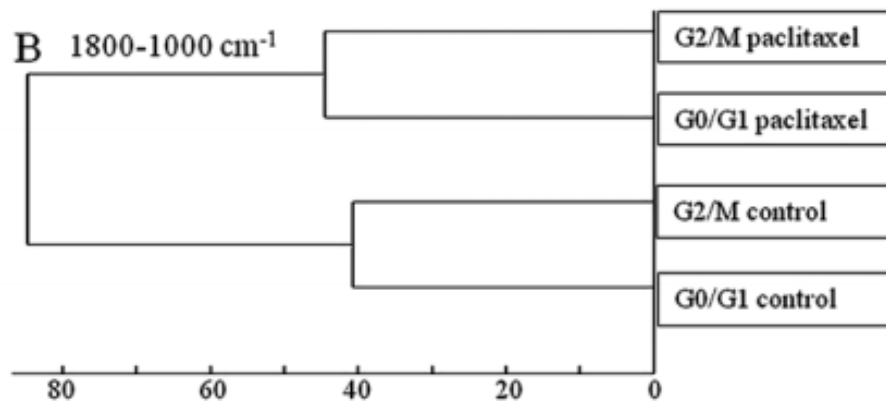


Abbildung 14: Hierarchische Clusteranalyse der Spektren von Prostata-Krebszellen in verschiedenen Zellzyklusphasen mit oder ohne Paclitaxel-Behandlung. Die Unterschiede zwischen Behandlung (paclitaxel) und Nicht-Behandlung (control) der Zellen sind deutlich stärker ausgeprägt als jene zwischen den unterschiedlichen Zellzyklusphasen (G₂/M bzw. G₀/G₁). Grafik nach [37], Fig. 5B.

Eine weitere Arbeit von Derenne et al. ist an dieser Stelle besonders erwähnenswert und kann als ein wichtiger Ausgangspunkt für die geplante Anwendung der FT-IR-Spektroskopie im Bereich des Screenings neuer antiproliferativer Substanzen an Zellkulturen angesehen werden. In dieser Arbeit wurde eindeutig gezeigt, dass sich die IR-Fingerprints von zuvor mit verschiedenen antiproliferativen Substanzen behandelten Prostata-Krebszellen (PC-3-Zellen) anhand der zugrundeliegenden Wirkmechanismen der Substanzklasse einteilen lassen. Hierzu wurden die PC-3-Zellen mit 7 verschiedenen antiproliferativen Substanzen behandelt, denen sich drei verschiedene übergeordnete pharmakologische Wirkungsmechanismen zuordnen lassen: Antimetabolite (Methotrexat, Mercaptopurin), die als strukturelle Analoga mit der Neusynthese der DNA interferieren, Hemmstoffe der Topoisomerase-II aus der Gruppe der Anthracycline (Doxorubicin, Daunorubicin) und Wirkstoffe, welche die De-/Polymerisation von Mikrotubuli und damit letztlich die Ausbildung des Spindelapparates hemmen (Paclitaxel, Vinblastin, Vincristin). Die Substanzen wurden in den jeweils ermittelten IC₅₀-Konzentrationen den Zellen für 48h zugesetzt und anschließend mittels FT-IR vermessen. Eine nachfolgende hierarchische Clusteranalyse (unter Verwendung des Ward-Algorithmus) zeigte, dass sich die Spektren anhand der zugrundeliegenden Wirkmechanismen in die drei zuvor vorgestellten Gruppen einteilen lassen (siehe Abbildung 15). [38]

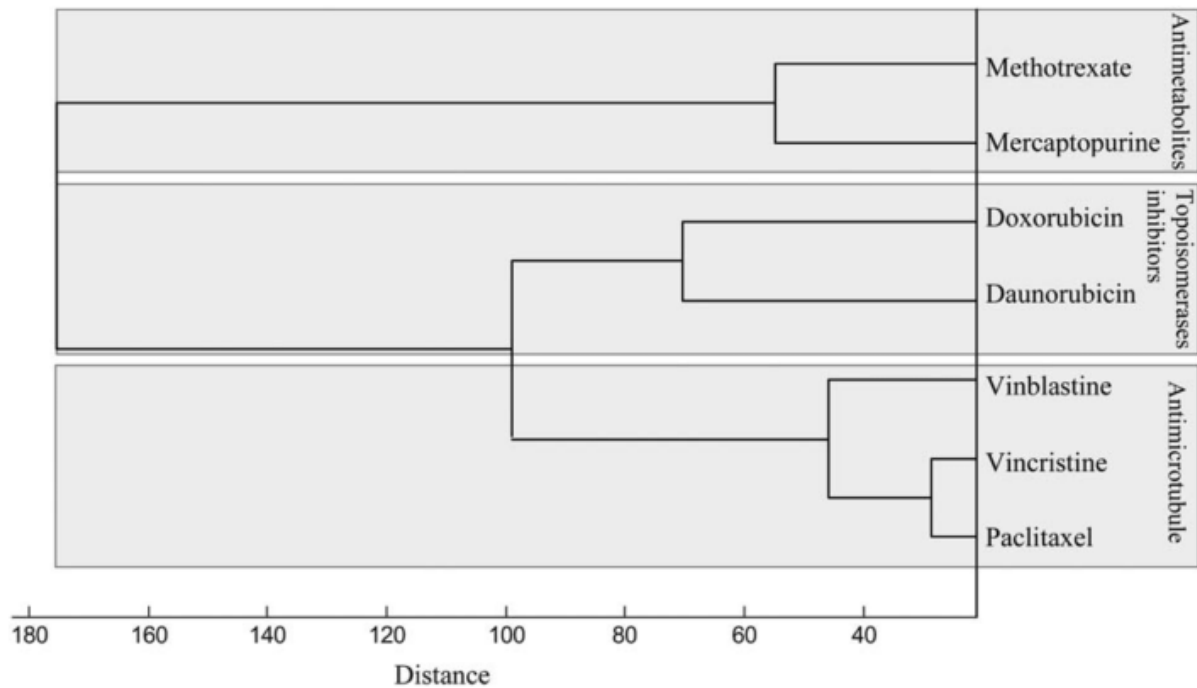


Abbildung 15: Die hierarchische Clusteranalyse der IR-Spektren behandelter Prostatakrebszellen zeigt, dass sich die Spektren nach den zugrundeliegenden Wirkmechanismen der jeweiligen Substanzklassen einteilen lassen. Grafik nach [38], Figure 4.

Durch diese Arbeiten liegt die Vermutung nahe, dass sich die FT-IR-Spektroskopie auch zum Screening von neuen Substanzen, deren Wirkmechanismus noch unbekannt ist, eignen könnte. Hierzu müssten zuerst Substanzen, deren Wirkmechanismus weitgehend bekannt ist, vermessen werden und anhand dieser Spektren ein Modell erstellt werden. Anhand dieses Modells können dann die Spektren der Substanzen mit unbekanntem Wirkmechanismus auf etwaige Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit zu bekannten Substanzen und deren Wirkmechanismen untersucht werden.

Zielsetzung

Wie zahlreiche Arbeiten in der Literatur bereits zeigen konnten, stellt die FT-IR-Spektroskopie eine sehr effiziente und robuste Methode zur Untersuchung von biologischem Material, insbesondere auch zur Untersuchung des Metaboloms von Zellen, dar. Ausgangspunkt für dieses Projekt war insbesondere die Arbeit von Derenne et al. [38], in der eindrucksvoll gezeigt wurde, dass sich die IR-Spektren von Prostata-Krebszellen, die zuvor mit verschiedenen antiproliferativen Substanzen behandelt wurden, statistisch signifikant gemäß der zugrunde liegenden Wirkmechanismen der jeweiligen Substanz trennen lassen. Diese Tatsache erweckt große Hoffnung, dass sich die IR-Spektroskopie als neuartige, schnell und einfach durchzuführende und vergleichsweise billige Methode zum Screening neuer potenziell antiproliferativer Substanzen an Zellkulturen eignet.

Da in der Pathogenese von in-stent Restenosen die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) eine bedeutende Rolle spielt, hat die Suche nach neuen Substanzen, die in deren übersteigerte Proliferation hemmend eingreifen, große Bedeutung erlangt. Da bereits einige Naturstoffe entdeckt wurden, die einen solchen erwünschten antiproliferativen Effekt auf VSMC zeigen, und teilweise auch schon therapeutischen Einsatz als Bestandteil sogenannter Drug-Eluting Stents (DES) erlangt haben, scheint der Bereich der Naturstoffe als eine geeignete erste Anlaufstelle bei der Suche neuer Substanzen. [25] [26] [27]

Um sicher zu stellen, dass die mittels FT-IR-Spektroskopie gewonnen Fingerprints tatsächlich den Einfluss der entsprechenden Substanz auf das gesamte Metabolom der Zelle widerspiegeln, und nicht Unterschiede durch verschiedene Handhabungen der Zellen oder verschiedenster exogener Einflüsse, ist für diese Art von Metabolom-Analysen ein robustes und effizientes Protokoll, in dem alle Arbeitsschritte, beginnend von der Zellkultur bis hin zum endgültigen Aufbringen der Probe auf den ATR-Kristall des IR-Spektrophotometers festgelegt sind, unerlässlich.

Das Ziel dieser Arbeit war nun also das Erstellen und Optimieren eines solchen Protokolls für glatte Gefäßmuskelzellen, um dieses später für ein Screening-Verfahren zur Analyse des Einflusses verschiedener Naturstoffe auf VSMC im Hinblick auf einen antiproliferativen Effekt heranziehen zu können.

Material und Methoden

Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Substanzen mit Bezugsquelle bzw. Herstellungsvorschriften.

Bezeichnung	Firma / Herstellung		
0,2% Trypanblau-Lösung	NaCl (0,9%)	18,0g	
	Trypanblau (0,2%)	4,0g	
	Aqua dest.	ad. 2000mL	
	nach dem Lösen filtrieren		
Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 (1:1)	Lonza Sales AG / Szabo Scandic ("DMEM:F12 1:1 wo HEPES", LONBE04-687Q)		
Fetales Kälberserum (FBS)	Life Technologies ("Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved, South America origin" catalogue number: 10270 lot number: 41F1142K)		
Gentamycin-Sulfat/Amphotericin B	Lonza Sales AG / Szabo Scandic (LONCC-4083)		
PBS (phosphate-buffered saline)	für 5 Liter:		
	NaCl	36,0g	
	Na ₂ HPO ₄	7,4g	
	KH ₂ PO ₄	2,15g	
	pH-Wert auf 7,4 einstellen, autoklavieren		
Trypsin/EDTA	Trypsin (von Gibco)	0,5g	0,05%
	Na ₂ - EDTA (von Carl Roth)	0,2g	0,02%
	in 1000mL PBS lösen, steril filtrieren		

Zellkultur

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um primäre glatte Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMC), die aus Rattenaorten isoliert wurden (bezogen von Lonza). Kultiviert wurden diese adhären wachsenden Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (1:1), welches mit 20% fetalem Kälberserum (fetal bovine serum, FBS) und dem Antibiotikum Gentamycin-Sulfat und dem Antimykotikum Amphotericin B versetzt wurde. Inkubiert wurden sie bei 37°C und 5% CO₂ in geeigneten Kulturfラスchen (Zellkulturflasche T-175, 175 cm² Standard-Wachstumsfläche für adhären Zellen; bezogen von Sarstedt, Deutschland).

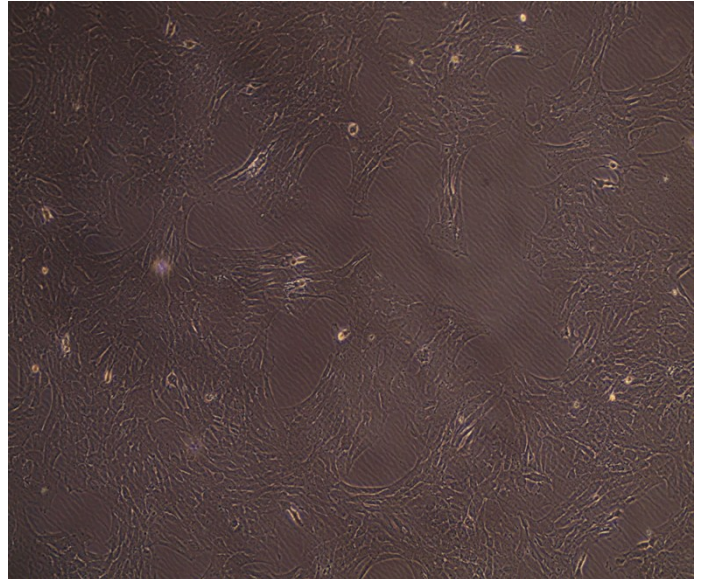


Abbildung 16: mikroskopische Aufnahme der glatten Gefäßmuskelzellen in Kultur (Olympus CKX31, 100x Vergrößerung, Phasenkontrast-Aufnahme)

Subkultivierung (Passagierung) der Zellen

Um eine Hemmung der Proliferation infolge von Zell-Zell-Kontakt (Kontakthemmung) bei zu hoher Konfluenz zu verhindern, wurden die Kulturen zwei Mal pro Woche passagiert (Montag und Freitag). Das Kulturmedium wurde einmal wöchentlich (Mittwoch) erneuert, um den Zellen frische Substrate bereitzustellen und eine ausreichend hohe Antibiotika bzw. Antimykotika-Konzentration im Kulturmedium zu gewährleisten.

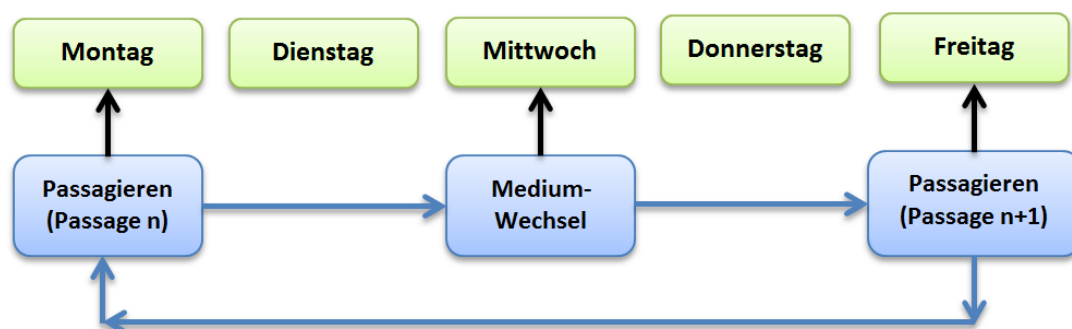


Abbildung 17: allgemeine wöchentliche Arbeitsschritte in der Zellkultur

Passagieren der Zellen - Vorgehensweise:

Alle verwendeten Reagenzien wurden eine halbe Stunde vor Arbeitsbeginn in einem Wasserbad (37°C) aufgewärmt, um sie der Kultivierungstemperatur der Zellen anzupassen. Die Adhärenz und Viabilität der inkubierten Zellen wurde mikroskopisch beurteilt (verwendetes Mikroskop: Olympus CKX31). Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und die adhärenz gewachsenen Zellen mit 20 mL PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) vorsichtig gewaschen. Dieser Waschschrift ist nötig, um die an den Zellen verbliebenen Reste des Kulturmediums zu entfernen, welche ansonsten die nachfolgende Reaktion mit Trypsin beeinträchtigen würden. Anschließend werden die Zellen durch Inkubation (5 Minuten) mit Trypsin/EDTA enzymatisch vom Boden der Kulturflasche gelöst und in eine Zell-Suspension übergeführt. Durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche wurde die Ablösung der Zellen begünstigt und anschließend mikroskopisch kontrolliert (Abrundung der Zellkörper und freie Beweglichkeit). Die Reaktion mit dem Trypsin wurde dann durch Zugabe der 4-fachen Menge an Kulturmedium (20 mL) gestoppt und die Suspension zentrifugiert (4 Minuten bei 1400 Umdrehungen/Minuten). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 10 mL Kulturmedium resuspendiert. Um Zell-Agglomerate bei der nachfolgenden Zellzahl-Bestimmung zu vermeiden, wird die Suspension durch einen Membranfilter (EasyStrainer® bezogen von Greiner Bio-One, Maschenweite: 70 µm) filtriert. Die Zellzahl-Bestimmung erfolgte aus einem Aliquot von etwa 0,5 mL mittels Flow-Cytometrie (Vi-Cell XR cell viability analyzer, Viabilität durch Trypanblau-Färbung bestimmt) oder durch mikroskopische Auszählung (Neubauer-Zählkammer). Basierend auf der ermittelten Zellzahl und der Anzahl an Tagen bis zum nächsten Passagieren wird ein entsprechendes Aliquot in 20 mL frisches Kulturmedium gegeben und inkubiert.

Ange-setzte Zellzahlen:

Montag: 1×10^6 Zellen

Freitag: 3×10^6 Zellen

Für alle weiteren Arbeitsschritte wurden stets nur Zellkulturen der Passage 6 bis 15 verwendet.

Aussäen der Zellen auf Mikrotiterplatten

Um bei der Austestung von Substanzen an den Zellen eine größere Anzahl an Parallelversuchen zu ermöglichen, werden die Zellen in Mikrotiterplatten mit verschiedener Anzahl an Wells ausgesät (Cellstar® von Greiner Bio-One). Das Vorgehen hierbei ist prinzipiell analog dem Passagieren: Die Zellen werden zuerst durch Behandlung mit Trypsin (5 Minuten bei 37°C) in der Kulturflasche in eine Zellsuspension übergeführt und anschließend die Zellzahl in der Suspension bestimmt. Danach werden Aliquote, welche die gewünschte Anzahl an Zellen beinhalten, in die Wells gefüllt und mit Kulturmedium versetzt. Die hierbei verwendeten Zellkonzentrationen („seeding density“) sind abhängig von der Wachstumsoberfläche der Wells bzw. Gefäße (siehe Abbildung 18) und dürfen insbesondere bei der Austestung von antiproliferativen Effekten nicht zu hoch gewählt werden, da ansonsten das Ergebnis durch die Kontakthemmung bei Erreichen von Konfluenz verfälscht wird.

Useful Numbers for Cell Culture

There are various sizes of dishes and flasks used for cell culture. Some useful numbers such as surface area and volumes of dissociation solutions are given below for various size culture vessels.

	Surface Area (mm ²)	Seeding Density	Cells at Confluency ¹	Versene (ml of 0.53 mM EDTA)	Trypsin (ml of 0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA)	Growth Medium (ml)
Dishes						
35 mm	962	0.3×10^6	1.2×10^6	1	1	2
60 mm	2,827	0.8×10^6	3.2×10^6	3	2	3
100 mm	7,854	2.2×10^6	8.8×10^6	5	3	10
150 mm	17,671	5.0×10^6	20.0×10^6	10	8	20
Cluster Plates						
6-well	962	0.3×10^6	1.2×10^6	2	2	3–5
12-well	401	0.1×10^6	0.4×10^6	1	1	1–2
24-well	200	0.05×10^6	0.2×10^6	0.5	0.5	0.5–1.0
Flasks						
T-25	2,500	0.7×10^6	2.8×10^6	3	3	3–5
T-75	7,500	2.1×10^6	8.4×10^6	5	5	8–15
T-160	16,000	4.6×10^6	18.4×10^6	10	10	15–30

¹ The number of cells on a confluent plate, dish, or flask will vary with cell type. For this table, HeLa cells were used.

Abbildung 18: Konzentrationen in der Zellkultur für die jeweiligen Gefäße. Grafik nach

<https://www.thermofisher.com/at/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/cell-culture-useful-numbers.html>. Abgerufen am 16.12.2015.

Da bei den nachfolgenden Experimenten nur 12- oder 6-Well Platten zum Einsatz kamen, wurden entsprechend $0,1 \times 10^6$ Zellen oder $0,3 \times 10^6$ angesetzt und mit je 1 bzw. 3 mL Kulturmedium versetzt. Die Platten wurden anschließend für 24h inkubiert, um den Zellen ein Anwachsen an der Oberfläche der Wells zu ermöglichen.

Lyophilisation (Gefriertrocknung)

Die Gefriertrocknung oder Lyophilisation stellt ein besonders schonendes Trocknungsverfahren dar, das in der Pharmazie bei der Trocknung von thermolabilen und hydrolyse-empfindlichen Arzneistoffen, wie beispielsweise Antibiotika, Impfstoffen und Proteinen große Bedeutung erlangt hat. Grundlage für dieses Verfahren ist der physikalische Prozess der Sublimation, dem direkten Übergang vom festen in den gasförmigen Aggregatzustand, ohne dazwischen den flüssigen Aggregatzustand zu durchwandern (siehe Abbildung 19). Da auch gefrorenes Wasser noch einen deutlichen Dampfdruck besitzt, kann der Wasserdampf über dem Eis durch Anlegen eines Hochvakuums und/oder durch Abscheidung an einem Kondensor aus dem System entfernt werden. Dadurch fällt der Wasserdampf-Partialdruck in der Umgebung des Eises unter den Sättigungsdampfdruck und es gehen ständig weitere Wassermoleküle aus dem gefrorenen Zustand in den gasförmigen Zustand über, wo sie dann wieder durch das Hochvakuum aus dem Gleichgewicht entzogen werden. Durch diesen kontinuierlichen Prozess treten nach und nach Poren anstelle der Eiskristalle und es entsteht letztendlich ein hochporöses Produkt (Lyophilisat), das sich besonders dadurch auszeichnet, dass es bei erneutem Zusatz von Wasser sehr schnell gelöst werden kann. Diese Eigenschaft bringt aber auch die Notwendigkeit mit sich, dass die Produkte bis zu ihrer Wiederauflösung in einem Vakuum-Exsikkator trocken gelagert werden müssen. [39]

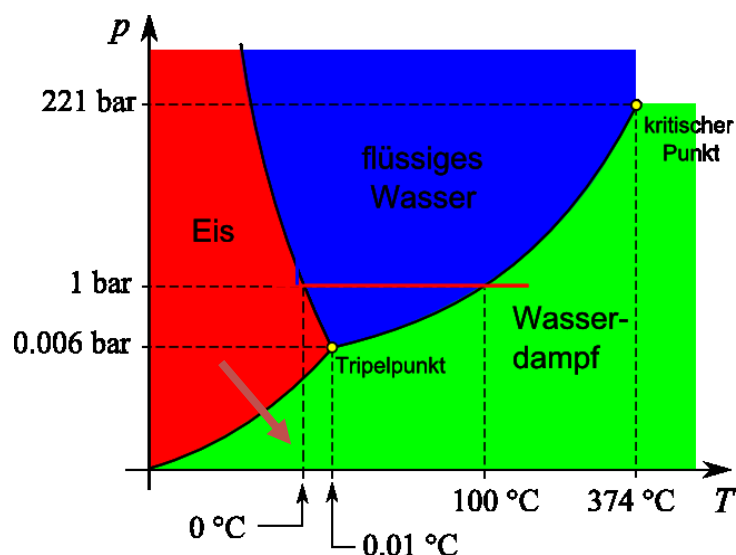


Abbildung 19: Phasendiagramm von Wasser. Der Prozess der Sublimation ist durch den roten Pfeil gekennzeichnet. Grafik modifiziert nach [40].

Die Bezeichnung der Lyophile, die für diese Experimente verwendet wurde, lautet „Laboratory freeze dryer VaCo 5-II“ von Zirbus Technology GmbH (Bad Grund, Deutschland). Die Proben wurden entweder mithilfe eines geeigneten Aufsatzes in die Lyophile eingebracht oder in einem Exsikkator, der an die Lyophile angeschlossen wurde, gefriergetrocknet. Die dabei erreichten Drücke lagen zwischen 0,050-0,060 mbar.

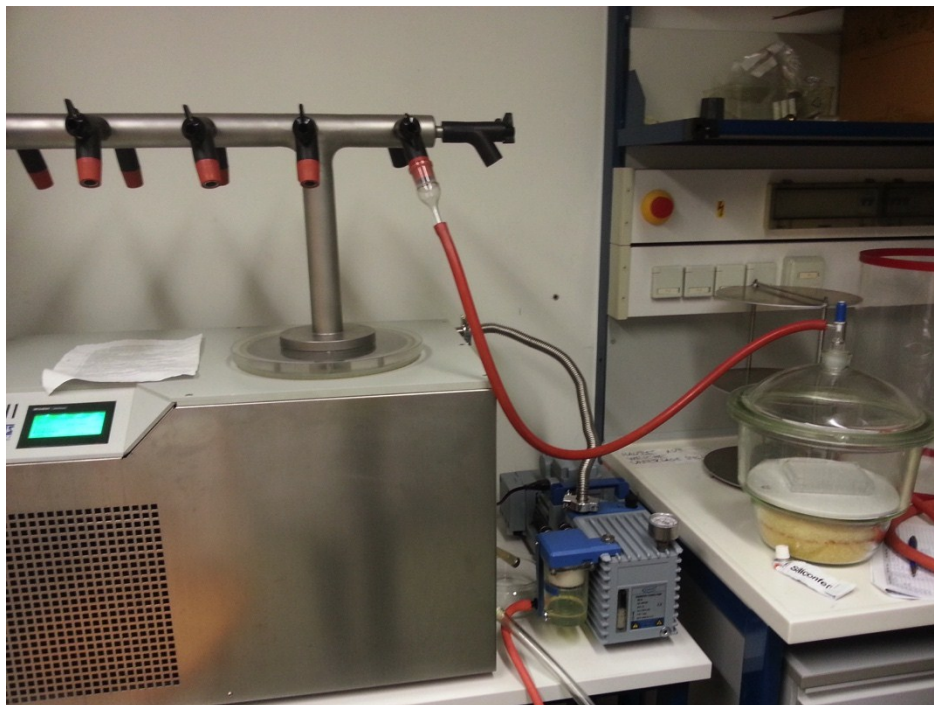


Abbildung 20: Lyophile „VaCo 5-II“ mit angeschlossenem Exsikkator.

Infrarot-Spektroskopie

Grundlagen

Infrarot-Strahlung bezeichnet jene elektromagnetische Strahlung, die im elektromagnetischen Spektrum mit einer Wellenlänge von 760 nm bis 1000 μm (1 mm) unmittelbar neben dem Bereich des sichtbaren Lichtes in Richtung höherer Wellenlänge zu liegen kommt. In der IR-Spektroskopie hat sich neben der Wellenlänge eine weitere Größe durchgesetzt, die Wellenzahl (Einheit: cm^{-1}), welche reziproke Werte der Wellenlänge darstellt und damit der Frequenz (Energie) direkt proportional ist. Der Bereich der IR-Strahlung kann grob in drei weitere Bereiche gegliedert werden: Nahes Infrarot (NIR; Wellenzahlbereich: 13160 cm^{-1} - 4000 cm^{-1}), Mittleres Infrarot (MIR; Wellenzahlbereich: 4000 cm^{-1} - 200 cm^{-1}) und Fernes Infrarot (FIR; Wellenzahlbereich: 200 cm^{-1} - 10 cm^{-1}). [41]

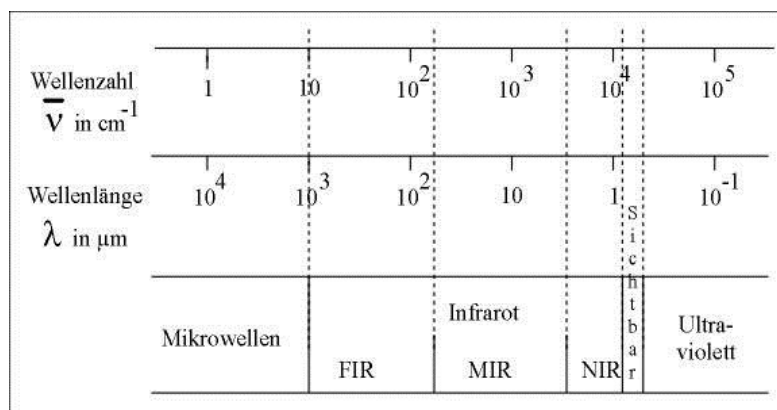


Abbildung 21: Ausschnitt des elektromagnetischen Spektrums mit den Unterbereichen der infraroten Strahlung. Grafik nach [41].

Normalerweise wird in der IR-Spektroskopie der Wellenzahlbereich zwischen 4000 cm^{-1} und 400 cm^{-1} untersucht. Durch Wechselwirkung der IR-Strahlung mit dem Probenmaterial, werden Schwingungen in den Molekülen der Probe induziert. Da die hierfür erforderlichen Energien je nach Art der Schwingung (Änderung in der Bindungslänge, „stretching“; Änderung im Bindungswinkel, „bending“) und der Molekülstruktur abhängig sind, kommt es nur bei den Wellenzahlen entsprechender Energie zu einer Absorption. [42] Diese Absorptionen (bzw. Transmissionen) werden dann in einem IR-Spektrum aufgezeichnet. Hierbei wird auf der Abszisse der untersuchte Wellenzahlen-Bereich, üblicherweise absteigend von rechts nach links, aufgetragen. Die Ordinate entspricht meist den gemessenen Transmissionen (Transmissionsspektren, Abbildung 22), seltener den Absorptionen (Absorptionsspektren). Für die klassische Anwendung der IR-Spektroskopie zur Identifizierung und

Reinheitsprüfung von chemischen Reinsubstanzen ist insbesondere der Bereich unter 1500 cm^{-1} interessant, da dieser charakteristisch für eine bestimmte Substanz ist. Durch einen direkten Vergleich des gemessenen Probenspektrums mit einem Referenzspektrum lassen sich dadurch Aussagen über Identität und Reinheit der untersuchten Substanz treffen. Im Bereich über 1500 cm^{-1} lassen sich die Peaks oftmals bestimmten charakteristischen funktionellen Gruppen zuordnen, wodurch sich die IR-Spektroskopie bis zu einem gewissen Grad auch unterstützend zu anderen Verfahren (NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie) für die Strukturaufklärung von chemischen Verbindungen eignet.

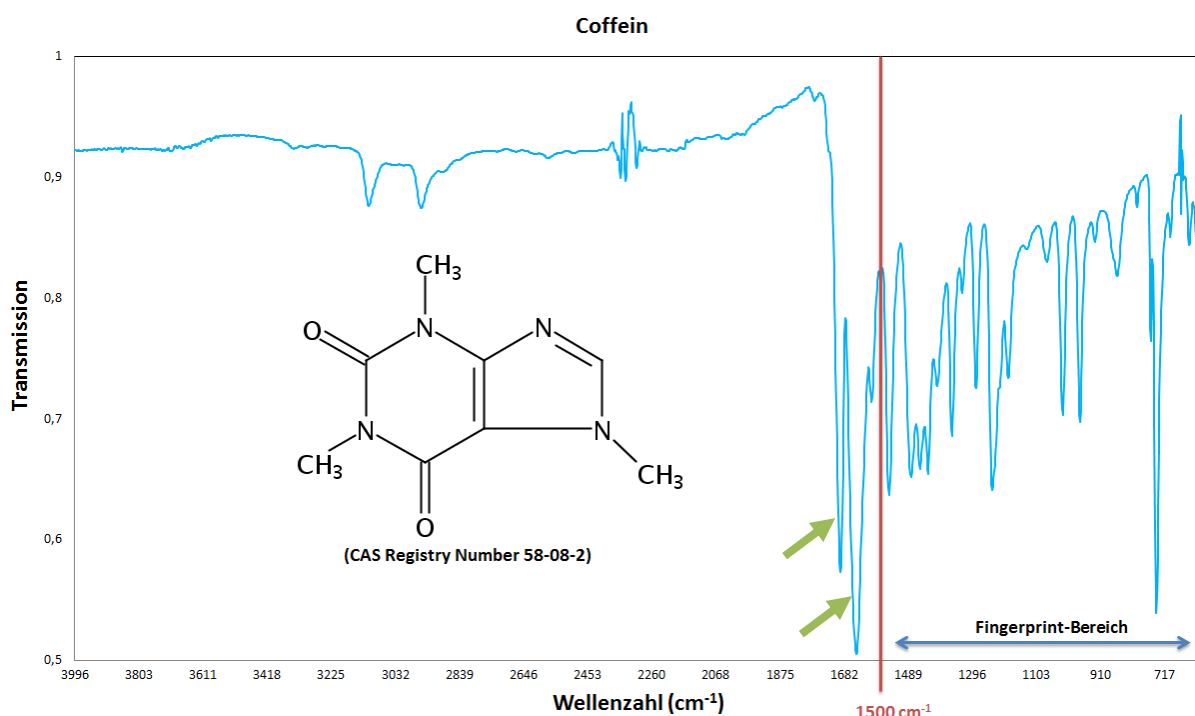


Abbildung 22: Typisches IR-Transmissionsspektrum einer chemischen Reinsubstanz (Coffein). Unter einer Wellenzahl von 1500 cm^{-1} befindet sich der „Fingerprint-Bereich“, der besonders reich an Peaks ist. Im Bereich über 1500 cm^{-1} finden sich Peaks, die sich häufig bestimmten funktionellen Gruppen zuordnen lassen, wie in diesem Fall die Absorption der beiden Carbonyl-Bindungen im Molekül bei 1645 cm^{-1} und 1693 cm^{-1} (grüne Pfeile).

Fourier Transformation IR-Spektroskopie (FT-IR)

Die FT-IR-Spektroskopie stellt eine entscheidende Weiterentwicklung der ursprünglichen Messmethode, der *dispersiven* IR-Spektroskopie, dar. Im Gegensatz zur dispersiven Methode werden hier nicht die einzelnen Wellenlängen nacheinander angeregt (Gitter- oder Prismen-Monochromator), sondern mithilfe eines Interferometers alle Wellenlängen des definierten Spektralbereiches gleichzeitig angeregt. Das resultierende Interferogramm kann dann anschließend durch die mathematische Operation der Fourier-Transformation in das gewohnte IR-Spektrum umgerechnet werden. Durch die Verwendung eines Interferometers anstelle eines Monochromators bietet die FT-IR-Spektroskopie einige deutliche Vorteile, wie besseres Signal-Rauschen-Verhältnis, höhere Frequenzgenauigkeit und deutlich kürzere Messzeiten. Durch diese Vorteile sind heute fast ausschließlich FT-IR-Spektrometer im Einsatz. [43]

Attenuated Total Reflection (ATR) Technik

Die ATR-Technik ist eine besondere IR-spektroskopische Technik, mit deren Hilfe es möglich ist feste oder flüssige Proben unmittelbar, und ohne vorheriger Herstellung von KBr-Presslingen, zu vermessen und stellt damit gewissermaßen das Pendant zur Messung der Proben in Transmission dar. Kernstück dieser Technik ist der ATR-Kristall, durch den die IR-Strahlung in Totalreflexion geführt wird. An der Grenzfläche dieses Kristalls bildet sich eine sogenannte evaneszente Welle aus, die in Wechselwirkung mit der aufgetragenen Probe treten kann und infolge von Absorption die geführte Strahlung im Kristall abschwächen kann. [44]

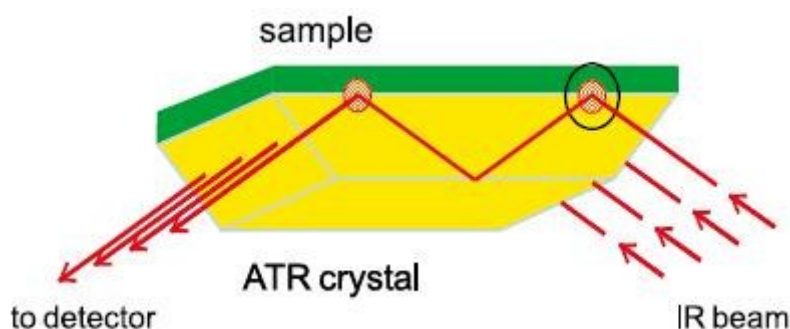


Abbildung 23: ATR-Kristall durch den die IR-Strahlung in Totalreflexion geführt wird. Die entstehende evaneszente Welle (schwarzer Kreis) tritt mit der aufgetragenen Probe in Wechselwirkung, wodurch der reflektierte Strahl abgeschwächt wird. Grafik nach [45].

Diese Methode bietet sich für die hier vorgenommenen Untersuchungen an den Zellen besonders an, da die Proben hierbei entweder mit einem geeigneten Aufsatz in flüssiger Form (als Zellsuspensionen) auf den ATR-Kristall aufgebracht und dort getrocknet werden können oder direkt als Feststoff (Lyophilisate) auf den ATR-Kristall aufgebracht und mittels eines Stempels angedrückt werden.

Messbedingungen und Spektrenbearbeitung

Alle Messungen wurden mit einem „Bruker Tensor 27“-FT-IR-Spektrophotometer (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts) unter Verwendung einer ATR-Einheit (MIRacle™ Single Reflection ATR; Pike Technologies, Madison, Wisconsin) durchgeführt und die Spektren bei einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Alle Proben wurden in technischen Triplikaten vermessen und vor jeder neuen Probe eine Hintergrundmessung (gereinigter ATR-Kristall ohne Probe) durchgeführt. Es wurden pro durchgeführter Messung je 32 Scans gemittelt und die Transmissionen im Bereich von 4000 cm^{-1} bis 600 cm^{-1} aufgezeichnet. Analysiert und bearbeitet wurden die erhaltenen Spektren mithilfe des Programmes „OPUS“ (Version 5.5, Bruker Optik GmbH). Die Spektren wurden für weitere Analysen stets einer Basislinienkorrektur und einer Vektornormierung unterzogen.

Die IR-Spektren in dieser Arbeit sind durchgehend als Absorptionsspektren dargestellt, da auch die Spektren in den relevanten Literaturstellen auf diese Art dargestellt wurden.

Statische Analyse der Daten

Da es sich bei den erhaltenen IR-Spektren um sehr komplexe Daten mit einer Vielzahl an beobachteten Variablen (Wellenzahlen) handelt, müssen diese mit entsprechenden statischen Verfahren analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit die Korrelations- und die Hauptkomponentenanalyse herangezogen.

Korrelationsanalyse

Der Begriff Korrelation bezeichnet den Zusammenhang bzw. die Abhängigkeit zwischen Variablen. Zumeist wird hierbei von einer linearen Korrelation ausgegangen, die durch den *Pearson'schen Korrelationskoeffizient* (r) beschrieben werden kann. Er wird wie folgt aus der Kovarianz und den Standardabweichungen der Zufallsvariablen x und y berechnet: [46, 47]

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad -1 \geq r \leq 1$$

Der Korrelationskoeffizient r stellt eine dimensionslose Zahl dar, die das Ausmaß des linearen Zusammenhangs zwischen den Zufallsvariablen x und y beschreibt. Er nimmt Werte zwischen -1 und +1 an, wobei ein Korrelationskoeffizient von ± 1 einem rein linearen Zusammenhang entspricht (Werte liegen auf einer steigenden bzw. fallenden Gerade; siehe Abbildung 24). [47]

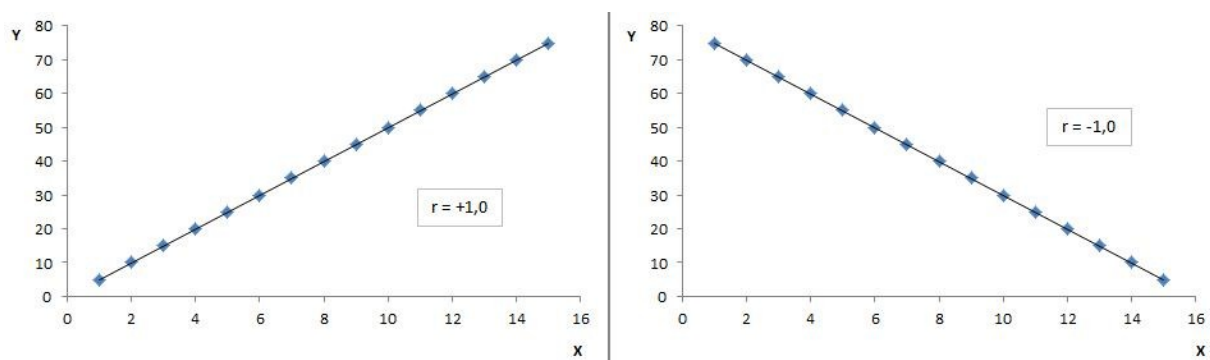


Abbildung 24: Ein Korrelationskoeffizient von ± 1 entspricht einem rein linearen Zusammenhang zwischen X und Y, die Werte liegen daher auf einer steigenden bzw. sinkenden Gerade. [46]

Jedoch kann ein hoher Korrelationskoeffizient auch durch einen Ausreißer in den ansonsten weitgehend unkorrelierten Daten bedingt sein. [46] Abbildung 25 zeigt einen solchen Fall: Beim Miteinbeziehen des Ausreißers beträgt der Korrelationskoeffizient 0,96 (r_{ges}), während er bei Ausschluss des Ausreißers nur mehr -0,12 beträgt (r_{ex}).

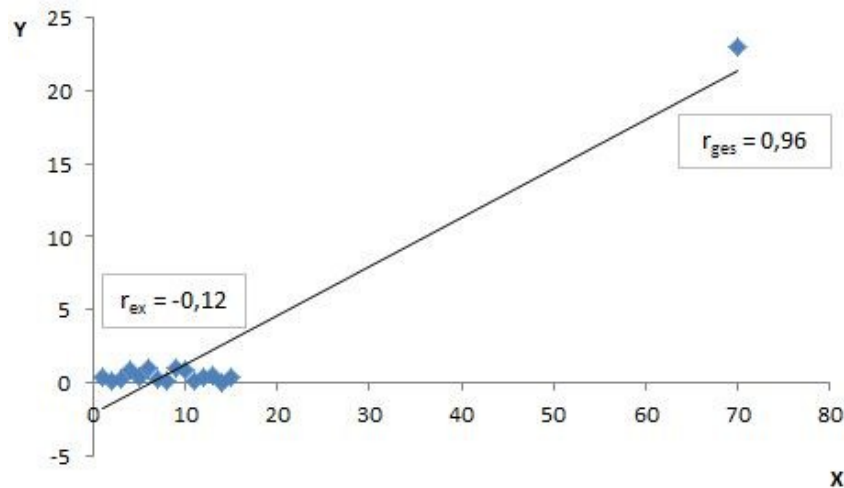


Abbildung 25: Beispiel, bei dem durch einen Ausreißer bedingt der Korrelationskoeffizient deutlich höher liegt ($r_{ges} = 0,96$) als bei alleiniger Betrachtung der Daten ohne Ausreißer ($r_{ex} = -0,12$). [46]

Je näher der Korrelationskoeffizient hingegen bei 0 liegt, desto geringer ist die lineare Korrelation zwischen den Variablen. Dies bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, dass die Variablen wirklich unkorreliert sind, denn es kann auch ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen ihnen bestehen (siehe Abbildung 26). [46]

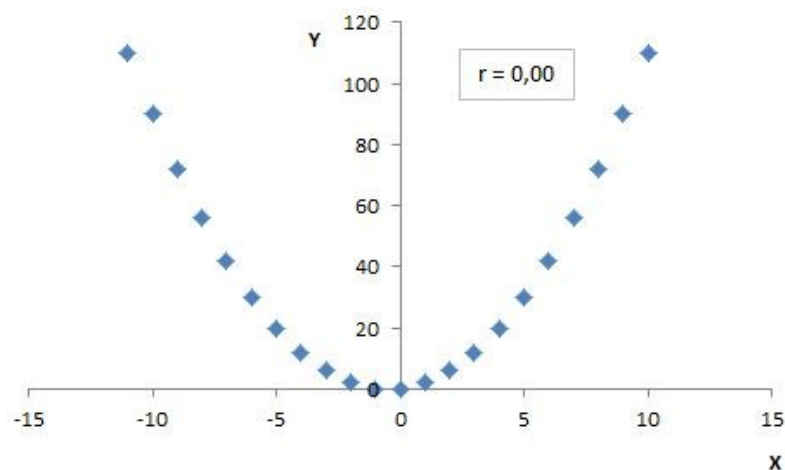


Abbildung 26: Ein nicht-linearer (hier quadratischer) Zusammenhang zwischen X und Y führt auch zu einem Korrelationskoeffizienten von 0. [46]

Der Korrelationskoeffizient wurde in den nachfolgenden Experimenten zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Spektren herangezogen. Er wurde mit Excel durch die Funktion „KORREL(Matrix1; Matrix2)“ zwischen den Spektren von Einzelmessungen und den jeweiligen Mittelwertspektren errechnet. Hierbei wurde ein Korrelationskoeffizient von mindestens 0,99 für eine ausreichende Reproduzierbarkeit erachtet ($r \geq 0,99$).

Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA)

Die Hauptkomponentenanalyse ist eine Methode der multivariaten Datenanalyse und zählt zu den faktoranalytischen Verfahren. Sie dient insbesondere der Datenreduktion von sehr komplexen Daten, wie in diesem Fall den erhaltenen IR-Spektren. Es soll hierbei eine unübersichtliche Vielzahl an tatsächlich beobachteten Variablen, im Falle der IR-Spektren den gemessenen Wellenzahlen, auf eine deutlich geringere Anzahl sogenannter latenter Variablen oder Hauptkomponenten (Faktoren) reduziert und zusammengefasst werden. Diese neuen Hauptkomponenten können dann anstelle der ursprünglichen Variablen zur Beschreibung der Objekte herangezogen werden (siehe Abbildung 27). Dadurch können die anfänglich hochdimensionalen Daten dann auch mithilfe der Hauptkomponenten in einem niederdimensionalen Raum graphisch dargestellt und beispielsweise auf etwaige Clusterbildung untersucht werden. [48]

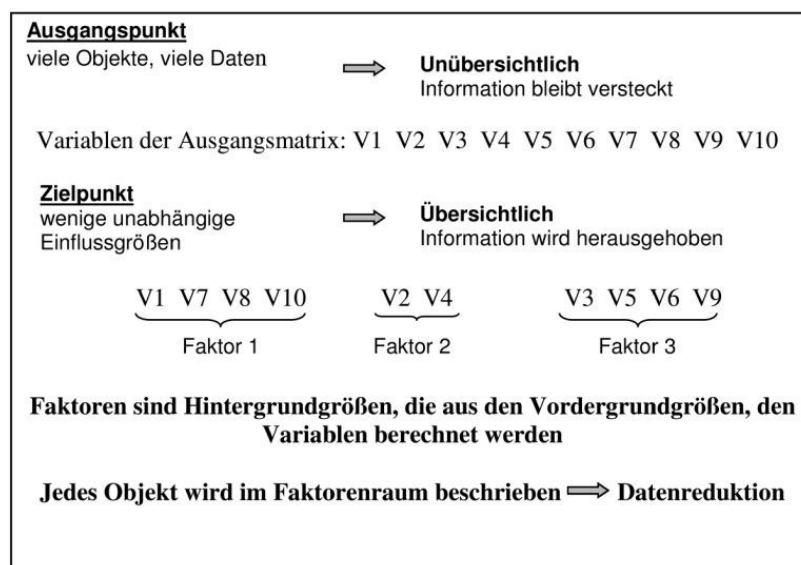


Abbildung 27: Allgemeines Prinzip der Hauptkomponentenanalyse. Ausgehend von einer Vielzahl an Variablen in den ursprünglichen Daten (V1 bis V10) wird eine geringere Anzahl an Faktoren bzw. Hauptkomponenten (Faktor 1, 2 und 3) ermittelt, mit deren Hilfe es möglich ist die Objekte zu beschreiben. In diesem Beispiel entsteht aus dem 10-dimensionalen Raum der Originalvariablen, ein dreidimensionaler Faktorenraum, der sich nun auch bei Bedarf graphisch darstellen lässt. Grafik nach [49].

Durch diese Datenreduktion sollen die wichtigen Informationen in den Daten erhalten bleiben bzw. hervorgehoben werden, während redundante Informationen ausgeschlossen werden. Zur Ermittlung der Hauptkomponenten wird wie folgt vorgegangen: Im ersten Schritt wird eine Gerade entlang der größten Varianz in den Daten gesucht, diese stellt dann die erste Hauptkomponente (PC 1) dar und erklärt den größten Teil der Varianz (Information) in den Daten. Im nächsten Schritt wird wieder eine Gerade entlang der nächstgrößten Varianz gesucht (zweite Hauptkomponente, PC 2) mit der Bedingung, dass diese orthogonal (unkorreliert) zur ersten Hauptkomponente steht. Dieser Vorgang wird wiederholt bis alle Hauptkomponenten gefunden wurden. [50]

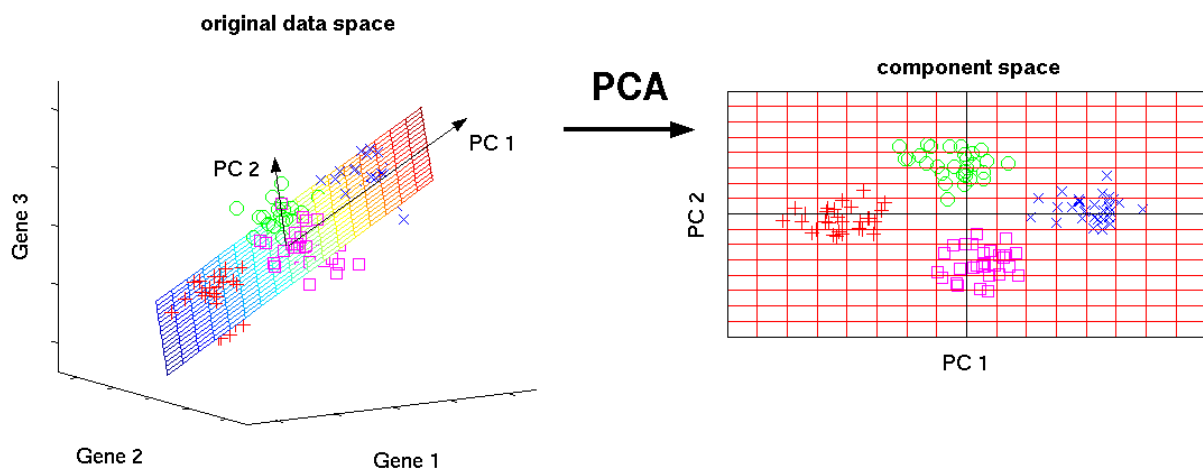


Abbildung 28: Beispiel einer Hauptkomponentenanalyse. In diesem Beispiel wird von Objekten, die vier verschiedenen Gruppen (verschiedene Symbole und Farben) angehören und durch nur drei Originalvariablen (Gene 1, 2 und 3) beschrieben werden, ausgegangen. Dadurch lässt sich die Datenwolke im dreidimensionalen Koordinatensystem darstellen, die Methode kann aber analog auch bei einer bedeutend größeren Anzahl an Variablen angewendet werden. Die erste Hauptkomponente (PC 1) wird in Richtung der größten Varianz durch die Datenwolke gelegt. Die zweite Hauptkomponente (PC 2) entlang der nächstgrößten Varianz, wobei diese orthogonal auf PC1 steht (links). Nach Projektion der Daten in die zweidimensionale Ebene von PC 1 und PC 2 ist immer noch eine klare Trennung der 4 verschiedenen Gruppen möglich. [51] (Grafik nach [51], Figure 3.1.).

Dadurch, dass mit den ersten beiden Hauptkomponenten oftmals schon ein Großteil der Gesamtvarianz erklärt werden kann, können die Daten durch diese in einem Scatterplot dargestellt und analysiert werden. Dabei können sie unter anderem auf Clusterbildung untersucht werden, Ausreißer identifiziert oder auch unbekannte Proben auf Zugehörigkeit zu einem bestehenden Cluster untersucht werden. [52]

Die Hauptkomponentenanalyse in dieser Arbeit wurde mit dem Programm „SIMCA-P 13.0“ (MKS Umetrics) durchgeführt.

Resultate

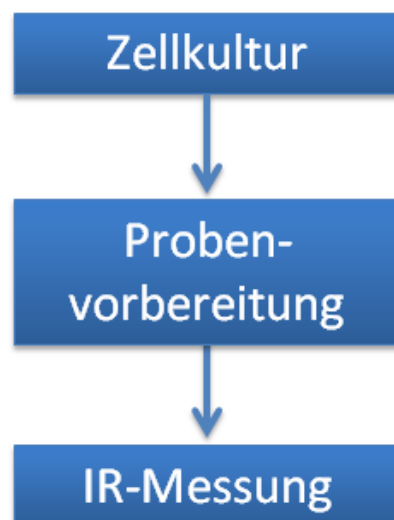
Erstellung und Optimierung eines robusten Protokolls für VSMC

Reproduzierbarkeit der IR-Spektren von unbehandelten Zellen

Eine primäre Anforderung an das Protokoll stellt die Reproduzierbarkeit der erhaltenen IR-Fingerprints von noch unbehandelten Zellen dar. Dies ist als Grundvoraussetzung zu verstehen, um spätere Veränderungen in den IR-Spektren eindeutig auf die entsprechenden Behandlungen mit verschiedenen Substanzen zurückzuführen und nicht als (Teil-)Resultat der natürlichen Variabilität zwischen den Zellen zu werten.

Um eine solche Reproduzierbarkeit erreichen zu können, ist ein robustes Arbeitsprotokoll, das alle Arbeitsschritte beginnend von der Inkubation der Zellen bis hin zur konkreten Messung am IR-Spektrophotometer umfasst, essentiell. Mit einem solchen Protokoll wird sichergestellt, dass im Zuge der Aufarbeitung der Proben möglichst wenig unerwünschte Veränderungen an dem Probenmaterial entstehen bzw. falls doch Veränderungen entstehen sollten, diese alle Proben möglichst im selben Ausmaß beeinflussen und somit schlussendlich zu keiner Veränderung der Grundinformationen führen.

Die grundsätzlichen Arbeitsschritte des Protokolls können in drei große Bereiche unterteilt werden:



Die fortlaufende Optimierung des Protokolls erfolgte stets im Bereich der Probenvorbereitung, während die Bedingungen im Bereich der Zellkultur (Kulturbedingungen, Vorgehensweise beim Passagieren) und der IR-Messungen (Anzahl der gemittelten Scans, Auflösung der Spektren) durchgehend so beibehalten wurden wie sie unter „Material und Methoden“ beschrieben sind.

Das Hauptziel bei der Probenvorbereitung besteht darin die kultivierten und vorerst noch unbehandelten Zellen in eine geeignete Form zu überführen, in der sie der ATR-FT-IR-Spektroskopie gut zugänglich sind und darüber hinaus durch den Prozess der Aufarbeitung selbst möglichst wenige Veränderungen in ihren Metabolom-Fingerprints erfahren. Dazu wurden zwei prinzipielle Methoden angedacht: Zum einen das Vermessen ganzer Zellen durch direktes Aufbringen auf den ATR-Kristall oder die Herstellung eines geeigneten Zellextraktes und dessen anschließender Vermessung. Das in dieser Arbeit erstellte Protokoll bezieht sich nur auf die Vermessung von ganzen Zellen, auf die Verwendung von Zellextrakten wird im Kapitel „Diskussion“ näher eingegangen.

Ausgehend von den kultivierten Zellen wurden nun weiters zwei verschiedene Strategien der Probenvorbereitung verfolgt: Die Vermessung von Zellsuspensionen unmittelbar nach deren Herstellung mit anschließender Trocknung direkt am ATR-Kristall (Suspensionsmessungen) oder die Messung von zuvor lyophilisierten Zellen.

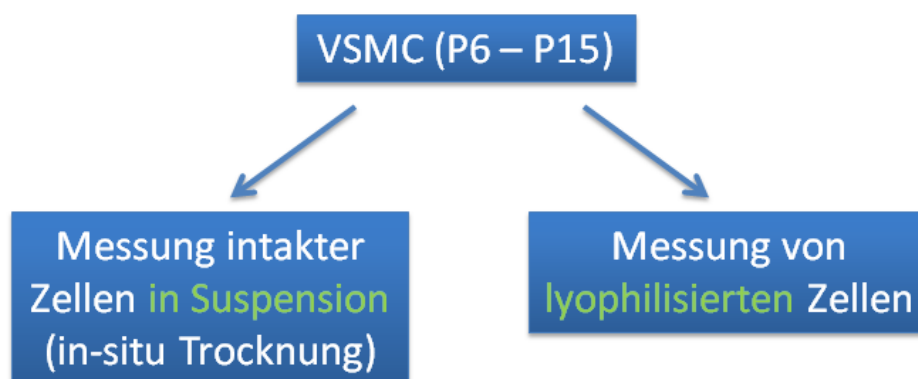


Abbildung 29: Die beiden prinzipiell verfolgten Vorgehensweisen bei der Vermessung von ganzen Zellen.

Messung intakter Zellen in Suspension (Suspensionsmessungen)

Als literarischer Ausgangspunkt für die Erstellung eines Protokolls solcher Suspensionsmessungen diente die Vorgehensweise zur Probenvorbereitung von T98G-Zellen (humane Glioblastom-Zelllinie),

welche in einer Publikation von Derenne et al. [35] zur Klassifizierung der Effekte von verschiedenen Polyphenolen mithilfe von FT-IR-Fingerprints verwendet wurde. Da es sich bei den Glioblastom-Zellen auch um adhärent wachsende Zellen handelt, wurde eine generelle Eignung dieses Protokolls auch für die VSMC angenommen. Es wurden einige geringfügige Veränderungen am Protokoll vorgenommen, eine Gegenüberstellung der allgemeinen Arbeitsschritte des ursprünglichen Protokolls von Derenne et al. [35] und der adaptierten Version für die VSMC wird in Abbildung 30 vorgenommen. Ausgegangen wurde bei den VSMC von den 24 Stunden zuvor auf 12-Well-Platten ausgesäten VSMC. In der Publikation wurden diesbezüglich keine Angaben gemacht.

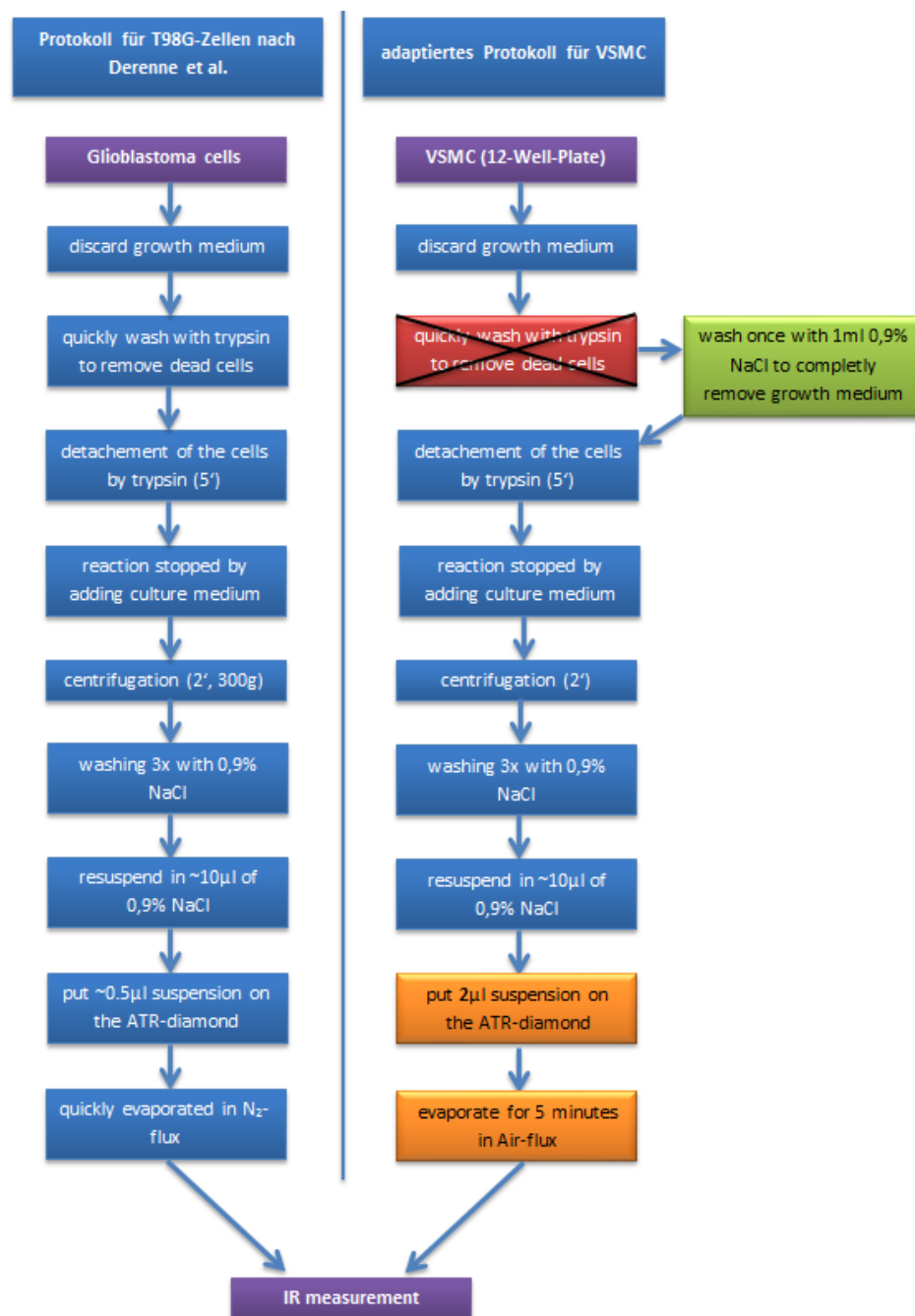


Abbildung 30: Vergleich zwischen dem ursprünglichen Protokoll von Derenne et al. [35] und der adaptierten Version für VSMC (blau: beibehaltene Schritte, rot: entfernte Schritte, grün: zusätzliche Schritte, orange: modifizierte Schritte).

Wie die Gegenüberstellung zeigt, wurde zum einen der Schritt des kurzen Waschens mit Trypsin, um die toten Zellen in der Kultur zu entfernen, aus dem Protokoll gestrichen und durch einen einfachen Waschschrift mit 1 mL 0,9% NaCl-Lösung ersetzt. Dies wurde deshalb gemacht, da nicht genau bekannt war wie empfindlich sich die VSMC gegenüber einer solchen kurzen Trypsin-Behandlung zeigen und man das Risiko von Zellverlusten bei zu hoher Sensibilität nicht eingehen wollte. Eine weitere Änderung im Protokoll wurde bei der Auftragemenge der Zellsuspension auf den ATR-Kristall vorgenommen, da das in der Arbeit von Derenne et al. beschriebene Volumen von 0,5 μL nur zu verrauschten Spektren führte. Als Ursache hierfür wurde die Tatsache gesehen, dass der Tropfen bzw. der Rückstand nach der Trocknung bei Verwendung von 0,5 μL nicht den ganzen ATR-Kristall bedeckte. Deshalb wurde das Volumen auf 2 μL erhöht, was eine deutliche Reduktion des Rauschens zur Folge hatte. Weiters wurde auch die in-situ Trocknung am Kristall nicht durch Überblasen mit reinem Stickstoff, sondern mit Druckluft durchgeführt. Hierfür wurde eine spezielle Vorrichtung konstruiert, mit deren Hilfe der Trocknungsprozess sehr gut durchführbar war und die Luft zusätzlich noch davor durch eine Watte von etwaigen größeren Verunreinigungen befreit wurde (siehe Abbildung 31). Da zur konkreten Dauer des Trocknungsprozesses in der Publikation keine genaueren Angaben gemacht wurden, mussten zuvor noch Versuche zur Findung einer optimalen Trocknungszeit gemacht werden. Hierzu wurden die Suspensionen auf den Kristall aufgebracht und solange im Luftstrom getrocknet bis optisch im Spektrum keine/kaum Veränderungen mehr zu beobachten waren. Basierend auf diesen Versuchen wurde eine optimale Trocknungsdauer von 5 Minuten in das Protokoll aufgenommen.

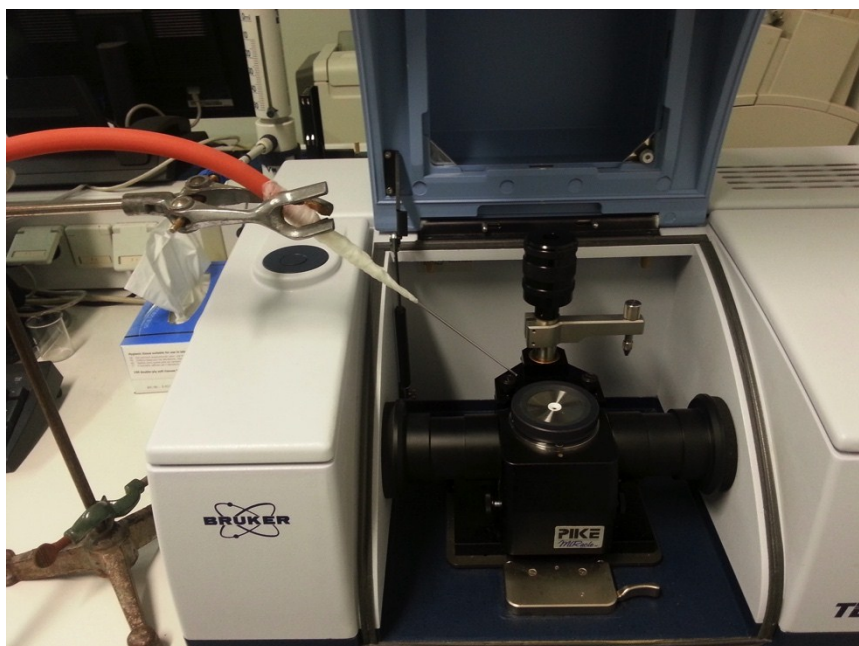


Abbildung 31: Vorrichtung zur in-situ Trocknung der Suspensionsproben direkt am ATR-Kristall durch einen Luftstrom.

Durchführung der Suspensionsmessungen

Da die Suspensionen unmittelbar nach ihrer Herstellung vermessen werden müssen, um enzymatische Veränderungen in den Fingerprints bei längeren Stehzeiten zu verhindern, wurde jeder Well der 12-Well-Platten einzeln und nacheinander in Suspension übergeführt und anschließend vermessen. Da diese Vorgehensweise einen enormen Zeitaufwand mit sich bringt, war es nicht möglich alle 12 Proben der Platte an einem Tag zu vermessen. Daher wurden nach 24h Inkubation der Platte vorerst nur die ersten 4 Wells (A-Reihe) vermessen und die restliche Platte für weitere 24h inkubiert. Am nächsten Tag (48h Inkubation der Platte) wurden die nächsten 4 Wells (B-Reihe) vermessen und letztlich nach insgesamt 72h Inkubation die verbleibenden 4 Wells (C-Reihe).

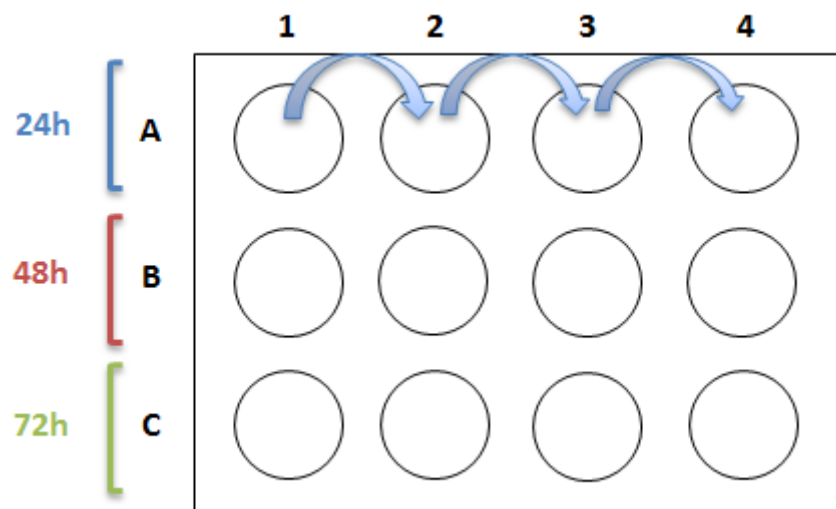


Abbildung 32: Vorgehensweise bei den Suspensionsmessungen. Die Pfeile geben die Reihenfolge an, in der die einzelnen Wells jeweils in Suspension überführt und anschließend vermessen wurden. Die 4 Wells der A-Reihe wurden nach 24h Inkubation vermessen, die der B-Reihe nach 48h und die C-Reihe nach 72h Inkubation.

Auswertung der Spektren

Die Reproduzierbarkeit der Spektren wurde anhand des Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen gemessenen Spektren und dem jeweiligen Mittelwertspektrum aller Proben der durchgeführten Messserie beurteilt. Als eine ausreichend gute Reproduzierbarkeit für nachfolgende Experimente wurde ein Korrelationskoeffizient von $\geq 0,99$ gewählt. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten für die Suspensionsmessungen sind in Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3: Korrelationskoeffizienten zwischen den Spektren der Einzelmessungen und den jeweiligen Mittelwert-Spektren. Ausreißer, die nicht in die Berechnung miteinbezogen wurden, sind rot gekennzeichnet.

	A-Reihe (24h) (n = 11)	B-Reihe (48h) (n = 12)	C-Reihe (72h) (n = 10)
Well 1	0,848	0,949	0,979
	0,932	0,994	0,519
	0,856	0,965	0,998
Well 2	0,850	0,997	0,997
	0,957	0,995	0,995
	-	0,993	0,999
Well 3	0,924	0,992	0,998
	0,933	0,981	0,998
	0,901	0,997	0,997
Well 4	0,934	0,983	0,995
	0,928	0,946	0,998
	0,945	0,996	0,998
mittlerer Korrelationskoeffizient	0,910	0,982	0,997

Die Korrelationskoeffizienten zeigten, dass die Reproduzierbarkeit im Laufe der längeren Inkubation immer besser wird, und erst nach 72h Inkubation den festgelegten, gewünschten Wertebereich erreicht. Abbildung 33 zeigt die Mittelwertspektren und Standardabweichungen nach 24h, 48h und 72h Inkubationszeit der Platte.

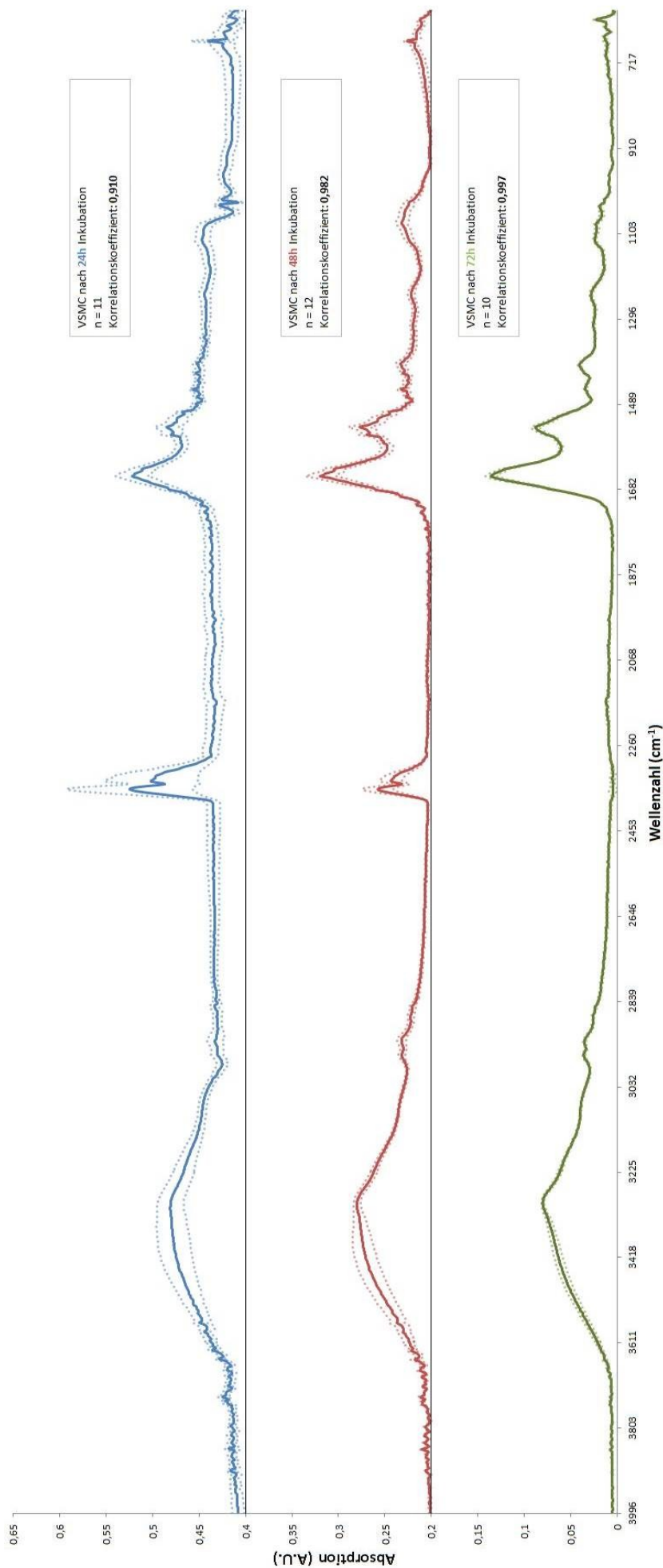


Abbildung 33: Mittelwertspektren nach 24h (blau), 48h (rot) und 72h (grün) Inkubation der Zellen in der 12-Well-Platte. Die Mittelwertspektren $\pm$ Standardabweichung sind jeweils als helle, punktierte Linien dargestellt. Die Spektren sind zur besseren Übersichtlichkeit auf der y-Achse zueinander versetzt dargestellt und mit den jeweiligen Grundlinien (schwarze Linien) versehen. Anzahl der Einzelmessungen (n) und mittlerer Korrelationskoeffizient sind jeweils vermerkt.

Bei dieser Abbildung ist sehr deutlich zu sehen, dass mit steigender Inkubationszeit die Standardabweichungen geringer werden. Dies ist daran zu erkennen, dass sich die Mittelwertspektren $\pm$ Standardabweichung (hellere, punktierte Linien) den jeweiligen Mittelwertspektren (durchgehende Linien) immer weiter annähern. Darüber hinaus ist anhand dieser Abbildung zu erkennen, dass es bestimmte Wellenzahl-Bereiche in den Spektren gibt, in denen besonders häufig eine größere Varianz auftritt. Besonders markant sind hierbei die Variationen in den beiden Wellenzahlbereichen $2300\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ und $3200\text{--}3550\text{ cm}^{-1}$. Die große Varianz im Bereich zwischen 2300 und 2400 cm^{-1} kann zumindest teilweise dadurch erklärt werden, dass auch CO_2 in diesem Bereich stark absorbiert (siehe Abbildung 34). Deshalb werden Variationen in der CO_2 -Konzentration während der Messungen als Hauptursache dieses größeren Varianzbereiches angesehen. Da vergleichbare Variationen in diesem Bereich nicht in den Spektren von Derenne et al. [35] zu erkennen waren, ist als eine Ursache dafür die Verwendung von Druckluft anstelle von Stickstoff zur Trocknung der Proben zu vermuten. Der Bereich von 3200 bis 3550 cm^{-1} entspricht dem Absorptionsbereich von Hydroxyl-Funktionen (OH-Funktionen), die in eine Wasserstoffbrückenbindung involviert sind [53], wie es z.B. auch bei Wasser der Fall ist. Aus diesem Grund wird als Hauptursache für die Varianz in diesem Bereich ein Einfluss des verschiedenen Restwassergehaltes der Proben nach dem (identischen) Trocknungsprozess am Kristall gesehen.

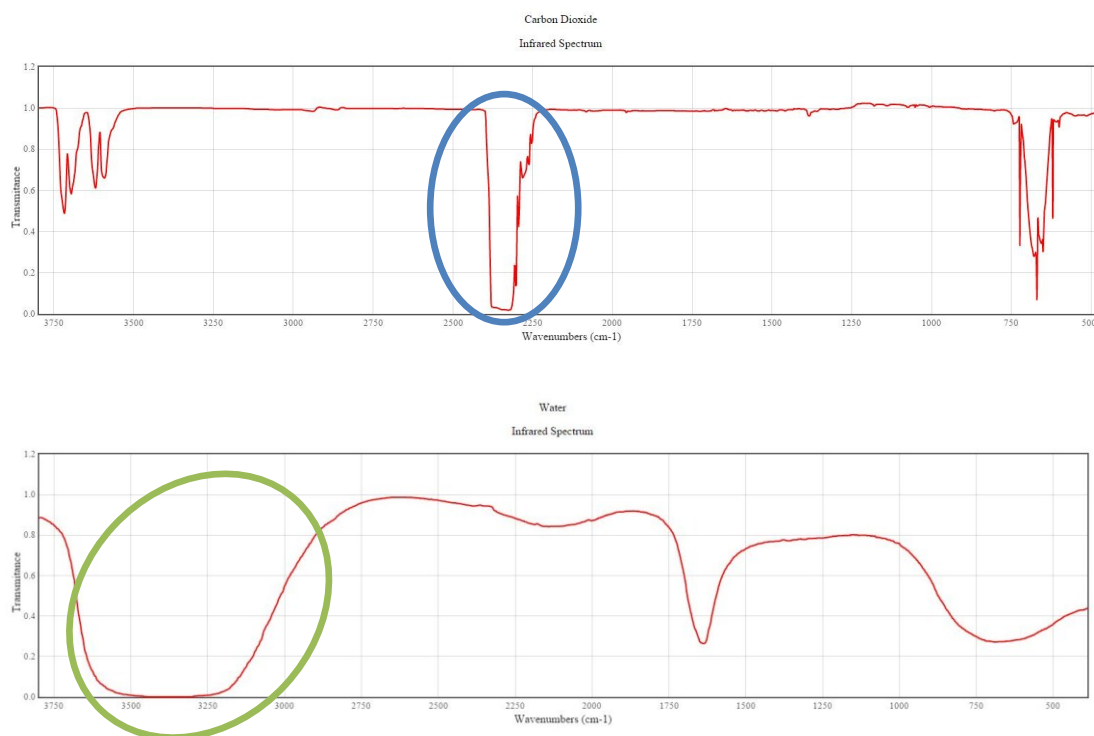


Abbildung 34: Transmissionsspektren von CO_2 (oben) und H_2O (unten). CO_2 zeigt eine starke Absorptionsbande im Bereich zwischen 2300 und 2400 cm^{-1} (blaue Markierung). H_2O besitzt im Wellenzahlbereich zwischen 3200 und 3500 cm^{-1} eine starke Absorptionsbande der OH-Bindung (grüne Markierung). Spektren nach [54] und [55].

Verwendung eines ausgewählten Bereiches der gesamten Spektren

Um diese beiden Einflüsse weitgehend auszuschließen, wurde entschieden für weitere Analysen nur noch einen bestimmten Ausschnitt des Spektrums heranzuziehen. Dieser Ausschnitt sollte als Fingerprint noch möglichst aussagekräftig sein und die beiden Wellenzahlbereiche mit großer Varianz nicht mehr enthalten.

Da sich auch Derenne et al. in ihren Arbeiten zur Klassifizierung antiproliferativer Substanzen an Prostatakrebszellen [38] auf den Bereich zwischen 1764 und 1300 cm^{-1} konzentriert haben, fiel die Wahl für diese Experimente auf den vergleichbaren Bereich von 1800-1000 cm^{-1} . Dieser Bereich enthält die Absorptionen aller für einen aussagekräftigen Fingerprint wichtigen Biomoleküle der Zellen. Dabei ist der Bereich zwischen 1800 und 1700 cm^{-1} charakteristisch für Lipide (Absorption bei 1745 cm^{-1} resultiert aus der C=O-Streckung des Esters von Phospholipiden). Die Absorptionen im Bereich von 1700-1300 cm^{-1} stammen hauptsächlich von Proteinen, wobei die Streckung der Carbonyl-Funktion der Peptidbindung bei 1650 cm^{-1} auftritt („Amid I“-Bande) und die Deformationsschwingung der N-H-Bindung bei 1540 cm^{-1} erscheint („Amid II“-Bande). Absorptionen im Bereich zwischen 1480 cm^{-1} und 1300 cm^{-1} stammen von den verschiedenen Aminosäuren-Seitenketten und Fettsäuren. Im Bereich von 1300-900 cm^{-1} liegen die Absorptionsbereiche der Kohlenhydrate und von Phosphat, das als Bestandteil des Nukleinsäure-Rückgrates (Absorption des Phosphorsäurediesters bei 1241 cm^{-1} und 1085 cm^{-1}) von besonderem Interesse ist. [38]

Tabelle 4: Berechnete Korrelationskoeffizienten derselben Spektren wie zuvor, aber unter alleiniger Betrachtung des Wellenzahlbereiches von 1800-1000 cm^{-1} . Ausreißer, die nicht in die Berechnung miteinbezogen wurden, sind rot gekennzeichnet.

	A-Reihe (24h)	B-Reihe (48h)	C-Reihe (72h)
Well 1	0,989	0,992	0,976
	0,972	0,993	0,988
	0,978	0,997	0,9995
Well 2	0,979	0,9999	0,9996
	0,995	0,9996	0,9995
	-	0,997	0,999
Well 3	0,977	0,998	0,999
	0,968	0,996	0,9996
	0,973	0,999	0,9997
Well 4	0,994	0,998	0,999
	0,985	0,996	0,999
	0,996	0,997	0,999
mittlerer Korrelationskoeffizient	0,982	0,997	0,999

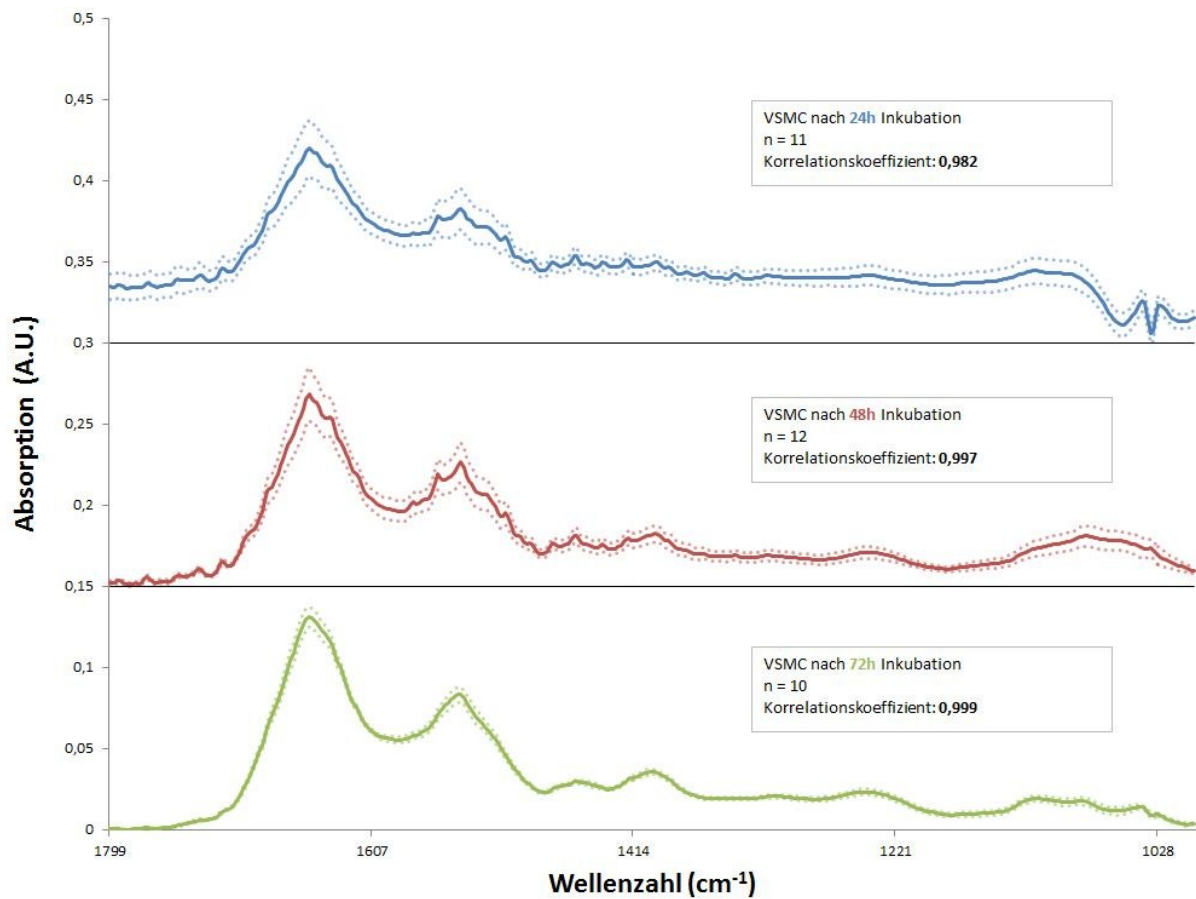


Abbildung 35: Ausschnitt der Absorptionsspektren im Wellenzahlbereich von 1800 bis 1000 cm^{-1} nach den verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen. Anzahl der Einzelmessungen (n) und mittlerer Korrelationskoeffizient sind jeweils vermerkt.

Die Korrelationskoeffizienten zeigten, dass bei der Verwendung dieses Abschnittes die Reproduzierbarkeit deutlich höher liegt als bei der Untersuchung der gesamten Spektren. So wurden hier bereits nach 48h Inkubation gewünschte Werte von über 0,99 für den Korrelationskoeffizienten erreicht, nach 72h Inkubation wurden sogar Werte von 0,999 erreicht.

Als Grund für diese kontinuierliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit mit der Dauer der Inkubation, wurde die fortlaufende Erhöhung der Zellzahl in den Wells angesehen. Durch diese Erhöhung der Zellzahl bewachsen die Zellen aber auch immer dichter die begrenzte Wachstumsoberfläche der jeweiligen Wells, bis es letztlich zur Hemmung der Proliferation infolge von Zell-Zell-Kontakten kommt (Kontakthemmung bei Konfluenz). Da dies im Hinblick auf die spätere Anwendbarkeit des Protokolls für antiproliferative Untersuchungen zu Verfälschungen der Ergebnisse führen kann, ist eine Inkubation für länger als 24h oder das Aussäen höherer Zellkonzentrationen in den 12-Well-Platten nicht möglich.

Erhöhung der Zellzahl durch Verwendung von 6-Well-Mikrotiterplatten

Als eine mögliche Lösung des Problems wurde die Verwendung von 6-Well-Platten anstelle der 12-Well-Platten gesehen. Durch die größere Wachstumsfläche in den Wells einer 6-Well-Platte ist es möglich dort höhere Zellkonzentrationen als in den 12-Well-Platten anzusetzen ($0,3 \times 10^6$ anstatt $0,1 \times 10^6$ Zellen pro Well, siehe unter „Material und Methoden“). Zur Abschätzung der Generationszeit der VSMC wurde eine einmalige Bestimmung der Zellkonzentration nach 28h Inkubation in einer 12-Well-Platte durchgeführt. Diese Bestimmung zeigte, dass die Generationszeit der VSMC bei ca. 24h liegt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Bestimmung der Generationszeit der VSMC.

angesetzte Zellkonzentration	Inkubationszeit (h)	Zellkonzentration nach Inkubation
$0,1 \times 10^6$	28	$0,24 \times 10^6$
$0,1 \times 10^6$	23,333 (= 23h 20 Minuten)	$0,20 \times 10^6$

Ausgehend von dieser Information wurde nun abgeschätzt wie hoch die Zellkonzentrationen in den Wells nach den 72h Inkubation in der 12-Well-Platte waren. Da in den 12-Well-Platten je $0,1 \times 10^6$ Zellen ausgesät wurden und 72h Inkubation in etwa drei Generationszeiten entsprechen, wurde diese Konzentration auf etwa $0,8 \times 10^6$ Zellen geschätzt. In den 6-Well-Platten ist ein Ansetzen der dreifachen Zellkonzentration ($0,3 \times 10^6$ Zellen/Well) ohne Gefahr der Konfluenz möglich. Dadurch befinden sich nach 24h Inkubation dieser Platten bereits ungefähr $0,6 \times 10^6$ Zellen in den Wells, eine Konzentration, die in den 12-Well-Platten erst nach 48 bis 72 Stunden erreicht wird.

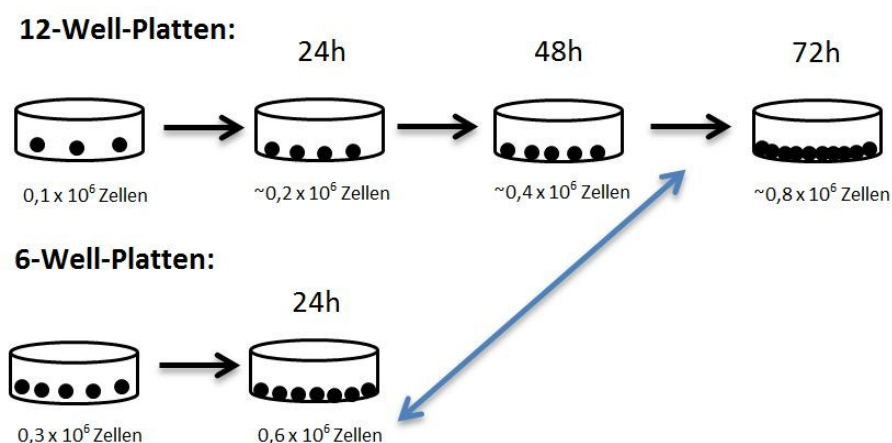


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Abschätzungen der Zellzahlen nach den verschiedenen Inkubationszeiten basierend auf der bestimmten Generationszeit. Der blaue Pfeil symbolisiert, dass in den 6-Well-Platten nach 24h Inkubation Zellkonzentrationen vorherrschen wie sie in den 12-Well-Platten erst nach 48 bis 72h erreicht werden.

Tabelle 6 und Abbildung 37 zeigen die Ergebnisse der Messungen von 6-Well-Platten nach 24h Inkubation.

Tabelle 6: Berechnete Korrelationskoeffizienten zwischen den Spektren der Einzelmessungen und den jeweiligen Mittelwert-Spektren der Zellen nach 24h Inkubation in einer 6-Well-Platte. Ausreißer, die nicht in die Berechnung miteinbezogen wurden, sind rot gekennzeichnet.

Well	Korrelationskoeffizient
A1	0,995
	0,998
	0,997
A2	0,905
	0,883
	0,989
A3	0,994
	0,996
	0,998
B1	0,998
	0,995
	0,9996
B2	0,998
	0,996
	0,998
B3	0,998
	0,997
	0,992
mittlerer Korrelationskoeffizient	0,996

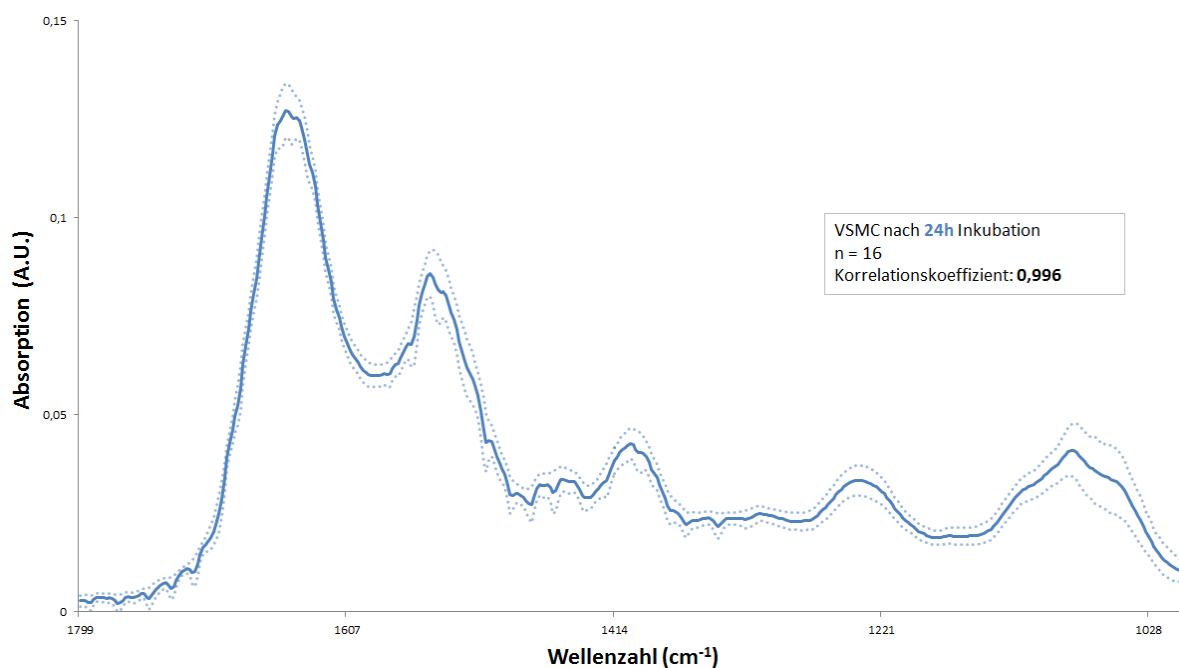


Abbildung 37: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung der Zellen nach 24h Inkubation in einer 6-Well-Platte.

Die Messungen zeigten, dass bei der Verwendung der 6-Well-Platten und entsprechend höheren Zellkonzentrationen bereits nach 24h Inkubation eine ähnlich gute Reproduzierbarkeit wie bei den 12-Well-Platten nach 48h erreicht wird. Diese Reproduzierbarkeit wurde als ausreichend gut angesehen, und daher für die weiteren Experimente 6-Well-Platten zum Aussäen der Zellen verwendet.

Fazit zur Methode der Suspensionsmessungen

Durch die vorgenommenen Anpassungen und Erweiterungen des ursprünglichen Protokolls von Derenne et al. konnte schlussendlich, insbesondere durch Auswahl eines geeigneten Ausschnittes der Gesamtspektren und die erhöhte Zellkonzentration in den 6-Well-Platten, nach 24h Inkubation eine ausreichend gute Reproduzierbarkeit der IR-Spektren erreicht werden. Als ein gravierender Nachteil dieser Suspensionsmessungen ist allerdings die Tatsache zu sehen, dass die erhaltenen Zellsuspensionen unmittelbar nach ihrer Herstellung vermessen werden müssen. Da die Trocknung pro Messung je 5 Minuten in Anspruch nimmt und stets drei Messungen von den einzelnen Proben gemacht werden, ist der Zeitaufwand pro Probe relativ hoch. Daher wären bei einer gleichzeitiger Herstellung aller Suspensionen aus den jeweiligen Wells, für manche Proben längere Stehzeiten in Suspension unvermeidbar. Da jedoch enzymatische Veränderungen der Proben im wässrigen Milieu den IR-Fingerprint verfälschen könnten, musste jeder Well separat in Suspension übergeführt und vermessen werden. Dies führt, insbesondere bei räumlicher Trennung zwischen der Zellkultur und dem Ort der IR-Messung, zu einer weiteren Erhöhung des Aufwands. Aus diesem Grund wurde eine zweite Strategie verfolgt, bei der durch Lyophilisation lagerfähige Zwischenstufen der Proben möglich gemacht werden sollen.

Messung lyophilisierter Zellen (Lyophilisationsmessungen)

Etablierung eines Lyophilisationsschrittes im Protokoll

Der Einsatz einer Trocknungsmethode in einem solchen Protokoll bietet vor allem den großen Vorteil von lager- und transportfähigen Proben und damit von größerer Flexibilität was den Zeitpunkt der Messung angeht. Erhaltene Zellsuspensionen müssen ansonsten für eine entsprechende Vergleichbarkeit unmittelbar nach deren Herstellung vermessen werden, da ansonsten die Fingerprints durch enzymatische Reaktionen in den Zellen in verschiedenem Ausmaß verändert werden würden (siehe Suspensionsmessungen). Dies würde in weiterer Folge Unterschiede in den Fingerprints generieren, die bei der späteren Analyse fälschlicherweise den verschiedenen Behandlungen zugerechnet werden könnten. Aus diesem Grund bietet sich die Verwendung der Gefriertrocknung als Trocknungsmethode für solche Metabolom-Untersuchungen an Zellen besonders an, da während des Trocknungsprozesses kein wässriges Milieu entsteht, in dem enzymatische Reaktionen in den Zellen zu unerwünschten Veränderungen der Fingerprints führen können.

Darüber hinaus haben Correa-García et al. [56] in ihren Metabolom-Untersuchungen mittels FT-IR-Spektroskopie an *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen (Saccharomycetaceae), einem gut charakterisierten eukaryotischen Organismus, eindeutig gezeigt, dass eine Differenzierung zwischen Zellen, die zuvor in verschiedenen Kulturmedien inkubiert wurden, anhand ihrer IR-Fingerprints auch nach einer Lyophilisation noch eindeutig möglich ist. Es hat sich auch gezeigt, dass die Variabilität der Spektren lyophilisierter Zellen in der Hauptkomponentenanalyse geringer ausfällt als bei den frisch vermessenen Zellen, was wiederum dafür spricht, dass unerwünschte biochemische Veränderungen bei den lyophilisierten Zellen in einem weitaus geringerem Ausmaß stattfinden als bei den frisch vermessenen Zellen, selbst wenn diese unmittelbar vermessen werden (siehe Abbildung 38). Dadurch wurde gezeigt, dass durch den Lyophilisationsprozess selbst die Gesamtheit der Informationen der Fingerprints nicht beeinträchtigt wird. [56]

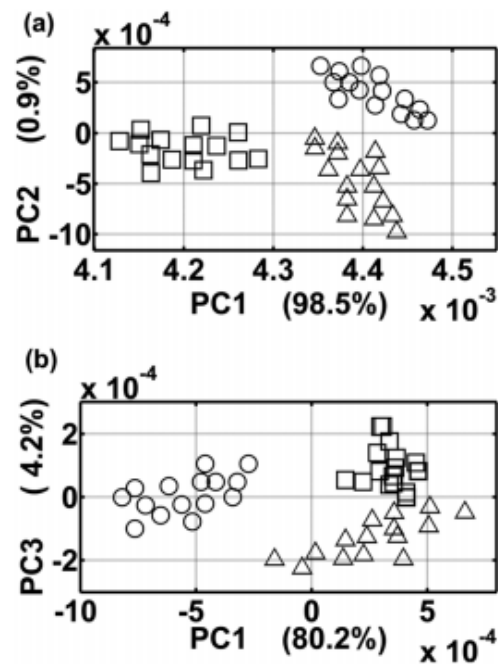


Abbildung 38: Scatter-Plot der Hauptkomponenten-Analyse der FT-IR-Spektren von *S. cerevisiae*, die in 3 verschiedenen Kulturmedien inkubiert wurden (verschiedene Symbole). (a) frische Zellen, (b) lyophilisierten Zellen. In beiden Fällen lassen sich die verschiedenen Kulturbedingungen eindeutig trennen. Grafik nach [56].

Diese Arbeiten legen nahe, dass sich der Lyophilisationsprozess auch für Metabolom-Analysen mithilfe der FT-IR-Spektroskopie an anderen eukaryotischen Zellen, wie in diesem Falle den glatten Gefäßmuskelzellen, eignet.

Erste Messungen lyophilisierter Zellen - Findung eines geeigneten Zusatzes

Die Zellen wurden wie zuvor auf Mikrotiterplatten ausgesät und für 24h inkubiert (Anheften der Zellen an der Oberfläche). Anschließend wurde das Kulturmedium verworfen und die Zellen 3x mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen, um alle Reste des Kulturmediums zu entfernen. Zuletzt wurden die Zellen dann noch mit je 500 μ L PBS versetzt und umgehend bei -80°C eingefroren. Der Zusatz von 500 μ L PBS wurde als notwendig erachtet, um nach dem Lyophilisationsprozess einen deutlichen Rückstand der Probe sehen zu können, der später dann direkt auf den ATR-Kristall aufgebracht werden kann (siehe Abbildung 39). Die Proben wurden für mindestens 4 Stunden bei -80°C gelagert, um ein vollständiges Gefrieren zu gewährleisten. Anschließend wurden die gefrorenen Proben unter Kühlung zur Lyophile transportiert und über Nacht (ca. 16h) lyophilisiert. Abbildung 40 zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines solchen Lyophilisationsproduktes.

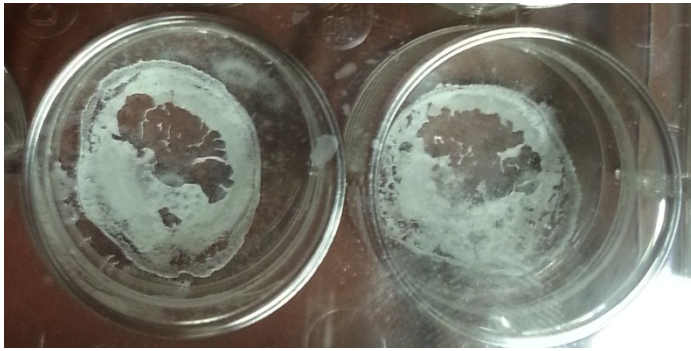


Abbildung 39: Lyophilisationsprodukte in den Wells einer Mikrotiterplatte. Die weißen Rückstände kommen hauptsächlich durch den Zusatz von 500 μ L PBS zustande und erleichtern das nachfolgende Aufbringen der Probe mittels Einweg-Impföse auf den ATR-Kristall.

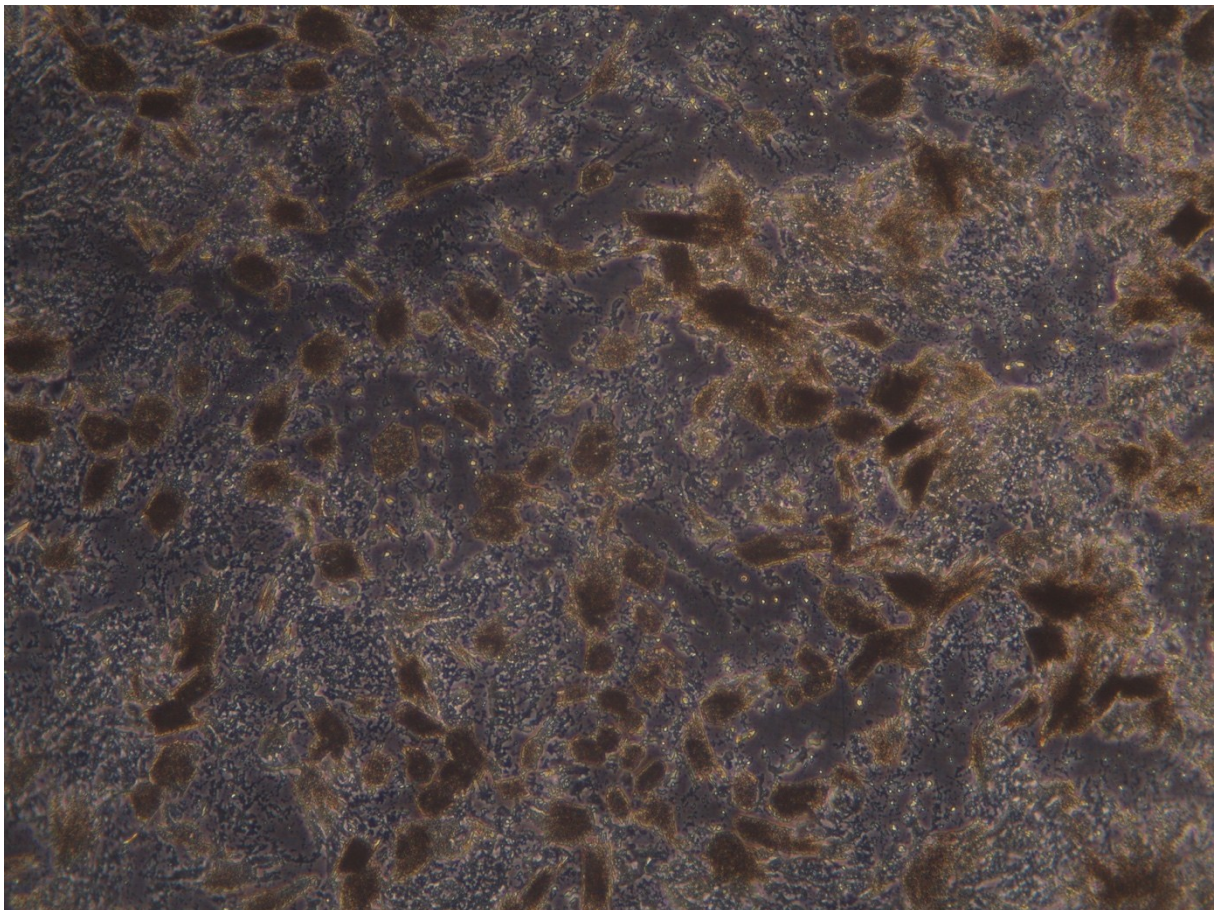


Abbildung 40: mikroskopische Aufnahme der Zellen mit 500 μ L PBS nach dem Lyophilisationsprozess. Die bräunlichen Strukturen scheinen die Überreste der glatten Gefäßmuskelzellen zu sein. (Mikroskop: Olympus CKX31, 200-fache Vergrößerung).

Die Lyophilisationsprodukte wurden mithilfe einer Einweg-Impföse direkt aus den Wells entnommen („abgekratzt“) und unmittelbar auf den ATR-Kristall aufgebracht. Durch einen Stempel wurden sie an den Kristall gepresst und anschließend vermessen. Abbildung 41 zeigt das Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung und den berechneten Korrelationskoeffizienten dieser Messungen.

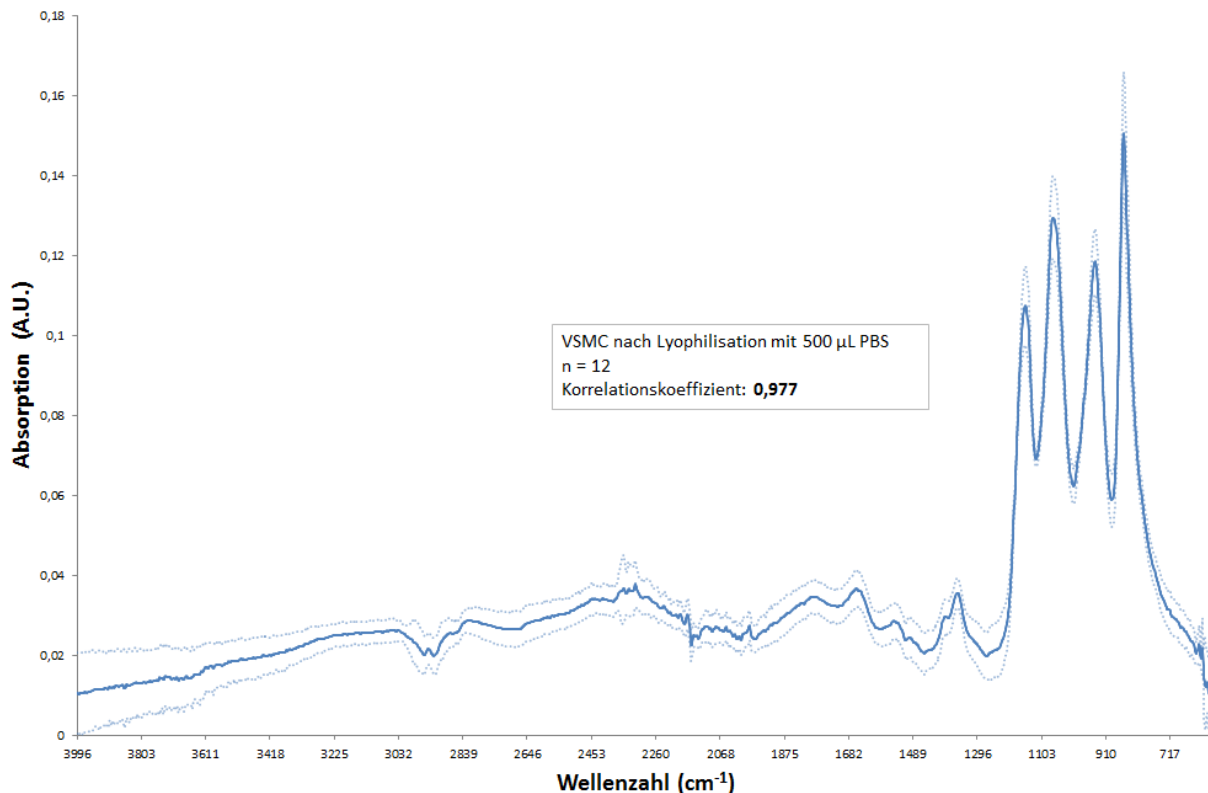


Abbildung 41: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung des gesamten gemessenen Bereiches (4000 cm^{-1} bis 600 cm^{-1}) der Lyophilisationsprodukte bei Zusatz von $500\text{ }\mu\text{L}$ PBS. Anzahl der Einzelmessungen (n) und Korrelationskoeffizient sind angegeben.

Auffällig war hierbei besonders das offensichtliche Abweichen des Spektrums von den bisher gemessenen Spektren der Zellen (siehe Suspensionsmessungen). So sind hier beispielsweise die ansonsten sehr markanten „Amid I“- und „Amid II“-Banden (bei 1650 cm^{-1} und 1540 cm^{-1}) kaum erkennbar und stattdessen treten starke Absorptionsbanden im Bereich von ca. 800 cm^{-1} bis 1200 cm^{-1} auf (Maxima bei 860 cm^{-1} , 947 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} und 1150 cm^{-1}). Absorptionen in diesen Bereichen zeigt auch Na_2HPO_4 (vergleiche Abbildung 42). [57] Der anschließende direkte Vergleich des Mittelwertspektrums mit reinem PBS, das ebenfalls lyophilisiert wurde (Referenz), zeigte ebenfalls eine sehr starke Übereinstimmung der Spektren (Korrelationskoeffizient von 0,984; Abbildung 43).

Dadurch war ersichtlich, dass die Absorptionen des enthaltenen Phosphates im PBS (Na_2HPO_4 und KH_2PO_4) das IR-Spektrum dominieren und die erwünschten Signale der Zellen dabei im Rauschen untergehen. Aus diesem Grund wurde die Verwendung von PBS bzw. generell eines Zusatzes, dessen Rückstände selbst eine Absorption im interessierten Bereich des IR-Spektrums zeigen, für solche Metabolom-Untersuchungen als ungeeignet befunden.

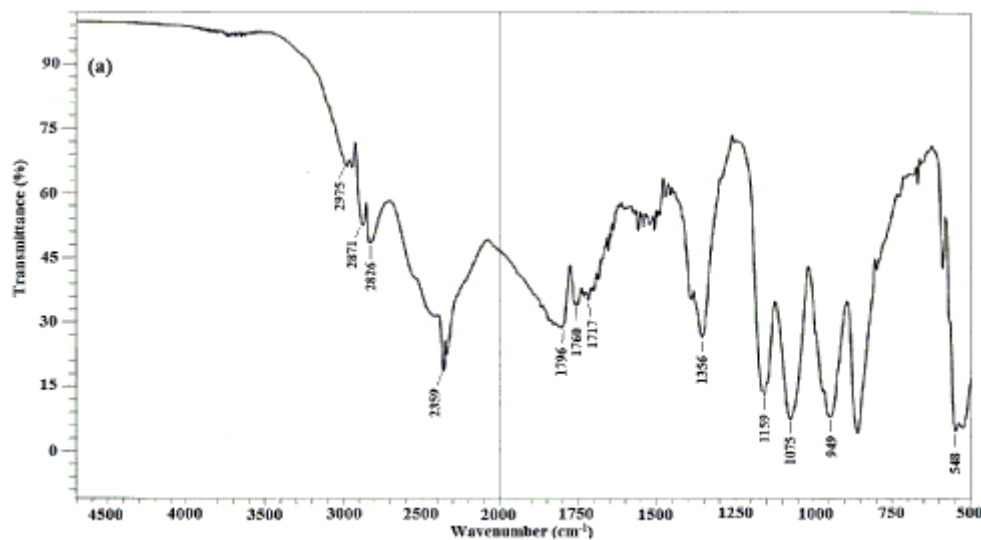


Abbildung 42: Transmissionsspektrum von Dinatrium-hydrogen-Orthophosphat (Na_2HPO_4). Spektrum nach [57].

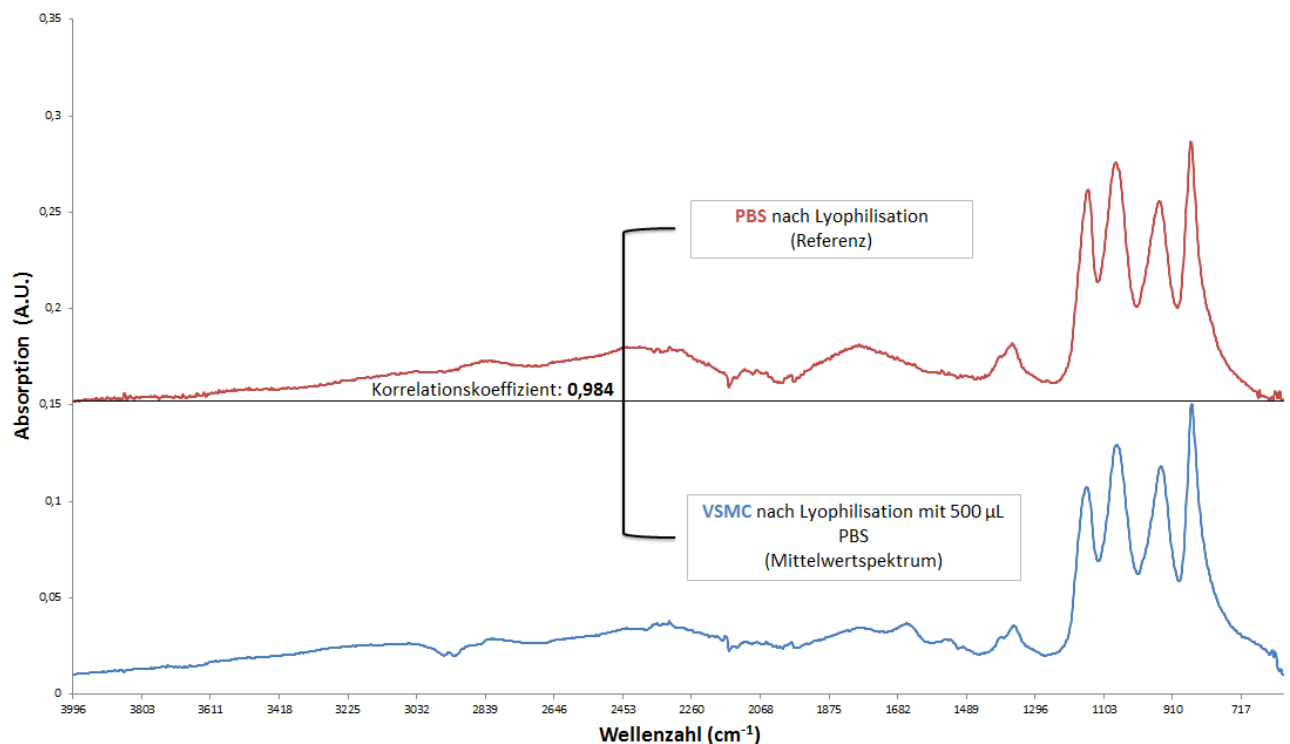


Abbildung 43: Vergleich des Mittelwertspektrums mit jenem der PBS-Referenz. Der Korrelationskoeffizient von 0,984 zeigt, dass die Absorptionen des Phosphates im PBS das Spektrum dominieren.

Als eine geeignete Alternative zur Verwendung von PBS als Zusatz, wurde der Einsatz von physiologischer NaCl-Lösung angesehen. Zum einen werden auch hierbei die Zellen bei den Waschschritten und nach dem Zusatz keinem osmotischen Stress ausgesetzt (isotonische Lösung, analog PBS), zum anderen zeigt NaCl selbst erst unter einer Wellenzahl von ca. 600 cm^{-1} eine deutliche Absorption, wodurch keine Überlagerungen der Zellsignale wie bei PBS auftreten sollten. Diese IR-Inaktivität des NaCl im gesamten untersuchten Bereich (4000 cm^{-1} bis 600 cm^{-1}) wurde weiters durch Probemessungen überprüft und bestätigt.

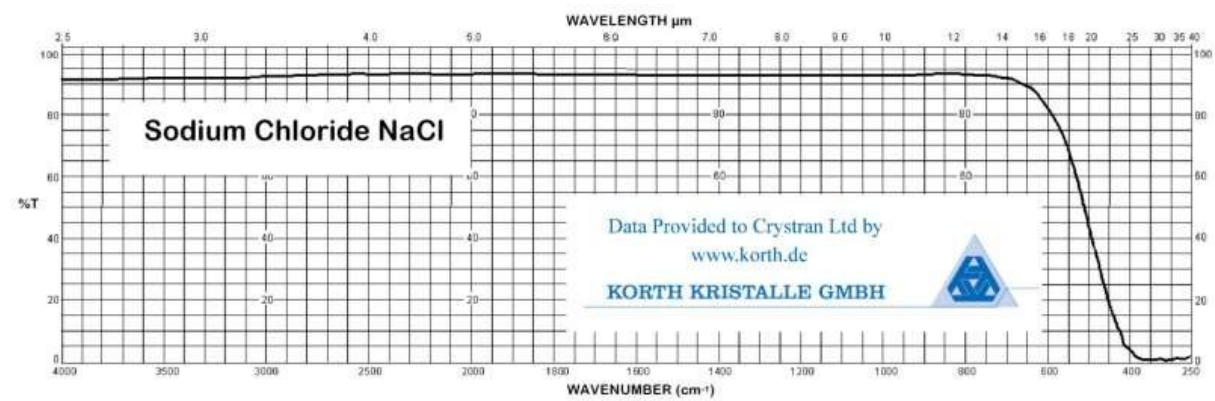


Abbildung 44: Transmissionsspektrum von NaCl. Das Spektrum zeigt, dass erst ab Wellenzahlen unter ca. 600 cm^{-1} deutliche Absorptionen von NaCl auftreten. Grafik nach [58].

Die Zellen wurden daher für die folgenden Messungen, nach ihrer 24-stündigen Inkubation in den Platten und der Entfernung des Kulturmediums, dreimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung (je 1 mL) gewaschen und mit 500 μL 0,9%iger NaCl-Lösung versetzt, bevor sie bei -80°C gefroren und anschließend lyophilisiert wurden. Die Lyophilisationsprodukte wurden dann analog wie bei der Verwendung von PBS mithilfe einer Einweg-Impföse direkt auf den ATR-Kristall transferiert, angepresst und vermessen. Das Ergebnis dieser Messungen (siehe Abbildung 45) waren allerdings nur sehr stark verrauschte Spektren, die sich so nicht für weitere Analysen eigneten.

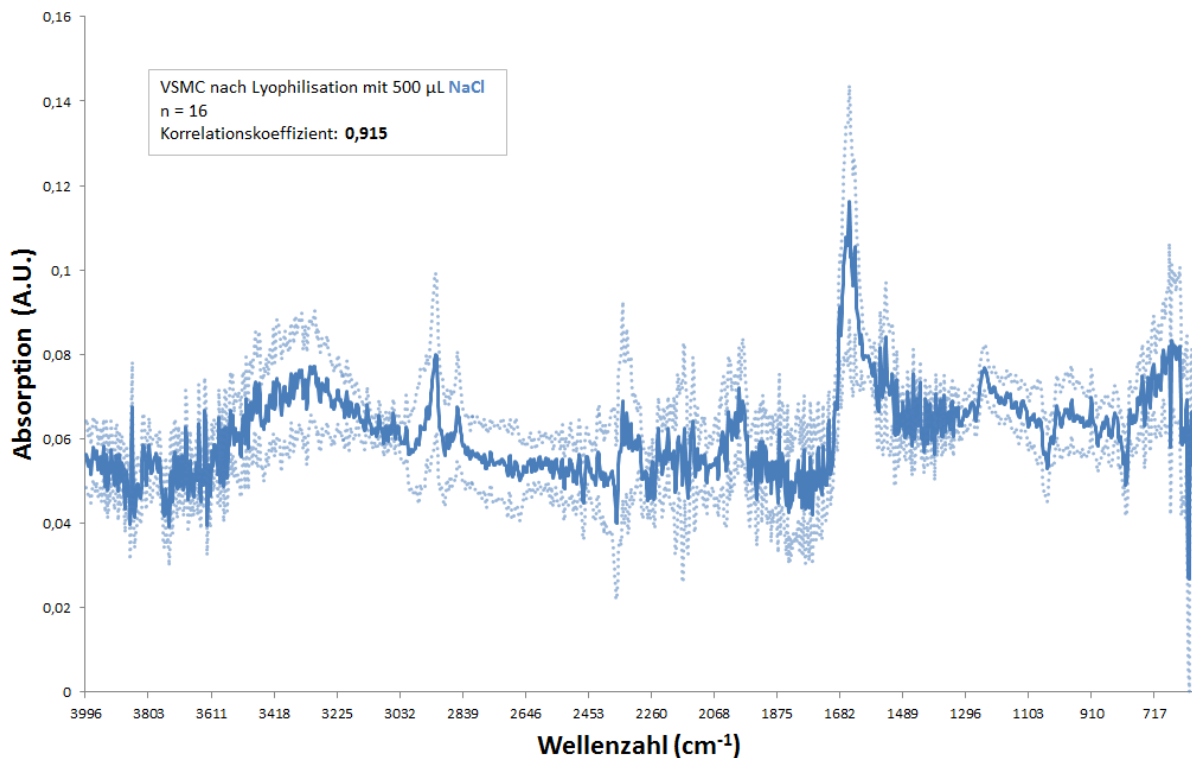


Abbildung 45: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung des gesamten gemessenen Bereiches (4000 cm^{-1} bis 600 cm^{-1}) der Lyophilisationsprodukte bei Zusatz von $500\text{ }\mu\text{L}$ 0,9%iger NaCl-Lösung. Anzahl der Einzelmessungen (n) und Korrelationskoeffizient sind angegeben.

Als primäre Ursache für dieses deutliche Rauschen wurde angenommen, dass sich zum Zeitpunkt der Messung im Vergleich zur Salzkonzentration nur eine relativ geringe Zellkonzentration in den transferierten Lyophilisaten am ATR-Kristall befand. Dafür spricht auch die Tatsache, dass dieses Rauschen erst mit der Verwendung des im gemessenen Bereich weitgehend IR-inaktiven NaCl deutlich sichtbar wurde, während dies bei der Verwendung von PBS durch die starken Absorptionen des Phosphates nur anhand der hohen Korrelation mit reinem PBS zu vermuten war.

Um die Zellkonzentrationen (relativ zur Salzmenge) in den Lyophilisaten zu erhöhen, wurden Versuche unternommen, bei denen jeweils eine geringere absolute Menge an NaCl-Lösung vor dem Einfrieren der Proben zugesetzt wurde ($100\text{ }\mu\text{L}$, $70\text{ }\mu\text{L}$, $50\text{ }\mu\text{L}$, $20\text{ }\mu\text{L}$). Allerdings führten diese Änderungen zu keiner deutlichen Verbesserung des Signal-Rauschen-Verhältnisses. Darüber hinaus wurde es auch erwartungsgemäß mit sinkender Salzkonzentration immer schwieriger mittels der Impföse eine ausreichende Menge der Probe aus den Wells zu entnehmen. Es wurde auch ein Experiment durchgeführt, bei dem ausschließlich die angesetzten Zellen ohne jeglichen NaCl-Zusatz lyophilisiert wurden, wobei es hier nach der Lyophilisation völlig unmöglich war die Probe mit der Impföse aus dem Well zu entfernen, geschweige denn eine ausreichende Probenmenge am Kristall zu

erreichen. Eine Senkung der Konzentration der NaCl-Lösung unter 0,9 % wurde nicht in Erwägung gezogen, da man die Zellen bei der Aufarbeitung keiner hypotonen Lösung aussetzen wollte und damit infolge des osmotischen Stresses Veränderungen in IR-Fingerprints verursachen könnte.

Erhöhung der Zellsignale durch Überführung der Zellen in Suspension bzw. Rekonstitution der erhaltenen Lyophilisate

Da alleine die Senkung der absoluten Menge an NaCl-Lösung keine deutlichen Erfolge brachte, wurden Überlegungen angestellt, dass möglicherweise auch bei der Probenentnahme aus den Wells nur ein geringer Teil der tatsächlich vorhandenen Zellmenge mit der Impföse auf den Kristall übergeführt wird. Dies könnte daher kommen, dass die adhärent angewachsenen Zellen durch den Zusatz an NaCl-Lösung nur bedeckt werden und anschließend in dieser Form gefroren und lyophilisiert werden. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass sich die lyophilisierten Zellen auch noch in den Lyophilisationsprodukten am Boden der Wells, bedeckt von einer NaCl-Schicht, befinden. Bei der Entnahme dieser Produkte mittels einer Impföse ist es dann, trotz „Abkratzen“ am Boden der Wells, nicht unwahrscheinlich, dass hauptsächlich die bedeckende Salzschrift und kaum Zellen überführt werden. Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen vor der Zugabe der NaCl-Lösung mittels Trypsin-Behandlung (400 µL für 5 Minuten) vom Boden gelöst und in Suspension übergeführt wurden. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium (800 µL) beendet und die erhaltene Suspension in Eppendorf-Tubes (1,5 mL) überführt, zentrifugiert (2 Minuten), dreimal mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen (je 1 mL) und mit 100 µL 0,9%iger NaCl-Lösung versetzt. Diese Suspensionen wurden nochmals kurz mittels Vortexer aufgeschüttelt und umgehend bei -80°C gefroren. Durch diese vorherige Überführung der Zellen in Suspension soll erreicht werden, dass die Zellen auch später im Lyophilisationsprodukt stochastisch verteilt im zugesetzten Salz vorliegen, anstatt nur am Boden der Wells. Abbildung 46 zeigt schematisch was durch diese Überführung in Suspension erreicht werden sollte.

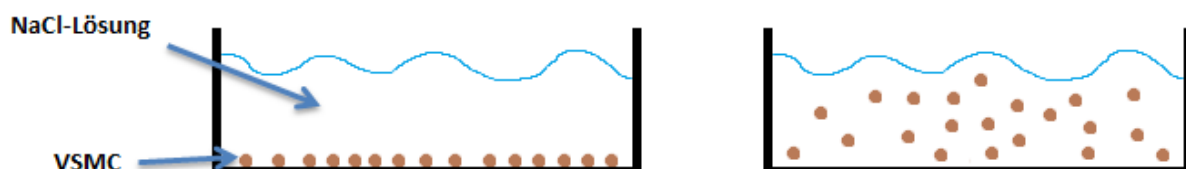


Abbildung 46: schematische Darstellung der Proben bei alleiniger Zugabe von NaCl-Lösung zu den adhärent gewachsenen Zellen (links) und bei vorhergehender Überführung in Suspension (rechts). Während links die Zellen durch die NaCl-Lösung nur bedeckt werden und in dieser Form höchstwahrscheinlich später auch in den Lyophilisaten vorliegen, ist anzunehmen, dass die Zellen in Suspension (rechts) auch später im Lyophilisat stochastisch verteilt im NaCl vorliegen werden.

Die vollständig gefrorenen Zellsuspensionen (>4h bei -80°C) wurden anschließend wie gehabt über Nacht lyophilisiert und vermessen. Es zeigte sich allerdings auch hier schnell, dass bei direkter Überführung der Lyophilisate auf den Kristall mittels einer Impföse keine ausreichenden Zellsignale erreicht werden können, womit an dieser Stelle generell die Vorgehensweise der direkten Überführung und Vermessung der festen Lyophilisate verworfen wurde.

Als eine geeignete alternative Methode zur Überführung der jeweiligen Proben auf den Kristall zeigte sich dann die Wiederauflösung (Rekonstitution) der Lyophilisate, die nun aus Zellsuspensionen hergestellt worden sind, unmittelbar vor ihrer Messung. Durch Zugabe von destilliertem Wasser wurden hierbei aus den festen Lyophilisaten wieder entsprechende Zellsuspensionen erhalten und diese als solche nun mittels einer Pipette auf den ATR-Kristall übergeführt, wo sie anschließend getrocknet und vermessen wurden. Die Trocknung wurde hierbei analog wie bei den Suspensionsmessungen durch 5-minütiges Überblasen der Suspensionen mit Druckluft direkt am ATR-Kristall (siehe Kapitel „Suspensionsmessungen“) bewerkstelligt. Als eine geeignete Menge an destilliertem Wasser wurde anfangs ein Volumen von 100 µL angesehen, da dies dem Volumen an zugesetzter 0,9%iger NaCl-Lösung vor dem Lyophilisationsprozesses entspricht und somit nach der Rekonstitution die lyophilisierten Zellen wieder in einer physiologischen NaCl-Lösung vorliegen. Die Lyophilisate wurden daher für die ersten Messungen dieser Art jeweils unmittelbar vor ihrer Messung mit 100 µL dest. Wasser versetzt, kurz mithilfe eines Vortexer durchmischt und 2 µL der Suspension mit einer Pipette auf dem Kristall platziert und getrocknet. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 47 dargestellt.

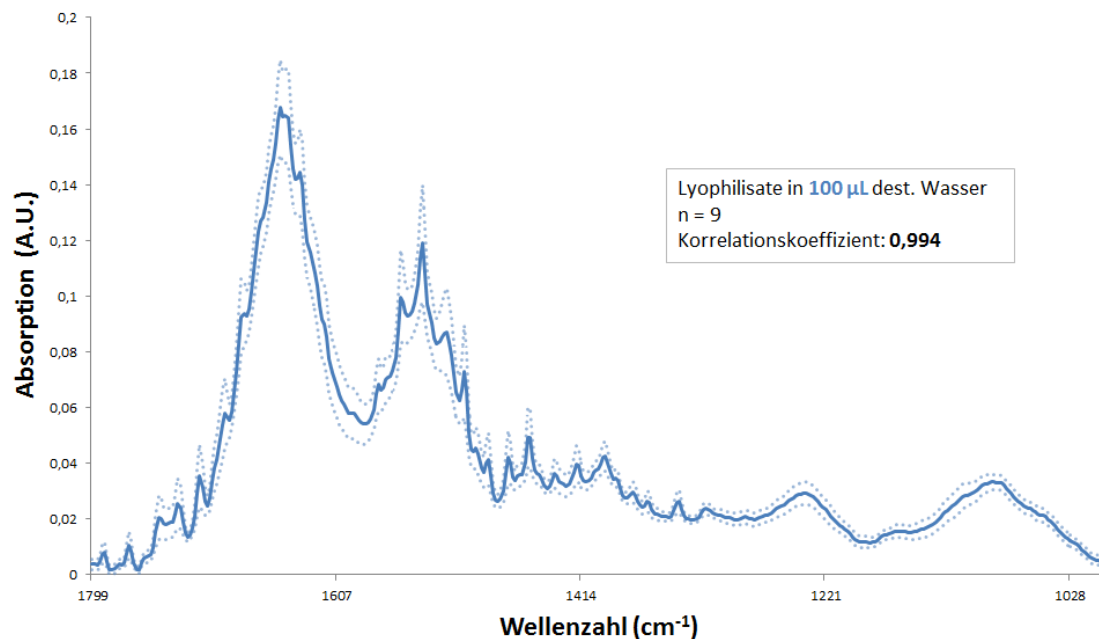


Abbildung 47: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung im Bereich von 1800 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} der resuspendierten Lyophilisate in $100\text{ }\mu\text{L}$ dest. Wasser. Anzahl der Einzelmessungen (n) und Korrelationskoeffizient sind angegeben.

Wie diese Ergebnisse zeigten, sind nun zwar deutliche Signale der Zellen im Spektrum erkennbar, was für eine generelle Eignung dieser Methode zum Transfer der lyophilisierten Zellen auf den ATR-Kristall spricht, allerdings waren diese nach wie vor von sehr deutlichem Rauschen begleitet. Um dieses Rauschen weiter zu vermindern wurde eine Konzentrierung der Suspension, die auf den Kristall aufgebracht wird, durchgeführt. Dazu wurden anstelle der $100\text{ }\mu\text{L}$ dest. Wasser nur mehr $10\text{ }\mu\text{L}$ zur Rekonstitution verwendet, was in Bezug zu den $100\text{ }\mu\text{L}$ NaCl-Lösung zum Zeitpunkt des Einfrierens einer 10-fachen Aufkonzentrierung der Suspension entspricht. Zwar entsteht hierbei dann keine physiologische NaCl-Lösung mehr, in der die lyophilisierten Zellen suspendiert sind, allerdings wurde dies aufgrund der kurzen Zeit zwischen der Herstellung und Messung dieser Suspensionen und der generellen Annahme, dass die Zellen während des Lyophilisationsprozesses den Großteil ihrer zellulären Integrität verlieren, als weitgehend vernachlässigbar angesehen. Die Ergebnisse der Messungen dieser konzentrierten Suspensionen sind in Tabelle 7 und Abbildung 48 gezeigt.

Tabelle 7: Berechnete Korrelationskoeffizienten zwischen den Spektren der Einzelmessungen und dem Mittelwert-Spektrum der resuspendierten Lyophilisate in 10 µL dest. Wasser. Ausreißer, die nicht in die Berechnung miteinbezogen wurden, sind rot gekennzeichnet.

Well	Korrelationskoeffizient
A1	0,996
	0,998
	0,997
A2	0,9998
	0,999
	0,998
A3	0,999
	0,980
	0,999
B1	0,998
	0,974
	0,999
B2	0,999
	0,998
	0,998
B3	0,997
	0,991
	0,940
Mittlerer Korrelationskoeffizient	0,995

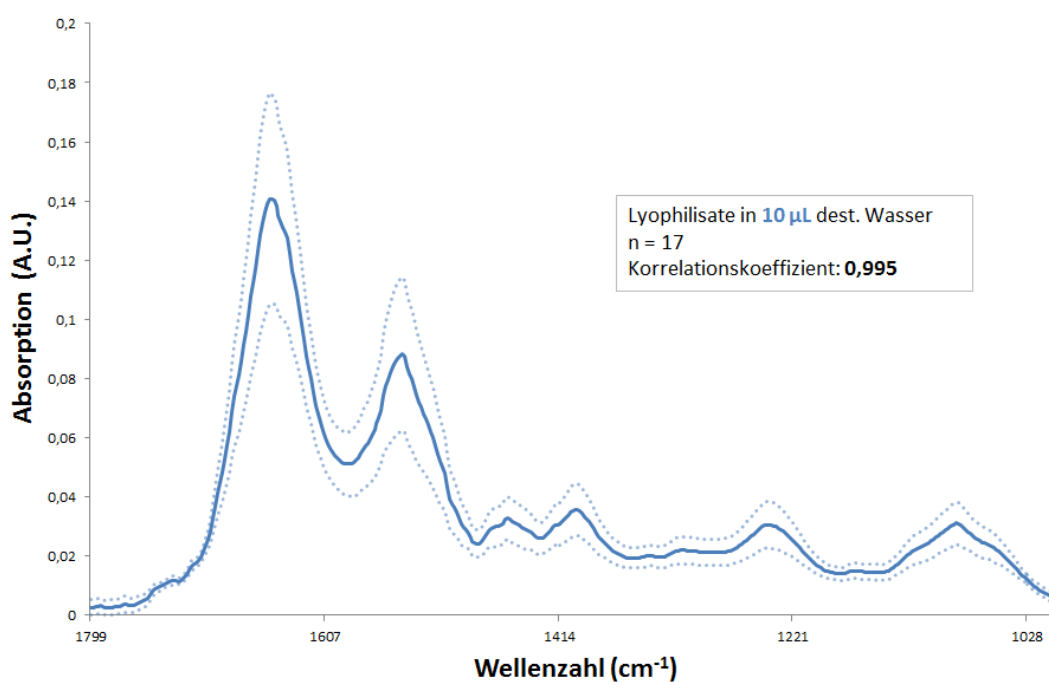


Abbildung 48: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung im Bereich von 1800 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1} der resuspendierten Lyophilisate in 10 µL dest. Wasser. Anzahl der Einzelmessungen (n) und Korrelationskoeffizient sind angegeben.

Wie die Ergebnisse zeigten, führt die Verwendung der zehnfach geringeren Mengen an destilliertem Wasser zur Rekonstitution der Lyophilisate zu einer deutlichen Reduktion des unerwünschten Rauschens in den Spektren, und es wurde mit einem mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,995 auch eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Spektren mit dieser Methode erzielt.

Fazit zur Messung lyophilisierter Zellen

Bei den Experimenten mit einem Lyophilisationsschritt im Protokoll hat sich sehr rasch gezeigt, dass die Auswahl des Zusatzes vor der Lyophilisation eine bedeutende Rolle spielt, und zwar insofern als dass dieser selbst im untersuchten Bereich IR-inaktiv sein muss, um nicht durch seine Eigenabsorptionen das resultierende IR-Spektrum zu dominieren und die Signale der Zellen zu überdecken. Aus diesem Grund wurde, anstelle des stark absorbierenden PBS, NaCl als IR-inaktiver Zusatz verwendet. Allerdings zeigte sich hier, dass die Zellkonzentrationen relativ zur Salzmenge am ATR-Kristall zu gering ausfielen, wodurch sehr stark verrauschte Spektren resultierten. Erst durch die Überführung der Proben in Suspension vor dem Lyophilisationsprozess und anschließender unmittelbarer Rekonstitution der Lyophilisate mit destilliertem Wasser und Trocknung am Kristall, konnte dieses Problem gelöst und letztlich eine ausreichend gute Reproduzierbarkeit mit dieser Methode erreicht werden.

Gegenüberstellung der Suspensions- und Lyophilisationsmessungen

Zwar fielen bei den Lyophilisationsmessungen die Korrelationskoeffizienten etwas geringer aus als sie letztendlich bei den Suspensionsmessungen erreicht werden konnten (mittlerer Korrelationskoeffizient von 0,996; siehe unter „Suspensionsmessungen“), dies wurde allerdings aufgrund des großen Vorteils von lagerfähigen Proben als verkraftbar gesehen, zumal auch hier die absolute Reproduzierbarkeit innerhalb der Methode als ausreichend gut ($> 0,99$) befunden wurde.

Abbildung 49 zeigt einen Vergleich der beiden Methoden mittels Hauptkomponentenanalyse.

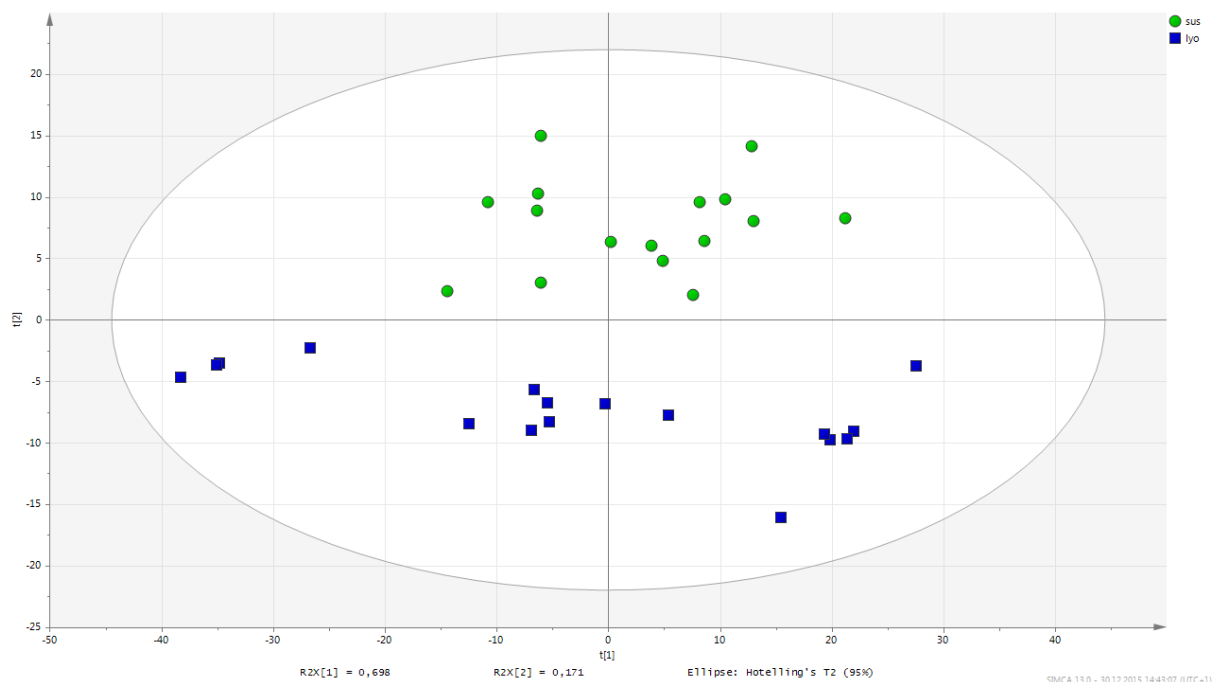


Abbildung 49: Scatter-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Spektren von Zellen, die durch „Suspensionsmessungen“ gemessen wurden (grüne Punkte; $n = 16$) und Spektren von Zellen, die durch „Lyophilisationsmessungen“ vermessen wurden (blaue Quadrate; $n = 17$). Dargestellt sind die ersten beiden Hauptkomponenten, die gemeinsam 86,9% der Gesamtvarianz der Daten erklären. Dabei erklärt die erste Hauptkomponente (x-Achse) 69,8% der Varianz, die zweite Hauptkomponente (y-Achse) 17,1% der Gesamtvarianz.

Dieser Vergleich der beiden Methoden mittels Hauptkomponentenanalyse zeigte, dass sich die Spektren mithilfe der zweiten Hauptkomponente (17,1% erklärte Varianz) entsprechend der angewendeten Methode klar in zwei Gruppen trennen lassen. Dies spricht dafür, dass im Zuge der verschiedenen Probenaufarbeitungen deutliche Unterschiede in den IR-Fingerprints erzeugt werden. Da aber für den späteren Einsatz als Screening-Methode nur eine der beiden Methoden verwendet werden soll, ist die Unterscheidbarkeit der beiden Verfahren als nebensächlich zu erachten. Viel wichtiger ist für diese Anwendung, dass innerhalb der beiden Methoden eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Spektren gegeben ist, was für beide Methoden zuvor durch die

Korrelationskoeffizienten gezeigt werden konnte. Eine weitere Auffälligkeit bei dieser Hauptkomponentenanalyse ist, dass die Varianz entlang der ersten Hauptkomponente, die ihrerseits den größten Teil der Gesamtvarianz (69,8%) in den Daten erklärt, bei den Lyophilisationsmessungen (blaue Quadrate) deutlich größer ausfällt als bei den Suspensionsmessungen (grüne Punkte).

Wenn auch bei reiner Betrachtung der erzielten Reproduzierbarkeit, die Methode der Suspensionsmessungen bessere Resultate lieferte als die Methode der Lyophilisationsmessungen, so ist letztere aufgrund ihres großen Vorteils von lager- und transportfähigen Proben, bei dennoch ausreichender Reproduzierbarkeit, als deutlich überlegen zu beurteilen. Aus diesem Grund wurde die Methode der Lyophilisationsmessungen als die Methode der Wahl für die spätere Anwendung eines Screening-Verfahrens an VSMC mittels FT-IR-Spektroskopie befunden.

Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte, ausgehend von entsprechenden Literaturstellen mit anderen Zelltypen, gezeigt werden, dass sich die FT-IR-Spektroskopie unter der Verwendung eines entsprechend robusten Aufarbeitungsprotokolls der Proben auch für Metabolom-Analysen an glatten Gefäßmuskelzellen eignet. Bei der Erstellung und Optimierung eines solchen Protokolls hat sich besonders die Etablierung eines Lyophilisationsschrittes im Protokoll als praktikabel erwiesen. Erst durch diesen zusätzlichen Schritt erscheint nun die tatsächliche Anwendung des Protokolls im Zuge eines größeren Screening-Prozesses von Substanzen an VSMC als sinnvoll durchführbar.

Extraktion der Zellen

Bei der Erstellung des Protokolls wurde in dieser Arbeit nur die Strategie der Vermessung von ganzen Zellen verfolgt, da dies auch die Methode der Wahl in den entsprechenden literarischen Ausgangspunkten war. Eine weitere Möglichkeit würde die Herstellung eines Extraktes der Zellen darstellen. Allerdings hätte die Herstellung eines Zellextraktes neben dem erhöhten Aufwand, auch den Nachteil, dass durch den Extraktionsprozess ein weiterer Schritt hinzukommen würde, in dem es zu Veränderungen der Fingerprints kommen kann. Daher ist es notwendig den Zellmetabolismus rasch zu beenden und die enzymatische Tätigkeit zu unterbinden (engl. „Quenching“). Dies wird normalerweise durch eine rasche Änderung der Temperatur oder des pH-Wertes erzielt, meist durch Behandlung mit gekühlter Methanol-Lösung (-40°C). [59] Auch die Auswahl des Lösungsmittels bzw. des Lösungsmittelgemisches hätte einen weitreichenden Einfluss auf den Informationsgehalt der Fingerprints, da insbesondere in Abhängigkeit des abgedeckten Polaritätsbereiches des/der verwendeten Lösungsmittel, nur bestimmte Zellinhaltsstoffe extrahiert werden und somit keine Erfassung des gesamten Zellinhaltes erfolgt. Eine entsprechende Eruiierung, welche Lösungsmittel eine bestmögliche Extraktion jener Substanzen oder Substanzklassen erlaubt, die für einen aussagekräftigen IR-Fingerprint notwendig sind, wäre daher zuvor unerlässlich. In diesem Zusammenhang wurden auch schon Metabolom-Untersuchungen an adhärent wachsenden SW480-Kolonkarzinomzellen mittels GC-MS durchgeführt, bei denen 7 verschiedene Extraktionsmittel bezüglich ihrer Ausbeute an extrahierten Metaboliten verglichen wurden. Die Arbeiten kamen zu dem Ergebnis, dass sich ein Methanol-Wasser-Gemisch ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 80%/20%) hierfür am besten eignet, insbesondere wenn die Zellen durch Abschaben in diesem Lösungsmittel (anstatt durch

Trypsin-Behandlung) vom Kulturboden gelöst und extrahiert werden. [60] Diese Arbeit könnte als Ausgangspunkt für Versuche zur Erstellung eines Extraktionsprotokolls für VSMC und der Vermessung mittels FT-IR herangezogen werden.

Ausblick: Anwendung des erstellten Protokolls zum Screening von antiproliferativen Naturstoffen

Der nächste Schritt besteht nun in der konkreten Anwendung des hier erstellten Protokolls (Methode der Lyophilisationsmessungen) zur Austestung von verschiedenen antiproliferativen Naturstoffen an den VSMC. Zu diesem Zweck müssen die Zellen noch vor Zusatz der jeweiligen Substanzen in ihrem Fortschreiten im Zellzyklus synchronisiert werden. Um dies zu erreichen, wird das normale Wachstumsmedium der Zellen nach den ersten 24h Inkubation in den Mikrotiterplatten (6-Well) durch ein alternatives Medium (engl. starvation medium) ersetzt, welches eine deutlich geringere Konzentration an FBS enthält (0,1% statt 20%). Dadurch fehlen den Zellen die nötigen mitogenen Signale, die normalerweise durch die enthaltenen Wachstumsfaktoren im FBS vermittelt werden, um von der G_1/G_0 -Phase in die S-phase über zu gehen. Durch eine weitere Inkubation für 24h mit diesem Medium erfolgt eine Akkumulierung der Zellen in der G_1/G_0 -Phase des Zellzyklus. Danach werden den nun synchronisierten Zellen die verschiedenen Substanzen zugesetzt, wobei hierbei zur Erhöhung der Variabilität jeweils zwei verschiedene Konzentrationen verwendet werden sollen (IC_{50} -Konzentration und dreifach IC_{50} -Konzentration). Pro Platte werden eine negative Kontrolle (keine Substanz zugesetzt) und eine positive Kontrolle (Taxol, bei dreifacher IC_{50} -Konzentration) durchgeführt. Nach Zusatz der Substanzen werden die Zellen für 30 Minuten vor-inkubiert, um eine Aufnahme der Substanzen in die Zellen zu gewährleisten. Danach wird allen Wells der Wachstumsfaktor PDGF zugesetzt, wodurch die Proliferation der Zellen angeregt wird. Abbildung 50 zeigt den Plan für eine solche Messung. Anschließend werden die Zellen mit den Substanzen für 24h inkubiert und es folgt die Aufarbeitung der Proben gemäß dem hier erstellten Protokolls (Lyophilisationsmessungen) und der Vermessung mittels FT-IR-Spektroskopie. Mit den so erhaltenen IR-Fingerprints der unbehandelten Zellen (negative Kontrolle) und jenen der Taxol-behandelten Zellen (positive Kontrolle) soll dann ein statistisches Modell erstellt werden, mit dessen Hilfe es möglich sein sollte die Spektren der Naturstoff-behandelten Zellen auf Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit in Bezug auf Taxol-Behandlung bzw. keinerlei Behandlung zu untersuchen. Dadurch können eventuell wertvolle Informationen über den Wirkmechanismus der untersuchten Naturstoffe gewonnen werden.

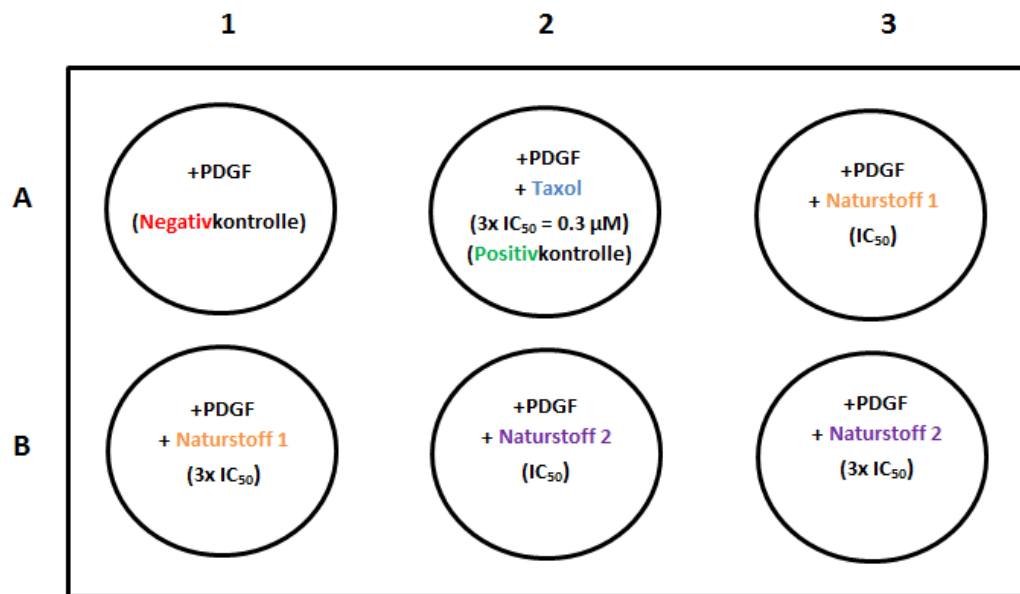


Abbildung 50: Genereller Plan für die Austestung von Substanzen an den VSMC in einer 6-Well-Platte. Je ein Well (A1) entfällt auf die negative Kontrolle und ein Well (A2) auf die positive Kontrolle (Taxol). Mit den verbleibenden vier Wells ist die Austestung von zwei verschiedenen Substanzen bei den zwei verschiedenen Konzentrationen möglich.

Zusammenfassung

Arteriosklerose und resultierende Komplikationen bleiben weiterhin die führende Todesursache in Industrieländern. Zur Behandlung schwerer Fälle von Arteriosklerose hat sich die Methode der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) mit anschließendem Setzen eines Stents etabliert. Dennoch zeigt diese Methode den gravierenden Nachteil sogenannter "in-stent Restenosen", ein Prozess, der durch die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen geprägt ist. Zu diesem Zweck wurden Wirkstoff-beschichtete Stents, sog. Drug-Eluting Stents (DES) entwickelt. Bei den derzeit verwendeten Beschichtungssubstanzen bestehen allerdings deutliche Bedenken bezüglich der Selektivität ihrer antiproliferativen Wirkung. Aus diesem Grund kommt der Suche nach neuen Beschichtungssubstanzen eine große Rolle in der Arzneimittelforschung zu. Der in-vitro Screening-Prozess neuer potenzieller Substanzen ist aber teuer und zeitaufwendig. Deshalb wären neue Screening-Methoden, die erste Informationen über die generelle Aktivität neuer Substanzen liefern können, von großem Interesse. In diesem Zusammenhang wurde in der Literatur schon mehrmals die FT-IR-Spektroskopie in Kombination mit geeigneten statistischen Verfahren zur Untersuchung von IR-Fingerprints als günstige und schnelle Methode für ein erstes Screening neuer Substanzen an Zellen nahegelegt. Die vorliegende Arbeit liefert nun den ersten notwendigen Schritt für ein solches Screening von Substanzen an glatten Gefäßmuskelzellen, ein robustes Aufarbeitungsprotokoll der Zellen zur Vermessung der Zellen mittels FT-IR.

Abstract

Atherosclerosis and arising complications, such as stroke or myocardial infarction, continue to be the leading cause of death and morbidity in developed countries. For the treatment of severe cases of atherosclerosis a procedure called "Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty" (PTCA) followed by the placement of a stent within the blood vessel is used in order to reestablish blood flow in narrowed vessels. However, this procedure shows the big disadvantage of "in-stent restenosis", a process of re-narrowing of stented vessels due to proliferation and migration of Vascular Smooth Muscle Cells (VSMC). Therefore so called Drug-Eluting Stents (DES), which are coated by different antiproliferative substances have been developed. But as there are still concerns about the selectivity of the currently used substances, the search for new coating substances became a major issue in drug discovery. However, the in-vitro screening process for new potential compounds is still expensive and highly time-consuming. Therefore, new screening methods for a first impression on the general activity of new potential compounds would be highly interesting. In this context, literature suggests that FT-IR-Spectroscopy followed by an appropriate statistical analysis of the spectra (IR-fingerprints) could be used as an inexpensive and quick first screening method for new potentially antiproliferative compounds on cells. This work now provides the necessary first step for such a screening process of substances on VSMC, a sufficiently robust preparation protocol for measuring the cells by FT-IR.

Literaturverzeichnis

- [1] Pschyrembel W., et al. (1986) Pschyrembel klinisches Wörterbuch: Mit klinischen Syndromen und Nomina Anatomica. S. 145.
- [2] Mutschler E., Schaible H., Vaupel P. (2007) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6. Auflage, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Mainz, Jena, S. 278-279.
- [3] Mutschler E., Schaible H., Vaupel P. (2007) Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 6. Auflage, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Mainz, Jena, S. 242-243.
- [4] Lusis A. J. (2000) Atherosclerosis. Nature 407(6801): 233–241. doi:10.1038/35025203.
- [5] Balletshofer B., Haasis R. (2006) Herz und Gefäße. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 39
- [6] Pape H., Kurtz A., Silbernagl S. (2014) Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 219
- [7] Pape H., Kurtz A., Silbernagl S. (2014) Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 220 Kapitel 6.3: Das Gefäßsystem, Abb. 6.6.
- [8] Reiner Z. et al. (2011) ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. Eur. Heart J. 3, 1769–1818 (doi:10.1093/eurheartj/ehr158)
- [9] Hambrecht R., Adams V., Erbs S., Linke A., Kränkel N., Shu Y., Baither Y., Gielen S., Thiele H., Gummert J.F., Mohr F.W., Schuler G. (2003) Regular Physical Activity Improves Endothelial Function in Patients With Coronary Artery Disease by Increasing Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. Circulation 107, 3152-3158. (DOI: 10.1161/01.CIR.0000074229.93804.5C)
- [10] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet 344, 1383–89.
- [11] <http://triadctsurgeons.com/programs/coronary-artery-bypass-grafting-cabg/>. Abgerufen am 07.12.2015.
- [12] Zeymer U., Zahn R. 2007. Drug-eluting stents: effective and safe for every patient and every lesion? Eur. Heart J. 28, 2559–2560. (doi:10.1093/eurheartj/ehl195)
- [13] Maisel W. H., Laskey W. K. 2007. Drug-Eluting Stents. Circulation 115, 426-427. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.688176)

- [14] Suwaidi J. A., Holmes D. R., Salam A. M., Lennon R., Berger P. B. (2004) Impact of coronary artery stents on mortality and nonfatal myocardial infarction: Meta-analysis of randomized trials comparing a strategy of routine stenting with that of balloon angioplasty. *Am. Heart J.* 147, 815–822.
- [15] Marx, S. O., Totary-Jain H., Marks, A. R. (2011) Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation in Restenosis. *Circ Cardiovasc Interv.* 4, 104-111. (doi: 10.1161/CIRCINTERVENTIONS.110.957332)
- [16] Purcell C., McGeachie J., Tennant M. (1997) Neo-intimal hyperplasia in vascular grafts and its implications for autologous arterial grafting. *Ann R Coll Surg Engl* 79, 164-168.
- [17] <http://www.britannica.com/science/cardiovascular-disease>. Abgerufen am 03.12.2015.
- [18] <http://www.cxvascular.com/cn-latest-news/cardiovascular-news---latest-news/primus-drug-coated-balloon-shows-efficacy-in-patients-with-in-stent-restenosis-of-drug-eluting-stents->. Abgerufen am 04.12.2015.
- [19] Joner M., Finn A., Farb A., Mont E. K., Kolodgie F. D., Ladich E., Kutys R., Skoriya K., Gold H. K., Virmani R. (2006) Pathology of Drug-Eluting Stents in Humans - Delayed Healing and Late Thrombotic Risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* Vol. 48, No. 1, 193–202. (DOI:10.1016/j.jacc.2006.03.042)
- [20] Wessely R., Schömig A., & Kastrati A. (2006). Sirolimus and paclitaxel on polymer-based drug-eluting stents: Similar but different. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(4), 708–714. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.09.047>
- [21] <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm082499.htm>. Abgerufen am 04.12.2015.
- [22] Teuscher E., Melzig M. F., Greifswald U. L. (2012) Biogene Arzneimittel – Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie. 7. Auflage. wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. S. 205-206.
- [23] <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm081189.htm>. Abgerufen am 07.12.2015.
- [24] <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/ucm175797.htm>. Abgerufen am 07.12.2015.
- [25] Mair C. E., Liu R., Atanasov A. G., Wimmer L., Nemetz-Fiedler D., Sider N., Heiss E. H., Mihovilovic M. D., Dirsch V. M., Rollinger J. M. 2015. Piperine Congeners as Inhibitors of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Planta Med.* 81, 1065–1074. (doi: 10.1055/s-0035-1546165)
- [26] Liu R, Heiss EH, Guo D et al. Capsaicin from chili (*Capsicum* spp.) inhibits vascular smooth muscle cell proliferation [version 1; referees: 2 approved, 1 approved with reservations] *F1000Research* 2015, 4:26 (doi: 10.12688/f1000research.6007.1)

- [27] Liu R., Heiss E. H., Sider N., Schinkovitz A., Gröblacher B., Guo D., Bucar F., Bauer R., Dirsch V. M., Atanasov A. G. 2015. Identification and characterization of [6]-shogaol from ginger as inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 843–852. (doi: 10.1002/mnfr.201400791)
- [28] Nielsen J, Oliver S. The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol.* 2005;23(11):544–6.
- [29] Ami D, Mereghetti P, Doglia SM. Multivariate Analysis for Fourier Transform Infrared Spectra of Complex Biological Systems and Processes. *Multivar Anal Manag Eng Sci.* 2012;189–220.
- [30] Wenning M., Scherer S. (2013). Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: Perspectives and limitations of the method. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16), 7111–7120. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-5087-3>
- [31] Oust A., Møretrø T., Kirschner C., Narvhus J. a., Kohler A. (2004). Evaluation of the robustness of FT-IR spectra of lactobacilli towards changes in the bacterial growth conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 239, 111–116. doi:10.1016/j.femsle.2004.08.024
- [32] Mehrotra R., Jangir D. K., Gupta A., Kandpal H. C., Vaidyan V. K., Jayakumar V. S. (2008). Differentiation of Normal and Malignant Breast Tissues using Infrared Spectroscopy. *AIP Conference Proceedings*, 141(2008), 141–143. <http://doi.org/10.1063/1.3046194>
- [33] Mehrotra R., Tyagi G., Jangir D. K., Dawar R., Gupta N. (2010). Analysis of ovarian tumor pathology by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Ovarian Research*, 3(1), 27. <http://doi.org/10.1186/1757-2215-3-27>
- [34] Gaigneaux A., Ruysschaert J. M., Goormaghtigh E. (2002). Infrared spectroscopy as a tool for discrimination between sensitive and multiresistant K562 cells. *European Journal of Biochemistry*, 269, 1968–1973. <http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2002.02841.x>
- [35] Derenne A., Van Hemelryck V., Lamoral-Theys D., Kiss R., Goormaghtigh E. (2013). FTIR spectroscopy: A new valuable tool to classify the effects of polyphenolic compounds on cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(1), 46–56. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.10.010>
- [36] Bedolla D. E., Kenig S., Mitri E., Storici P., Vaccari L. (2014). Further insights into the assessment of cell cycle phases by FTIR microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 75, 127–135. <http://doi.org/10.1016/j.vibspec.2014.08.007>
- [37] Derenne A., Mignolet A., Goormaghtigh E. (2013). FTIR spectral signature of anticancer drug effects on PC-3 cancer cells: is there any influence of the cell cycle? *The Analyst*, 138(14), 3998–4005. <http://doi.org/10.1039/c3an00225j>
- [38] Derenne, A., Gasper, R., & Goormaghtigh, E. (2011). The FTIR spectrum of prostate cancer cells allows the classification of anticancer drugs according to their mode of action. *The Analyst*, 136(6), 1134. <http://doi.org/10.1039/c0an00872a>
- [39] Fahr A. (2015) Voigt Pharmazeutische Technologie. 12. Auflage, deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, S. 32-33.

- [40] <https://homepage.univie.ac.at/franz.embacher/Splitter/VomEisZumWasserdampf/>. Abgerufen am 30.11.2015.
- [41] <http://polariton.exphysik.uni-leipzig.de/subsites/staff/bundesmann/ftir/ir.html>. Abgerufen am 06.01.2016.
- [42] http://www.chem.uzh.ch/robinson/lectures/AC_BII/Kap18/kap18.html. Abgerufen am 06.01.2016.
- [43] <http://www.chemie.de/lexikon/Fourier-Transformations-IR-Spektroskopie.html>. Abgerufen am 06.01.2016.
- [44] <http://www.chemie.de/lexikon/ATR-Spektroskopie.html>. Abgerufen am 06.01.2016.
- [45] <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=5958>. Abgerufen am 06.01.2016.
- [46] http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/cc_correlation.html. Abgerufen am 03.01.2016.
- [47] http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/cc_corr_coeff.html. Abgerufen am 03.01.2016.
- [48] Kessler W. (2007) Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. S. 21-88.
- [49] Kessler W. (2007) Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. S. 24, Abb. 2.1.
- [50] http://www.statistics4u.info/fundstat_germ/cc_pca.html. Abgerufen am 04.01.2016.
- [51] Scholz M. (2006) Approaches to analyse and interpret biological profile data, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam, S. 16.
- [52] <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemoinformatik/erlangen/datenanalyse/pca.html>. Abgerufen am 05.01.2016.
- [53] <http://www.chem.ucla.edu/~webspectra/irtable.html>. Abgerufen am 19.12.2015.
- [54] <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C124389&Type=IR-SPEC&Index=1#IR-SPEC>. Abgerufen am 19.12.2015.
- [55] <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7732185&Type=IR-SPEC&Index=1#IR-SPEC>. Abgerufen am 19.12.2015.
- [56] Correa-García S., Bermúdez-Moretti M., Travo A., Délérís G., Forfar I. (2014) FTIR spectroscopic metabolome analysis of lyophilized and fresh *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. *Anal. Methods* 6, 1855–1861.
- [57] Trivedi MK, Branton A, Trivedi D, Nayak G, Bairwa K, et al. (2015) Spectroscopic Characterization of Disodium Hydrogen Orthophosphate and Sodium Nitrate after Biofield Treatment. *J Chromatogr Sep Tech* 6:282. doi:10.4172/2157-7064.1000282

[58] <http://www.crystran.co.uk/optical-materials/sodium-chloride-nacl>. Abgerufen am 29.12.2015.

[59] Villas-Bôas S. G., Højer-Pedersen J., Åkesson M., Smedsgaard J., Nielsen J. (2005). Global metabolite analysis of yeast: Evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, 22(14), 1155–1169. <http://doi.org/10.1002/yea.1308>

[60] Dettmer K., Nürnberger N., Kaspar H., Gruber M. a., Almstetter M. F., Oefner P. J. (2011). Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: Optimization of harvesting and extraction protocols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(3), 1127–1139. <http://doi.org/10.1007/s00216-010-4425-x>

Abbildungsverzeichnis

Die Abbildungen 1 bis 15, 18, 19, 21, 23, 27, 28, 34, 38, 42, und 44 wurden der Literatur entnommen und an den jeweiligen Stellen entsprechend zitiert.

Abbildung 1: Aufbau einer arteriellen Gefäßwand.	5
Abbildung 2: Eine Arteriole des Skelettmuskels in verschiedenen Stadien der Vasokonstriktion.	6
Abbildung 3: Arteriosklerotische Gefäßveränderungen.	8
Abbildung 4: Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems als führende Todesursache beider Geschlechter im Jahre 2014 in Österreich.	9
Abbildung 5: Deutlicher Rückgang der Haupttodesursache "Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems" seit 1980 in Österreich.	10
Abbildung 6: SCORE-System zur Abschätzung des 10-Jahres-Risikos für ein erstmaliges schwerwiegendes kardiovaskuläres Ereignis (in einer Hochrisiko-Region in Europa).	11
Abbildung 7: Überbrückung eines arteriosklerotisch verengten Gefäßbereiches durch einen Bypass.	13
Abbildung 8: Schritte bei der Durchführung einer Ballon-Angioplastie mit Stent-Platzierung.	14
Abbildung 9: Drug-Eluting Stent, schematisch.	15
Abbildung 10: Vergleich der Endothelialisierungs-Rate von bare metal stents (BMS) mit der von drug-eluting stents (DES) als Funktion der Zeit.	16
Abbildung 11: Durch Resazurin-Konversions-Assay bestimmte Viabilität von Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) nach Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an [6]-Shogaol im Vergleich zu Paclitaxel oder reinem Lösungsmittel (0,1% DMSO, Vehikel).	19
Abbildung 12: Darstellung der Wechselwirkung zwischen den verschiedenen "omen" einer Zelle.	21
Abbildung 13: FT-IR-Absorptionsspektrum einer intakten murinen Oozyte.	23
Abbildung 14: Hierarchische Clusteranalyse der Spektren von Prostata-Krebszellen in verschiedenen Zellzyklusphasen mit oder ohne Paclitaxel-Behandlung.	25
Abbildung 15: Die hierarchische Clusteranalyse der IR-Spektren behandelter Prostatakrebszellen zeigt, dass sich die Spektren nach den zugrundeliegenden Wirkmechanismen der jeweiligen Substanzklassen einteilen lassen.	26
Abbildung 16: mikroskopische Aufnahme der glatten Gefäßmuskelzellen in Kultur (Olympus CKX31, 100x Vergrößerung, Phasenkontrast-Aufnahme).	29

Abbildung 17: allgemeine wöchentliche Arbeitsschritte in der Zellkultur.....	29
Abbildung 18: Konzentrationen in der Zellkultur für die jeweiligen Gefäße.	31
Abbildung 19: Phasendiagramm von Wasser.....	32
Abbildung 20: Lyophile „VaCo 5-II“ mit angeschlossenem Exsikkator.....	33
Abbildung 21: Ausschnitt des elektromagnetischen Spektrums mit den Unterbereichen der infraroten Strahlung.	34
Abbildung 22: Typisches IR-Transmissionsspektrum einer chemischen Reinsubstanz (Coffein).....	35
Abbildung 23: ATR-Kristall durch den die IR-Strahlung in Totalreflexion geführt wird.	36
Abbildung 24: Ein Korrelationskoeffizient von ± 1 entspricht einem rein linearen Zusammenhang zwischen X und Y, die Werte liegen daher auf einer steigenden bzw. sinkenden Gerade.	38
Abbildung 25: Beispiel, bei dem durch einen Ausreißer bedingt der Korrelationskoeffizient deutlich höher liegt ($r_{\text{ges}} = 0,96$) als bei alleiniger Betrachtung der Daten ohne Ausreißer ($r_{\text{ex}} = -0,12$).	39
Abbildung 26: Ein nicht-linearer (hier quadratischer) Zusammenhang zwischen X und Y führt auch zu einem Korrelationskoeffizienten von 0.	39
Abbildung 27: Allgemeines Prinzip der Hauptkomponentenanalyse.....	40
Abbildung 28: Beispiel einer Hauptkomponentenanalyse.....	41
Abbildung 29: Die beiden prinzipiell verfolgten Vorgehensweisen bei der Vermessung von ganzen Zellen.	43
Abbildung 30: Vergleich zwischen dem ursprünglichen Protokoll von Derenne et al. [35] und der adaptierten Version für VSMC (blau: beibehaltene Schritte, rot: entfernte Schritte, grün: zusätzliche Schritte, orange: modifizierte Schritte).....	44
Abbildung 31: Vorrichtung zur in-situ Trocknung der Suspensionsproben direkt am ATR-Kristall durch einen Luftstrom.	45
Abbildung 32: Vorgehensweise bei den Suspensionsmessungen.....	46
Abbildung 33: Mittelwertspektren nach 24h (blau), 48h (rot) und 72h (grün) Inkubation der Zellen in der 12-Well-Platte.	48
Abbildung 34: Transmissionsspektren von CO ₂ (oben) und H ₂ O (unten).....	49
Abbildung 35: Ausschnitt der Absorptionsspektren im Wellenzahlbereich von 1800 bis 1000 cm ⁻¹ nach den verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen.	51
Abbildung 36: Schematische Darstellung der Abschätzungen der Zellzahlen nach den verschiedenen Inkubationszeiten basierend auf der bestimmten Generationszeit.	52
Abbildung 37: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung der Zellen nach 24h Inkubation in einer 6-Well-Platte.....	53

Abbildung 38: Scatter-Plot der Hauptkomponenten-Analyse der FT-IR-Spektren von <i>S. cerevisiae</i> , die in 3 verschiedenen Kulturmedien inkubiert wurden (verschiedene Symbole).....	56
Abbildung 39: Lyophilisationsprodukte in den Wells einer Mikrotiterplatte.	57
Abbildung 40: mikroskopische Aufnahme der Zellen mit 500 µL PBS nach dem Lyophilisationsprozess.	57
Abbildung 41: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung des gesamten gemessenen Bereiches (4000 cm ⁻¹ bis 600 cm ⁻¹) der Lyophilisationsprodukte bei Zusatz von 500 µL PBS.	58
Abbildung 42: Transmissionsspektrum von Dinatrium-hydrogen-Orthophosphat (Na ₂ HPO ₄).	59
Abbildung 43: Vergleich des Mittelwertspektrums mit jenem der PBS-Referenz.	59
Abbildung 44: Transmissionsspektrum von NaCl.	60
Abbildung 45: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung des gesamten gemessenen Bereiches (4000 cm ⁻¹ bis 600 cm ⁻¹) der Lyophilisationsprodukte bei Zusatz von 500 µL 0,9%iger NaCl-Lösung. .	61
Abbildung 46: schematische Darstellung der Proben bei alleiniger Zugabe von NaCl-Lösung zu den adhären gewachsenen Zellen (links) und bei vorhergehender Überführung in Suspension (rechts).	62
Abbildung 47: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung im Bereich von 1800 cm ⁻¹ bis 1000 cm ⁻¹ der resuspendierten Lyophilisate in 100 µL dest. Wasser.....	64
Abbildung 48: Mittelwertspektrum $\pm$ Standardabweichung im Bereich von 1800 cm ⁻¹ bis 1000 cm ⁻¹ der resuspendierten Lyophilisate in 10 µL dest. Wasser.....	65
Abbildung 49: Scatter-Plot der Hauptkomponentenanalyse der Spektren von Zellen, die durch „Suspensionsmessungen“ gemessen wurden (grüne Punkte; n = 16) und Spektren von Zellen, die durch „Lyophilisationsmessungen“ vermessen wurden (blaue Quadrate; n = 17).	67
Abbildung 50: Genereller Plan für die Austestung von Substanzen an den VSMC in einer 6-Well-Platte.	71

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 wurde der Literatur entnommen und an der entsprechenden Stelle zitiert.

Tabelle 1: Risikofaktoren der Arteriosklerose für entsprechende Gefäßregionen in der Reihenfolge ihres epidemiologischen Auftretens.	7
Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten Substanzen mit Bezugsquelle bzw. Herstellungsvorschriften.	28
Tabelle 3: Korrelationskoeffizienten zwischen den Spektren der Einzelmessungen und den jeweiligen Mittelwert-Spektren.....	47
Tabelle 4: Berechnete Korrelationskoeffizienten derselben Spektren wie zuvor, aber unter alleiniger Betrachtung des Wellenzahlbereiches von 1800-1000 cm ⁻¹	50
Tabelle 5: Bestimmung der Generationszeit der VSMC.....	52
Tabelle 6: Berechnete Korrelationskoeffizienten zwischen den Spektren der Einzelmessungen und den jeweiligen Mittelwert-Spektren der Zellen nach 24h Inkubation in einer 6-Well-Platte.....	53
Tabelle 7: Berechnete Korrelationskoeffizienten zwischen den Spektren der Einzelmessungen und dem Mittelwert-Spektrum der resuspendierten Lyophilisate in 10 µL dest. Wasser.....	65

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn ao. Univ. Prof. Dr. Saukel und Frau Univ.-Prof. Dr. Dirsch für die Möglichkeit einer so spannenden und vielseitigen Diplomarbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Ramin Nikzad, MSc. für seine kontinuierliche Unterstützung und Motivation während den praktischen Arbeiten und für die statistischen Analysen der Spektren.

Auch bei Yuangfang Li möchte ich mich für seine tolle Unterweisung in die Zellkulturtechniken bedanken.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Alexander Franz Perhal
Anschrift:	Pfeilgasse 4-6/441, 1080 Wien
E-Mail:	alexander.perhal@gmail.com
Geburtsdatum und -ort:	09.09.1991 in Wels, Oberösterreich
Staatsangehörigkeit:	Österreich
Familienstand:	ledig

Akademische Ausbildung

seit Wintersemester 2011	Diplomstudium Pharmazie an der Universität Wien
---------------------------------	---

Präsenzdienst

November 2010 – Juli 2011	Zivildienst bei der Lebenshilfe Oberösterreich
----------------------------------	--

Schulische Ausbildung

2002 - 2010	Naturwissenschaftliches Bundesrealgymnasium Vöcklabruck, Oberösterreich
1998 - 2002	Volksschule Schwanenstadt, Oberösterreich