

Aus dem Department für Anatomie Tübingen
Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik

**Zytotoxische und Enzym-biochemische
Untersuchungen von Pyrrolidinderivaten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Pointner, Benedikt

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Hirt

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Knipper-Breer

Tag der Disputation: 07.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Kurzüberblick	1
1.2 Begriffsdefinitionen	2
1.3 Methoden der Konservierung	3
1.3.1 Trockenkonservierung.....	3
1.3.2 Temperaturreduktion.....	4
1.3.3 Feuchtkonservierung.....	4
1.3.4 Einbetten	6
1.3.5 Imprägnierung mit aushärtenden Substanzen	6
1.4 Historie der Konservierung	7
1.4.1 Antike bis Moderne	7
1.4.2 Moderne bis Gegenwart.....	8
1.4.3 Problematik der Formaldehyd-Fixierung	10
1.5 Anforderungen an Fixierlösungen.....	10
1.6 Pyrrolidinderivate als Substitut für Formaldehyd	11
1.7 Zellkultur	12
1.8 Enzyme	13
1.8.1 Alkalische Phosphatase	13
1.8.2 Matrix-Metalloproteinasen.....	14
1.9 Ziele der Arbeit	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Geräte.....	18
2.2 Verbrauchsartikel.....	20
2.3 Chemikalien und Lösungen	21
2.3.1 Kommerziell erwerbliche Chemikalien und Lösungen	21
2.3.2 Angesetzte Lösungen	23
2.4 Definition der Pyrrolidinderivate.....	23
2.5 „Assays“	24
2.5.1 Zytotoxizitäts-Assay	24
2.5.2 Alkalische Phosphatase-Assay	26
2.5.3 WST-1-Assay	28
2.5.4 FRET-basierter Endopeptidase-Assay.....	30
2.6 Immunzytochemie.....	33
2.7 Zellkultur	35
2.7.1 Kultivieren	35
2.7.2 Passagieren und Aussäen	35
2.7.3 Kryokonservierung und Auftauen.....	36
2.7.4 Enzym-Anreicherung in Saos-2-Überständen.....	37
2.8. Mikroskopie.....	38
2.9 Analyse und Statistik	38
3 Ergebnisse	40
3.1 Wachstumskurve	40
3.1.1 WST-1-Wachstumskurve	40

3.1.2 DAPI-Färbungen	41
3.1.3 Immunfluoreszenz-Färbungen	44
3.1.4 ALP-Sekretionskurve	47
3.2 Löslichkeitsanalysen	48
3.2.1 Ablauf der Verdünnungsschritte	49
3.2.2 Löslichkeitsbilder	49
3.2.3 Auswertung der Löslichkeitsanalysen	50
3.3 Toxizitätstests	52
3.3.1 Visualisierung der Zell-Toxizität durch Pyrrolidinderivate	52
3.3.2 DMSO-Toxizitätstest	53
3.3.3 PD-KL-Toxizitätstests	54
3.3.4 PD-M-Toxizitätstests	58
3.3.5 PD-K-Toxizitätstests	64
3.3.6 PD-L-Toxizitätstest	65
3.3.7 PD-M-A-Toxizitätstest	66
3.4 Enzym-Inhibition	67
3.4.1 Alkalische Phosphatase-Inhibition	68
3.4.2 Kollagenase-Inhibition	68
3.4.4 Überstand-Inhibition	69
4 Diskussion	71
4.1 Biosicherheit und Arbeitsschutz	71
4.2 Toxizitätstests	74
4.2.1 Bedeutung von Zytotoxizitätstests	74
4.2.2 Kritische Betrachtung des WST-1-Assays	77
4.2.3 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse der Toxizitätstests	79
4.3 Bestätigung der Enzym-inhibitorischen Wirkung	81
4.4 Vorteile von Pyrrolidinderivaten gegenüber Formaldehyd	82
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick	85
5 Zusammenfassung	87
6 Literaturverzeichnis	89
7 Erklärung zum Eigenanteil	98

Abkürzungsverzeichnis

ADBAC	Benzalkoniumchlorid
AGW	Arbeitsplatzgrenzwert
ALP	alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dest.	destilliert
DMEM	DMEM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EN	Europäische Norm
et al.	et alii
EU	Europäische Union
FCS	Fetal Calf Serum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
<i>g</i>	G-Kraft
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
IARC	International Agency for Research on Cancer
l	Liter
m	Meter (oder milli)
Mca	7-Methoxycoumarin-4-acetic
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloprotease(n)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MT1	Membran-Typ-1
MW	Medienwechsel / Mittelwert
n	nano
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NMWL	nominal molecular weight limit
Nr.	Nummer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Pyrrolidinderivat(e)
PD-K	Gemisch aus PD mit kurzkettigen Alkylresten
PD-KL	Gemisch aus PD mit kurzkettigen und langkettigen Alkylresten
PD-L	Gemisch aus PD mit langkettigen Alkylresten
PD-M	PD mit definiertem Alkylrest mittlerer Kettenlänge
PD-M-A	Pyrrolidinderivat mit Alkylrest mittlerer Kettenlänge und modifizierter Amingruppe

PEX	Hemopexin-ähnliche Domain
pH	potentia hydrogenii
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
pNPh	p-Nitrophenol
RFU	Relative Fluorescence Units
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Saos	Sarcoma osteogenic
STD	Standardabweichung
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TIMP	Tissue-Inhibitor of Metallo-Proteinase
v/v	Volumenprozent
v. Chr.	vor Christus
WS	Working Solution
WST	water soluble tetrazolium
ZKM	Zellkulturmedium
μ	micro
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Kurzüberblick

Die Konservierung von biologischen Präparaten stellt in der Anatomie eine Aufgabe von elementarer Bedeutung dar. Das seit über 100 Jahren verwendete Formaldehyd hat sich als Standard-Substanz zur Konservierung von Körperspendern weltweit etabliert (Bedino 2003). Jedoch ist Formaldehyd nicht nur aufgrund seiner bekannten toxischen Eigenschaften (siehe 4.1), sondern vielmehr wegen seiner Einstufung als humankanzerogen und keimzellschädigend (Verordnung (EU) Nr. 2015/491 2015) derzeit einer kritischen Betrachtung ausgesetzt. Für anatomische Institute entstand eine relevante Problematik dadurch, dass die „Maximale Arbeitsplatz-Konzentration“ für Formaldehyd seit Februar 2015 gesenkt wurde (Technische Regel für Gefahrstoffe: Arbeitsplatzgrenzwerte (TRGS 900) 2019) und dessen Verwendung in den nächsten Jahren noch stärker eingeschränkt beziehungsweise verboten werden könnte. Bereits die Umsetzung der neuen AGW bereitet anatomischen Instituten derart Schwierigkeiten, dass manche schon geschlossen werden mussten oder von der Schließung bedroht sind (Thullner *et al.* 2016).

Aus diesen Gründen besteht im Hinblick auf den Arbeitsschutz ein großer Bedarf an einer neuen Substanz für die anatomische Konservierung, um die Konzentration von Formaldehyd zu reduzieren oder es gar zu substituieren.

Am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen wird aktuell ein neues, vielversprechendes Verfahren zur Konservierung von Körperspendern unter Verwendung von Pyrrolidinderivaten erforscht. Die fixierende Wirkung dieser Stoffgruppe konnte durch erste Experimente unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt und an makroskopischen Präparaten erfolgreich getestet werden.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden biotoxische und enzymkinetische Eigenschaften von ausgewählten Pyrrolidinderivaten am Saos-2-Zellkulturmodell mit Hilfe von Toxizitäts- und Enzyminhibitionstests untersucht.

Dadurch sollen aussagekräftige Informationen in Bezug auf Biosicherheit und Arbeitsschutz von Pyrrolidinderivaten generiert werden, um die sichere Anwendung als Formaldehyd-Substitut in der Anatomie zu bewerten.

1.2 Begriffsdefinitionen

Bei der Konservierung (lateinisch *conservare*: erhalten) spricht man von „Maßnahmen, die verderbliche anorganische oder organische (...) Stoffe in ihrem natürlichen Zustand erhalten und damit vor einer Zersetzung durch physikalische, chemische und biologische Einflüsse bewahren sollen“ (Hopp 2018). Im englischen Sprachraum wird eher der Begriff „*preservation*“ synonym verwendet (Brenner 2014).

Der Ausdruck „Fixierung“ (lateinisch *figere*: anheften) beschreibt „verschiedene Methoden zur Konservierung und Strukturverfestigung von Geweben und Organen in möglichst natürlichem Zustand“ (Pschyrembel Online (a) 2018). Laut *Owen und Steedman (1956)* dient die Fixierung dazu, Elemente unlöslich zu machen und sie vor weiterer Veränderung zu bewahren. Das Ziel der Konservierung hingegen sei es, diesen Zustand zu erhalten.

Es ist festzustellen, dass die beiden Begriffe Konservierung und Fixierung je nach Autor unterschiedlich definiert werden. Eine allgemeingültige Festlegung der Begriffe ist daher nicht konsequent möglich. Zur Vereinfachung werden die beiden Ausdrücke daher bei dieser Arbeit als Synonym verwendet.

Wenn die Leichenkonservierung durch einen künstlichen Prozess herbeigeführt wird, spricht man von Einbalsamierung (englisch: „*embalming*“) (Batra *et al.* 2010). Soll der Zustand für eine lange Zeit aufrechterhalten werden, wird der Begriff Mumifizierung verwendet. Mumifikation hingegen beschreibt einen natürlich ablaufenden Prozess (Pschyrembel Online (b) 2016). Nach der

Mumifizierung oder der Mumifikation werden die entsprechenden Objekte als „Mumien“ bezeichnet.

Im deutschen Sprachraum gestaltet sich die Abgrenzung der Begriffe „Einbalsamierung“, „Mumifizierung“ und „Mumifikation“ voneinander als schwierig, da sie häufig als Synonym eingesetzt werden.

Beim postmortalen Zerfall spielen im Wesentlichen drei Prozesse eine Rolle: Autolyse, Verwesung und Fäulnis. Durch einen Mangel an Sauerstoff im toten Körper sistiert der aerobe Metabolismus und es werden hydrolytische Enzyme aus den Lysosomen freigesetzt. Dadurch kommt es zum Abbau von Zellen durch enzymatische Selbstverdauung (=Autolyse) (Evans 1963).

Die Verwesung wird durch Enzyme von saprotrophen Organismen (hauptsächlich Bakterien und Pilze) vermittelt. Dabei findet in Anwesenheit von Sauerstoff aus der Umgebung ein postmortaler Zerfall von komplexen organischen Verbindungen vor allem durch Oxidation und Nitrifikation statt (Pschyrembel Redaktion (c) 2016). Geschehen die Verfallsprozesse unter Sauerstoffabschluss, kommt es zur Fäulnis, die oft mit übelriechenden Produkten wie zum Beispiel Schwefelwasserstoff und Buttersäure einhergeht (Mayer 2011).

1.3 Methoden der Konservierung

Im Laufe der Geschichte wurde eine Vielzahl von Möglichkeiten entwickelt, um Leichname zu konservieren. Im nächsten Abschnitt werden die für die Anatomie relevantesten Methoden aufgeführt.

1.3.1 Trockenkonservierung

Dem Präparat Flüssigkeit durch Trocknen (Exsikkation) zu entziehen, stellt eine sehr simple Methode der Konservierung da. Während dies bei der Mumifikation ein ganz natürlich herbeigeführter Prozess ist, kann der Vorgang durch den Zusatz von natürlichen oder chemischen Stoffen unterstützt werden. Die

Dehydratisierung durch den Einsatz von Salzen ist beispielsweise ein sehr altes Verfahren.

Es lassen sich folgende aktive Formen der Trockenkonservierung unterscheiden: Mumifikation beziehungsweise Einbalsamierung (siehe oben) und Gefriertrocknung (Mayer 2011).

Bei der Gefriertrocknung (Lyophilisation) findet ein Prozess in mehreren Schritten statt. Zuerst wird das Objekt eingefroren. Dann folgt die Primärtrocknung (Sublimation), gefolgt von der Sekundärtrocknung, bei der durch Erwärmen stärker gebundenes Wasser herausgelöst wird. Obwohl dies eine sehr schnelle und kostengünstige Methode darstellt, sind die Gewebe derart stark ausgehärtet, dass sie in ihrer Form nicht mehr verändert werden können (Pikal *et al.* 1983).

1.3.2 Temperaturreduktion

Durch die Einwirkung von Kälte werden Um- und Abbauprozesse im Gewebe vermindert beziehungsweise eingestellt. Daher können unfixierte Leichen durch Gefrierung konserviert werden, ohne dass sonstige Prozesse notwendig sind („fresh-frozen cadavers“). Um die Präparate verwenden zu können, müssen sie zuerst aufgetaut werden, was zu einem vermehrt einsetzenden Zerfall des biologischen Materials führt (Guimaraes da Silva *et al.* 2004). Obwohl die Präparate nach der Verwendung wieder eingefroren werden können, ist die Anzahl der Gefrier-Auftau-Zyklen, und daher die Langzeit-Konservierung sehr begrenzt. Des Weiteren geht von ihnen eine signifikante Infektionsgefahr aus (Anderson 2006).

1.3.3 Feuchtkonservierung

Die wohl am häufigsten verwendete Technik in der Anatomie ist die Feuchtkonservierung. Die dabei verwendeten Lösungen und deren Inhaltsstoffe können angelehnt an Mayer (2011) in folgende funktionelle chemische Gruppen eingeteilt werden:

- Konservierungsstoffe (englisch: „preservatives“)
Dies sind Chemikalien, die den postmortalen Zerfall vermindern (Autolyse und Verwesung). Beispiele sind: Formaldehyd, Phenol, Salze und Ethanol (Mayer 2011)
- Desinfektionsmittel (englisch: „germicides“, „disinfectants“)
Desinfizierende Wirkstoffe töten Mikroorganismen ab wie zum Beispiel quartäre Ammoniumverbindungen (Benzalkoniumchlorid) und Alkohole (Mayer 2011, Brenner 2014).
- Modifizierungsstoffe (englisch: „modifying agents“):
 - Puffer dienen zur pH-Wert-Einstellung (zum Beispiel Borax, Natrium-Phosphat, Zitrat).
 - Antikoagulantien erhalten die postmortale Viskosität des Blutes (zum Beispiel Zitrat, Oxalat, EDTA).
 - Tenside (englisch: „surfactants“) setzen die Oberflächen- und Grenzspannung herab. Dadurch wird die Diffusion des Fixierungstoffes verbessert (zum Beispiel Sulfonat).
 - Befeuchtungsmittel (englisch: „humectants“) dienen zur Hydratisierung des Gewebes (zum Beispiel Glycerin, Sorbitol) (Mayer 2011, Brenner 2014).
- Farbstoffe (englisch: „dyes“)
Durch den Einsatz von Farbstoffen können bestimmte Gewebe gefärbt werden, um beispielsweise natürliche Farben wiederherzustellen (Mayer 2011).
- Parfümierende Stoffe (englisch: „perfuming agents“)
Sie reduzieren strenge Gerüche und sorgen für ein angenehm riechendes Arbeitsumfeld. Beispiele sind: Benzaldehyd, Öle und Salicylsäuremethylester (Mayer 2011).
- Lösungsmittel (englisch: „diluent“)
 - Lösungsmittel (zum Beispiel Wasser und Alkohole) dienen dazu, unlösliche Inhaltsstoffe von Fixierungsmitteln in Lösung zu bringen beziehungsweise zu halten (Batra *et al.* 2010) (Brenner 2014).

1.3.4 Einbetten

Für die dauerhafte Herstellung von sowohl mikroskopischen als auch makroskopischen Präparaten kann das so genannte „Einbetten“ oder „Einschließen“ verwendet werden. Dazu wird das Präparat in eine möglichst durchsichtige Substanz gegeben (zum Beispiel Paraffin, Kunstharz, Celloidin) und von dieser Masse unter Luftabschluss komplett umschlossen. Nach dieser Prozedur sind die Präparate theoretisch unbegrenzt haltbar, stabil und können (bei entsprechender Größe) bedenkenlos in die Hand genommen werden. Jedoch verbleiben die eingebetteten Gewebe in ihrem Zustand und können weder weiter präpariert, noch realistisch palpiert werden (Steinmann 1982). Ein Beispiel für eine natürliche Form dieser Konservierungsmethode sind Bernstein-Einschlüsse. Dabei handelt es sich um Funde von kleinen Organismen (zum Beispiel Insekten), aber auch Teilen von Dinosauriern, die Millionen von Jahren überdauerten, indem sie von Bernstein umschlossen wurden (Xing *et al.* 2016).

1.3.5 Imprägnierung mit aushärtenden Substanzen

Bei der Plastination werden Gewebe im Vorab fixiert, entwässert und entfettet. Der eigentliche Plastinationsvorgang besteht aus der Imprägnierung mit Kunststoff (Polymere wie zum Beispiel Silikone, Epoxidharze, Polyesterharze), der während der Phase der Aushärtung in einen festen Aggregatzustand übergeht. Bei dem Vorgang kommt es größtenteils zu Austauschprozessen (von Hagens 1979).

Ein Vorteil der Plastination ist, dass man anschauliche und stabile Präparate herstellen kann, die dreidimensional und von allen Seiten betrachtet werden können. Eine unkomplizierte Lagerung und lange Haltbarkeit sind ebenso gegeben. Allerdings ist die Plastination für die anatomische Lehre nur bedingt geeignet, da (wie beim Einbetten) nachträgliche Präparierschritte kaum noch möglich sind und die Konsistenz der Gewebe stark verändert ist. Dieses Verfahren bietet sich folglich für den klassischen Präparierkurs nicht an (Riederer 2014).

Weitere Substanzen, die zur Imprägnierung herangezogen werden sind zum Beispiel Polyethylenglycol und Paraffin (Mayer 2011).

1.4 Historie der Konservierung

1.4.1 Antike bis Moderne

Die Geschichte der Konservierung von menschlichen Leichnamen kann bis mehrere Jahrtausende v. Chr. zurückverfolgt werden. Das älteste beschriebene Beispiel einer künstlich herbeigeführten Form der Konservierung, der Mumifizierung, bezieht sich auf Funde in Bestattungsstätten der so genannten Chinchorro-Kultur an der südamerikanischen Westküste. Diese werden auf 8000 bis 7000 v. Chr. datiert (Marquet *et al.* 2012). Besser bekannt ist uns die Mumifizierung aus dem alten Ägypten, deren Beginn bis zur ersten Dynastie (3200 v. Chr.) zurückzuführen ist. Zu dieser Zeit wurde der Prozess aus rein religiösen Gründen durchgeführt, denn in diversen antiken Kulturen wurde ewiges Leben mit einer intakten Körperhülle assoziiert (Brenner 2014). Von den Ägyptern ist bekannt, dass sie bei der Mumifizierung sowohl diverse Organe dem Körper entnahmen (Exenteration) als auch verschiedene Naturstoffe benutzten wie zum Beispiel Natron, pflanzliche Öle und Harze, um den Leichnam länger haltbar zu machen (Mayer 2011).

Von den antiken Kulturen breiteten sich die verschiedenen Techniken der Mumifizierung nach Europa aus, wo sie sich während des Mittelalters kaum veränderten. Die dabei verwendeten Chemikalien waren im Wesentlichen vergleichbar. Die Beweggründe, Verstorbene zu fixieren, sowie die daraus resultierenden Änderungen im Prozedere waren jedoch verschieden.

Erst im Zeitalter der Renaissance änderten sich die Methoden der Konservierung signifikant, da sich im Zuge der sich schnell entwickelnden Naturwissenschaften ein reges Interesse nach besseren Möglichkeiten zum Studium der Anatomie entwickelte (Ezugworie J 2009). Ein wichtiger Schritt war dabei die Injektion von Fixier-Lösungen in das Gefäßsystem des Körpers. Leonardo da Vinci (1452-1519) beispielsweise war einer der Ersten, der dies beschrieb (Brenner 2014).

Im 18. Jahrhundert waren Wissenschaftler wie der Brite William Hunter (1718-1783) dann in der Lage, mit ihren Fixierlösungen sämtliche Körperteile zu erreichen. Für die Injektion wurden verschiedene Öle zum Beispiel aus Kamille oder Lavendel, aber auch Alkohol verwendet (Brenner 2014).

1.4.2 Moderne bis Gegenwart

Zu einem Durchbruch bei der Fixierung von Leichnamen kam es 1869 mit dem Entdecken von Formaldehyd (Methanal) als Konservierungsmethode durch August Wilhelm von Hofmann (Binawara B 2010). Die wässrige Lösung von Formaldehyd wird Formalin genannt. Viele weitere Fixanzen, die in den folgenden Jahrzehnten entstanden, basierten auf Formaldehyd, wie zum Beispiel die Lösungen nach *Jores (1913)* oder *Kaiserling (1922)*. Formaldehyd ist jedoch wie viele andere zur Fixierung verwendeten Substanzen toxisch und karzinogen (Thullner *et al.* 2016)

Um die Formaldehydkonzentration für Anwender von Präparaten zu verringern, wurde eine neue Methode von *Frolich et al. (1984)* entwickelt. Sie verringerten die Konzentration von Formaldehyd im Präparationssaal, indem sie Formaldehyd-fixierte Präparate nachträglich in einer Lösung aus Phenoxyethanol drei Monate lang lagerten. Nachdem mehrere Fälle veröffentlicht wurden, bei denen sich eine neurotoxische Wirkung von Phenoxyethanol zeigte (Morton 1990), wird diese Methode nur noch eingeschränkt eingesetzt. Am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik in Tübingen wird für den Kurs der makroskopischen Anatomie derzeit unter anderem eine Modifikation der Formaldehydlösung nach *Tutsch (1975)* verwendet.

In der Mitte des 19. Jahrhunderts wurde Phenol als weitere Fixierungslösung von *Laskowski (1886)* eingeführt. Obwohl es lokal als auch systemisch sehr toxisch ist und eine reizende auf Schleimhäute, Haut und Augen hat (Bedino 1994), wird es heute immer noch an einigen Instituten verwendet (Bedino 2005).

Nicht unerwähnt soll die Fixierung nach Thiel bleiben. Obwohl der erste Artikel von Thiel erst 1992 publiziert wurde (Thiel 1992), ist diese Methode vor allem im deutsch-sprachigen Raum sehr verbreitet (Balta *et al.* 2015). Bei der Thiel-Fixierung werden in Farbe und Form sehr realistisch aussehende Präparate produziert. Außerdem ist die Flexibilität von Gelenken realistischer als bei klassisch Formaldehyd-fixierten Körpern (Benkhadra *et al.* 2011). Jedoch sind in der Fixierlösung nach Thiel Substanzen enthalten, die nach den EU-Gefahrgutklassen als toxisch (Morpholin), gesundheitsschädlich (Borsäure, Ethylenglykol), umweltgefährlich (p-Chlorocresol), korrosiv (p-Chlorocresol, Morpholin) oder hoch entflammbar (Morpholin, Isopropylalkohol) eingestuft werden (EU Chemicals Agency 2019).

Neuere Forschungen konzentrieren sich auf Formaldehyd-freie Fixantien, welche eine möglichst lebensgetreue Konservierung ermöglichen sollen (Balta *et al.* 2015). In diesem Zusammenhang gibt es einige neue Ansätze wie zum Beispiel ein Gemisch aus Ethanol-Glycerin und Thymol publiziert von Hammer *et al.* (2012). Diese Methode ermöglicht es, den Körper mit guter haptischer und optischer Gewebequalität für zwölf Monate zu konservieren, ist aber im Vergleich zu Formaldehyd sehr kostenintensiv (Brenner 2014). Außerdem geht von dieser zum größten Teil aus Alkoholen bestehenden Lösung Explosionsgefahr aus (Hammer *et al.* 2012) und sie ist generell nicht zur Fixierung von Leichnamen zugelassen (siehe 4.1).

Goyri-O'Neill *et al.* publizierten 2013 eine Fixierlösung bestehend aus Mono- und Diethylen-Glykol, welche aber bei Hautproben einen Monat nach der Fixierung keine vollständig überzeugenden Ergebnisse lieferte (Goyri-O'Neill *et al.* 2013). Der Vergleich der Fixiermethoden untereinander gestaltet sich generell schwierig, da es keine standardisierten Kriterien gibt, um die Methoden gegenüberzustellen (Balta *et al.* 2015). Außerdem fehlen gerade bei neueren Ansätzen noch wichtige Informationen, zum Beispiel zur Lagerungsdauer der Präparate (Hayashi *et al.* 2016) oder der Eindringtiefe der Lösung in tiefe Gewebsschichten (Goyri-O'Neill *et al.* 2013).

1.4.3 Problematik der Formaldehyd-Fixierung

In der anatomischen Lehre hat sich Formaldehyd als Fixiermittel der Wahl durchgesetzt (Bedino 2003). Es wird weltweit in 87% der anatomischen Institute verwendet (Benkhadra *et al.* 2011). Seine wichtigste Funktionsweise besteht im Quervernetzen von Proteinen (Fraenkel-Conrat und Olcott 1948). Es werden dabei Methylenbrücken und Brücken per Schiff'sche Basen ausgebildet. Dies wirkt antimikrobiell und verlangsamt den Verwesungsprozess (Mason und O'Leary 1991). Allerdings gibt es auch Nachteile. Das fixierte Gewebe ist sehr starr, Haut und Organe weisen ein unrealistisches Aussehen auf und bei Hautkontakt mit den fixierten Präparaten kann es zu Hautausschlägen sowie allergischen Reaktionen kommen (Hubbell *et al.* 2002). Formaldehyd wurde darüber hinaus von der „International Agency for Research on Cancer“ im Jahr 2004 als potentiell „humankanzerogen“ deklariert. Seit 2016 wird Formaldehyd europaweit offiziell als krebserzeugend (Gefahrenklasse 1B) eingestuft (Verordnung (EU) Nr. 2015/491 2015). In diesem Zuge wurden weltweit strengere Arbeitsplatzgrenzwerte (AGW) festgelegt (Kim *et al.* 2011). Der in Deutschland seit dem 1.1.2016 gültige maximale AGW ist $0,37 \text{ mg/m}^3$ (Technische Regel für Gefahrstoffe: Arbeitsplatzgrenzwerte (TRGS 900) 2019). Als direkte Folge dieser neuen Regelung können einige anatomische Institute in Deutschland wie zum Beispiel in Frankfurt den Präparierkurs für Medizinstudenten nicht mehr durchführen (Waschke 2016).

1.5 Anforderungen an Fixierlösungen

Der folgende Textabschnitt beschäftigt sich mit den Eigenschaften, die eine ideale Fixierlösung aufweisen sollte und wurde aus den folgenden Publikationen zusammengefasst:

Coleman (1992), Goyri-O'Neill *et al.* (2013), Balta *et al.* (2015), Shoja *et al.* (2013), Owen und Steedman (1956)

- Das Fixanz soll gute Diffusionseigenschaften in sämtlichen Geweben besitzen.
- Organe und Gewebe sollen sich für lange Zeit ohne Schrumpfung und Verzerrungen erhalten lassen.
- Die fixierenden Substanzen sollen sich ohne Ausfällen von Gewebsbestandteilen oder der Substanz selbst in wässrigen Medien gut lösen lassen.
- Die natürlichen Farben der unterschiedlichen Gewebe sollen erhalten bleiben.
- Die Flexibilität der Gelenke, sowie die Dehnbarkeit der Lunge sollen nach der Fixierung noch gegeben sein.
- Austrocknen der Gewebe soll verhindert werden.
- Infektionsgefahr soll durch Abtöten sämtlicher vom Leichnam ausgehenden Pathogene (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) ausgeschlossen werden.
- Ebenso soll eine Reduktion der von der Fixierlösung ausgehenden gesundheitsschädlichen Einflüsse stattfinden.
- Die Geruchsbelästigung soll möglichst geringgehalten werden.
- Die Fixierlösung soll eine Unempfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen aufweisen.
- Die Lagerung der Substanz soll einfach und unkompliziert sein. Dies bedeutet zum Beispiel geringe Entflammbarkeit oder Explosionsgefahr und keine umwelttoxischen Effekte.
- Sowohl die Herstellung als auch der Prozess der Fixierung sollen unkompliziert und kostengünstig sein.

1.6 Pyrrolidinderivate als Substitut für Formaldehyd

Um eine adäquate Alternative zu Formaldehyd zu finden, werden am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen Pyrrolidinderivate als neue Fixiermethode erforscht. Eine Fragestellung der Untersuchungen ist,

inwieweit die bei der Fixierung eingesetzte Konzentration von Formaldehyd deutlich verringern oder Formaldehyd als Fixiermittel komplett ersetzt werden kann.

Im Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik in Tübingen werden Pyrrolidin-fixierte Leichname bereits bei diversen Weiterbildungskursen für Chirurgen und bei der „Sectio chirurgica“ erfolgreich eingesetzt (Hirt *et al.* 2010). Bei der „Sectio chirurgica“ handelt es sich um eine Online-Lehrveranstaltung, bei der „live“ operative Eingriffe am anatomischen Präparat durch erfahrene Chirurgen durchgeführt und mit Hilfe von anatomischen und radiologischen Demonstrationen ergänzt werden (siehe hierzu auch: www.sectio-chirurgica.de). Im Rahmen dieser Anwendungen berichten die teilnehmenden Ärzte über ein natürliches Aussehen und eine realistische Haptik der mit Pyrrolidin fixierten Körperspender.

Der fixierende Effekt von Pyrrolidinderivaten konnte mit Enzym-Assays bestätigt werden, die eine umfassende Blockierung der Enzymaktivität durch Pyrrolidinderivate zeigten (Manuskript in Vorbereitung). Es wird daher vermutet, dass Pyrrolidinderivate in Bezug auf ihre Eigenschaften als Fixanz den Verwesungsprozess verhindern, indem sie die dafür notwendigen Enzyme der Autolyse und die Enzyme von Mikroorganismen inhibieren.

Zur Untersuchung weiterer Eigenschaften von Pyrrolidinderivaten wurden im Rahmen dieser Arbeit Toxizitäts- und Enzyminhibitionstests in Zellkulturen durchgeführt. Dadurch können Toxizitätsgrenzen ermittelt und weitere Erkenntnisse zur Wirkungsweise von Pyrrolidinderivaten gewonnen werden.

1.7 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden Saos-2-Zellen als Zellkulturmodell verwendet. Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie standardisiert sehr häufig verwendet wird und ihre Eigenschaften in Bezug auf die Sezernierung von Enzymen wie zum Beispiel alkalische Phosphatase bereits weitgehend erforscht sind (Fogh *et al.* 1977,

Ayobian-Markazi *et al.* 2012). Darüber hinaus besitzt unsere Arbeitsgruppe große Erfahrung und Expertise mit dem Saos-2-Zellkulturmodell (Schmidt *et al.* 2011). Die Saos-2-Zelllinie geht aus einem Osteosarkom hervor, das 1973 bei einem kaukasischen Mädchen diagnostiziert und isoliert wurde (Fogh *et al.* 1977). Das Osteosarkom ist der am häufigsten vorkommende primäre maligne Knochentumor (Su *et al.* 2009). Wie für maligne Tumorzellen typisch, besitzen diese häufig die Eigenschaften des Ausgangsgewebes. Die Zellen des Osteosarkoms sind deshalb in der Lage, Knochen und Osteoide zu produzieren. Saos-2-Zellen eignen sich besonders für die Zellkultur, da sie sich als immortalisierte Zelllinie potentiell unbegrenzt vervielfältigen lassen. Wie oben beschrieben, weisen Saos-2-Zellen aufgrund ihrer Abstammung von Osteosarkom-Zellen viele Eigenschaften auf, die ebenso für humane Osteoblasten charakteristisch sind wie zum Beispiel die Sekretion von alkalischer Phosphatase (Rodan *et al.* 1987) und verschiedenen Metalloproteasen (Rifas *et al.* 1994).

1.8 Enzyme

Bei dieser Arbeit wurden Untersuchungen der inhibitorischen Eigenschaften von Pyrrolidinderivaten in Bezug auf die enzymatische Aktivität von alkalischer Phosphatase und Metalloproteasen durchgeführt. Im nächsten Abschnitt werden diese Enzyme näher vorgestellt.

1.8.1 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase (ALP) katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern (=Dephosphorylierung) bei einer Vielzahl von Molekülen wie zum Beispiel Nukleotiden, Proteinen und Alkaloiden. Sie arbeitet dabei im alkalischen Milieu mit einem pH-Optimum von 9,8. Um ALP *in vitro* nachzuweisen, ist deshalb das Vorhandensein eines geeigneten Puffers notwendig (Coleman 1992). Für seine

katalytische Aktivität benötigt die ALP Magnesium- und Zinkionen als Kofaktoren (Roig *et al.* 1982).

Beim Menschen sind bisher 15 Isoenzyme bekannt (Le Du und Millan 2002). Von diesen werden vier Isoenzyme aufgrund ihrer unterschiedlichen Gene voneinander abgegrenzt (Dünndarm-ALP, Plazenta-ALP, Keimblatt-ALP und Gewebe-unspezifische-ALP). Die weiteren Isoenzyme sind Abkömmlinge der Gewebe-unspezifischen-ALP und werden je nach Gewebe, in dem Sie vorkommen, unterschiedlich glykosyliert (zum Beispiel Knochen-ALP und Leber-ALP) (Le Du und Millan 2002).

Die aus dem Knochen stammende skelettale ALP (oder auch Knochen-ALP) wird sowohl von humanen Osteoblasten (Masuhara *et al.* 1987) als auch von Osteosarkom-Zellen (wie zum Beispiel der Saos-2-Zelllinie) gebildet (Rodan *et al.* 1987).

Die genaue Funktion der skelettalen ALP ist zwar noch unklar, aber ihr Nachweis im Serum ist ein hochspezifischer Marker für die Osteoblastenaktivität (Masrouf Roudsari und Mahjoub 2012).

Generell ist die ALP ein sehr widerstandsfähiges Enzym, was sich darin zeigt, dass sie strukturell intakt und funktionell aktiv aus einer 4000 Jahre alten ägyptischen Mumie isoliert werden konnte (Weser *et al.* 1995).

1.8.2 Matrix-Metalloproteinasen

Die Familie der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) besteht aus ungefähr 23 strukturell ähnlichen und Zink-abhängigen Endopeptidasen (EC III) (Bauvois 2012). Abbildung 1 zeigt den grundlegenden Aufbau sämtlicher Vertreter:

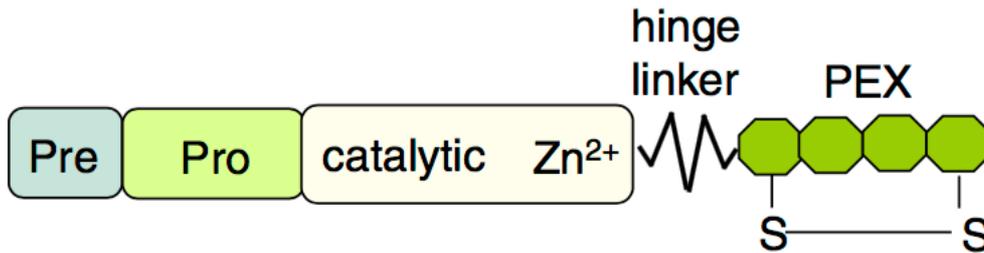


Abbildung 1: Systematischer Aufbau einer Metalloproteinase (Bauvois 2012). Pre: Signalpeptid, Pro: Pro-Form, PEX: Hemopexin-ähnliche Domain.

Um zur Prozessierung in das endoplasmatische Retikulum zu gelangen, wird ein Signalpeptid („Pre“) benötigt. Bevor die Metalloproteinase jedoch von der Pro-Form in ihren aktiven Zustand übergehen kann, muss sie zuerst aktiviert werden. Dafür wird ein Komplex aus der Membran-Typ-1-MMP (= MT1-MMP) und dem sogenannten TIMP-2 (tissue inhibitor of MMP-2) benötigt, der zur auto-katalytischen Abspaltung des Pro-Peptids führt. TIMP-2, von Saos-2-Zellen produziert, ist ein spezifischer Inhibitor der MMP-2 (Rifas *et al.* 1994). Die PEX-Domain (HemoPEXin-ähnlich) bindet TIMP's und ist an der Aktivierung des Enzyms beteiligt (Bauvois 2012).

Zu den wesentlichen Aufgaben der MMP gehört zum einen die Zersetzung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix, zum anderen besteht ihre Funktion in der Prozessierung von Signalmolekülen, wobei sie zum Beispiel verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine aktivieren (Bauvois 2012). Die folgende Abbildung 2 bietet einen Überblick über die Funktionen der MMP's:

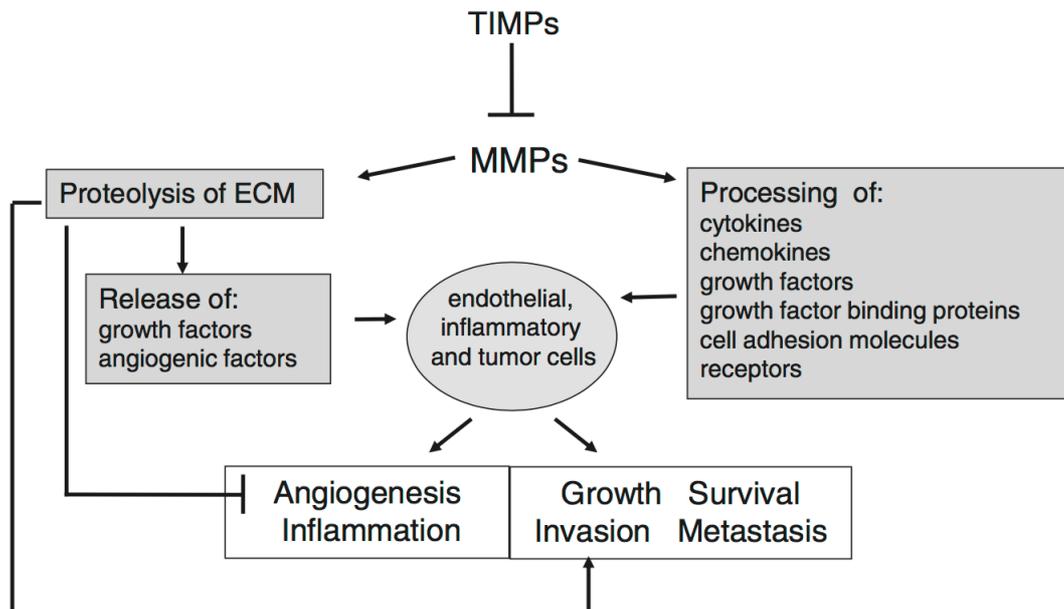


Abbildung 2: Schematische Darstellung über die Funktionen der MMP's bei Tumoren (Bauvois 2012). MMP: Matrix-Metalloproteinase, TIMP: tissue inhibitor of MMP, ECM: extrazelluläre Matrix.

1.9 Ziele der Arbeit

Am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Eberhard Karls Universität Tübingen werden in einer interdisziplinären Arbeitsgruppe aus Biologen, Chemikern und Medizinern unter Leitung von Prof. Dr. Bernhard Hirt und Prof. Dr. Lothar Just Pyrrolidinderivate als Ersatzstoffe für Formaldehyd bei der Konservierung von Leichnamen entwickelt und erforscht. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Wirkungsweise von Pyrrolidinderivaten unter anderem in der Inhibition von Enzymen besteht (Manuskript in Vorbereitung).

Um mehr Informationen bezüglich Biosicherheit und Arbeitsschutz zu bekommen, werden bei dieser Arbeit enzymkinetische und biotoxische Tests an der Zelllinie Saos-2 durchgeführt.

Als erstes wurde die Wirkungsweise von Pyrrolidinderivaten auf Saos-2-Zellen untersucht, wobei Proliferationsanalysen und immunhistochemischen Färbungen durchgeführt wurden. Zudem wurde die Löslichkeit der verwendeten Pyrrolidinderivate analysiert.

Im Anschluss wurden Untersuchungen zur Bestimmung der Toxizitätsgrenze von Pyrrolidinderivaten durchgeführt und Konzentrationen ermittelt, bei denen die Aktivität von ausgewählten Enzymen durch die Behandlung mit Pyrrolidinderivaten blockiert wird.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Geräte sind in der Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1: verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
Environmental-Incubator „ES-20“	Biosan, Riga, Lettland
Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader „SPECTRAFluor“	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Fluoreszenz-Quelle „Illuminator HXP 120 C“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Freezing container „Mr. Frosty“	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Inkubator „HeraCell 150(i)“	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kamera „AxioCam HR R3“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroplatten-Reader „Diareader“	Dialab GmbH, Sasbach a. K.
Mikroskop „Axiovert 25“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop „Observer.Z1“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Objektiv „A-Plan 5x/0,12 Ph0“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Objektiv „CP Achromat 10x/0,25 Ph1“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Objektiv „EC Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph1“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Objektiv „EC Plan-Neofluar 5x/0.16 M27“	Carl Zeiss AG, Oberkochen

Objektiv „LD A-Plan 20x/0,30 Ph1“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Objektiv „LD A-Plan 40x/0,50 Ph2“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Objektiv „LD Plan-Neofluar 20x/0,4 Korr Ph 2 M27“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Okular „E-PI 10x/20“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
pH-Messgerät „inoLab pH Level 1“	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Pipetten (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 1000-1000 µl)	Starlab GmbH, Hamburg
Pipettiergerät „pipetus 100-240 Volt“	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Reagenzglasschüttler „Vortex Genie 2“	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Reflektor „Analy. DIC Trans.light“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Reflektor „38 HE Green Fluorescent Prot“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Reflektor „43 HE DsRed“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Reflektor „49 DAPI“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Ringblende „Ph0-0,4/Ph1-0,4“	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Schüttler „Shaker DOS-10L“	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Schüttler „Shaker DRS-12“	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Sicherheitswerkbank „Safe 2020“	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waage „M-power“	Sartorius AG, Göttingen
Wärmeplatte „MR 3001“	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach

Thermoschüttler pro	CellMedia, GmbH & Co. KG, Elsteraue
Zentrifuge „Rotina 380R“	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen

2.2 Verbrauchsartikel

Folgende Verbrauchsartikel wurden verwendet (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: verwendete Verbrauchsartikel.

Verbrauchsartikel	Hersteller
Falcon Pipettenspitzen	Corning Inc., Corning, USA
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Parafilm	Bemis Company Inc., Neenah, USA
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Hamburg
Spritzenfilter „Millex-GP“	Merck KGaA, Darmstadt
Ultrazentrifugationsfilter „Amicon Ultra-15“ (1x10 ⁴ NMWL)	Merck KGaA, Darmstadt
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
48-Well-Mikrotiterplatten	Corning, Inc., Corning, USA
96-Well-Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
50 ml Spritze	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA

2.3 Chemikalien und Lösungen

Bei dieser Arbeit wurden sowohl kommerziell erwerbliche Chemikalien und Lösungen (siehe Tabelle 3), als auch eigens angesetzte Lösungen (siehe Tabelle 4) verwendet.

2.3.1 Kommerziell erwerbliche Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: verwendete kommerziell erwerbliche Chemikalien und Lösungen.

Kommerziell erworbene Chemikalien und Lösungen	Hersteller
Aqua dest.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Brij L23 Lösung	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Collagenase from Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
DMEM Dulbecco´s Modified Eagle Medium (low glucose)	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz
DMEM (w/o phenol-red)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dulbecco`s PBS	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ethanol, 99 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fetal Calf Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hepes Buffer	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
KI-67-AK	DCS GmbH & Co.KG, Hamburg
L-Glutamin (Stocklösung: 200 mM in NaCl)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natrium-Chlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-dihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml; 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Phalloidin Rhodamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trizma base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypan-Blau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vimentin Clone-V9	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
4-Aminophenylmercuric acetate (APMA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Stocklösung: 1 mg/ml in PBS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.3.2 Angesetzte Lösungen

Tabelle 4: angesetzte Lösungen.

Angesetzte Lösungen	Inhaltsstoffe (Hersteller siehe 2.3.1)
Ethanol, 70 %	700 ml Ethanol, 99 % Ad 1 l Aqua dest.
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, phosphate buffered saline)	80 g Natrium-Chlorid 2 g Kalium-Chlorid 2,4 g Kalium-dihydrogenphosphat 12 g Natrium-dihydrogenphosphat Ad 10 l Aqua dest. pH: 7,4
Paraformaldehyd, 4 %	40 g Paraformaldehyd 100 ml 10x PBS (siehe oben) Ad 1 l Aqua dest. pH: 7,4
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS, tris buffered saline)	30,3 g Trizma base 81,8 g Natrium-Chlorid Ad 10 l Aqua dest. pH: 7,4
Zellkulturmedium	DMEM + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) L-Glutamin + 1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin

2.4 Definition der Pyrrolidinderivate

Folgende Pyrrolidinderivate wurden bei dieser Arbeit eingesetzt:

PD-KL:

Gemisch aus mehreren Pyrrolidinderivaten mit definierten kurzkettigen und definierten langkettigen Alkylresten

PD-M:

Pyrrolidinderivat mit definiertem Alkylrest mittlerer Kettenlänge

PD-M-A:

Pyrrolidinderivat mit definiertem Alkylrest mittlerer Kettenlänge und modifizierter Amingruppe

PD-L:

Gemisch aus Pyrrolidinderivaten mit definierten langkettigen Alkylresten

PD-K:

Gemisch aus Pyrrolidinderivaten mit definierten kurzkettigen Alkylresten

2.5 „Assays“

2.5.1 Zytotoxizitäts-Assay

Bei den Zytotoxizitäts-Assays wurden Saos-2-Zellen für alle Versuche in identischer Art und Weise verwendet:

- Saos-2-Zellen wurden auf 48-Well-Platten mit einer Konzentration von 2×10^4 Zellen pro cm^2 in Zellkulturmedium ausgesät (300 μl pro Well).
- Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 .
- Nach dieser Zeit wurde der Überstand aus den Wells vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, sodass nur die am Boden der Wells adhärenen Zellen verblieben.

- Zuvor waren die verschiedenen Pyrrolidin-Konzentrationen mit Hilfe von Verdünnungsreihen vorbereitet worden. Diese wurden nun zu je 300 µl in die Wells gegeben und dann für 24 h inkubiert.
- Anschließend wurden je nach Testmodus (siehe unten) die entsprechenden Pyrrolidinkonzentrationen hinzugefügt und für eine definierte Zeit inkubiert. Eine Übersicht über die im Ergebnisteil verwendeten Substanzen, Testmodi und die jeweiligen Einwirkzeiten der getesteten Substanzen ist in Tabelle 5 dargestellt.
- Pro Versuch wurden für jede Konzentration drei Wells (n=3) verwendet.
- Am Ende der Inkubation erfolgte die Bestimmung der Zelltoxizität durch einen WST-1-Assay. Bei der Auswertung wurden die Messergebnisse gemittelt.

Der Testaufbau der Zytotoxizitäts-Assays wurde so angepasst, dass die Versuche nach dem Aussäen der Saos-2-Zellen mit folgenden Testmodi durchgeführt wurden:

- „Langzeit“-Toxizitätstest:
Inkubation für 24 h → Behandlung mit Pyrrolidinderivat (PD) → Inkubation für 72 h (Einwirkzeit) → WST-1-Assay
- „Kurzzeit“-Toxizitätstest:
Inkubation für 24 h → Behandlung mit PD → Inkubation für 1 h (Einwirkzeit) → WST-1-Assay
- „Auswasch“-Toxizitätstest:
Inkubation für 24 h → Behandlung mit PD → Inkubation für 1 h (Einwirkzeit) → „Auswaschen“ → Inkubation für 72 h → WST-1-Assay

„Auswaschen“ bedeutet, dass der Überstand (zusammen mit dem Pyrrolidinderivat) in den Wells abgesaugt und durch neues Zellkulturmedium (je 300 µl) ersetzt wurde.

Tabelle 5: Übersicht der einzelnen Zytotoxizitäts-Assays (siehe 3.3). Testmodi siehe oben (Abschnitt 2.5.1). Testsubstanzen siehe 2.4.

Testsubstanz	Testmodus	Einwirkzeit	Konzentrationsbereich	Abbildung (siehe 3.3)
PD-KL	Langzeit	72 h	0,625 – 40 µg/ml	14
PD-KL	Kurzzeit	1 h	0,625 – 40 µg/ml	15
PD-KL	Auswasch	1 h	0,625 – 40 µg/ml	16
PD-KL	Auswasch	10 min	0,625 – 40 µg/ml	17
PD-M	Langzeit	72 h	0,625 – 40 µg/ml	18
PD-M	Kurzzeit	1 h	0,625 – 40 µg/ml	19
PD-M	Auswasch	1 h	0,625 – 40 µg/ml	20
PD-M	Auswasch	10 min	0,625 – 40 µg/ml	21
PD-M	Auswasch	5 min	33 – 1000 µg/ml	22
PD-M	Auswasch	2 min	33 – 1000 µg/ml	23
PD-K	Langzeit	72 h	0,625 – 40 µg/ml	24
PD-L	Langzeit	72 h	0,625 – 40 µg/ml	25
PD-M-A	Langzeit	72 h	2,5 – 160 µg/ml	26
DMSO	Langzeit	72 h	1:1000 – 1:125	13

Für alle Toxizitätstests dieser Arbeit wird eine Toxizitätsgrenze von 50% des WST-1-Extinktionswerts der Negativkontrolle (maximales WST-1-Signal ohne Belastung durch ein Pyrrolidinderivat) definiert. Dies ist angelehnt an die LD₅₀, welche ein häufig verwendeter Parameter bei der Toxizitätsbestimmung ist (Trevan 1927). Die LD₅₀ ist definiert als die Wirkstoffdosis, bei der 50 % der Versuchsorganismen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes sterben.

2.5.2 Alkalische Phosphatase-Assay

Bei den Versuchen zum Nachweis von Alkalischer Phosphatase im Überstand der Saos-2-Zellen wurde der Test „QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase Assay

Kit“ (BioAssay Systems 2009) verwendet und nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Das Testsystem enthält das Substrat p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP), welches durch die alkalische Phosphatase zu p-Nitrophenol (pNPh) und Phosphat hydrolytisch dephosphoryliert wird (siehe Abbildung 3).

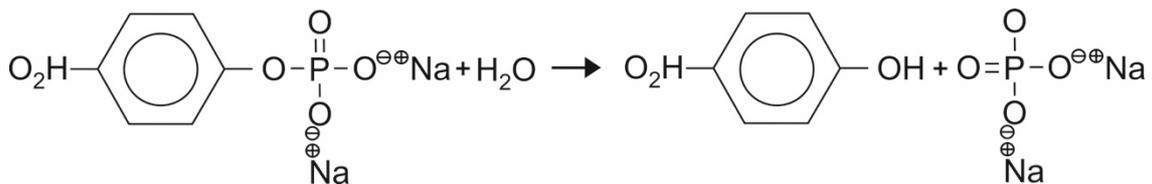


Abbildung 3: Reaktion von pNPP zu pNPh und Phosphat. Zeichnung angelehnt an BioAssay Systems (2009)

Entstandenes p-Nitrophenol führt zu einem gelben Farbumschlag, der mit einem Mikroplatten-Reader (siehe 2.1 Geräte) bei 405 nm bestimmt werden kann.

Wie im Protokoll des Herstellers empfohlen, wurde im Vorab eine Standardkurve mit verschiedenen bekannten Standardkonzentrationen von alkalischer Phosphatase, die im Kit enthalten waren („standard solution“), durchgeführt. Die halb-logarithmisch aufgetragene Standardkurve zeigte einen sehr linearen Verlauf. Dies spricht für eine exakte Durchführung und für die Funktionsfähigkeit des Kits.

Angepasst an die Angaben des Herstellers wurde dann für den Alkalische Phosphatase-Assay folgendes Protokoll verwendet:

- Als erstes wurden 50 µl Zellüberstand der jeweiligen zu untersuchenden Saos-2-Kultur in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert.
- Im Anschluss wurde das Substrat (pNPP = Komponente A des Kits) 1:100 (v/v) mit Assay-Puffer (Komponente B) verdünnt. Dabei wurde beachtet, dass das Arbeiten mit pNPP im abgedunkelten Raum erfolgen muss.
- Danach erfolgte eine 1:1 Verdünnung (v/v) des Substrats mit den Saos-2-Überständen. In jedem Well befanden sich dann insgesamt 100 µl.

- Die Mikrotiterplatte wurde kurz geschwenkt, um die Substanzen gut zu vermischen.
- Dann wurde die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 60 min im Dunkeln inkubiert.
- Beim Vorhandensein von Luftblasen in den Wells wurden diese am Ende der Inkubationszeit mit einer sterilen Nadel entfernt.
- Am Ende wurde die Extinktion mit einem Mikroplatten-Reader bei 405 nm nach 30 min und nach 60 min bestimmt.

2.5.3 WST-1-Assay

Der WST-1-Assay findet Verwendung bei Proliferations- und Toxizitätstests (Riss *et al.* 2004). Eine gesunde Zelle weist einen intakten Citratzyklus auf, der unter anderem das Reduktionsäquivalent NADH/H^+ dem Organismus indirekt zur Energiegewinnung zur Verfügung stellt. Das Vorhandensein von NADH/H^+ bei einer gesunden Zelle bzw. dessen Fehlen bei geschädigten oder toten Zellen macht sich der WST-1-Assay zu Nutze. Das Reagenz WST-1 (water soluble tetrazolium) wird mit Hilfe von NADH/H^+ als Coenzym zu Formazan reduziert (siehe Abbildung 4). Da sowohl WST-1 (hellrot), als auch Formazan (dunkelrot) eine charakteristische Farbe besitzen, kann der durch das Abfließen der Reaktion entstehende Farbumschlag als Extinktion photometrisch mit einem Mikroplatten-Reader bestimmt werden (Berridge *et al.* 2005).

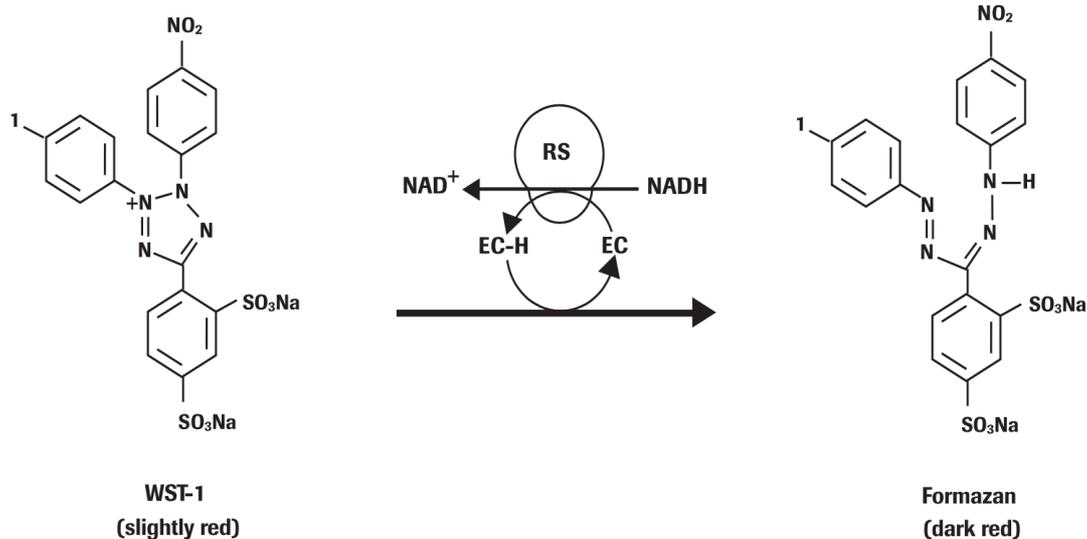


Abbildung 4: Reaktion von WST zu Formazan (Roche Diagnostics GmbH 2011)

Aufgrund des ausbleibenden Farbumschlags kommt es bei toten Zellen folglich zu keinen positiven Messwerten. Im Anschluss werden die entsprechenden Messwerte mit der Positivkontrolle verglichen, wodurch eine Aussage in Bezug auf die Zellzahl gemacht werden kann. Da die Extinktionswerte des WST-1-Assays unter standardisieren Bedingungen mit der Zellzahl sehr stark korrelieren, wird im Folgenden die Zellzahl als Ergebnis des WST-1-Assays angesehen.

In dieser Arbeit wurde der WST-1-Assay dazu verwendet, um die zytotoxische Wirkung der getesteten Pyrrolidinderivate auf in Mikrotiterplatten kultivierten Saos-2-Zellen zu bestimmen. Dazu wurde das Kit „Cell Proliferation Reagent WST-1“ (Roche Diagnostics GmbH 2011) eingesetzt. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde dabei nach dem folgenden Protokoll verfahren:

- Die Überstände der kultivierten Zellen wurden als erstes abgesaugt.
- Dann erfolgte ein Waschvorgang der Zellen mit 300 µl auf 37 °C erwärmtem Zellkulturmedium, um tote nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.
- Das WST-1-Reagenz wurde 1:11 (v/v) mit Zellkulturmedium verdünnt. Dabei wurde beachtet, dass das Arbeiten mit WST-1 im abgedunkelten Raum erfolgen muss.

- 400 µl dieser Lösung wurden in je ein Well einer 48-Well-Mikrotiterplatte pipettiert, in dem sich die zu untersuchenden kultivierten Zellen befinden.
- Zusätzlich wurden 400 µl in ein leeres Well als Leerwert (Blank) gegeben.
- Dann wurde die Mikrotiterplatte bei 37 °C für 60 min inkubiert.
- Beim Vorhandensein von Luftblasen in den Wells wurden diese am Ende der Inkubationszeit mit einer sterilen Nadel entfernt.
- Am Ende wurde die Extinktion mit einem Mikroplatten-Reader bei 450 - 630 nm bestimmt.

2.5.4 FRET-basierter Endopeptidase-Assay

In einer Versuchsreihe wurden Proteasen (zum Beispiel Metalloproteasen), welche sich im Überstand der Saos-2-Zellkulturen befinden, blockiert und durch einen Assay analysiert, der auf dem FRET-Phänomen beruht. Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist ein physikalischer Prozess, bei dem die Energie eines angeregten Farbstoffs (Donor) auf einen anderen Farbstoff (Akzeptor) strahlungsfrei ohne Emission oder Absorption von Photonen übertragen wird (Förster 1948).

Bei herkömmlichen Enzym-Immunoassays werden häufig Protein-Mischungen, wie beispielsweise bovines Serumalbumin (BSA) verwendet, um unerwünschte und nicht-spezifische Bindungen zu verhindern. Diese Protein-Mischungen können jedoch mit Proteasen verunreinigt sein (Kapprell *et al.* 2011).

Deshalb wurde von Kapprell und Kollegen ein Endopeptidase-Assay basierend auf dem Phänomen des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (FRET) entwickelt. Dieser ist in der Lage, proteolytische Aktivität ohne die Störung durch unspezifische Proteinbindungen zu gewährleisten (Kapprell *et al.* 2011).

Dazu wurde eine universelle „Bibliothek“ von ca. 19⁵ Peptidsubstraten generiert. Sie umfasst dadurch eine sehr große Anzahl von humanen und tierischen Proteinsequenzen, die es erlaubt, nahezu sämtliche bekannte Proteasen zu detektieren (Kapprell *et al.* 2011).

An jedes Substrat der Bibliothek sind jeweils ein Fluorophor (7-Methoxycoumarin-4-acetic acid = Mca) und ein Chromophor (2,4-Dinitrophenyl =

Dnp) gebunden. Das Chromophor („Quencher“) unterdrückt im unveränderten Zustand die Aktivität des Fluorophors. Wird aber der Teil des Peptids, an dem das Chromophor gebunden ist, durch Proteasen hydrolytisch abgespalten, sendet das Fluorophor eine starke Fluoreszenz aus (siehe Abbildung 5).

Die Intensität der Fluoreszenz kann im Anschluss mit einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader quantitativ bestimmt werden.

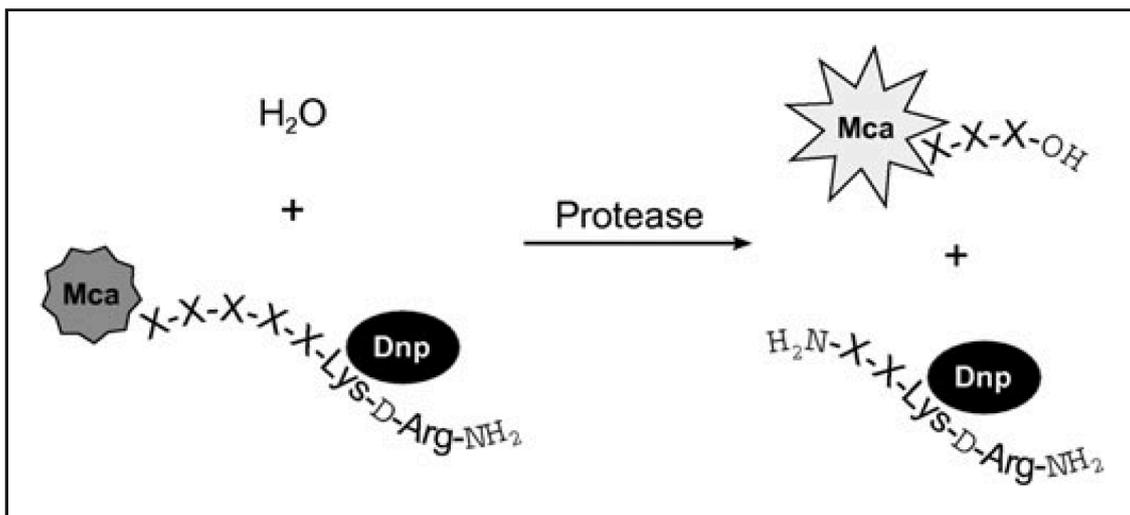


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer proteolytischen Hydrolyse eines FRET-Substrats (Kapprell et al. 2011). Mca: 7-Methoxycoumarin-4-acetic acid, Dnp: 2,4-Dinitrophenyl.

In Zusammenarbeit mit Herrn Claus Zeyer und Herrn Dr. rer. nat. Hubert Kalbacher, der an der Entwicklung des FRET-Verfahrens beteiligt war, wurden am Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum der Eberhard Karls Universität Tübingen die Versuche nach dem nachstehenden Protokoll durchgeführt:

- Als erstes wurde der Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader auf 37 °C aufgeheizt.
- Es wurden folgende Filter-Einstellungen vorgenommen: Absorption bei 320 nm, Emission bei 405 nm
- Im Anschluss wurde die FRET-Working-Solution (WS) hergestellt:
 - Die FRET-Ausgangs-Bibliothek wird bei -20 °C gelagert.

- Zur Herstellung der WS musste diese lichtgeschützt aufgetaut und 1:10 (v/v) mit TBS verdünnt werden.
- Für jede Probe wurden immer 100 µl in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert.
- Dabei waren in jedem Well stets 10 µl WS + 40 µl Substrat + 50 µl Pyrrolidin-Lösung (siehe 2.5 Pyrrolidinderivate), bei den Negativkontrollen 10 µl WS + 90 µl Substrat.
- Zuerst wurde das Substrat in die Wells pipettiert, dann die Pyrrolidin-Lösung und zum Schluss die WS. Dadurch wurde sichergestellt, dass möglichst wenig Substrat mit der WS reagiert, bevor die Messung beginnt.
- In Minutenabständen wurde dann über einen Zeitraum von 30 min die Fluoreszenzintensität mit einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader gemessen. Die Fluoreszenzintensität wird in „Relative Fluorescence Units“ (RFU) angegeben.
- Bei der Auswertung wurden die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten der ersten 10 min verwendet, weil in diesem Bereich von der höchsten Messgenauigkeit auszugehen ist.
- Aus den Messwerten von Minute 1-10 wurde dann eine Steigung berechnet, welche im Anschluss relativ zur Kontrolle genommen wurde. Zum Schluss wurden die relativen Steigungen von drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Da der FRET-Assay die Menge aller Proteasen misst, kann keine genaue Aussage gemacht werden, welche Proteasen bei diesem Versuch bestimmt werden. Es ist jedoch aufgrund der in der Einleitung beschriebenen Eigenschaften von Saos-2-Zellen davon auszugehen, dass es sich dabei hauptsächlich um Metalloproteasen handelt.

2.6 Immunzytochemie

Nachdem die Saos-2-Zellen bis zu vier Tage kultiviert worden sind, wurden sie nach dem unten aufgeführten Protokoll in den Mikrotiterplatten immunzytochemisch gefärbt:

- Nach der Differenzierung und Auswertung der Zellkultur wurden die Saos-2-Zellen mit 4 % (w/v) PFA für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 3x mit PBS für je 5 min gewaschen.
- Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden und die Zellen für die Detektion intrazellulärer Proteine zu permeabilisieren, folgte eine 30-minütige Inkubation mit 4 % (v/v) Ziegenserum, welches mit 0,1 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Triton in PBS verdünnt wurde.
- Im Anschluss wurde der primäre Antikörper (ebenfalls verdünnt mit 0,1 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Triton in PBS) hinzugefügt und dann bei 4 °C über Nacht inkubiert.
- Nach der Inkubation des primären Antikörpers wurde 3x mit PBS für je 5 min gewaschen.
- Danach wurde der Sekundärantikörper (verdünnt mit 0,1 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Triton in PBS) zusammen mit DAPI (0,2 µg/ml) in die Wells pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die bei dieser Arbeit eingesetzten primären und Fluorophor-gebundenen sekundären Antikörper sind in Tabelle 6 zusammengefasst:

Tabelle 6: Liste der verwendeten primären und Fluorophor-gebundenen sekundären Antikörper

Primär-Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Ki-67	Kaninchen	gebrauchsfertig	DCS GmbH & Co.KG, Hamburg
Vimentin	Maus	1:100	Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark
Sekundär-Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α mouse Cy3	Ziege	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories, USA
α rabbit Cy3	Ziege	1:200	Jackson Immuno Research Laboratories, USA

Ki67 ist ein häufig verwendeter Marker zur Bestimmung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation, denn es wird während allen aktiven Zellphasen exprimiert, aber nicht während der G₀-Phase (Scholzen und Gerdes 2000).

Das aus dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) gewonnene Toxin „Phalloidin“ hat eine starke Affinität zu F-Aktin. Da F-Aktin Hauptbestandteil von Mikrofilamenten ist, wird Phalloidin zur Anfärbung des Zytoskeletts verwendet (Wulf *et al.* 1979). Es wurde in der Verdünnung 1:500 (v/v) eingesetzt.

Vimentin ist ein Intermediärfilament, welches sich daher ebenfalls zur Darstellung des Zytoskeletts eignet (Kidd *et al.* 2014).

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich vermehrt in AT-reiche Regionen in der kleinen Furche von doppelsträngiger DNA anlagert und somit zum Färben von Zellkernen dient (Kapuscinski 1995).

2.7 Zellkultur

Es wurden für alle Experimente ausschließlich Saos-2-Zellen verwendet. Diese wurden in unserem Labor zum Zeitpunkt dieser Arbeit ständig kultiviert und zusätzlich in kryokonservierter Form in einem Stickstofftank gelagert, damit sie bei Bedarf aufgetaut werden konnten.

2.7.1 Kultivieren

Die Zellen wurden in den meisten Fällen in 75 cm²-Zellkulturflaschen, teilweise auch in 175 cm²-Zellkulturflaschen, in Zellkulturmedium (siehe 2.3.2) kultiviert und dann bei ausreichender Zellzahl auf 48-Well-Platten mit 0,95 cm² ausgesät (siehe 2.7.2). Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Luftsättigung. Bei Kultivierung von längerer Dauer wurde ein kompletter Medienwechsel zwischen dem 4. und 6. Tag durchgeführt.

2.7.2 Passagieren und Aussäen

Hatten die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 80 % erreicht, wurden sie mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin-EDTA 0,05 % (v/v) behandelt, um die Adhärenz der Zellen vom Flaschenboden aufzuheben. Nach einer kurzen Inkubation von 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Luftsättigung wurde das Trypsin-EDTA mit Zellkulturmedium geblockt. Als nächstes wurde diese Zell-Suspension in einen 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert.

Danach wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende Zell-Pellet mit frischen Zellkulturmedium re-suspendiert. Die Zellen wurden entweder zur weiteren Kultivierung gemäß einem gewissen Verdünnungsfaktor aufgeteilt oder in gewünschter Zellzahl in die Wells der 48-Well-Platten ausgesät. Der Anteil lebender Zellen der ab-trypsinierten Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Färbung der abgestorbenen Zellen mit Trypan-Blau bestimmt.

Dadurch konnte eine definierte Menge an Zellen pro Quadratcentimeter ausgesät werden. Für genaue Aussaat-Dichten siehe 2.5.1 und 3.1.

2.7.3 Kryokonservierung und Auftauen

Damit die Zellen je nach Bedarf gelagert und wieder aktiviert werden können, werden diese mit Hilfe der sogenannten „Kryokonservierung“ eingefroren und daraufhin wieder aufgetaut.

Kryokonservierung:

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben zuerst „abtrypsinisiert“ und dann ihre Zellzahl bestimmt.

Zusätzlich wurde dem Zellkulturmedium, in dem die Zellen gelöst wurden, 10 % (v/v) DMSO und 20 % (v/v) FCS zugesetzt (Einfriermedium).

Pro Kryo-Röhrchen wurden dann $1,5$ bis $2,0 \times 10^6$ Zellen pipettiert. Bevor die Kryo-Röhrchen in einen Stickstofftank überführt wurden, sind sie für mindestens vier Stunden bei -80 °C gelagert worden. Dabei wurden die Zellen in einem „Freezing Container“ aufbewahrt, welcher durch langsames Abkühlen (ca. 1 °C/min) ein schonendes Einfrieren ermöglicht. Zur kontinuierlichen Lagerung wurden die Zellen dann in die flüssige Phase eines mit Stickstoff gefüllten Tanks bei -196 °C überführt. Dies ist notwendig, da die Lagerung im Temperaturbereich von -25 bis -130 °C aufgrund der Bildung von Eiskristallen zu Schäden an den Zellen führen kann (Mazur 1984).

Auftauen:

Nachdem die kryokonservierten Zellen dem Stickstoff-Tank entnommen worden sind, wurden sie kurz für 1 min in ein 37 °C warmes Wasserbad inkubiert. Danach wurde der Inhalt eines Kryo-Röhrchens in ein frisches Röhrchen mit vorgewärmtem Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm für 6 min pelletiert und entsprechend der gewünschten Zellzahl in frischem Zellkulturmedium re-suspendiert. Bevor die Zellen für die Versuche verwendet wurden, sind sie nach dem Auftauen mindestens einmal passagiert worden.

2.7.4 Enzym-Anreicherung in Saos-2-Überständen

Die Menge an Proteasen im Überstand von Saos-2-Zellen (selbst wenn sie für lange Zeit und in großer Dichte kultiviert wurden) reichte nicht aus, um durch den FRET-Assay nachgewiesen werden zu können. Deshalb wurde die Konzentration im Überstand durch Ultrazentrifugation ungefähr um den Faktor 100 erhöht. Im folgenden Protokoll sind die einzelnen Schritte aufgeführt:

- Zur Kultivierung wurden Saos-2-Zellen in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen pro cm^2 mit Zellkulturmedium ausgesät und für neun Tage inkubiert. Es wurde dabei Zellkulturmedium mit DMEM, aber ohne Phenolrot verwendet. Am Tag sechs erfolgte ein vollständiger Medienwechsel.
- Vor Benutzung der Ultrazentrifugationsfilter mussten diese zuerst durch Ultrazentrifugation bei 5000 g mit destilliertem Wasser für 15 min ausgewaschen werden.
- Als nächstes wurden die Saos-2-Überstände aus der Zellkulturflasche entnommen, in Falcons gefüllt und bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert, um die Zellen vom Überstand zu trennen.
- Der zentrifugierte Überstand wurde dann mit einem 0,4 μm -Filter steril filtriert.
- 11 ml des Überstandes wurden im Anschluss in einen Ultrazentrifugationsfilter gefüllt und bei 5000 g für 15 min (bei „fixed-angle rotor“) ultrazentrifugiert.
- Nach Reinigung (siehe oben) konnte der Ultrazentrifugationsfilter für weitere Durchgänge wiederverwendet werden.
- Zum Schluss wurden alle bereits ultrazentrifugierten Überstände gesammelt und einem weiteren Ultrazentrifugationsschritt (5000 g, 10-15 min) unterzogen.

2.8. Mikroskopie

Sämtliche Geräte, die zur Mikroskopie verwendet wurden und in diesem Abschnitt aufgeführt sind, stammen von der Firma „Carl Zeiss AG“, Oberkochen. Die Zellkulturen wurden regelhaft mit dem Mikroskop „Axiovert 25“ in Kombination mit dem Okular „E-PI 10x/20“, den Ringblenden „Ph0-0,4/Ph1-0,4“ und den Objektiven „A-Plan 5x/0,12 Ph0“, „CP Achromat 10x/0,25 Ph1“, „LD A-Plan 20x/0,30 Ph1“ und „LD A-Plan 40x/0,50 Ph2“ kontrolliert.

Bei allen Bildaufnahmen wurde stets das Mikroskop „Observer.Z1“ in Kombination mit der Kamera „AxioCam HR R3“ verwendet.

Bei den Aufnahmen der DAPI-Fluoreszenzfärbungen (siehe 3.1.2, Abbildung 7) wurden 59 Kacheln mit dem Objektiv „EC Plan-Neofluar 5x/0.16 M27“ zusammen mit dem Reflektor „49 DAPI“ als Raster aufgenommen. Im Anschluss wurden diese Einzelbilder mit einem speziellen Werkzeug der Software „ZEN 2“ zusammengefügt, wodurch ganze Wells auf einer Bilddatei abgebildet werden konnten.

Bei den Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen (siehe 3.1.3, Abbildung 8 und 9) kamen die Objektive „EC Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph1“ und „LD Plan-Neofluar 20x/0,4 Korr Ph 2 M27“ zum Einsatz. Es wurden dabei die Reflektoren „49 DAPI“, „38 HE Green Fluorescent Prot“ und „43 HE DsRed“ verwendet.

Die mit Phasenkontrast aufgenommenen Bilder der Löslichkeitsanalysen (Abbildung 11) und der PD-KL-Toxizität (siehe 3.3.1 Abbildung 12) wurden mit dem Objektiv „EC Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph1“ und dem Reflektor „Analy. DIC Trans.light“ gemacht.

2.9 Analyse und Statistik

Die Aufnahmen, Bearbeitung und Verwaltung der mikroskopischen Bilder erfolgten mit der Software „ZEN 2“ der Firma „Carl Zeiss AG“, Oberkochen.

„Microsoft Excel 2016“ von „Microsoft Corp.“, Redmond, USA wurde zur Archivierung und Analyse von Daten verwendet.

Für statistische Analysen wurde „SigmaStat 3.5“ von „Systat Software, Inc.“, Chicago, USA eingesetzt. Die statistischen Testverfahren sind bei den jeweiligen Experimenten im Ergebnis-Teil dieser Arbeit angegeben. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

Abbildungen wurden mit Hilfe von „CorelDraw X7“ der Firma „Corel Corp.“, München erstellt.

3 Ergebnisse

Vor der Durchführung der Toxizitätsversuche und Enzym-Inhibitionstests wurden sowohl das Wachstumsverhalten der Saos-2-Zellen mit Hilfe eines WST-1-Assays als auch die Enzymproduktion der Saos-2-Zellen mit Hilfe eines ALP-Assays untersucht. Darüber hinaus wurden DAPI-Zellkernfärbungen und immunhistochemische Färbungen angefertigt. Das Ziel dieser Versuche war herauszufinden, zu welchem Proliferationszeitpunkt die Zellen eine konstante Teilungsrate aufweisen, da dieser Zustand am besten dazu geeignet ist, oben genannte Tests durchzuführen.

3.1 Wachstumskurve

Zur Erstellung der Wachstumskurve wurden zehn 48-Well-Platten mit jeweils fünf Wells mit einer Dichte von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 ausgesät und zehn Tage lang kultiviert. Die Zellen wurden in 300 μl Zellkulturmedium ausgesät. Danach wurden die Platten bei 37°C und in 5% CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Nach Tag 4 und Tag 8 wurden komplette Medienwechsel (MW) durchgeführt. Die Messwerte an den Tagen der Medienwechsel wurden bei der Auswertung den Messwerten der darauffolgenden Tage hinzugefügt.

3.1.1 WST-1-Wachstumskurve

Für die Bestimmung der Zahl der adhärennten Zellen wurden WST-Assays durchgeführt. Die Extinktion wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 450 nm und 630 nm gemessen (siehe 2.5.3). Da für jeden Versuchstag jeweils eine eigene Zellkulturplatte ausgesät wurde, waren die Messungen voneinander unabhängig.

Die Wachstumskurve (siehe Abbildung 6) zeigte eine stetige Steigung, die zum Tag 7 hin abflacht und beim Übergang von Tag 8 auf Tag 9 wieder ansteigt. Der Knick bei Tag 7 bis Tag 8 ist am wahrscheinlichsten darauf zurückzuführen, dass

der Verbrauch von Nährstoffen beziehungsweise das Anfallen von Abbauprodukten im Überstand bei beginnender Konfluenz zu einer Hemmung des Zellwachstums führte. Wie zu erkennen ist, wurde dieser Effekt nach einem Mediumwechsel aufgehoben. Die Messwerte an Tag 3 waren wegen eines Anwendungsfehlers nicht verwertbar.

Aufgrund der Ergebnisse entschieden wir uns, die Toxizitätstests bis zum Tag 4 anzulegen, da in diesem Zeitraum von einer annähernd linearen Teilungsrate auszugehen ist.

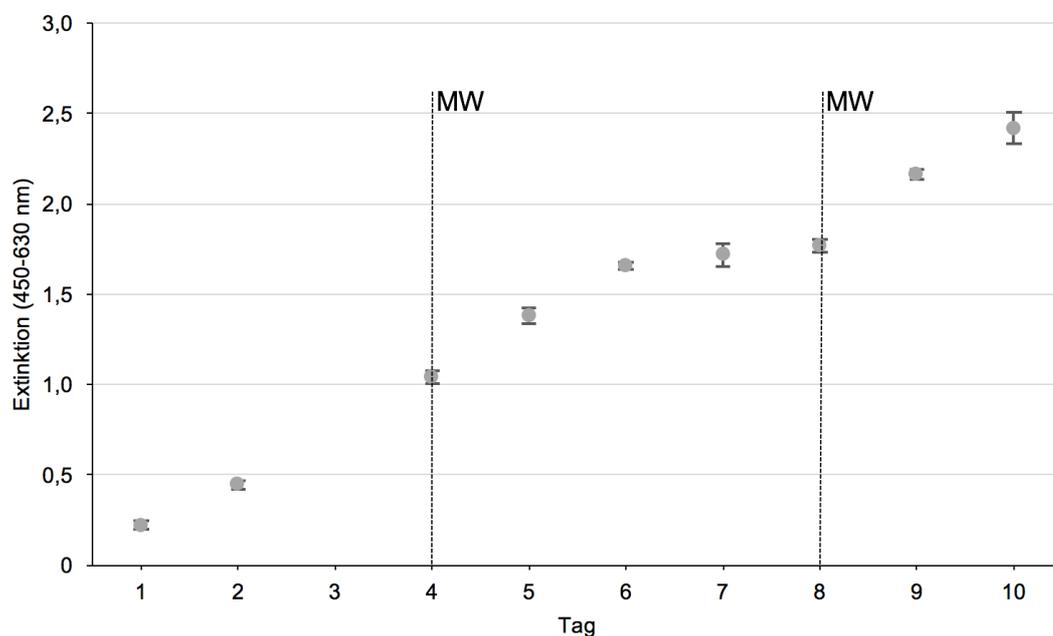


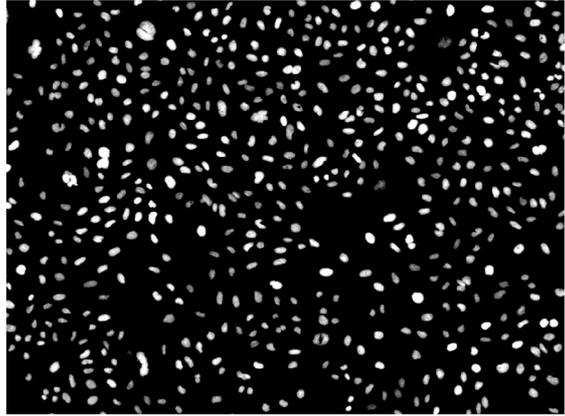
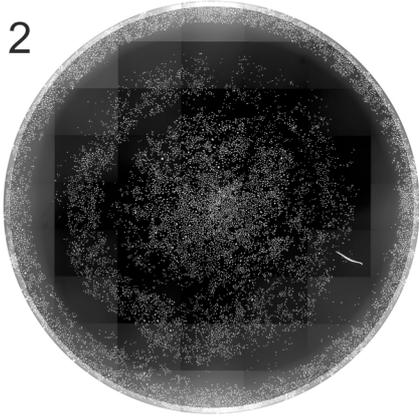
Abbildung 6: WST-Wachstumskurve. Dargestellt sind die gemittelten Extinktionswerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen, welche mit Hilfe eines WST-1-Assay für jeweils zehn Tage bestimmt wurden. Die Messergebnisse an Tag 3 waren aufgrund eines Anwendungsfehlers nicht verwertbar. Nach Tag 4 und Tag 8 wurden komplette Mediumwechsel (MW) durchgeführt. Die Messwerte an den Tagen der Medienwechsel wurden bei der Auswertung den Messwerten der darauffolgenden Tage hinzugefügt.

3.1.2 DAPI-Färbungen

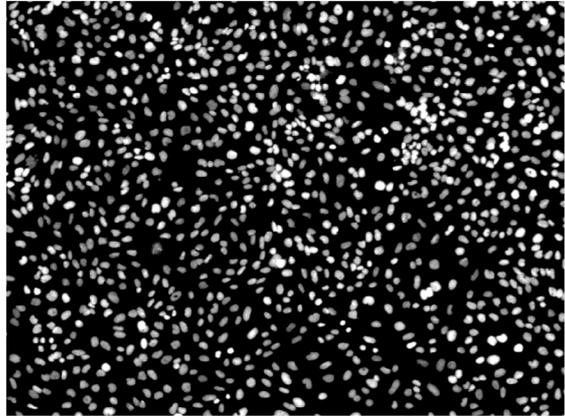
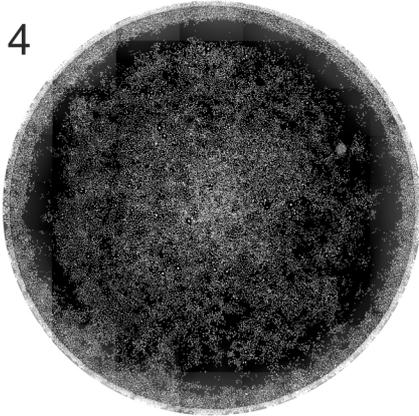
Zur Überprüfung der homogenen Aussaat und des Wachstums der Saos-2-Zellen wurde von allen zehn Tagen der Kultivierung jeweils ein ganzes Well fotografiert. Zuvor waren die Zellkerne mit DAPI gefärbt worden.

Im Folgenden (siehe Abbildung 7) sind diese Bilder sowohl als Ganzes, als auch in 10-facher Vergrößerung an repräsentativen Ausschnitten dargestellt.

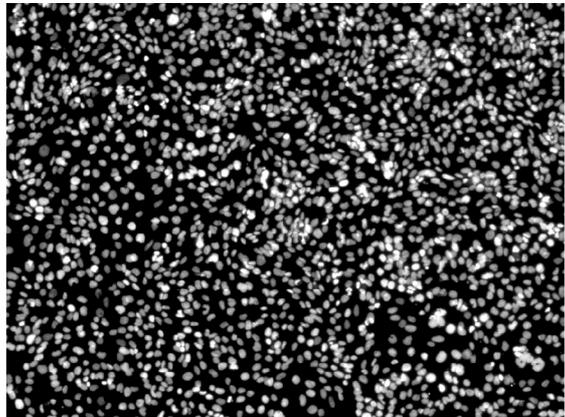
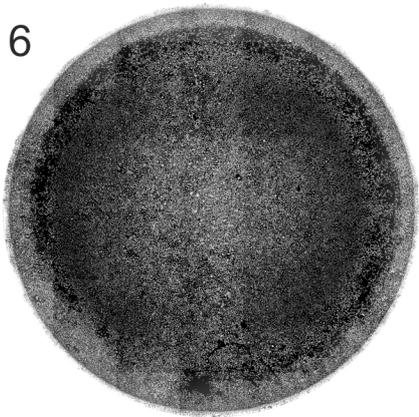
Tag 2



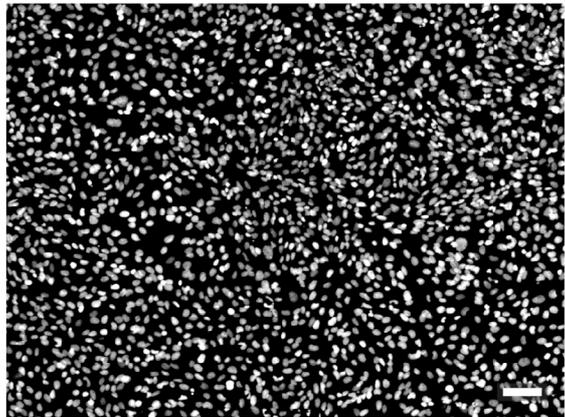
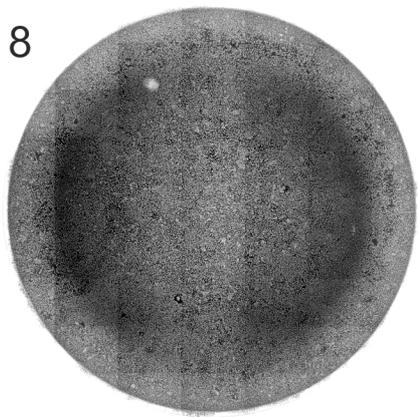
Tag 4



Tag 6



Tag 8



Tag 10

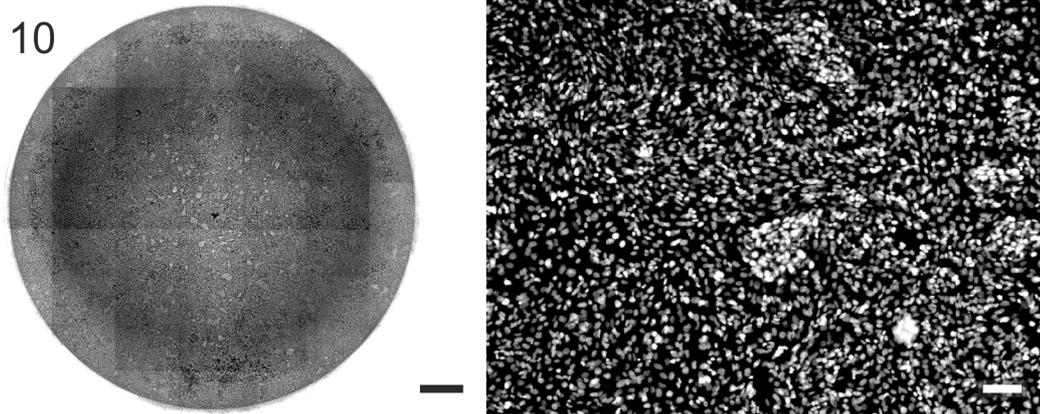


Abbildung 7: DAPI-Färbungen der Saos-2-Zellen. Dargestellt sind DAPI-Fluoreszenzaufnahmen an Tag 2, 4, 6, 8 und 10. Die Bilder der rechten Spalte sind ein Ausschnitt aus den Bildern der linken Spalte in 10-facher Vergrößerung. Der schwarze Maßstabsbalken entspricht 1000 µm, der weiße 100 µm.

Im Verlauf von Tag 2 bis Tag 10 zeigte sich eine zunehmende Vermehrung der adhärennten Saos-2-Zellen. An Tag 10 ist die Zellzahl so groß und die Zellen sind so dicht aneinandergedrängt, dass sie übereinander wachsen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass das Wachstum in diesem Zustand im Vergleich zu den Tagen davor eingeschränkt ist.

Zur differenzierteren visuellen Darstellung der Saos-2-Zellen und deren Verteilung wurden Immunfluoreszenz-Färbungen angefertigt.

3.1.3 Immunfluoreszenz-Färbungen

Nach der histologischen Fixierung der Saos-2-Zellen mit Formaldehyd wurden die fixierten Zellen verschiedenen Färbungen unterzogen. Zur Darstellung der Zellkerne wurden sowohl DAPI als auch der Proliferationsmarker Ki67 herangezogen. Fluoreszenzfärbungen des Zytoskeletts erfolgten sowohl mit Phalloidin, welches das Mikrofilament Aktin anfärbt (siehe Abbildung 8), als auch mit einem Antikörper gegen Vimentin (siehe Abbildung 9). Die Aufnahmen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten (d1, d4) und in 2 unterschiedlichen Vergrößerungen.

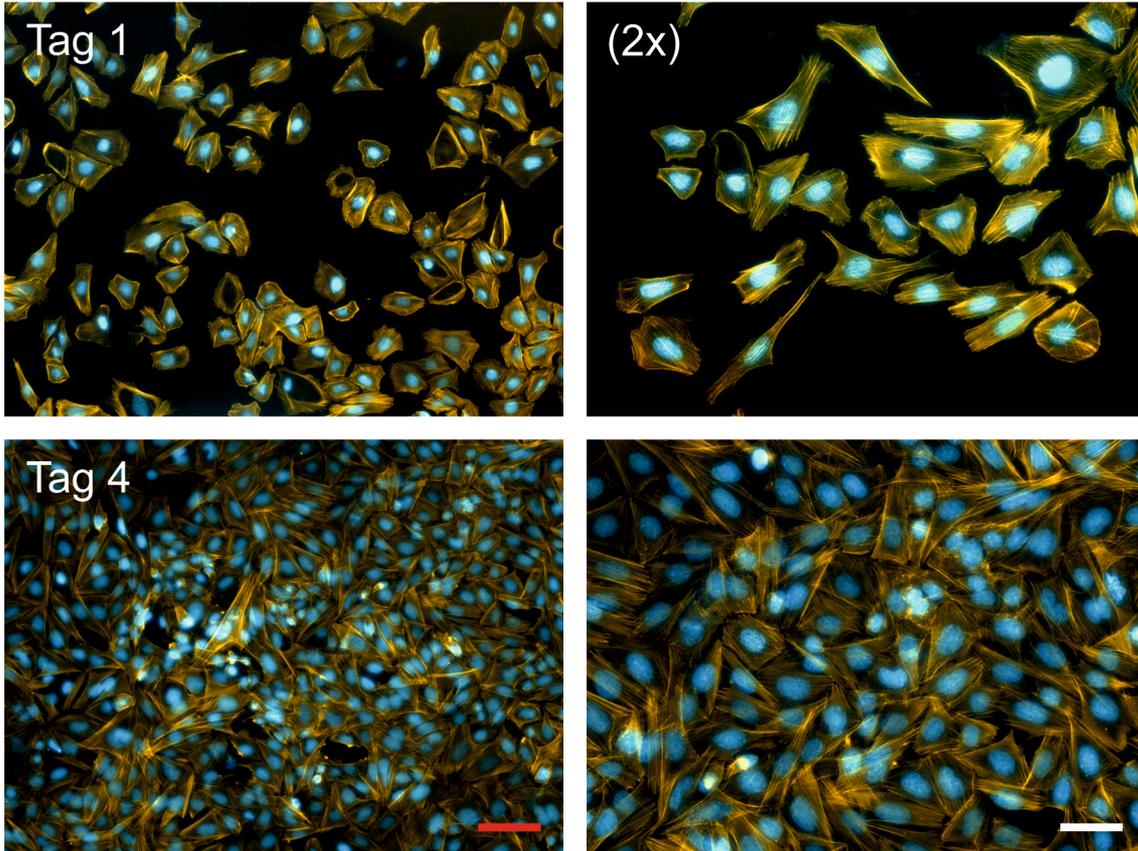


Abbildung 8: Fluoreszenzfärbung der Saos-2-Zellen mit Phalloidin und DAPI. Dargestellt sind DAPI- und Phalloidin-Fluoreszenzaufnahmen an Tag 2 und 4. Die Bilder der rechten Spalte sind ein Ausschnitt aus den Bildern der linken Spalte in 2-facher Vergrößerung. Der rote Maßstabsbalken entspricht 100 μm , der weiße 50 μm .

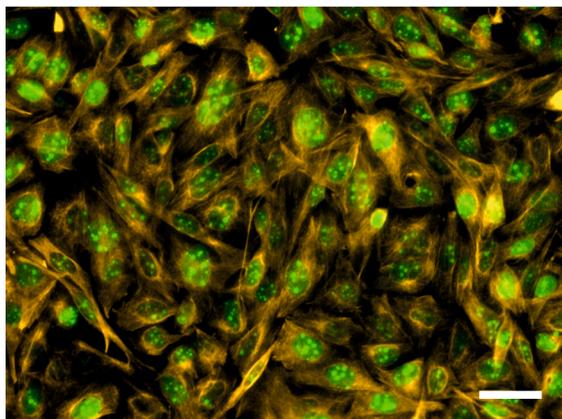
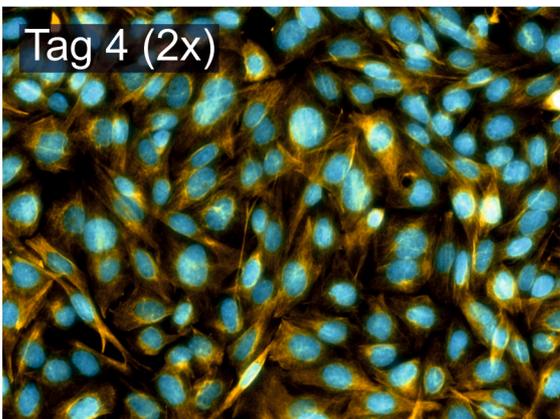
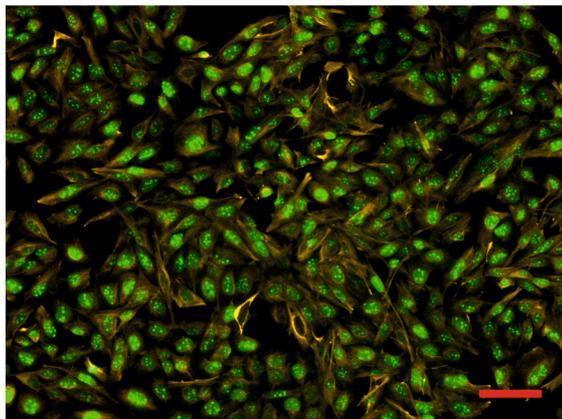
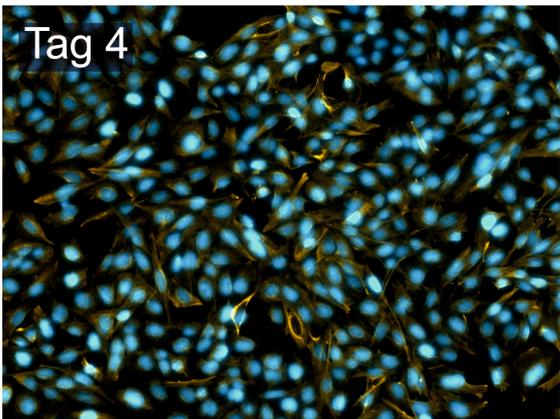
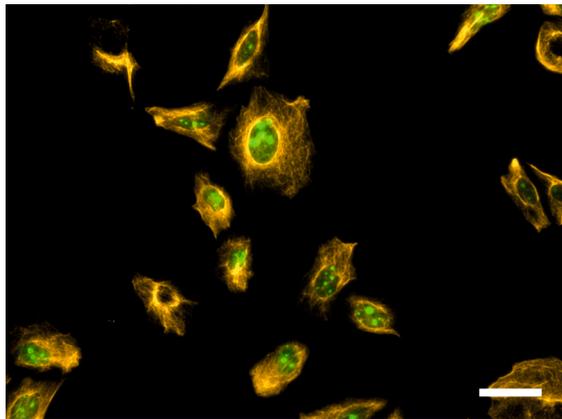
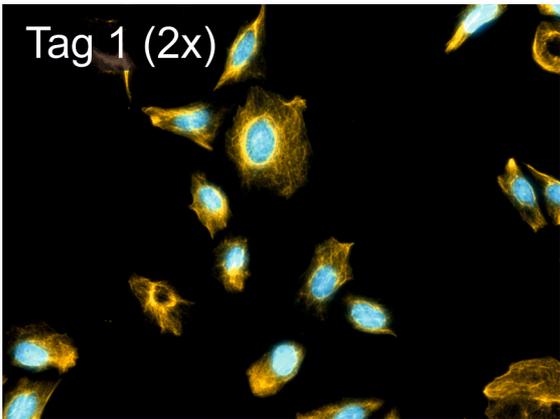
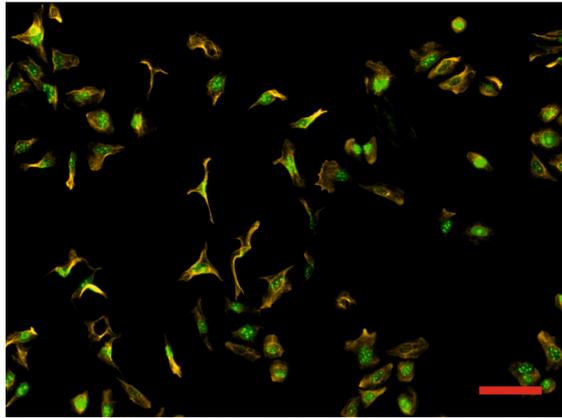
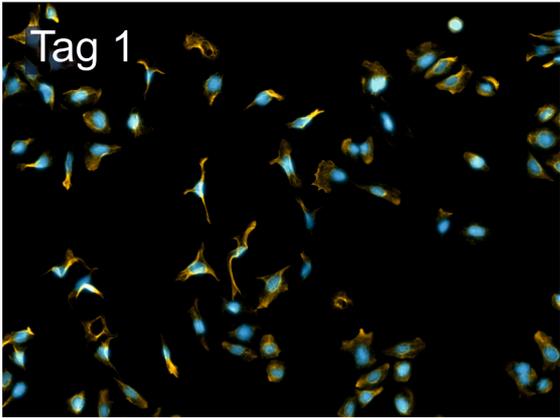


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung der Saos-2-Zellen mit Vimentin, DAPI und Ki67. Dargestellt sind Aufnahmen von Vimentin-Immunfluoreszenzfärbungen an Tag 2 und 4. Zusätzlich wurde entweder mit DAPI (linke Spalte) oder gegen Ki67 (rechte Spalte) gefärbt. Die Bilder in der 2. und 4. Zeile sind ein Ausschnitt aus den darüber liegenden Zeilen. Der rote Maßstabsbalken entspricht 100 µm, der weiße 50 µm.

3.1.4 ALP-Sekretionskurve

Für die ALP-Sekretionskurve wurden dieselben Zellen verwendet wie für die WST-Wachstumskurve. Die Konzentration der alkalischen Phosphatase im Überstand wurde mit dem entsprechenden Assay und der Messung der Extinktion bei 405 nm bestimmt (siehe 2.5.2). Die Messwerte an den Tagen der Medienwechsel wurden additiv den Messwerten der darauffolgenden Tage hinzugefügt.

Die kumulative Zunahme der ALP-Konzentration im Überstand zeigte sich zwischen Tag 1 und Tag 8 in einem annähernd exponentiellen Verlauf der gemessenen ALP-Werte (siehe Abbildung 10). Im Zeitraum zwischen Tag 8 und Tag 10 dagegen stellt sich die Steigung linear dar.

Aufgrund der scheinbar konstanten ALP-Freisetzung während der ersten Tage, entschieden wir uns in Anlehnung an die Ergebnisse der WST-Wachstumskurve, die Toxizitäts- und Enzyminhibitionstests bis zu Tag 4 durchzuführen.

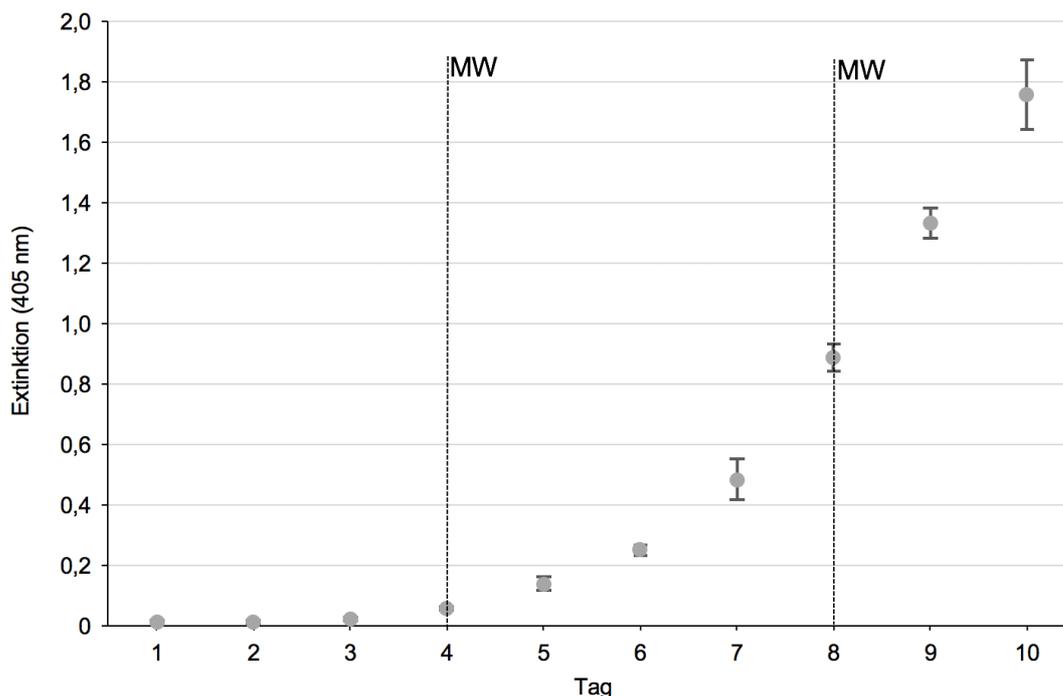


Abbildung 10: ALP-Sekretionskurve. Die ALP-Konzentration der Saos-2-Zellen wurde durch einen ALP-Assay quantitativ für jeweils zehn Tage bestimmt (n=5). Nach Tag 4 und Tag 8 wurden komplette Mediumwechsel (MW) durchgeführt. Die Messwerte an den Tagen der Medienwechsel wurden bei der Auswertung den Messwerten der darauffolgenden Tage hinzugefügt.

3.2 Löslichkeitsanalysen

Die Herstellung der Pyrrolidinderivate wurde von den Kollegen im „Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik“ durchgeführt. Da aber am Anfang dieser Arbeit noch sehr wenig über das chemische Verhalten von Pyrrolidinderivaten bekannt war, wurden zunächst Untersuchungen zur Bestimmung der Löslichkeit durchgeführt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die photometrischen Messungen nicht durch ausgefallene Pyrrolidin-Komplexe gestört werden und dass die eingesetzten Konzentrationen in voller Höhe im Medium gelöst zur Verfügung stehen.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Verdünnungsreihen und eine Auswahl entsprechender Bilder aufgeführt.

3.2.1 Ablauf der Verdünnungsschritte

Die Verdünnung von Pyrrolidinderivaten wurde sowohl bei den Verdünnungsreihen, als auch bei den Toxizitätsversuchen und Enzym-Inhibitionstests stets in identischer Weise durchgeführt.

Als erstes wurde Pyrrolidin in einer Konzentration von 2% (v/v) mit DMSO verdünnt. Danach erfolgten alle weiteren Verdünnungsschritte mit Zellkulturmedium. Die einzelnen Verdünnungsschritte und die Inkubation wurden mit je 500 µl in Wells einer 48-Well-Platte durchgeführt.

3.2.2 Löslichkeitsbilder

Von ausgewählten PD-KL-Konzentrationen wurden Hellfeld-Bilder am Lichtmikroskop in 100-facher Vergrößerung aufgenommen, um die jeweilige Stärke der Komplexbildung zu dokumentieren (siehe Abbildung 15). Bei den Konzentrationen 2.500 µg/ml und 10.000 µg/ml war die Komplexbildung sogar makroskopisch zu erkennen.

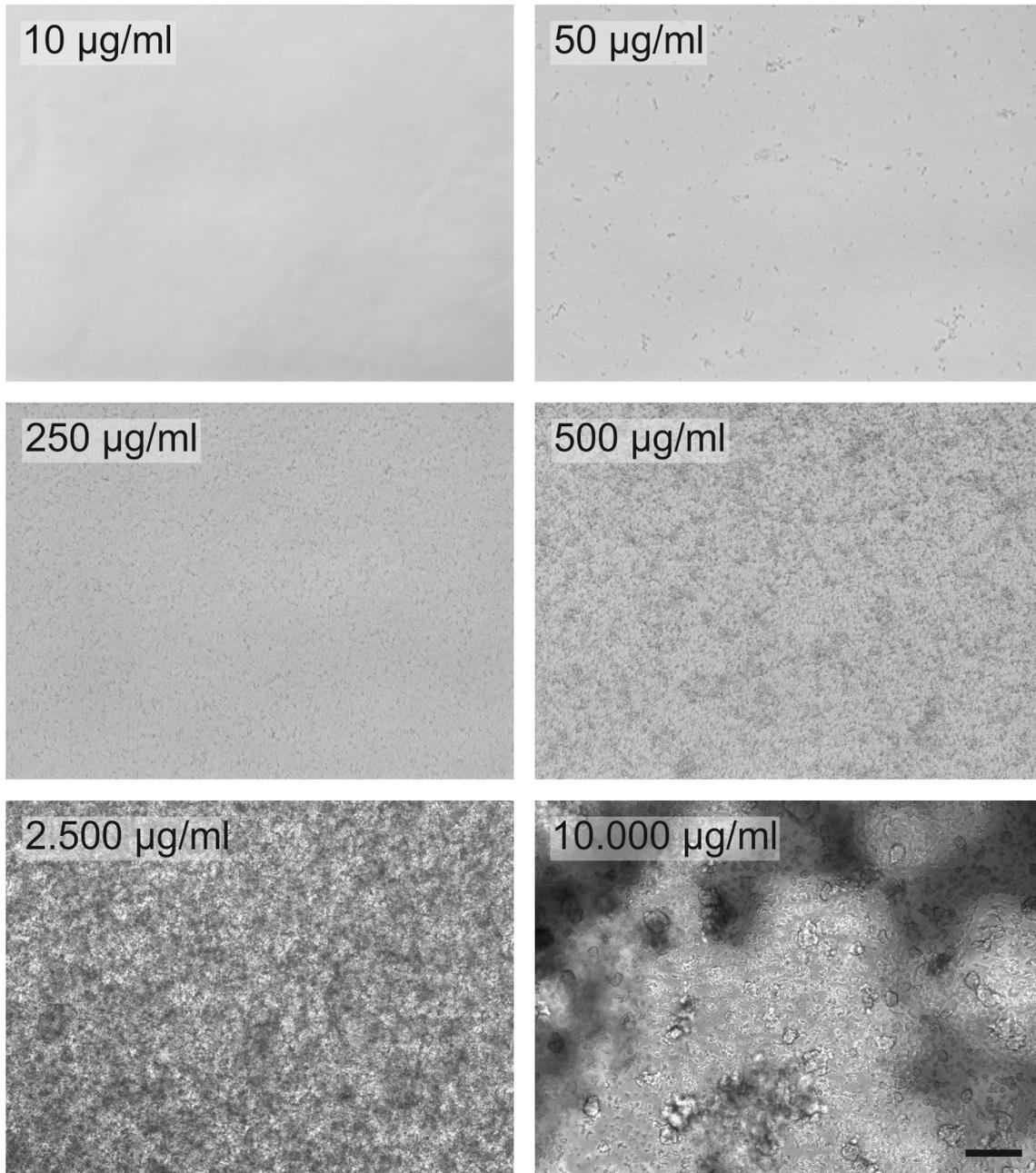


Abbildung 11: Phasenkontrast-Aufnahmen der Löslichkeitsbilder von PD-KL. Dargestellt ist die Löslichkeit eines Pyrrolidinderivats (PD-KL) in unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg/ml - 10.000 µg/ml). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Anhand dieser Bilder erfolgte die Kategorisierung der Stärke der Komplexbildung von 0 bis 3 (siehe unten).

3.2.3 Auswertung der Löslichkeitsanalysen

Bei der Erstellung und Auswertung der Verdünnungsreihen (siehe Tabelle 7) wurden verschiedene Parameter berücksichtigt. Zum einen wurden die

unterschiedlichen Pyrrolidinderivate (PD-KL, PD-M, PD-K, PD-L und PD-M-A) verglichen. Daneben wurde untersucht, ob sich die Inkubation bei Raumtemperatur (20°C) oder im Zellkultur-Inkubator (37°C) auf die Löslichkeit auswirkt sowie ob sich die Löslichkeit über 3 Tage hinweg verändert. Dabei wurde die Stärke der Komplexbildung (Ausfallen) anhand subjektiver Einschätzung auf einer Skala von 0 bis 3 bewertet:

- 0: komplett gelöst (vergleiche Abbildung 11: 10 µg/ml)
- 1: leicht ausgefallen (vergleiche Abbildung 11: 50 µg/ml)
- 2: mittelstark ausgefallen (vergleiche Abbildung 11: 250 µg/ml und 500 µg/ml)
- 3: stark ausgefallen (vergleiche Abbildung 11: 2.500 µg/ml und 10.000 µg/ml)

Tabelle 7: Löslichkeitsanalysen. Pyrrolidinderivate (PD) wurden in verschiedenen Konzentrationen bei unterschiedlicher Temperatur über drei Tage inkubiert. Die Stärke der Komplexbildung wurde subjektiv mit Zahlen bewertet (1: leicht, 2: mittelstark, 3: stark).

PD-KL (RT)	d1	3	3	3	2	2	1	1	1	0	0
	d2	3	3	3	2	1	1	1	1	0	0
	d3	3	3	3	2	2	1	2	1	0	0
PD-KL (37°C)	d1	3	3	3	2	2	2	2	2	0	0
	d2	3	3	3	3	2	2	2	2	1	0
	d3	3	3	3	3	2	2	2	2	1	0
PD-M (RT)	d1	3	3	3	2	2	1	1	0	0	0
	d2	3	3	3	2	2	2	1	0	0	0
	d3	3	3	3	2	2	2	1	0	0	0
PD-M (37°C)	d1	3	3	3	2	2	2	2	1	0	0
	d2	3	3	3	3	2	2	2	2	0	0
	d3	3	3	3	3	2	2	2	2	0	0
PD-K (RT)	d1	0	1	2	2	1	1	0	0	0	0
	d2	0	1	2	2	2	1	0	0	0	0
	d3	3	3	2	2	2	1	0	0	0	0
PD-K (37°C)	d1	3	3	3	2	2	2	1	0	0	0
	d2	3	3	3	3	3	2	1	0	0	0
	d3	3	3	3	3	2	2	2	0	0	0
PD-L (RT)	d1	3	3	3	2	2	1	1	1	1	0
	d2	3	3	3	2	2	1	1	1	1	0
	d3	3	3	3	2	2	1	1	1	1	0
PD-L (37°C)	d1	3	3	3	2	2	2	2	2	2	1
	d2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
	d3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2
PD-M-A (RT)	d1	3	3	3	3	3	3	3	2	2	0
	d2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	0
	d3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	0
PD-M-A (37°C)	d1	3	3	3	3	3	3	3	2	0	0
	d2	3	3	3	3	3	3	3	2	0	0
	d3	3	3	3	3	3	3	3	2	0	0
PD-Konzentration [µg/ml]		10000	5000	2500	1000	500	250	100	50	25	10
DMSO-Konzentration		50%	25%	12,5%	5%	2,5%	1,25%	0,5%	0,25%	0,125%	0,05%

Es zeigte sich, dass sich die Löslichkeit im Zeitraum von Tag 1 bis Tag 3 abgesehen von PD-K (RT) nicht verändert. Die Inkubation bei 37°C verbessert die Löslichkeit nur bei dem Derivat PD-M. Alle anderen Derivate sind bei RT besser gelöst als bei 37°C. Für alle untersuchten Derivate gilt generell, dass die Löslichkeitsschwelle im Bereich von 10 µg/ml bis 100 µg/ml liegt. Wie sich die jeweilige Stärke der Komplexbildung (0,1,2,3) auf das Reaktionsverhalten von Pyrrolidinderivat auswirkt, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden.

3.3 Toxizitätstests

Zu Pyrrolidinderivaten wurden bisher keine Zytotoxizitätstests oder pharmakologische Untersuchungen veröffentlicht. Im folgenden Textabschnitt soll die Toxizität von Pyrrolidinderivaten am Zellkulturmodell der Saos-2-Zelllinie untersucht werden, um die Toxizitätsgrenze der einzelnen Derivate zu ermitteln. Zum genauen Vorgehen bei diesen Versuchen siehe 2.5.1.

3.3.1 Visualisierung der Zell-Toxizität durch Pyrrolidinderivate

Die Visualisierung der Zytotoxizität verschiedener PD-KL-Konzentrationen gegenüber Saos-2-Zellen ist in Abbildung 12 gezeigt. Es wurden Saos-2-Zellen ausgesät, mit einer bestimmten PD-KL-Konzentration behandelt und für 72 h inkubiert (siehe 3.3). Im nächsten Schritt wurden repräsentative Ausschnitte der Wells am Mikroskop mit Phasenkontrast fotografiert.

Während des Prozesses des Absterbens kugeln sich Zellen ab und erscheinen mit einem hellen Rand. Sind die Zellen vollständig abgestorben, dann lösen sie sich vom Boden des Wells ab. Bei den Konzentrationen 10 und 20 µg/ml (siehe Abbildung 12) sind tote Zellen deshalb aus dem Fokus der Optik des Mikroskops geraten und sind als große Ringe verschwommen zu erkennen. Auf dem Bild der Negativkontrolle (0 µg/ml) sind viele vitale und nur wenige tote Zellen zu erkennen. Mit steigenden PD-KL-Konzentration nimmt die Zellzahl stetig ab,

wobei in bei der Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ nahezu sämtliche Zellen abgestorben sind.

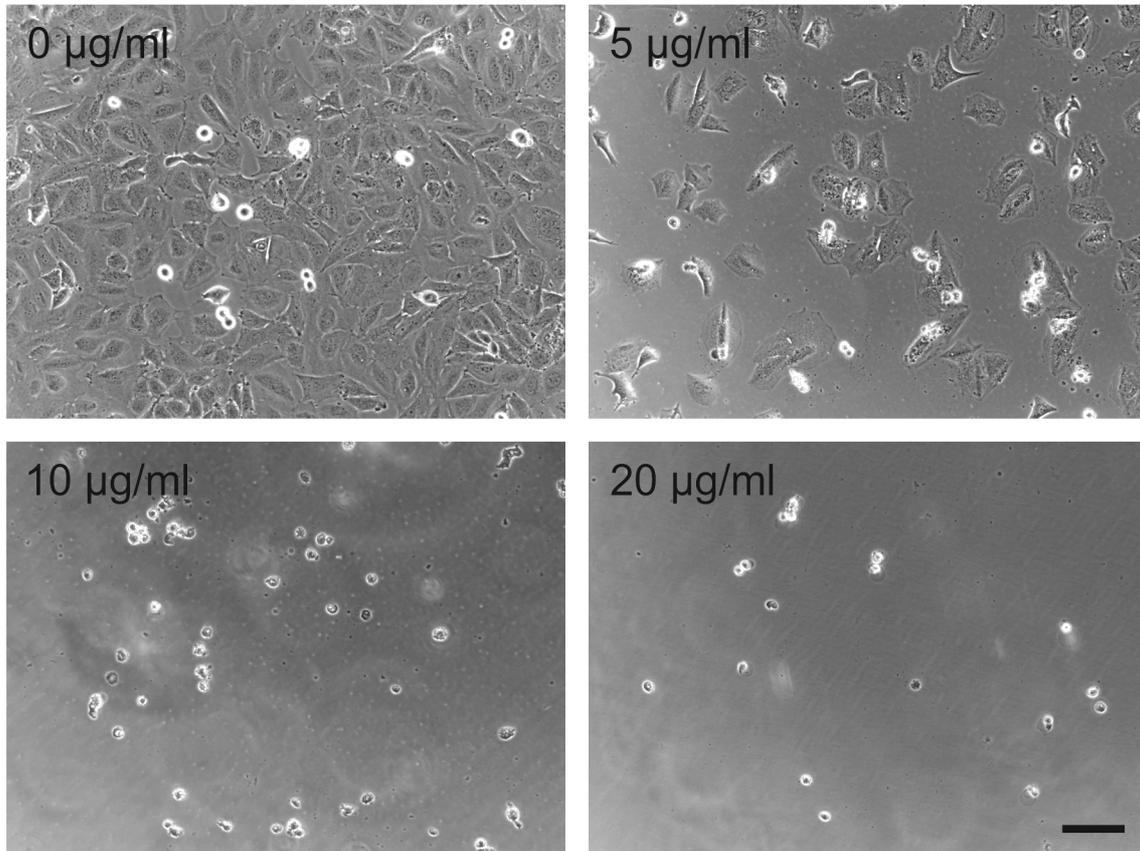


Abbildung 12: Phasenkontrast-Aufnahmen der PD-KL-Toxizität nach drei Tagen (72 Stunden) bei Konzentrationen von 0 $\mu\text{g/ml}$ (Negativkontrolle) bis 20 $\mu\text{g/ml}$ PD-KL. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

3.3.2 DMSO-Toxizitätstest

Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, wurden die Konzentrationen der Pyrrolidinderivate durch Verdünnung mit DMSO und Zellkulturmedium hergestellt. Als Vorversuch zu den eigentlichen Toxizitätstests mit Pyrrolidin wurden Saos-2-Zellen in hohen Konzentration mit DMSO behandelt. Dadurch sollte bewertet werden, ob der Toxizitätseffekt auf der Wirkung von DMSO beruht.

Der Versuchsaufbau entspricht einem „Langzeit“-Toxizitätstest (siehe 2.5.1), nur dass statt einem Pyrrolidinderivat DMSO verwendet wurde.

Abbildung 13 bestätigt, dass bis zur Verdünnung von 1:125 keine signifikanten Toxizitätseffekte durch DMSO zu beobachten sind. Bezogen auf die folgenden Tests entspräche dies einer Pyrrolidin-Konzentration von 160 µg/ml. Die Konzentrationen, die für die Pyrrolidin-Toxizitätstests verwendet wurden, liegen bis auf Ausnahmen (siehe Abbildung 21 und 22) unter 160 µg/ml.

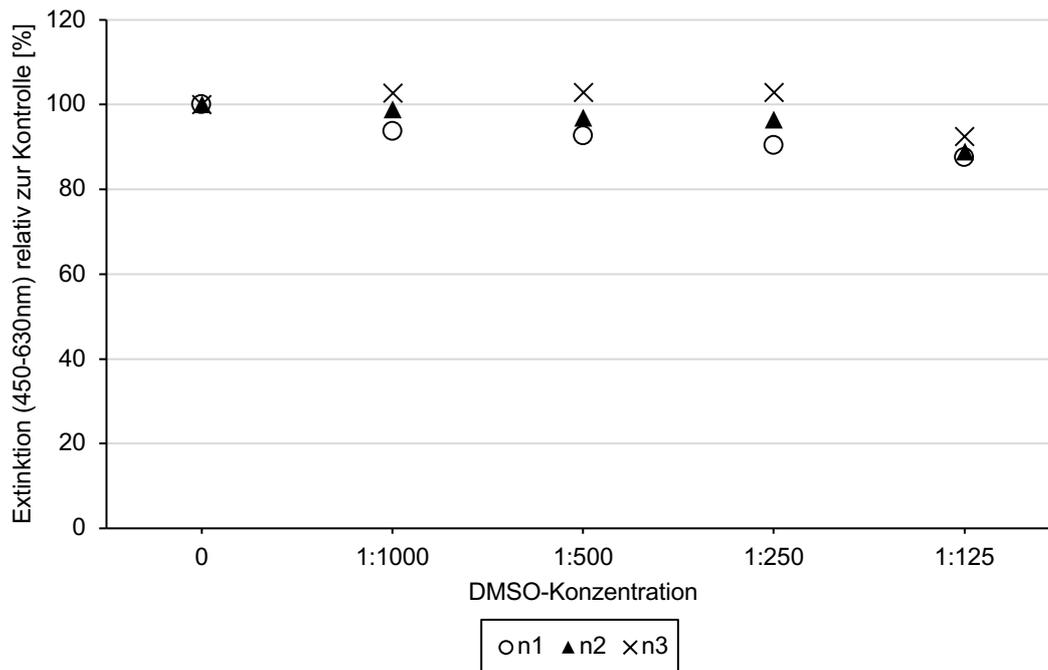


Abbildung 13: DMSO-Toxizitätstest. Zur Kontrolle für die Pyrrolidin-Toxizitätstests wurde das Lösungsmittel DMSO in Bezug auf seine Toxizität untersucht. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3).

3.3.3 PD-KL-Toxizitätstests

Die Pyrrolidin-Toxizität wurde im Fall von PD-KL über verschiedene Zeiträume und mit verschiedenen Modifikationen durchgeführt.

PD-KL-Langzeit-Toxizitätstest (siehe Abbildung 14):

Zur genauen Durchführung des „Langzeit“-Toxizitätstest siehe 2.5.1.

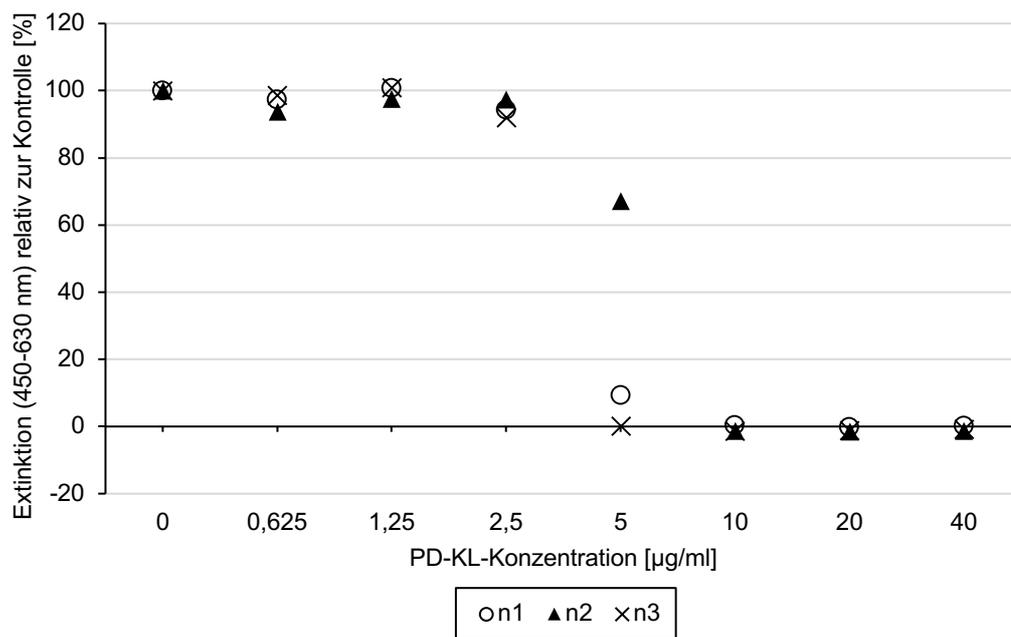


Abbildung 14: PD-KL-Langzeit-Toxizitätstest. Nach Behandlung mit PD-KL wurden die Saos-2-Zellen für 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3).

Für den „Langzeit“-Versuch mit PD-KL wurde eine Toxizitätsgrenze im Bereich von 5 µg/ml beobachtet. Bei kleineren Konzentrationen ist die Zellzahl nahezu identisch mit der Kontrolle, es ist also kein Toxizitätseffekt erkennbar. Bei größeren Konzentrationen konnten durch den Assay keine vitalen Zellen mehr nachgewiesen werden.

PD-KL-Kurzzeit-Toxizitätstest:

Durch den folgenden Versuch sollte getestet werden, ob die Dauer der Inkubation mit Pyrrolidin einen Einfluss auf die Hemmung des Zellwachstums hat. Bei den „Kurzzeit-Tests“ wurden die Saos-2-Zellen daher zusammen mit den entsprechenden PD-KL-Konzentrationen nur für 60 Minuten inkubiert.

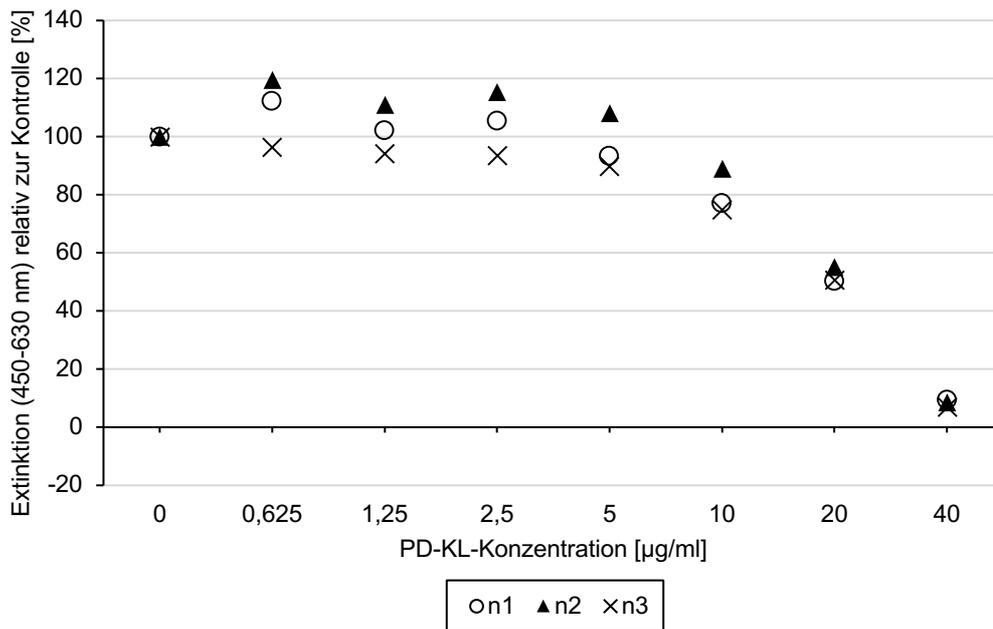


Abbildung 15: PD-KL-Kurzzeit-Toxizitätstest. Nach Behandlung mit PD-KL wurden die Saos-2-Zellen für 60 Minuten inkubiert. Durch einen WST-1-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass sich die Toxizitätsgrenze im Vergleich zum Langzeit-Test (5 µg/ml) um den Faktor vier zu höheren Konzentrationen hin verschiebt, da erst bei 20 µg/ml die Hälfte der Zellen abgestorben ist.

PD-KL-Auswasch-Toxizitätstest:

Das Ziel der „Auswasch-Versuche“ bestand darin, herauszufinden, ob sich die Saos-2-Zellen nach der Behandlung mit Pyrrolidin wieder vermehren können. Wie bei den Kurzzeit-Versuchen wurden die Saos-2-Zellen für 60 Minuten mit PD-KL behandelt (siehe Abbildung 20). Im Anschluss wurde der Test aber nicht abgebrochen, sondern der Überstand (zusammen mit dem PD-KL) in den Wells abgesaugt und durch neues Zellkulturmedium (je 300 µl) ersetzt. Es folgte eine Inkubation für weitere 72 Stunden, bevor die Zellzahl durch einen WST-Assay bestimmt wurde.

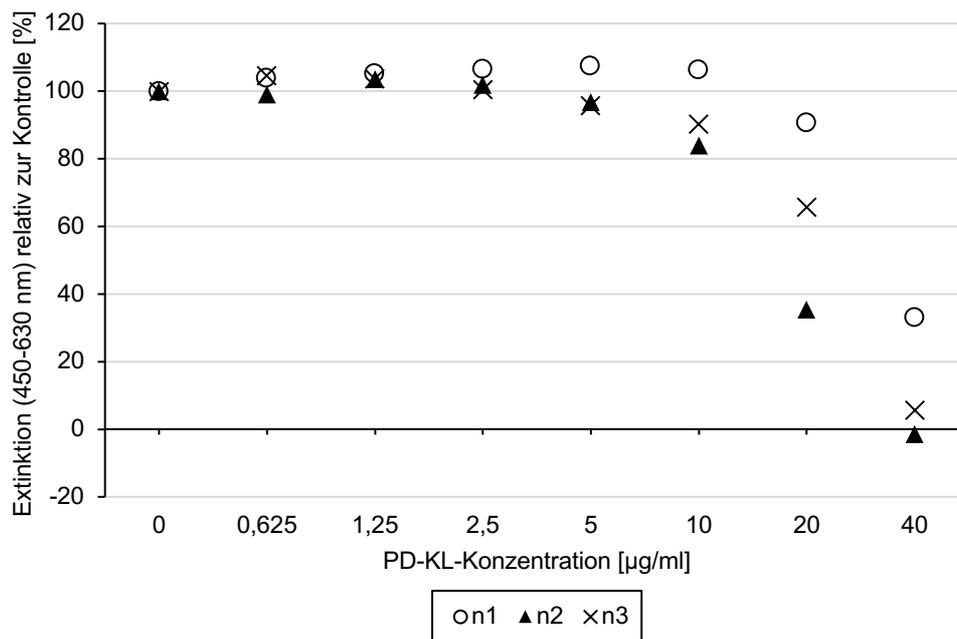


Abbildung 16: PD-KL-Auswasch-Toxizitätstest (60 Minuten). Nach Behandlung mit PD-KL wurden die Saos-2-Zellen für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde PD-KL ausgewaschen und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-1-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind normalverteilt.

Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, sind die Messwerte vergleichbar mit denen des Kurzzeitversuchs (siehe Abbildung 19). Die Toxizitätsgrenze liegt bei ungefähr 20 µg/ml. Hier zeigt sich daher kein signifikanter Effekt durch das „Auswaschen“ (nach Inkubation für 60 Minuten).

Führt man die Behandlung mit Pyrrolidin bei demselben Versuchsaufbau nur für zehn Minuten durch, so verschiebt sich die Toxizitätsgrenze hin zu höheren Konzentrationen (siehe Abbildung 17). Die genaue Bestimmung der Grenze ist bei diesem Versuch aber nicht möglich, da sich diese außerhalb der untersuchten Konzentrationen befindet. In einem späteren Abschnitt dieser Arbeit sind Auswaschversuche mit höheren Konzentrationen von PD-M beschrieben (siehe Abbildung 22 und 23).

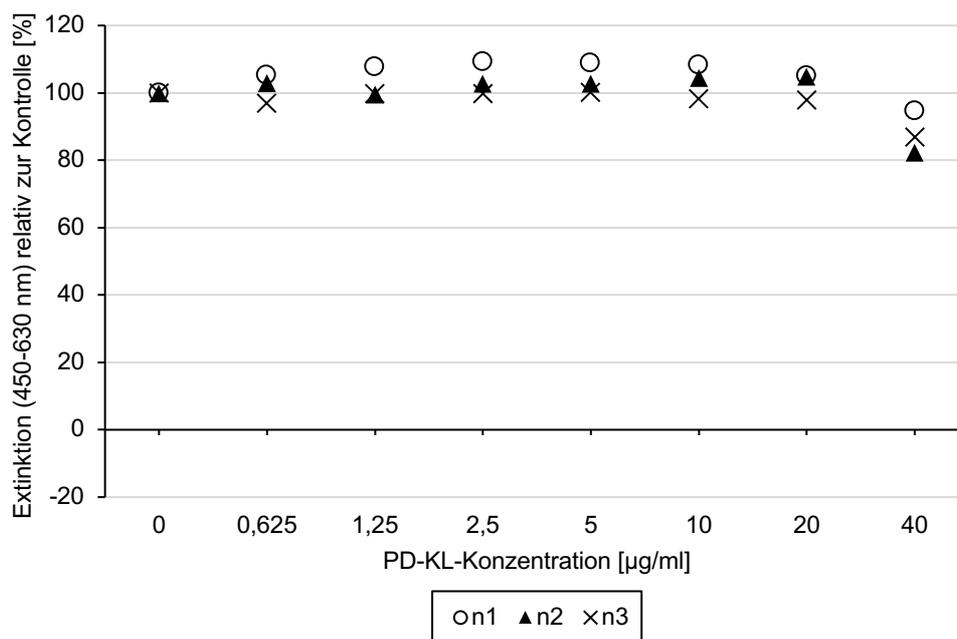


Abbildung 17: PD-KL-Auswasch-Toxizitätstest (10 Minuten). Nach Behandlung mit PD-KL wurden die Saos-2-Zellen für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde PD-KL ausgewaschen und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

Neben PD-KL wurden weitere Pyrrolidinderivate untersucht, um festzustellen, wie diese sich auf die Toxizität auswirken. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

3.3.4 PD-M-Toxizitätstests

Im Vergleich zu PD-KL, bei dem verschiedene Pyrrolidinderivate vermengt sind, ist in PD-M nur Pyrrolidin mit einem definierten Alkylrest von mittlerer Kettenlänge enthalten.

PD-M-Langzeit-Toxizitätstest:

Dieser Versuch wurde entsprechend den „Langzeit“-Toxizitätstest durchgeführt (siehe 2.5.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 18 dargestellt.

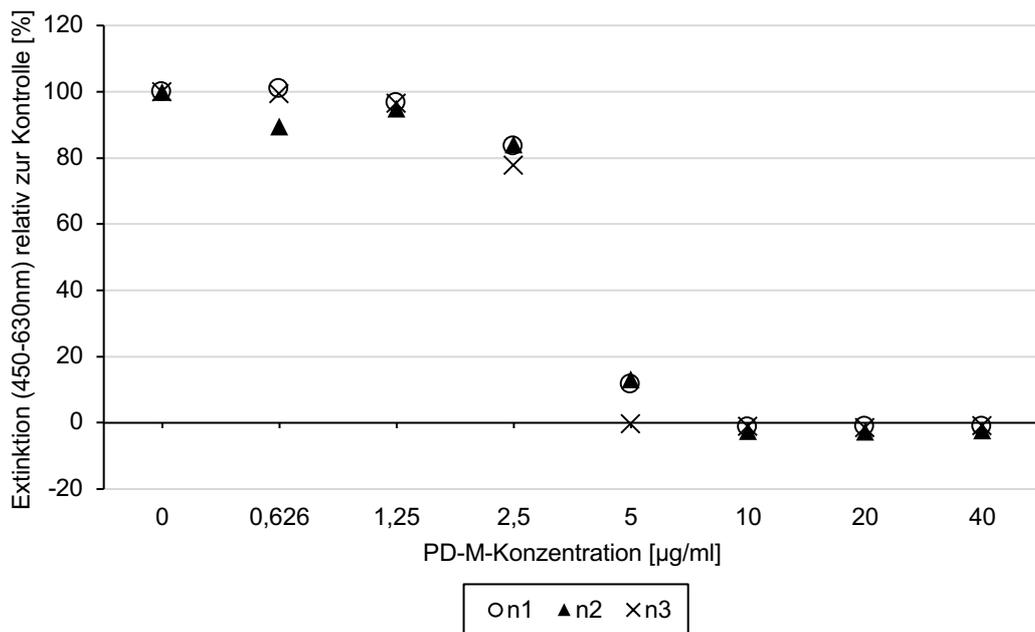


Abbildung 18: PD-M-Langzeit-Toxizitätstest. Nach Behandlung mit PD-M wurden die Saos-2-Zellen für 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

Die Ergebnisse aus Abbildung 18 entsprechen weitestgehend den Werten aus dem Langzeit-Versuch PD-KL (siehe 3.3.3). Die Grenze der Toxizität befindet sich zwischen 2,5 und 5 µg/ml.

PD-M-Kurzzeit-Toxizitätstest:

Die Saos-2-Zellen wurden für 60 Minuten mit PD-M behandelt (Abbildung 19). Die Ergebnisse sind wiederum vergleichbar mit dem Kurzzeittest des PD-KL.

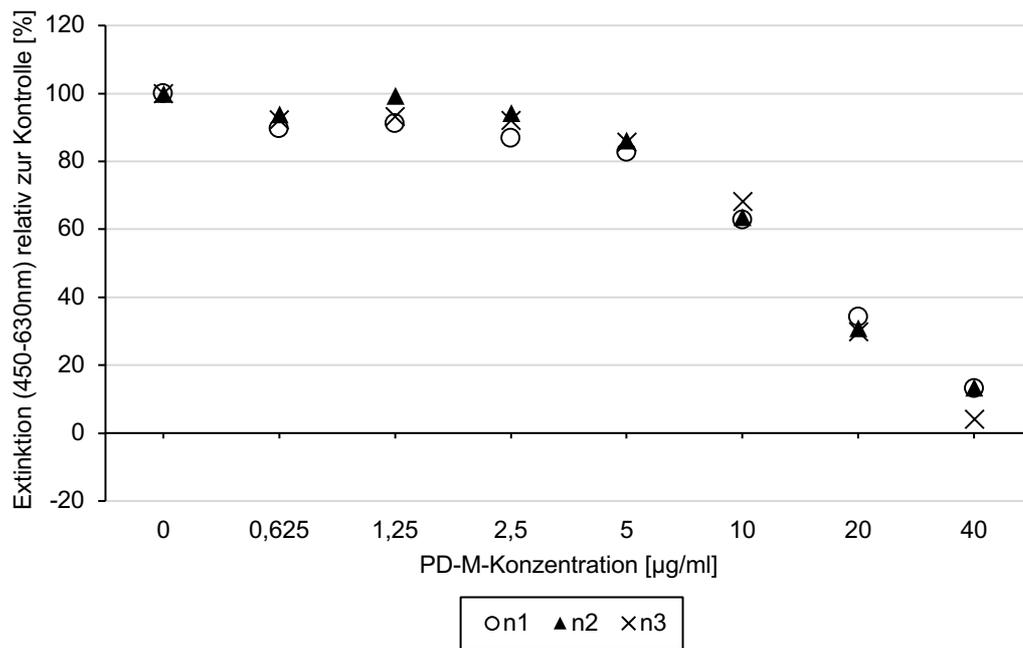


Abbildung 19: PD-M-Kurzzeit-Toxizitätstest. Nach Behandlung mit PD-M wurden die Saos-2-Zellen für 60 Minuten inkubiert. Durch einen WST-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

PD-M-Auswasch-Toxizitätstest (siehe Abbildung 20):

Die Ergebnisse entsprechen annähernd den Versuchen mit PD-KL. Die Toxizitätsgrenze befindet sich im Bereich von 20 µg/ml bis 40 µg/ml.

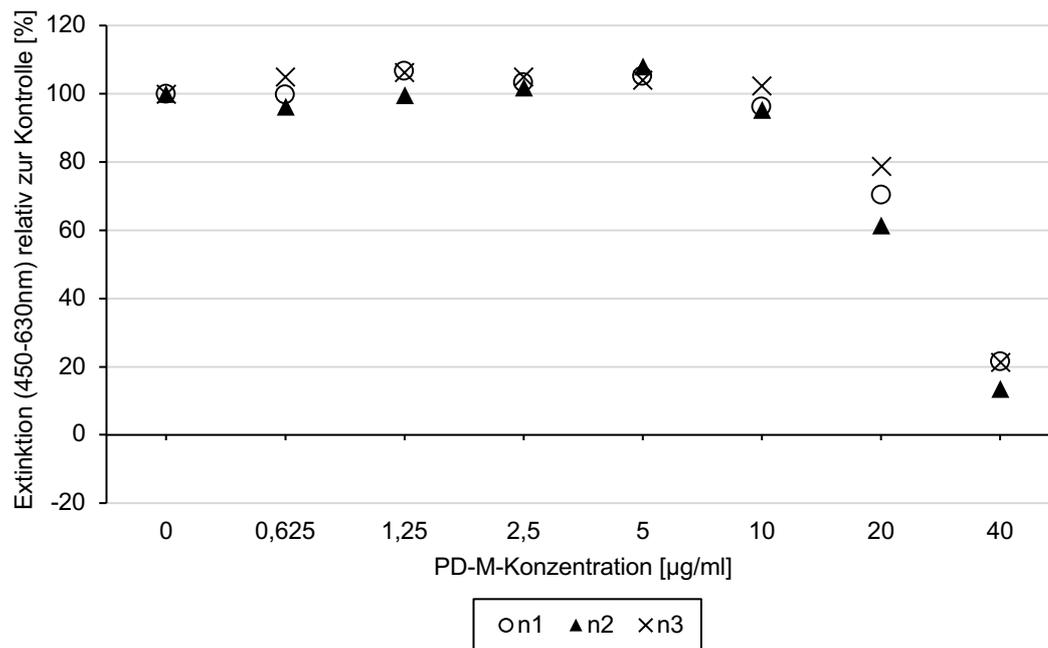


Abbildung 20: PD-M-Auswasch-Toxizitätstest (60 Minuten). Nach Behandlung mit PD-M wurden die Saos-2-Zellen für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde PD-M ausgewaschen und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

Bei dem entsprechenden Auswasch-Versuch mit zehn Minuten liegt die Toxizitätsgrenze außerhalb des Messbereichs (siehe Abbildung 21).

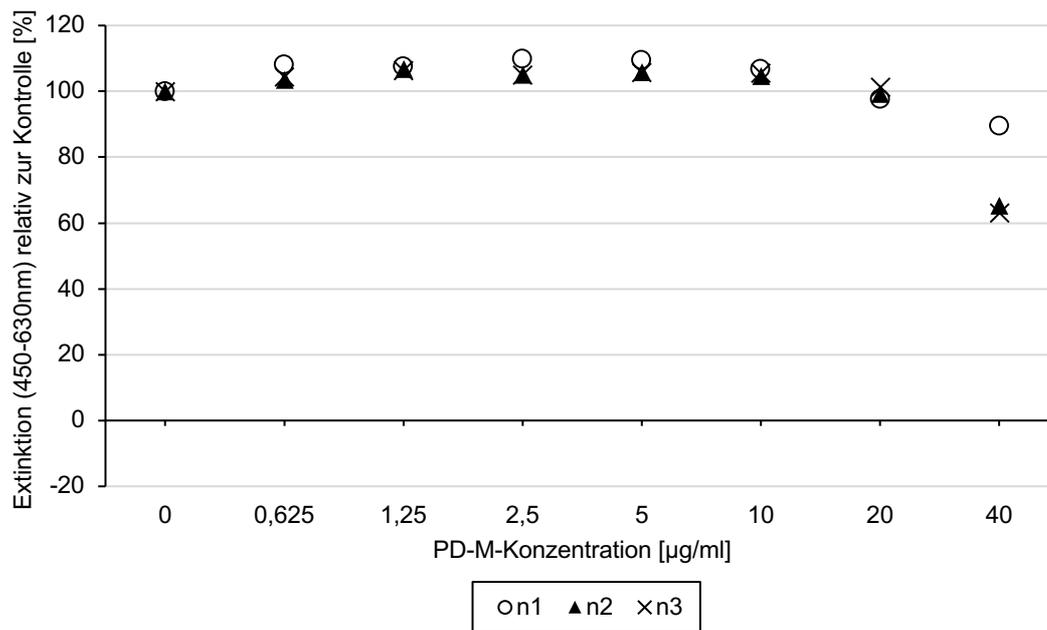


Abbildung 21: PD-M-Auswasch-Toxizitätstest (10 Minuten). Nach Behandlung mit PD-M wurden die Saos-2-Zellen für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde PD-M ausgewaschen und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-1-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

Bei den Auswasch-Versuchen mit den Derivaten PD-KL und PD-M mit 10 Minuten Inkubation konnte die Toxizitätsgrenze nicht bestimmt werden, da diese im Messbereich nicht abgebildet ist. Aus diesem Grund wurden weitere Auswaschversuche durchgeführt. Dabei wurde zum einen ein größerer Konzentrationsbereich untersucht. Zum anderen wurde die Zeitspanne, während dieser mit PD-M behandelt wurde, auf fünf Minuten (Abbildung 22) beziehungsweise zwei Minuten (Abbildung 23) verkürzt, um herauszufinden, welcher Effekt sich daraus in Bezug auf die Vitalität der Saos-2-Zellen ergibt.

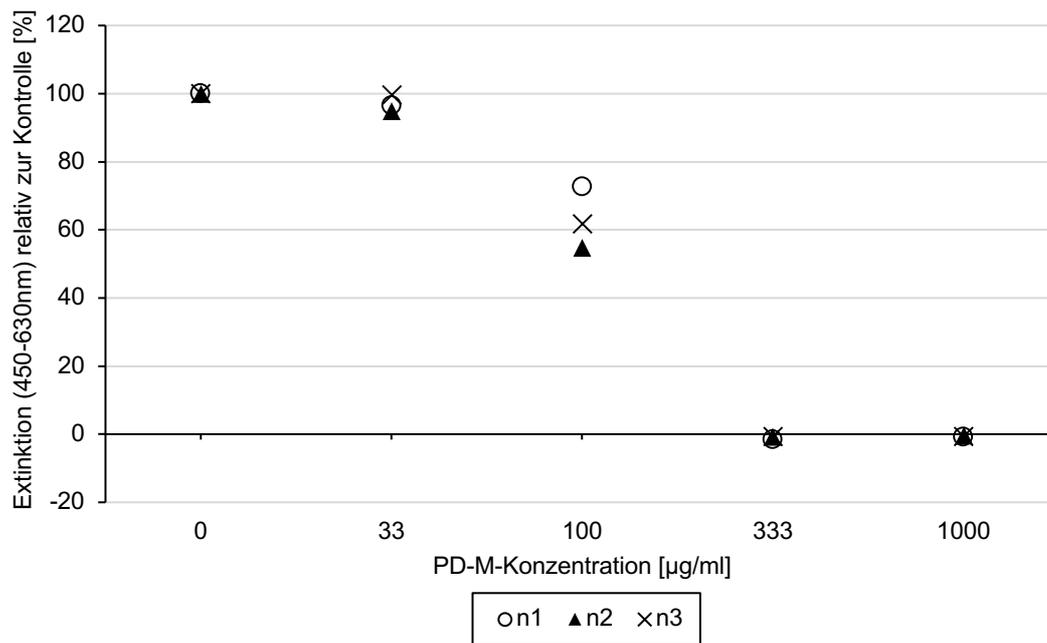


Abbildung 22: PD-M-Auswasch-Toxizitätstest (5 Minuten). Nach Behandlung mit PD-M wurden die Saos-2-Zellen für 5 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde PD-M ausgewaschen und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

Bei den Ergebnissen des fünfminütigen Auswaschversuchs, die in Abbildung 22 aufgeführt sind, zeigt sich, dass die Grenze der Toxizität im Bereich bei 100 µg/ml liegt.

Im Falle einer Behandlung mit PD-M für zwei Minuten (Abbildung 23) befindet sich die Grenze im Bereich von 100 bis 333 µg/ml.

Die Verringerung der Einwirkzeit von PD-M hat somit einen positiven Effekt auf das Überleben der Saos-2-Zellen.

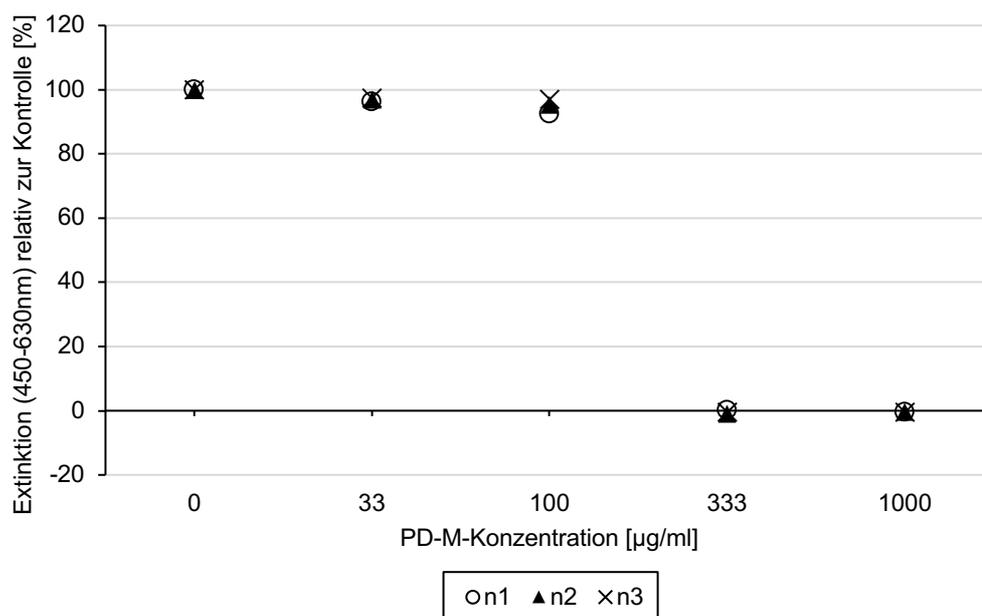


Abbildung 23: PD-M-Auswasch-Toxizitätstest (zwei Minuten). Nach Behandlung mit PD-M wurden die Saos-2-Zellen für zwei Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde PD-M ausgewaschen und die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-1-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

3.3.5 PD-K-Toxizitätstests

Um die Frage zu beantworten, ob die Länge der Alkylketten von Pyrrolidinderivaten einen Einfluss auf die Toxizität hat, wurden weitere Langzeit-Versuche gemacht.

Der Langzeit-Versuch mit PD-K wurde wie zuvor mit einer Einwirkdauer von 72 Stunden durchgeführt. Der darauffolgende WST-Assay ergab, dass die Toxizitätsgrenze bei 20 µg/ml liegt (siehe Abbildung 24). Im Vergleich zu dem Derivat mit mittlerer Kettenlänge (PD-M; 2,5 - 5 µg/ml) scheint das Derivat mit kleinen Kettenlängen (PD-K) also weniger toxisch zu sein.

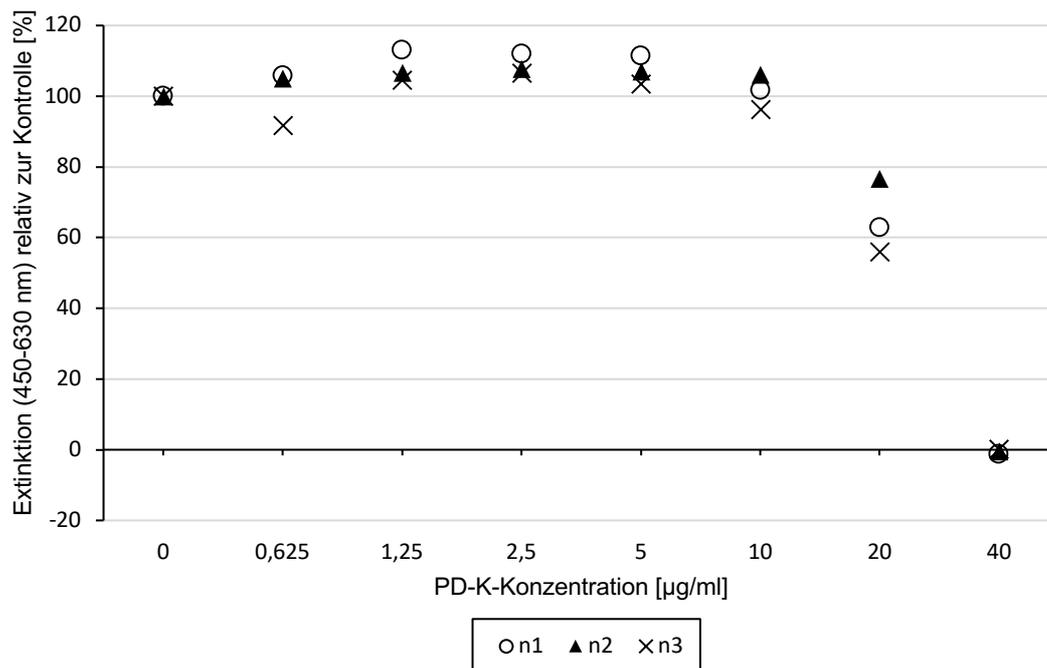


Abbildung 24: PD-K-Langzeit-Toxizitätstest. Nach Behandlung mit PD-K wurden die Saos-2-Zellen für 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-1-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

3.3.6 PD-L-Toxizitätstest

Im Falle des Langzeit-Versuchs mit PD-L war die Toxizitätsgrenze im Bereich zwischen 2,5 und 5 µg/ml feststellbar (siehe Abbildung 25). Diese ist somit der Toxizitätsgrenze beim PD-M-Langzeit-Versuch ähnlich (5 µg/ml).

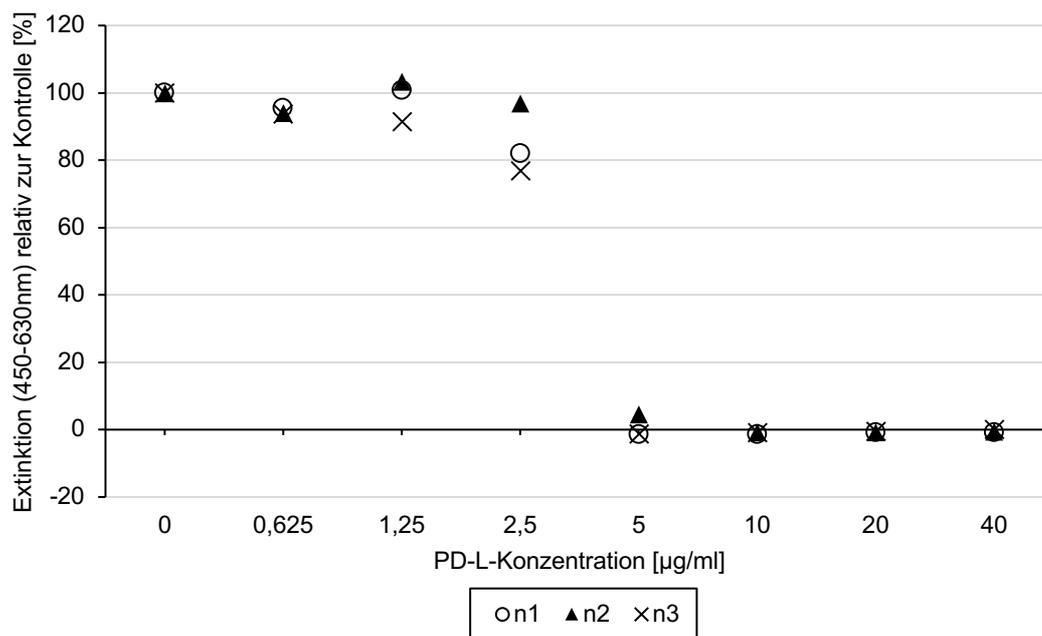


Abbildung 25: PD-L-Langzeit-Toxizitätstest. Nach Behandlung mit PD-L wurden die Saos-2-Zellen für 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-1-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

3.3.7 PD-M-A-Toxizitätstest

Beim PD-M-A-Langzeit-Versuch konnte eine Toxizitätsgrenze von 20 µg/ml bis 40 µg/ml festgestellt werden (siehe Abbildung 26). Somit weist das Derivat PD-M-A beim Langzeit-Versuch von allen Pyrrolidinderivaten die geringste Toxizität auf.

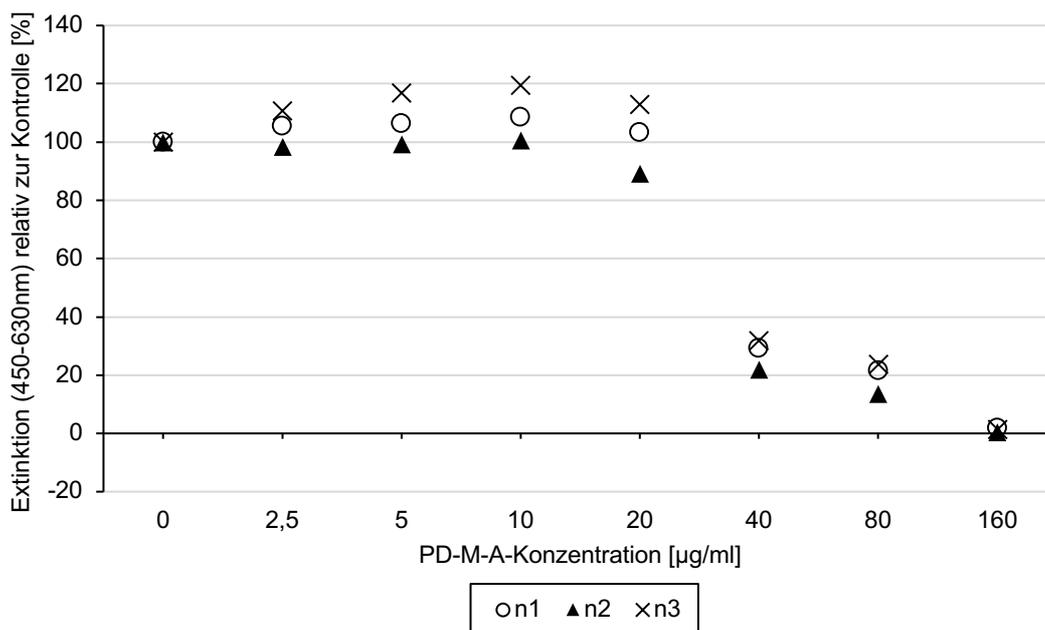


Abbildung 26: PD-M-A-Langzeit-Toxizitätstest. Nach Behandlung mit PD-M-A wurden die Saos-2-Zellen für 72 Stunden inkubiert. Durch einen WST-1-Assay wurde die Zellzahl bestimmt. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Werte sind nicht normalverteilt.

3.4 Enzym-Inhibition

Die Untersuchung von Pyrrolidinderivaten in Bezug auf die Eigenschaft, Enzyme zu inhibieren, stellt die zweite große Komponente dieser Arbeit dar. Da die Toxizitätsversuche an Saos-2-Zellen gemacht worden sind, wurde diese Zelllinie auch bei den Experimenten zur Enzym-Inhibition verwendet. Wie in der Einleitung beschrieben, sezernieren Saos-2-Zellen zahlreiche Enzyme wie zum Beispiel alkalische Phosphatase (ALP) und Metalloproteinasen. In der Zellkultur können diese Enzyme aus dem Überstand der Zellen bestimmt werden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse von Experimenten aufgeführt, welche den Effekt der Enzym-Inhibition von Pyrrolidinderivaten sowohl auf den Überstand der Zellen als auch auf einzelne ausgewählte Enzyme zeigen.

3.4.1 Alkalische Phosphatase-Inhibition

Zur besseren Durchführbarkeit der Versuche wurde bei dieser Arbeit eine kommerziell erworbene Form der ALP verwendet. Diese ist als „standard solution“ im Kit des ALP-Assays vorhanden (siehe 2.5.2).

Bei diesem Versuch wurde ALP in einer Mikrotiterplatte mit verschiedenen PD-KL-Konzentrationen verdünnt. Die Endkonzentration der ALP betrug in jedem Well 100 mU/ml.

Nachdem die Platte für 60 Minuten bei 24 °C inkubiert worden ist, wurde die Extinktion mit einem ELISA-Reader bestimmt.

Die Ergebnisse der ALP-Inhibitionsversuche waren nicht verwertbar. Es ist anzunehmen, dass Komponenten des ALP-Kits mit den Pyrrolidinderivaten reagierten, was zu nicht validen Ergebnissen führte.

3.4.2 Kollagenase-Inhibition

Kollagenasen sind Proteasen, welche Peptidbindungen zwischen Prolin und anderen Aminosäuren spalten. Sie könnten folglich durch einen FRET-basierten Endopeptidase-Assay bestimmt werden. Bei diesem Versuch wurde die kommerziell erworbene Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* verwendet, um eine reine und standardisierte Substanz für den ersten Enzyminhibitionsversuch einzusetzen. Es wurde dabei vorgegangen, wie in 2.5.4 beschrieben.

Aus den Messwerten von Minute 1 bis 10 wurde eine Steigung berechnet, welche im Anschluss relativ zur Kontrolle genommen wurde. Zum Schluss wurden die relativen Steigungen von drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

An den Ergebnissen (siehe Abbildung 27) ist zu erkennen, dass 75% der Kollagenaseaktivität im Bereich zwischen 1000-2500 µg/ml inhibiert wurde. Ab einer Konzentration von 10.000 µg/ml ist die Enzymaktivität dann vollständig inhibiert.

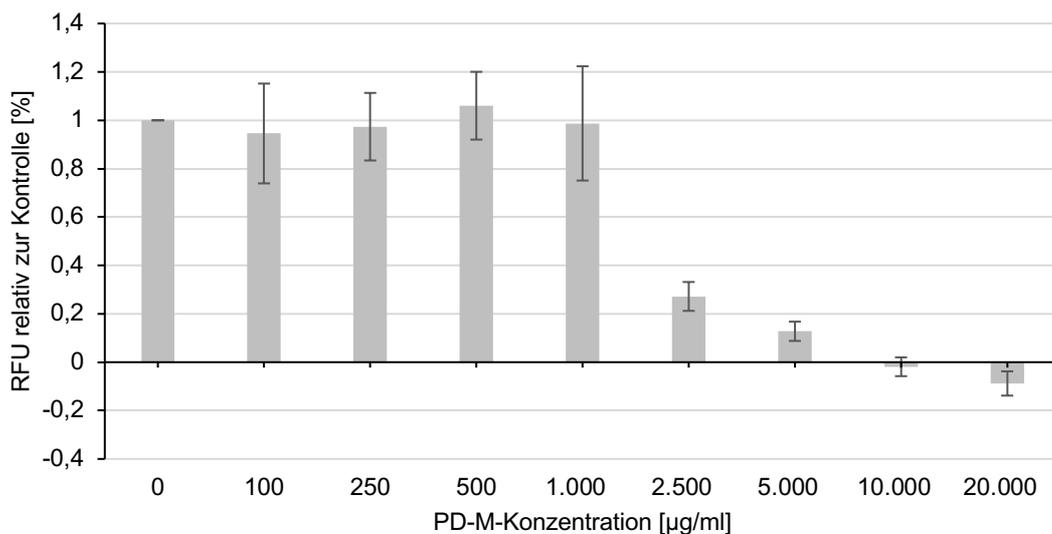


Abbildung 27: Inhibition von Kollagenase. Unter Verwendung eines FRET-basierten Endopeptidase-Assays wurde der Inhibitionseffekt von PD-M auf Kollagenase getestet. Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Fehlerbalken zeigen $MW \pm STD$ an. RFU: Relative Fluorescence Units

3.4.4 Überstand-Inhibition

Saos-2-Zellen geben hauptsächlich Metalloproteinasen in den Überstand ab. Dieser wurde gesammelt, konzentriert (siehe 2.7.4) und als Substrat für den FRET-basierten Endopeptidase-Assay verwendet.

In gleicher Weise wie beim Kollagenase-Versuch wurde ein Mittelwert aus den relativen Steigungen berechnet.

Es zeigt sich, dass die stärkste Inhibition der Proteasen aus dem Überstand im Bereich um die Konzentration von 250 – 1.000 µg/ml stattfindet (siehe Abbildung 28). Dabei fällt auf, dass es Messwerte gibt, die deutlich höher als die Kontrolle oder auch negativ sind. Am ehesten ist dies auf Störungen des Messsystems zurückzuführen, weil sich im Überstand der Saos-2-Zellen neben Metalloproteinasen weitere Substanzen befinden, welche die Messung der Fluoreszenz beeinflussen können. Da sich die Messwerte der drei höchsten Konzentration deutlich im negativen Bereich befinden, kann keine absolute Aussage gemacht werden, bei welcher Fluoreszenzintensität die Enzyme komplett inhibiert wurden.

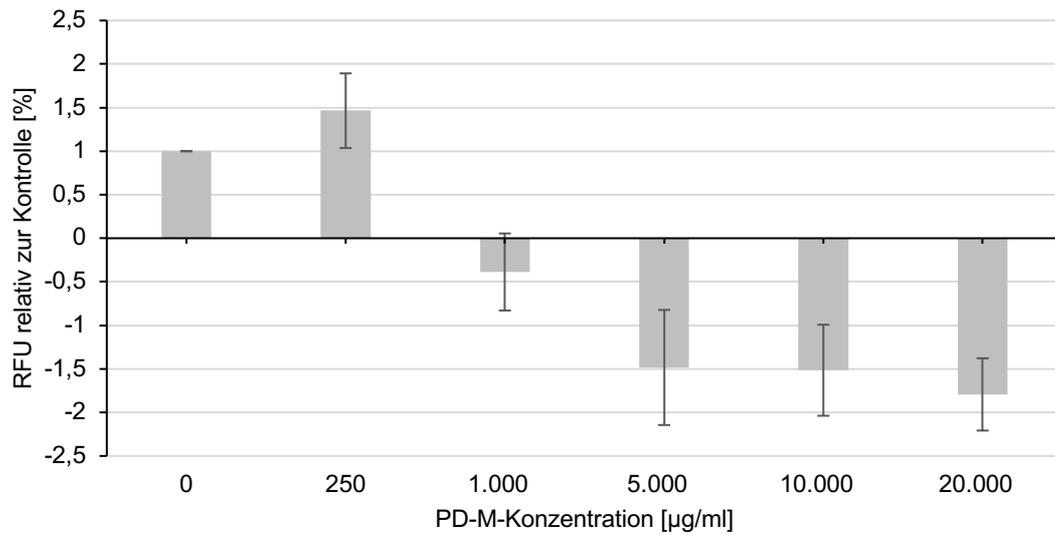


Abbildung 28: Inhibition der Saos-2-Überstände. Unter Verwendung eines FRET-basierten Endopeptidase-Assays wurde der Inhibitionseffekt von PD-M auf Saos-2-Überstände getestet. Es wurde drei unabhängige Versuche durchgeführt (n=3). Die Fehlerbalken zeigen $\text{MW} \pm \text{STD}$ an. RFU: Relative Fluorescence Units

4 Diskussion

4.1 Biosicherheit und Arbeitsschutz

Biozide unterliegen in der europäischen Union der Biozidverordnung, welche die Zulassung und die Verwendung von Biozidprodukten regelt (Verordnung (EU) Nr. 528/2012 2012). Darin ist ein Biozid definiert als „jeglicher Stoff oder jegliches Gemisch [...], der/das dazu bestimmt ist, auf andere Art als durch bloße physikalische oder mechanische Einwirkung Schadorganismen zu zerstören, abzuschrecken, unschädlich zu machen, ihre Wirkung zu verhindern oder sie in anderer Weise zu bekämpfen“ (Verordnung (EU) Nr. 528/2012 2012).

Unter diese Verordnung fallen in der Kategorie „Biozide“ auch Substanzen zur Fixierung von Leichnamen. Laut der Biozidverordnung (EU) 528/2012, die am 1. September 2013 in Kraft trat, dürfen Biozide in Europa nur dann für das Einbalsamieren verwendet werden, wenn Sie in Produktart 22 „Flüssigkeiten für Einbalsamierung und Taxidermie“ eingetragen sind. Außer Formaldehyd sind die aktuell gelisteten Substanzen (Bronopol, vier quartäre Ammoniumverbindungen (ADBAC) und zwei Jodverbindungen) nicht für die Fixierung und Konservierung von Körpern, Organen und Geweben geeignet. Darüber hinaus an den anatomischen Instituten verwendete, nicht in der Produktart 22 gelistete Stoffe dürfen außerhalb der experimentellen Forschung nicht eingesetzt werden.

Nach Formaldehyd gehören Alkohole zu den am häufigsten verwendeten Fixierungsmethoden (Batra *et al.* 2010). Vor allem Ethanol wird sowohl als alleiniges Fixans, als auch in Kombination mit anderen Alkoholen verwendet, beispielsweise Glycerin (Hammer *et al.* 2012) oder Phenol (Brenner 2014). Dies ist als problematisch anzusehen, denn es gibt keine rechtliche Grundlage für den Einsatz von Alkoholen zur Fixierung. Weitere in der Anatomie verwendeten Fixanzien sind davon ebenfalls betroffen.

Ein relevantes Dilemma ist dadurch entstanden, dass Formaldehyd zusätzlich zu seinen bekannten toxischen Eigenschaften (siehe Tabelle 8) in Europa

rechtsverbindlich seit Januar 2016 als humankanzerogen (Carc. 1B) und keimzellschädigend (Muta. 2) eingestuft ist (Verordnung (EU) Nr. 2015/491 2015). Bereits im Jahr 2004 hatte eine Arbeitsgruppe der International Agency for Research on Cancer (IARC) Formaldehyd als für den Menschen krebserzeugend klassifiziert (IARC Monographs Vol. 88 2006).

Tabelle 8: Einstufung und Kennzeichnung von Formaldehyd entnommen aus „Thullner et al. (2016)“.

Einstufung (Gefahrenklasse, Gefahrenkategorie)	Gefahrenhinweise (H-Satz)	Piktogramm Signalwort
Kanzerogenität, Kategorie 1B (bisher Kanzerogenität Kategorie 2)	H350: Kann Krebs erzeugen	
Keimzellmutagenität, Kategorie 2 (bisher nicht eingestuft)	H341: Kann vermutlich genetische Defekte verursachen	
Akute Toxizität, Kategorie 3, Einatmen*	H331: Giftig bei Einatmen	
Akute Toxizität, Kategorie 3, Hautkontakt*	H311: Giftig bei Hautkontakt	
Akute Toxizität, Kategorie 3, Verschlucken*	H301: Giftig bei Verschlucken	
Ätzwirkung auf die Haut, Kategorie 1B	H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden	
Sensibilisierung der Haut, Kategorie 1	H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen	
* Mindesteinstufung		„Gefahr“

In Zukunft könnte folglich eine Verwendung von Formaldehyd-basierten Produkten für die Konservierung von biologischen Geweben wie humanen Körperpräparaten nur mit erheblichen Einschränkungen verbunden sein oder verboten werden. Für die Fixierung ist Formaldehyd derzeit nur aufgrund einer Übergangsfrist für sogenannte Altwirkstoffe noch einsetzbar. Die Neubewertung von Formaldehyd soll bis zum Jahr 2025/2026 abgeschlossen sein. Sollte Formaldehyd zur Konservierung von Leichen verboten werden, ist ein unbedenklicher Ersatzstoff erforderlich, der eine Langzeitfixierung von Körperspendern ermöglicht.

Die maximale Arbeitsplatzkonzentration für Formaldehyd in Deutschland wurde im Jahr 2015 von 0,62 mg/m³ auf 0,37 mg/m³ herabgesetzt (Technische Regel für Gefahrstoffe: Arbeitsplatzgrenzwerte (TRGS 900) 2019). Der neue Arbeitsplatzgrenzwert (AGW) ist von vielen anatomischen Instituten nur schwer zu erreichen (Thullner *et al.* 2016), weshalb an einzelnen anatomischen Instituten der Präparierkurs aktuell ausgesetzt werden muss (Waschke 2016). Als Maßnahme werden in den anatomischen (und auch pathologischen) Instituten kostenintensive technische Lösungen wie aufwendige Lüftungsanlagen geplant und durchgeführt. Bei den Schutzmaßnahmen ist in Deutschland durch die Gefahrstoffverordnung (GefStoffV) eine im Arbeitsschutz als STOP-Prinzip (siehe Abbildung 29) bekannte Rangfolge festgelegt: Vor der Durchführung technischer Maßnahmen (T) steht die Substitution (S) eines Gefahrstoffes (Verordnung zum Schutz vor Gefahrstoffen 2017).

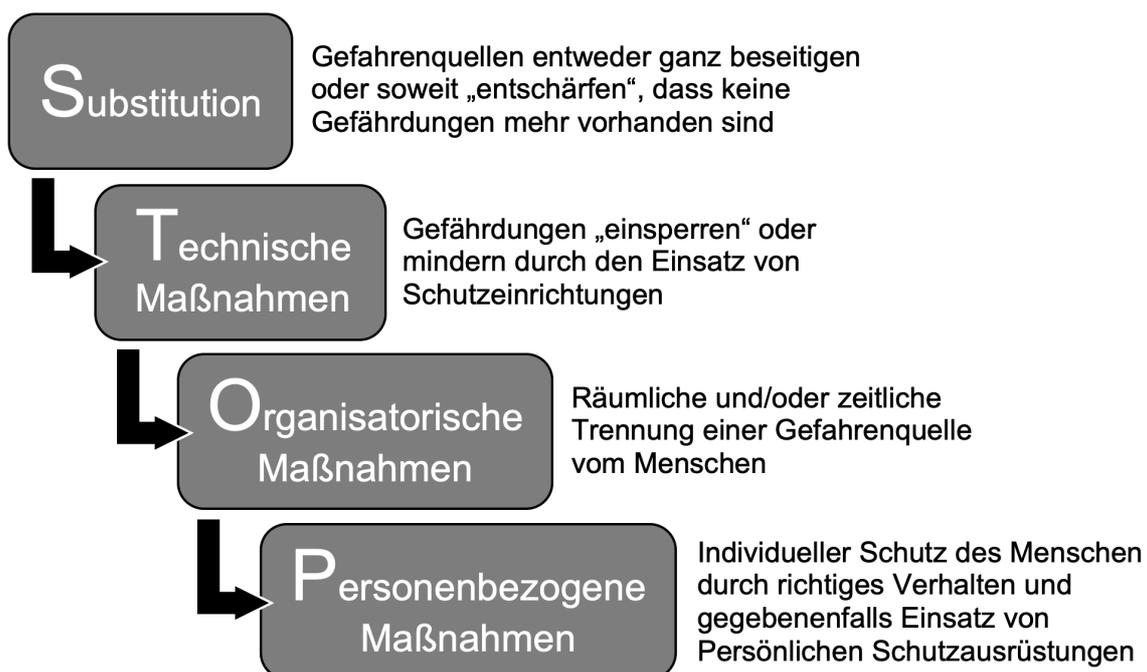


Abbildung 29: Das STOP-Prinzip. Das Stop-Prinzip definiert eine festgelegte Rangfolge von Arbeitsschutzmaßnahmen. Zeichnung angelehnt an „Prävention aktuell (2018)“.

Mit der Verfügbarkeit eines sicheren Formaldehyd-Substituts am Markt würden technische Umsetzungen obsolet. Organisatorische (O) und personelle (P) Maßnahmen könnten entfallen.

Eine völlig neue Chemikalie zur Substitution von Formaldehyd stellen Pyrrolidinderivate dar, die am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Eberhard Karls Universität Tübingen für die Verwendung als fixierende Verbindungen entdeckt wurden.

Die Charakterisierung dieses neuen Fixanz in Bezug auf Biosicherheit steht bisher noch aus. Die hier aufgeführten Toxizitätstests stellen eine Basis für weitere Untersuchungen dar, um die sicherheitsrelevanten Aspekte von Pyrrolidinderivaten am Arbeitsplatz zu bewerten.

4.2 Toxizitätstests

Bei dieser Arbeit wurden Zytotoxizitätstests vor allem zur Bestimmung der Toxizitätsgrenzen von Pyrrolidinderivaten herangezogen. Bevor die Ergebnisse näher analysiert werden, ist die Bedeutung von Zytotoxizitätsversuchen bei der Entwicklung von neuen Produkten im Folgenden näher beschrieben.

4.2.1 Bedeutung von Zytotoxizitätstests

Toxikologische Untersuchungen werden durchgeführt, um mögliche Gesundheitsrisiken von Substanzen auf den Menschen, Tiere oder die Umwelt abzuschätzen (Bundesamt für Risikobewertung 2019). Neben der Testung von „Akuter Toxizität“ stehen hierfür eine Vielzahl von weiteren Studientypen zu Verfügung (Haut- und Augenreizung, Genotoxizität, Kanzerogenität, Neurotoxizität, etc.). Wie diese im Einzelnen zu erfolgen haben ist in der „Verordnung (EG) Nr. 440/2008 (2008)“ und in der „Biozidverordnung (EU) 528/2012“ aufgeführt.

Bei toxikologischen Tests werden entweder Zellkulturen (*in vitro*), Tierversuche (*in vivo*) oder Struktur-Wirkungs-Beziehungen (quantitative Beziehung zwischen

der Wirkung eines Moleküls und seiner chemischen Struktur) herangezogen (Bundesamt für Risikobewertung 2019).

Es gibt diverse Gründe, *In-vitro*-Modelle Tierversuchen vorzuziehen. Als Hauptgrund ist der Tierschutz zu nennen (§ 7 TierSchG). Hierfür beschreibt das 3R-Prinzip („Reduce, Refine, Replace“) den Einsatz von alternativen Strategien, um die Anzahl von Labortieren zu reduzieren und die existierenden Methoden zu modifizieren, damit das Leid und der Schmerz der Tiere verringert werden kann (siehe Abbildung 30)(Kirk 2018). Das 3R-Prinzip wurde 1959 von William Russel und Rex Burch in ihrem Buch „The Principles of Human Experimental Technique“ beschrieben und war das erste wegweisende und noch heute aktuelle Prinzip für Tierethik und Tierschutz (Russell und Burch 1959).

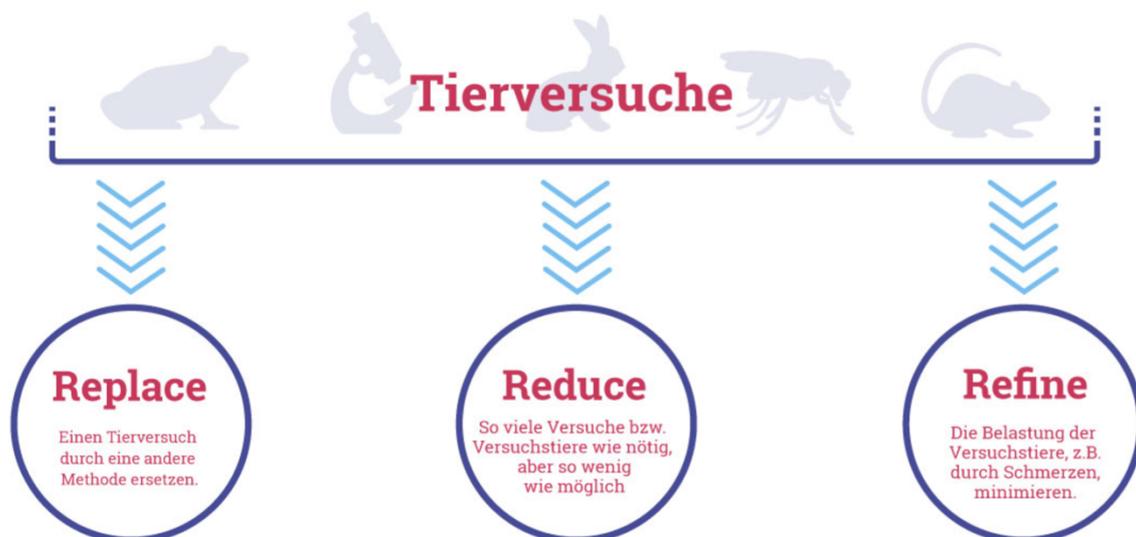


Abbildung 30: Die 3R-Prinzipien beschreiben Maßnahmen, um Tierversuche vollständig zu vermeiden (**R**eplacement), die Zahl der Tiere (**R**eduction) und ihr Leiden (**R**efinement) zu beschränken. Quelle: Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (2015)

Weitere Vorteile von *in vitro*-Modellen sind die einfache Durchführbarkeit von zytotoxischen Tests und die Genauigkeit bei der Identifikation von Endpunkten (Zucco *et al.* 2004), denn Tierversuche haben eine verringerte Aussagekraft bei der Definition von akuter Toxizität (Ekwall *et al.* 1998).

Das einfachste und am häufigsten verwendete *In-vitro*-Modell für Toxizität ist die Zellkultur (Zucco *et al.* 2004). Hierbei liegen die Vorteile auf der Hand. Mit geringen ethischen Bedenken können Zellkulturen jeder Art über längere Zeit

kultiviert werden. Darüber hinaus führen bei Zellkulturen geringere experimentelle Abweichungen zu statistisch signifikanten Ergebnissen, einem besseren Verständnis von molekularen Mechanismen, geringeren Kosten und Zeitersparnis (Allen *et al.* 2005). Da Zellkulturen ein sehr simples System sind, ist es jedoch nicht möglich, systemische toxikologische Effekte zu untersuchen, sondern nur spezifische Tests durchzuführen (Dhawan und Kwon 2018). Das liegt unter anderem daran, dass *In-vivo*-Faktoren wie zum Beispiel Metabolismus, Wirkstoff-Modifikation (durch Leber, Niere und andere Organe) und immunologische Effekte der Test-Substanz nicht berücksichtigt werden können (Yang und Xiong 2012). Außerdem durchlaufen viele Zelllinien im Gegensatz zur *In-vivo*-Situation nicht alle Stufen der Entwicklung, Differenzierung und des Alterns (Tiffany-Castiglioni *et al.* 1999). Es ist also festzuhalten, dass sich aus *In-vitro*-Tests gewonnene Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf die *In-vivo*-Situation übertragen lassen.

Außerdem ist zu bedenken, dass *In-vitro*-Systeme die akute Toxizität, aber nicht die chronischen Auswirkungen der getesteten Substanz detektieren (Yang und Xiong 2012).

Bei der Zellkultur kommen am häufigsten immortalisierte (= etablierte) Zelllinien zum Einsatz (Zucco *et al.* 2004), so auch bei dieser Arbeit in Form von Saos-2-Zellen. Immortalisierte Zellen wurden entweder von einem Tumor isoliert oder wurden mit Hilfe eines Virus potentiell unsterblich gemacht (Maqsood *et al.* 2013). Neben den bereits aufgeführten Vorteilen von Zellkulturen haben Zelllinien den weiteren Vorteil, dass sie homogene und genetisch identische Populationen sind und deshalb reproduzierbarere Ergebnisse liefern (Kaur und Dufour 2012). Da sie weltweit von vielen Laboren verwendet werden, sind sie sehr gut charakterisiert und können sehr standardisiert eingesetzt werden.

Ein Nachteil ist, dass die serielle Passage über einen längeren Zeitraum infolge des genetischen Drifts zu phänotypischen und genotypischen Variationen führen kann (Hughes *et al.* 2007). Aus diesem Grund können die Eigenschaften von Zelllinien mit der Zeit sehr stark von ihren ursprünglichen primären Zellen abweichen (Kaur und Dufour 2012). Ein weiteres Problem von Zelllinien ist ihre Kontamination mit anderen Zellen oder Mykoplasmen (Capes-Davis *et al.* 2010).

Bei dieser Arbeit wurde die weit verbreitete Zelllinie Saos-2 verwendet, weil über Saos-2-Zellen bekannt ist, dass sie alkalische Phosphatase und Metalloproteinasen sezernieren (siehe 1.7). Die Tatsache, dass Saos-2 eigentlich Osteosarkomzellen sind, spielt hierbei keine Rolle.

4.2.2 Kritische Betrachtung des WST-1-Assays

In der vorliegenden Arbeit wurde der WST-1-Assay genutzt, um über die metabolische Aktivität der Kulturen auf die Vitalität der Zellen zu schließen und somit die Toxizitätsgrenzen zu bestimmen. Der WST-1-Assay so wie der etwas gebräuchlichere MTT-Assay (Berridge *et al.* 2005) basieren auf der Reduktion von Tetrazoliumsalzen, deren Farbumschlag zur Abschätzung der mitochondrialen Aktivität herangezogen werden kann (siehe 2.5.3). Im Gegensatz zum MTT-Assay bietet der WST-1-Assay jedoch den Vorteil, dass diese Salze nicht ausfallen, sondern in Lösung bleiben (Bernas und Dobrucki 2004). Beim MTT-Assay ist vor der photometrischen Messung ein weiterer Zwischenschritt in Form des Hinzufügens einer Solubilisationslösung (zum Beispiel DMSO) notwendig (Riss *et al.* 2004).

In Bezug auf den WST-1-Assay ist zu diskutieren, ob der photometrisch bestimmte Wert der tatsächlichen relativierten Zellzahl entspricht. Folgende Aspekte müssen in Betracht gezogen werden:

Damit WST-1 zu Formazan reduziert werden kann, wird NADH/H⁺ als Coenzym benötigt. Die Bereitstellung von NADH/H⁺ kann in Abhängigkeit von der Phase des Zellzyklus, in der sich die Zellen befinden, innerhalb und zwischen Zellpopulationen stark variieren (Berridge *et al.* 2005). Darüber hinaus werden vitale Zellen in der G₀-Phase nicht immer von toten Zellen unterschieden (Berridge *et al.* 2005). Aus diesen Gründen wurden die Toxizitätsversuche von Tag 1 bis Tag 4 angelegt, da die Wachstumskurve (siehe Abbildung 6) an diesen Tagen eine stabile Teilungsrates aufweist und sich deshalb die meisten Zellen in der exponentiellen Phase zu befinden scheinen.

Des Weiteren werden im Verlauf des Zellwachstums und damit einhergehender zunehmender Zelldichte die Zellen in der Mikrotiterplatte aneinandergedrängt

(siehe Abbildungen 7,8,9). Dadurch wird ihr Volumen verringert und die Kontaktfläche zwischen den Zellen erhöht. Aus diesem Grund steht weniger Oberfläche zur Verfügung, um Substrate aus dem Zellkulturmedium zu entnehmen. Dies könnte zu einer Abnahme des Zellmetabolismus und konsekutiv verringerten NADH/H⁺-Produktion führen, was möglicherweise eine verminderte Reduktion von WST-1 zu Formazan an der Zelloberfläche bedingen könnte. Wiederum gilt hier, dass unsere Messungen davon am ehesten nicht beeinflusst werden, weil die Zellen an den ersten vier Tagen noch keine relevant hohe Konfluenz erreicht haben.

Bei hoher Konfluenz liegen Zellen nicht nur nebeneinander, sondern auch übereinander (siehe Abbildung 7). Durch die dreidimensionale Anordnung der Zellen könnte der beim WST-1-Assay gemessene Extinktionswert durch Überlagerung von Farben verfälscht werden, da der Strahlengang des ELISA-Readers in vertikaler Ebene verläuft.

In Komplex I der Atmungskette stellt NADH/H⁺ unter anderem die Energie zum Aufbau eines Protonengradienten zur Verfügung, welcher von der ATP-Synthase genutzt wird, um über oxidative Phosphorylierung ATP zu produzieren (Lobo-Jarne und Ugalde 2018). Wenn Zellen untergehen, ist ATP nicht nur eine Voraussetzung für die Apoptose (Leist *et al.* 1997), sondern könnte dabei von diesen vermehrt ausgeschüttet werden (Zamaraeva *et al.* 2005). Folglich könnte es zu einer negativen Abweichung des WST-1-Werts von der tatsächlichen Zellzahl kommen, da eine Überproduktion von ATP während der Apoptose einen erhöhten Verbrauch von NADH/H⁺ zur Folge hat.

Wang *et al.* (2010) verglichen den MTT- und den MTS-Assay, einem weiteren Assay mit Tetrazoliumsalz, mit verlässlichen Ergebnissen von ATP- und DNA-basierten Assays sowie Zellzählungen. Es zeigte sich, dass die Toxizitätsgrenze beim MTT- und MTS-Assay um den Faktor 2 höher war. Dies führen die Autoren auf mögliche Interaktionen der Testsubstanz (Epigallocatechingallat) mit mitochondrialen Enzymen oder den Tetrazoliumsalzen selbst zurück.

4.2.3 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse der Toxizitätstests

Die Toxizitätstests wurden herangezogen, um Toxizitätsgrenzen von ausgewählten Pyrrolidinderivaten zu bestimmen. Bei allen Versuchen wurden dabei Saos-2-Zellen zuerst für 24 Stunden inkubiert, bevor sie für unterschiedlich lange Zeiträume mit verschiedenen Pyrrolidinderivaten behandelt wurden. Dieses Vorgehen kann als etabliert bezeichnet werden, weil es von vielen anderen Autoren in ähnlicher Weise bei Zytotoxizitätstests publiziert wurde (He *et al.* 2018) (Kim *et al.* 2003).

Nach Auswertung der Ergebnisse lassen sich folgende Aussagen für die Toxizitätstests ableiten:

Es konnte kein „Auswasch“-Effekt (siehe 2.5.1) festgestellt werden.

Die ermittelten Toxizitätsgrenzen der Kurzzeit-Versuche (sowohl PD-KL als auch PD-M) waren vergleichbar mit den Ergebnissen der Auswaschversuche der entsprechenden Derivate. Es ist also davon auszugehen, dass sich aufgrund der Pyrrolidin-Wirkung gehemmte Zellen nach Inkubation mit frischem Zellkulturmedium nicht wieder regenerieren.

Die Toxizität ist konzentrationsabhängig.

Bei sämtlichen durchgeführten Versuchen war die Toxizität abhängig von den eingesetzten Pyrrolidin-Konzentrationen.

Die Toxizität ist abhängig von der Einwirkzeit.

Abbildung 30 vergleicht den Langzeit-, den Kurzzeit- und zwei Auswaschversuche mit je unterschiedlichen Einwirkzeiten. Obwohl sich der Testaufbau der Langzeit- bzw. Kurzeittests von den Auswaschtests unterscheidet, werden diese an dieser Stelle dennoch verglichen, weil wie oben beschrieben kein Auswasch-Effekt festgestellt werden konnte. Abbildung 30 ist zwar nur ein qualitativer Vergleich, aber es ist ersichtlich, dass die Toxizitätsgrenzen mit der Einwirkzeit korrelieren. Der Auswaschversuch mit 2

Minuten weist dabei die höchste Toxizitätsgrenze auf (100 – 300 µg/ml), der Langzeittest mit 72 Stunden die geringste (2,5 – 5 µg/ml).

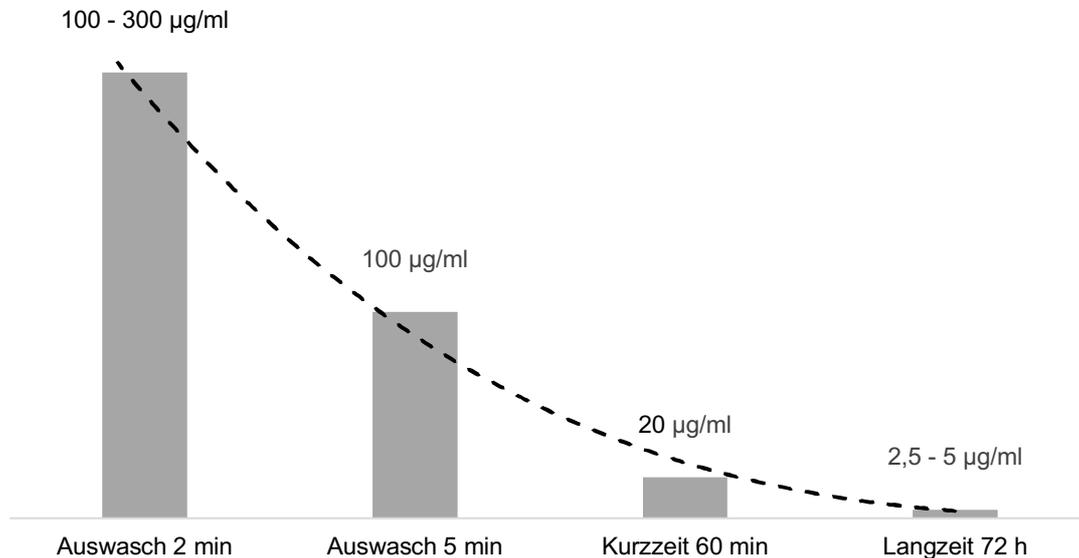


Abbildung 30. Qualitativer Vergleich der Toxizitätsgrenzen des Derivats PD-M bei unterschiedlichen Einwirkzeiten. Zum Aufbau der einzelnen Testmodi siehe 2.5.1. Die Toxizitätsgrenzen sind als Werte über den Balken dargestellt. Die Trendlinie ist potentiell.

Die untersuchten Pyrrolidinderivate haben verschiedene Toxizitätsgrenzen.

Wie in Abbildung 31 zusammengefasst ist, konnten beim Vergleich der Langzeittests aller untersuchten Pyrrolidinderivate unterschiedliche Toxizitätsgrenzen ermittelt werden. PD-L und PD-M weisen mit einer Grenze von 2,5 - 5 µg/ml die höchste Toxizität auf, PD-M-A (20 – 40 µg/ml) und PD-K (20 µg/ml) sind dagegen am wenigsten toxisch.

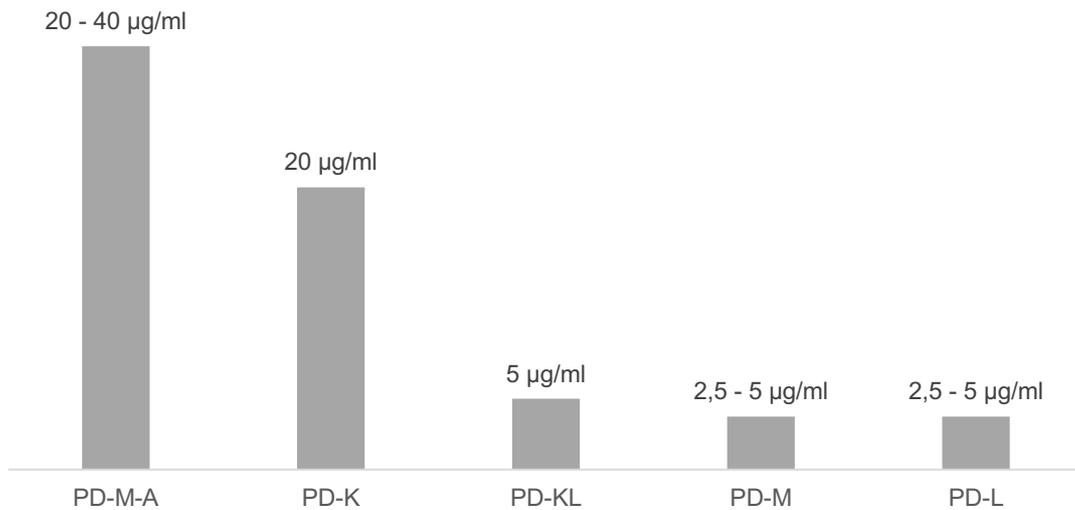


Abbildung 31. Qualitativer Vergleich der Toxizitätsgrenzen der untersuchten Pyrrolidinderivate. Die Toxizitätsgrenzen sind als Werte über den Balken dargestellt.

4.3 Bestätigung der Enzym-inhibitorischen Wirkung

Im Zuge dieser Arbeit konnte beim Inhibitionsversuch mit Kollagenase eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 1000-2500 µg/ml ermittelt werden (siehe Abbildung 27). Diese Ergebnisse stützen die These, dass der fixierende Effekt von Pyrrolidinderivaten auf der Inhibition von Enzymen beruht, wodurch der Verwesungsprozess unterbunden und Mikroorganismen gehemmt werden.

Allerdings sind die Zytotoxizitätsgrenzen der entsprechenden Pyrrolidinderivate (2,5 µg/ml – 40 µg/ml) deutlich höher als die Grenze der Enzyminhibition (1000-2500 µg/ml). Das bedeutet im Falle der Zellkultur, dass bei enzyminhibierenden Konzentrationen alle Zellen bereits abgestorben sind. Dies spielt zwar bei der Fixierung von Körperspendern keine große Rolle, da die Zell-Vitalität nicht mehr von Bedeutung ist.

4.4 Vorteile von Pyrrolidinderivaten gegenüber Formaldehyd

Da diese Arbeit sich mit der Zytotoxizität von Pyrrolidinderivaten beschäftigt, liegt es nahe, die Ergebnisse mit der Toxizität von Formaldehyd zu vergleichen.

In der Literatur lassen sich diverse Zytotoxizitätstests von Formaldehyd finden. Die Ergebnisse weichen zum Teil enorm voneinander ab, da sie sich im Hinblick auf die verwendeten Zellen, die Inkubationszeiten und die eingesetzten Assays unterscheiden. Bei zwei Arbeiten jedoch wurden vergleichbare Testmodalitäten verwendet sowohl untereinander, als auch im Vergleich zu dieser Arbeit (Lovschall *et al.* 2003, Marcsek *et al.* 2007). In beidem Fällen wurden Zellkulturen (siehe unten) für 24 h mit Formaldehyd inkubiert und dann mit einem MTT-Assay analysiert. Dieser Inkubationszeit entspricht dem Versuchsaufbau der „Kurzzeitversuche“. Der MTT-Assay ist wie bereits erwähnt dem WST-1-Assay sehr ähnlich und beruht auf demselben Wirkmechanismus (siehe oben). In beiden Fällen wurde Formalin mit Zusatz von 10% Methanol verwendet. Eine Unsicherheit im Vergleich bleibt bestehen, denn bei Marcsek *et al.* (2007) wurden 20 mL MTT für 3 h inkubiert, bei Lovschall *et al.* (2003) ist dies nicht näher beschrieben. Ob sich der Ablauf des MTT-Assays jedoch auf die gemessenen Toxizitätsgrenzen auswirkt, ist fraglich, da die MTT-Messwerte immer relativ zur Kontrolle ausgewertet wurden. Darüber hinaus wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet. Abhängig von diesen zeigten sich folgende Ergebnisse (LD₅₀):

Marcsek *et al.* (2007)

- „VERO“: 160 µM
- „HepG2“: 125 µM
- „MCF-7“: 150 µM

Lovschall *et al.* (2003)

- „Human Pulp Fibroblasts“: 260 µM
- „Human buccal epithelial cells“: 190 µM
- „HeLa“: 160 µM

Bei Marcsek *et al.* (2007) ist zu beachten, dass es sich nur um ungefähre Größen handelt, da die Werte aus einer Graphik abgelesen wurden. Der Durchschnitt alle oben aufgeführten Literatur-Ergebnisse beträgt 174 µM.

Zum Vergleich soll der PD-M-Kurzzeitversuch mit der Toxizitätsgrenze von ungefähr 15 µg/ml herangezogen werden. Umgerechnet ergibt sich eine Stoffmengenkonzentration (Molare Masse von PD-M: 353 g/mol) von 42 µM.

Wenn man diesen Wert nun mit dem durchschnittlichen Ergebnis aus der Literatur vergleicht, zeigt sich für PD-M eine circa 4-fach höhere Toxizität *in-vitro* als für Formaldehyd.

Die Validität der Ergebnisse der Toxizitätstest von Formaldehyd sind jedoch kritisch zu beurteilen, denn Formaldehyd ist zwar gut wasserlöslich (die wässrige Lösung wird auch „Formalin“ genannt), hat aber bei Raumtemperatur einen gasförmigen Aggregatzustand (TOXNET 2015). Es ist also davon auszugehen, dass eine beträchtliche Menge von Formaldehyd bei der Inkubation im Inkubator verdunstet und dass darüber hinaus beim Öffnen des Inkubators verdunstetes Formaldehyd entweichen kann. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass eine viel geringere Konzentration von Formaldehyd bei den oben aufgeführten Versuchen auf die Zellkulturen gewirkt hat und aus diesem Grund die Toxizität deutlich größer ist als angenommen. Um bessere Aussagen im Vergleich der beiden Substanzen treffen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig wie zum Beispiel Messungen am Arbeitsplatz.

Die größte Gefahr, die von Formaldehyd ausgeht, ist aber nicht die akute Toxizität, sondern seine kanzerogene Wirkung. Da Formaldehyd gasförmig ist, kann es durch die Atemwege aufgenommen werden. Nach intensiven Bemühungen in den letzten Jahrzehnten die Evidenz von Formalin-induzierten Tumoren aufzuzeigen, konnte ein erhöhtes Risiko für naso-pharyngeale Tumoren unter anderem am Mausmodell (Swenberg *et al.* 1980, Kerns *et al.* 1983, Monticello *et al.* 1996) und in epidemiologischen Studien (Hauptmann *et al.* 2004) gezeigt werden. Diese Ergebnisse veranlassten die „International Agency for Research on Cancer“ Formaldehyd im Jahr 2004 offiziell als humankanzerogen einzustufen (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2006). Aktuell gibt es keine Hinweise darauf, dass inhaliertes Formaldehyd weiter eindringt als in das nasale respiratorische Epithel

und es besteht keine klare Evidenz für ein erhöhtes Tumorrisiko außerhalb des Nasen-Rachen-Raums (Moeller *et al.* 2011, Swenberg *et al.* 2013).

Es ist also festzuhalten, dass gegenüber Formaldehyd exponierte Personen aufgrund von Verdunstung und konsekutiver Einatmung einer Gefahr ausgesetzt sind, naso-pharyngeale Tumore zu entwickeln.

Bei Pyrrolidinderivaten hingegen ist nicht von einer kanzerogenen Gefährdung durch Inhalation der verdunsteten Substanz auszugehen, da Vorarbeiten in unserem Institut gezeigt haben, dass Pyrrolidinderivate selbst bei Inkubation bei 80 °C nicht ausgasen.

Wie die Ergebnisse der Toxizitätstests dieser Arbeit gezeigt haben, geht von Pyrrolidinderivaten aufgrund der nachgewiesenen toxischen Wirkung eine potentielle Gefährdung für Menschen und Tiere aus. Weitere mögliche Expositionswege bei Anwendung in der Anatomie sind Augen- und Hautkontakt. Insbesondere der Schutz vor einer Absorption durch die Haut bei Kontakt durch Handschuhe ist die wahrscheinlich bedeutendste Maßnahme. Um die Sicherheit von Studenten im Präparationskurs einzuschätzen haben Opitz und Kollegen (Opitz *et al.* 2017) Schweinepräparate mit jeweils Formaldehyd, Ethanol und Phenoxyethanol fixiert und die Durchlässigkeit von Handschuhen verschiedener Materialien getestet. Sie kommen zu dem Schluss, dass nur Einmalhandschuhe aus Nitrilkautschuk einen ausreichenden Schutz für 20 Minuten oder mehr bieten.

Zusammengefasst kann die von Pyrrolidinderivaten ausgehende toxische Gefährdung wahrscheinlich durch das Tragen von geeigneten Einmalhandschuhen und eventuell Spritzschutzbrillen auf ein Minimum reduziert werden.

Ein weiterer Vorteil von Pyrrolidinderivaten gegenüber Formaldehyd ist die Lebensechtheit der fixierten Gewebe, wie Untersuchungen im Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik zeigen. Aufgrund des quervernetzenden Wirkmechanismus haben mit Formaldehyd fixierte Körperspender bekanntermaßen den Nachteil, dass Gewebe und Gelenke sehr starr und unbeweglich sind (Richins *et al.* 1963). Die fixierende Wirkung von

Pyrrolidinderivaten hingegen beruht auf der Entfaltung von Funktionsproteinen. Präparate, die an unserem Institut mit Pyrrolidinderivaten angefertigt wurden, haben ein natürlicheres Aussehen, eine realistischer Haptik und sind deshalb in hohem Maße für den Präparierkurs und andere Lehr-Formate in der Anatomie geeignet.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Um den Einsatz von Pyrrolidinderivaten als Formaldehyd-Substitut in der Anatomie in Bezug auf Biosicherheit und Arbeitsschutz zu bewerten, wurden in der hier vorgelegten Arbeit biotoxische und enzymkinetische Eigenschaften von ausgewählten Pyrrolidinderivaten am Saos-2-Zellkulturmodell mit Hilfe von Zytotoxizitäts- und Enzyminhibitionstests untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Toxizität abhängig von Einwirkzeit und Konzentration ist, und sich je nach Pyrrolidinderivat unterscheidet. Eine Verkürzung der Inkubationszeit und Derivate mit kürzeren Kettenlängen verschieben die Toxizitätsgrenze hin zu höheren Konzentrationen. Unter Beachtung der Löslichkeit müssen deshalb weitere Untersuchungen mit kürzeren Einwirkzeiten und modifizierten Kettenlängen stattfinden, um die Auswirkungen auf die Toxizität differenziert bewerten zu können.

Darüber hinaus konnte der Wirkmechanismus von Pyrrolidinderivaten bei der Fixierung durch Enzyminhibitionstests eines ausgewählten Derivats bestätigt werden. Das Potenzial der Enzyminhibition ist noch bei weiteren Pyrrolidinderivaten und Einwirkzeiten zu prüfen.

Der Vergleich der Ergebnisse der Toxizitäts- mit den Inhibitionstests zeigte, dass sämtliche Zellen nicht mehr vital wären, wenn eine suffizient inhibierende Konzentration vorläge. Es ist jedoch davon auszugehen, dass zum Beispiel Epithelzellen in Zellverbänden wesentlich widerstandsfähiger gegenüber der Toxizität von Pyrrolidinderivaten sind. Da aber nur die akute Toxizität *in vivo* untersucht wurde, können durch die hier beschriebenen Ergebnisse keine

direkten Rückschlüsse auf einen lebenden Organismus gemacht werden. Deshalb sind weiterführende Untersuchungen in der *In-vivo*-Situation notwendig. Bezüglich des Arbeitsschutzes ist es wahrscheinlich, dass Nitril-Einmalhandschuhe als persönliche Schutzmaßnahme beispielsweise für Studenten im Präparierkurs ausreichend sind. Um genauere Aussagen treffen zu können, sind weiterführende Untersuchungen von Kanzerogenität und Toxizität am Arbeitsplatz notwendig.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Pyrrolidinderivate ein großes Potenzial als Substitut für Formaldehyd in der Anatomie aufweisen. Mit dieser Arbeit wurde ein erster Schritt unternommen, die Eigenschaften der Klasse der Pyrrolidinderivate näher zu analysieren, Toxizitätsgrenzen zu definieren und Enzym-Inhibitorische Konzentrationen zu bestimmen. Um abzuschätzen, welche Derivate und welche Zusammensetzungen sich am besten zur Fixierung von Körperspendern eignen, sind zusätzliche Zytotoxizitätstest notwendig. Damit Pyrrolidinderivate als Produkt marktreif werden können, müssen weiterführende *In-vivo*-Toxizitätstests und arbeitsplatzgezogene Untersuchungen stattfinden, um den Arbeitsschutz zu gewährleisten.

5 Zusammenfassung

Das in der Anatomie als Standard-Substanz zur Konservierung von Körperspendern eingesetzte Formaldehyd stellt eine Gefahr für den Anwender dar, weil es neben seinen bekannten toxischen Eigenschaften human-karzinogen ist und deshalb seit 2016 europaweit offiziell als krebserzeugend (Gefahrenklasse 1B) eingestuft ist.

Am Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik der Universität Tübingen wurden Pyrrolidinderivate als Substitut für Formaldehyd entwickelt. Es ist zu vermuten, dass Pyrrolidinderivate den Verwesungsprozess verhindern, indem sie die dafür notwendigen Enzyme der Autolyse und die Enzyme von Mikroorganismen inhibieren.

Um aussagekräftige Informationen in Bezug auf Biosicherheit und Arbeitsschutz von Pyrrolidinderivaten zu erhalten, wurden in der hier vorgelegten Arbeit biotoxische und enzymkinetische Eigenschaften von ausgewählten Pyrrolidinderivaten untersucht.

Dabei wurden am Saos-2-Zellkulturmodell bei mehreren unterschiedlichen Pyrrolidinderivaten Zytotoxizitätstests mit Hilfe des WST-1-Assay zur Ermittlung von Toxizitätsgrenzen durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Enzym-inhibitorischen Eigenschaften von Pyrrolidinderivaten durch einen Alkalischen-Phosphatase-Assay und einen FRET-basierten Endopeptidase-Assay getestet. Bei den Zytotoxizitätstests konnte festgestellt werden, dass die Toxizität abhängig von der Konzentration und der Einwirkzeit ist. Außerdem weisen die untersuchten Pyrrolidinderivate verschiedene Toxizitätsgrenzen auf. Bei Derivaten mit kürzeren Kettenlängen und modifizierter Amin-Gruppe konnte eine geringere Toxizität festgestellt werden.

Des Weiteren konnte die Theorie der Wirkungsweise von Pyrrolidinderivaten durch die Enzym-Inhibitionstests mit Kollagenase weiter untermauert werden.

Trotz der nachgewiesenen toxischen Wirkung von wässrigen Pyrrolidinderivat-Lösungen *in vitro*, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Gefährdung für den Anwender durch das Tragen von geeigneten Einmalhandschuhen und eventuell Spritzschutzbrillen auf ein Minimum reduziert werden kann. Dies ist ein

bedeutender Vorteil im Vergleich zum gasförmigen Formaldehyd, bei dem aufgrund von inhalativer Exposition die Inzidenz von nasopharyngealen Tumoren nachweislich erhöht ist.

Neben den für den Arbeitsschutz wichtigen Erkenntnissen liefert die vorliegende Arbeit darüber hinaus die Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur angestrebten Produkt-Zulassung von Pyrrolidinderivaten als Fixiermittel.

6 Literaturverzeichnis

Allen, D. D., *et al.* (2005). "Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies." Drug Dev Ind Pharm **31**(8): 757-768.

Anderson, S. D. (2006). "Practical light embalming technique for use in the surgical fresh tissue dissection laboratory." Clin Anat **19**(1): 8-11.

Ayobian-Markazi, N., *et al.* (2012). "Comparison of cell viability and morphology of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) seeded on various bone substitute materials: An in vitro study." Dent Res J (Isfahan) **9**(1): 86-92.

Balta, J. Y., *et al.* (2015). "Human preservation techniques in anatomy: A 21st century medical education perspective." Clin Anat **28**(6): 725-734.

Batra, A. P. S., *et al.* (2010). "Embalming and other methods of dead body preservation." International Journal of Medical Toxicology and Legal Medicine **Vol. 12 No. 3**.

Bauvois, B. (2012). "New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression." Biochim Biophys Acta **1825**(1): 29-36.

Bedino, J. H. (1994). "Phenol exposure in embalming rooms: part 1." Champion Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices **621**: 2498–2500.

Bedino, J. H. (2003). "Embalming chemistry: glutaraldehyde versus formaldehyde." Champion Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices **649**: 2614–2632.

Bedino, J. H. (2005). "Phenol versus formaldehyde as an exposure hazard in embalming: myths and reality." Champion Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices **653**: 2672.

Benkhadra, M., *et al.* (2011). "Is Thiel's embalming method widely known? A world survey about its use." Surg Radiol Anat **33**(4): 359-363.

Bernas, T. und J. W. Dobrucki (2004). "Backscattered light confocal imaging of intracellular MTT-formazan crystals." Microsc Res Tech **64**(2): 126-134.

Berridge, M. V., *et al.* (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." Biotechnol Annu Rev **11**: 127-152.

Binawara B, R. C., Mathur K, Sharma H, Goyal K (2010). "Acute effect of formalin on pulmonary function tests in medical students." Pak J Physiol **6:8–10**.

BioAssay Systems (2009). "QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit." URL: <https://www.bioassaysys.com/Datasheet/DALP.pdf> (zuletzt aufgerufen am 26.04.2019)

Brenner, E. (2014). "Human body preservation - old and new techniques." J Anat **224**(3): 316-344.

Bundesamt für Risikobewertung (2019). "Toxikologische Beurteilung von chemischen Stoffen." URL: https://www.bfr.bund.de/de/toxikologische_beurteilung_von_chemischen_stoffen-70287.html (zuletzt aufgerufen am 22.06.2019)

Capes-Davis, A., *et al.* (2010). "Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines." Int J Cancer **127**(1): 1-8.

Coleman, J. E. (1992). "Structure and mechanism of alkaline phosphatase." Annu Rev Biophys Biomol Struct **21**: 441-483.

Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (2015). "Die 3R-Prinzipien bei Tierversuchen." URL: <https://www.tierversuche-verstehen.de/das3rprinzip/> (zuletzt aufgerufen am 30.06.2019)

Dhawan, A. und S. Kwon (2018). In Vitro Toxicology. London, United Kingdom, Elsevier/Academic Press.

Ekwall, B., *et al.* (1998). "MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity: Part V. Rodent and Human Toxicity Data for the 50 Reference Chemicals." Altern Lab Anim **26 Suppl 2**: 571-616.

EU Chemicals Agency (2019). URL: <https://echa.europa.eu/de/> (zuletzt aufgerufen am 12.10.2019)

Evans (1963). "The Chemistry of Death." Charles C. Thomas, Springfield, IL, USA.

Ezugworie J, A. C., Ozoemena R (2009). "Trends in the development of embalming methods." Internet J Altern Med **7** doi: **10.5580/29b**.

Fogh, J., *et al.* (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." J Natl Cancer Inst **59**(1): 221-226.

Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Ann. Physik **437**: 55.

Fraenkel-Conrat, H. und H. S. Olcott (1948). "The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups." J Am Chem Soc **70**(8): 2673-2684.

Frolich, K. W., *et al.* (1984). "Phenoxyethanol as a nontoxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical specimens for dissection and demonstration purposes." Anat Rec **208**(2): 271-278.

Goyri-O'Neill, J., *et al.* (2013). "Improvement of the embalming perfusion method: the innovation and the results by light and scanning electron microscopy." Acta Med Port **26**(3): 188-194.

Guimaraes da Silva, R. M., *et al.* (2004). "Preservation of cadavers for surgical technique training." Vet Surg **33**(6): 606-608.

Hammer, N., *et al.* (2012). "Ethanol-glycerin fixation with thymol conservation: a potential alternative to formaldehyde and phenol embalming." Anat Sci Educ **5**(4): 225-233.

Hauptmann, M., *et al.* (2004). "Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries." Am J Epidemiol **159**(12): 1117-1130.

Hayashi, S., *et al.* (2016). "History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method." Anat Sci Int **91**(1): 1-7.

He, W., *et al.* (2018). "Effects of silica-gentamicin nanohybrids on osteogenic differentiation of human osteoblast-like SaOS-2 cells." Int J Nanomedicine **13**: 877-893.

Hirt, B., *et al.* (2010). "Surgical prosection in a traditional anatomical curriculum-Tubingens' Sectio chirurgica." Ann Anat **192**(6): 349-354.

Hopp, V. (2018). Konservierung [E. conservation]. Chemische Kreisläufe in der Natur: Chemie - Biologie - Energetik. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 605-629.

Hubbell, D. S., *et al.* (2002). "Teaching gross anatomy using living tissue." Clin Anat **15**(2): 157-159.

Hughes, P., *et al.* (2007). "The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?" Biotechniques **43**(5): 575, 577-578, 581-572 *passim*.

IARC Monographs Vol. 88 (2006). "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol. Vol. 88. Hrsg.: International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon 2006."

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2006). "Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol." IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum **88**: 1-478.

Jores, L. (1913). "Über eine verbesserte Konservierung anatomischer Präparate." Münch. Med. Wschr. **60**: S. 976.

Kaiserling, C. (1922). "Rückblicke auf Theorie und Praxis der farbigen Konservierung." Virch. Arch **237**: S. 467–474.

Kapprell, H. P., *et al.* (2011). "Development of a fluorescence resonance energy transfer peptide library technology for detection of protease contaminants in protein-based raw materials used in diagnostic assays." Assay Drug Dev Technol **9**(5): 549-553.

Kapuscinski, J. (1995). "DAPI: a DNA-specific fluorescent probe." Biotech Histochem **70**(5): 220-233.

Kaur, G. und J. M. Dufour (2012). "Cell lines: Valuable tools or useless artifacts." Spermatogenesis **2**(1): 1-5.

Kerns, W. D., *et al.* (1983). "Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure." Cancer Res **43**(9): 4382-4392.

Kidd, M. E., *et al.* (2014). "The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer." Am J Respir Cell Mol Biol **50**(1): 1-6.

Kim, K. H., *et al.* (2011). "Exposure to formaldehyde and its potential human health hazards." J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev **29**(4): 277-299.

Kim, L., *et al.* (2003). "Lycopene II--effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells." J Med Food **6**(2): 79-86.

Kirk, R. G. W. (2018). "Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research." Sci Technol Human Values **43**(4): 622-648.

Laskowski, S. (1886). "L'embaumement la conservation des sujet et les préparations anatomiques." gedruckt, in französisch. Genève, Georg. URL: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/la/1030021192/1030021192.PDF> (zuletzt aufgerufen am 09.06.2019)

Le Du, M. H. und J. L. Millan (2002). "Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases." J Biol Chem **277**(51): 49808-49814.

Leist, M., *et al.* (1997). "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis." J Exp Med **185**(8): 1481-1486.

- Lobo-Jarne, T. und C. Ugalde (2018). "Respiratory chain supercomplexes: Structures, function and biogenesis." Semin Cell Dev Biol **76**: 179-190.
- Lovschall, H., *et al.* (2003). "Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays." Toxicology in Vitro **16**: 63–69.
- Maqsood, M. I., *et al.* (2013). "Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment." Cell Biol Int **37**(10): 1038-1045.
- Marcsek, Z. L., *et al.* (2007). "Effect of formaldehyde and resveratrol on the viability of Vero, HepG2 and MCF-7 cells." Cell Biol Int **31**(10): 1214-1219.
- Marquet, P. A., *et al.* (2012). "Emergence of social complexity among coastal hunter-gatherers in the Atacama Desert of northern Chile." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(37): 14754-14760.
- Mason, J. T. und T. J. O'Leary (1991). "Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation." J Histochem Cytochem **39**(2): 225-229.
- Masrour Roudsari, J. und S. Mahjoub (2012). "Quantification and comparison of bone-specific alkaline phosphatase with two methods in normal and paget's specimens." Caspian J Intern Med **3**(3): 478-483.
- Masuhara, K., *et al.* (1987). "Purification of bone alkaline phosphatase from human osteosarcoma." Bone Miner **3**(2): 159-170.
- Mayer, R. G. (2011). Embalming: History, Theory, and Practice, 5th edition. United States, McGraw-Hill Education.
- Mazur, P. (1984). "Freezing of living cells: mechanisms and implications." Am J Physiol **247**(3 Pt 1): C125-142.
- Moeller, B. C., *et al.* (2011). "Determination of N2-hydroxymethyl-dG adducts in the nasal epithelium and bone marrow of nonhuman primates following 13CD2-formaldehyde inhalation exposure." Chem Res Toxicol **24**(2): 162-164.
- Monticello, T. M., *et al.* (1996). "Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells." Cancer Res **56**(5): 1012-1022.
- Morton, W. E. (1990). "Occupational phenoxyethanol neurotoxicity: a report of three cases." J Occup Med **32**(1): 42-45.
- Opitz, T., *et al.* (2017). "Permeation measurements in preclinical medical training (anatomy)." The 9th International Symposium on Modern Principles of Air Monitoring and Biomonitoring AIRMON 2017, Programme and Abstracts: S. 72.

Owen und Steedman (1956). "Preservation of Animal Tissues, with a Note on Staining Solutions." Journal of Microscopical Science **97(3)**: 319 - 321.

Pikal, M. J., *et al.* (1983). "Physical chemistry of freeze-drying: measurement of sublimation rates for frozen aqueous solutions by a microbalance technique." J Pharm Sci **72(6)**: 635-650.

Prävention aktuell (2018). "Das Stop-Prinzip." Universum Verlag. URL: <https://praevention-aktuell.de/das-stop-prinzip/> (zuletzt aufgerufen am 22.06.19)

Pschyrembel Online (a) (2018). "Fixierung." Walter de Gruyter Verlag. URL: <https://www.pschyrembel.de/Fixierung/K07UH/doc/> (zuletzt aufgerufen am 08.06.19)

Pschyrembel Online (b) (2016). "Mumifikation." Walter de Gruyter Verlag. URL: <https://www.pschyrembel.de/Mumifikation/K0EKU/doc/> (zuletzt aufgerufen am 08.06.2019)

Pschyrembel Redaktion (c) (2016). "Verwesung." Walter de Gruyter Verlag. URL: <https://www.pschyrembel.de/Verwesung%20/K0NQX/doc/> (zuletzt aufgerufen am 08.06.2019)

Richins, C. A., *et al.* (1963). "Improved Fluids for Anatomical Embalming and Storage." Anat Rec **146**: 241-243.

Riederer, B. M. (2014). "Plastination and its importance in teaching anatomy. Critical points for long-term preservation of human tissue." J Anat **224(3)**: 309-315.

Rifas, L., *et al.* (1994). "Expression of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human osteoblast-like cells: differentiation is associated with repression of metalloproteinase biosynthesis." Endocrinology **134(1)**: 213-221.

Riss, T. L., *et al.* (2004). Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual. G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, K. Brimacombe *et al.* Bethesda (MD).

Roche Diagnostics GmbH (2011). "Cell Proliferation Reagent WST-1." URL: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/cellprorobul.pdf> (zuletzt aufgerufen am 26.04.2019)

Rodan, S. B., *et al.* (1987). "Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties." Cancer Res **47(18)**: 4961-4966.

Roig, M. G., *et al.* (1982). "Kinetic studies of the transphosphorylation reactions catalyzed by alkaline phosphatase from *E. coli*: hydrolysis of p-nitrophenyl phosphate and o-carboxyphenyl phosphate in presence of Tris." Int J Biochem **14(7)**: 655-666.

Russell, W. M. S. und R. L. Burch (1959). The principles of humane experimental technique. London,, Methuen.

Schmidt, T., *et al.* (2011). "Evaluation of a thin and mechanically stable collagen cell carrier." Tissue Eng Part C Methods **17**(12): 1161-1170.

Scholzen, T. und J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol **182**(3): 311-322.

Shoja, M. M., *et al.* (2013). "A historical perspective: infection from cadaveric dissection from the 18th to 20th centuries." Clin Anat **26**(2): 154-160.

Steinmann, W. F. (1982). "Makroskopische Präparationsmethoden in der Medizin." Thieme.

Su, Y., *et al.* (2009). "Establishment and characterization of a new highly metastatic human osteosarcoma cell line." Clin Exp Metastasis **26**(7): 599-610.

Swenberg, J. A., *et al.* (1980). "Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor." Cancer Res **40**(9): 3398-3402.

Swenberg, J. A., *et al.* (2013). "Formaldehyde carcinogenicity research: 30 years and counting for mode of action, epidemiology, and cancer risk assessment." Toxicol Pathol **41**(2): 181-189.

Technische Regel für Gefahrstoffe: Arbeitsplatzgrenzwerte (TRGS 900) (2019). "Technische Regel für Gefahrstoffe: Arbeitsplatzgrenzwerte (TRGS 900). BArBl. (2006) Nr. 1, S. 41-55, zuletzt geändert und ergänzt: GMBI 2019 S. 117-119 [Nr. 7] (v. 29.03.2019)." URL: https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRGS/pdf/TRGS-900.pdf?__blob=publicationFile (zuletzt aufgerufen am 28.06.2019)

Thiel, W. (1992). "[The preservation of the whole corpse with natural color]." Ann Anat **174**(3): 185-195.

Thullner, I., *et al.* (2016). "Formaldehyd in der vorklinisch medizinischen Ausbildung (Anatomie). Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft. 76 (10): 219-228."

Tiffany-Castiglioni, E., *et al.* (1999). "Bridging the gap between in vitro and in vivo models for neurotoxicology." Toxicol Sci **51**(2): 178-183.

TOXNET (2015). "Formaldehyde." URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+164> (zuletzt aufgerufen am 14.08.2019)

Trevan, J. W. (1927). "The error of determination of toxicity." Proceedings of the Royal Society of London **101**(712): 483–514.

Tutsch, H. (1975). "Eine geruchsfreie, gut konservierende Injektionslösung für Kursleichen." Anat. Anz. **138**: 126-128.

Verordnung (EG) Nr. 440/2008 (2008). "Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethode gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) OJ L 142, 31.5.2008, p. 1–739."

Verordnung (EU) Nr. 528/2012 (2012). "Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten. Amtsblatt der Europäischen Union L167/1, 27.06.2012."

Verordnung (EU) Nr. 2015/491 (2015). "Verordnung (EU) 2015/491 der Kommission vom 23. März 2015 zur Änderung der Verordnung (EU) Nr. 605/2014 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen zwecks Einfügung von Gefahren- und Sicherheitshinweisen in kroatischer Sprache und zwecks Anpassung an den technischen und wissenschaftlichen Fortschritt. ABl. EU L 78, 24. März 2015, S. 12-13."

Verordnung zum Schutz vor Gefahrstoffen (2017). "Verordnung zum Schutz vor Gefahrstoffen (Gefahrstoffverordnung - GefStoffV). Vom 26. November 2010 (BGBl. I S 1643) geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 28. Juli 2011 (BGBl. I S 1622), durch Artikel 2 der Verordnung vom 24. April 2013 (BGBl. I S 944), durch Artikel 2 der Verordnung vom 15. Juli 2013 (BGBl. I S 2514), durch Artikel 2 der Verordnung vom 03. Februar 2015 (BGBl. I S 49), durch Artikel 1 der Verordnung vom 15. November 2016 (BGBl. I S 2549) und durch Artikel 148 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S 626)."

von Hagens, G. (1979). "Impregnation of soft biological specimens with thermosetting resins and elastomers." Anat Rec **194**(2): 247-255.

Wang, P., *et al.* (2010). "Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols." PLoS One **5**(4): e10202.

Waschke, J. (2016). "Bedeutung von Formaldehyd für die anatomische Lehre." DGUV. URL: http://www.dguv.de/medien/ifa/de/vera/2016_fg_formaldehyd/vortrag_waschke.pdf (zuletzt aufgerufen am 09.06.2019)

Weser, U., *et al.* (1995). "Enzymatic and immunological activity of 4000 years aged bone alkaline phosphatase." FEBS Lett **375**(3): 280-282.

Wulf, E., *et al.* (1979). "Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4498-4502.

Xing, L., *et al.* (2016). "A Feathered Dinosaur Tail with Primitive Plumage Trapped in Mid-Cretaceous Amber." Curr Biol **26**(24): 3352-3360.

Yang, Z. und H.-R. Xiong (2012). "In vitro, Tissue-Based Models as a Replacement for Animal Models in Testing of Drugs at the Preclinical Stages." INTECH Open Access Publisher.

Zamaraeva, M. V., *et al.* (2005). "Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase." Cell Death Differ **12**(11): 1390-1397.

Zucco, F., *et al.* (2004). "Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after." Toxicol In Vitro **18**(2): 153-163.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für „Klinische Anatomie und Zellanalytik“ der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Bernhard Hirt durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. Lothar Just und Dr. rer. nat. Peter Neckel.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglied Karin Seid von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 18.12.2019

Benedikt Pointner