

High Content Analyse - Anwendungen in der Pharmazeutischen Biologie

Dr. Birgit Kraus

Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Regensburg

Viele der heutzutage pharmazeutisch genutzten Substanzen sind biogenen Ursprungs (Abbildung 1), d.h. sie lassen sich von Naturstoffen ableiten [1]. Bei diesen biogenen Arzneistoffen handelt es sich um Verbindungen, die aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und auch Tieren gewonnen werden. Darüber hinaus finden Naturstoffe auch in Form von Substanzgemischen (= Extrakte) eine häufige Anwendung.

Mit diesen Naturstoffen, den von ihnen abgeleiteten Strukturen und ihren Gemischen befasst sich die sogenannte Pharmazeutische Biologie. Hierbei handelt es sich um ein sehr diverses, interdisziplinäres Forschungsgebiet,

das Teilgebiete wie Ethnobotanik, Naturstoffchemie inklusive der Naturstoffanalytik, aber auch Pharmakologie, Molekularbiologie und Zellbiologie miteinander vereint.

Die Ethnobotanik beschäftigt sich mit der traditionellen Anwendung von Arznei- und Nutzpflanzen, deren Ökologie, Sammlung oder auch Anbau.

In der Naturstoffchemie geht es zum einen um die Isolierung von einzelnen Inhaltsstoffen und deren Strukturaufklärung. Ein weiterer wesentlicher Aspekt ist die chemische Synthese der isolierten Strukturen und die Herstellung von Derivaten.

Die Naturstoffanalytik beinhaltet die Quantifizierung und Charakterisierung von Naturstoffen und ihren Gemischen, die Herstellung von Naturstoff-Extrakten und die Analytik der Extrakte insbesondere in Hinblick auf ihre Qualitätskontrolle. Darüber hinaus müssen Extrakte, sowie isolierte Einzelverbindungen oder synthetisierte Derivate, pharmakologisch charakterisiert und Aussagen über ihre Toxizität getroffen werden. Hierbei kommen Methoden aus der Pharmakologie, Toxikologie, Molekularbiologie und Zellbiologie zum Einsatz.

Zellkulturmodelle mit Zellen humanen Ursprungs sind deshalb auf diesem Gebiet, wie in fast allen Forschungsbereichen der Life Sciences, unverzichtbar geworden. Bei der Generierung von Daten aus Zellkulturmodellen gewinnen Imaging-Verfahren zunehmend an Bedeutung. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfärbungen in Kombination mit automatisierter mikroskopischer Bildaufnahme und -auswertung lassen sich eine Vielzahl von zellulären Parametern gleichzeitig bestimmen. Diese Technik wird als so genannte „High Content Analyse“ bezeichnet [2]. Im

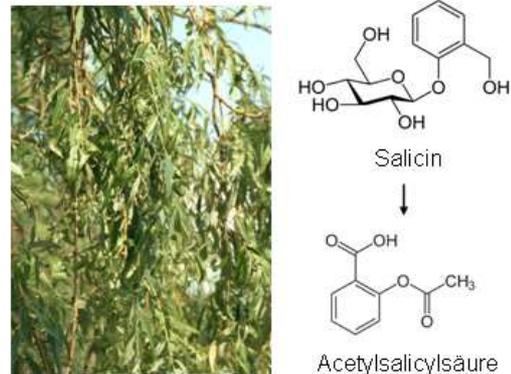


Abbildung 1: Acetylsalicylsäure, bekannt als Aspirin® - wahrscheinlich prominentestes Beispiel für einen Arzneistoff dessen Grundstruktur ursprünglich aus einer Pflanze isoliert wurde. Acetylsalicylsäure ist ein chemisches Derivat von Salicin, einem sekundären Pflanzenstoff aus der Weide (*Salix* sp.).

Gegensatz zu Hochdurchsatzanalysen („High Throughput Analyse“), bei der meist für eine Probe nur ein einziger oder sehr wenige Parameter ermittelt werden, ist es das Ziel der High Content Analyse, möglichst viele Parameter einer Probe (bzw. eines Bildes) gleichzeitig zu bestimmen. Durch das Erfassen der größtmöglichen Menge an Informationen aus nur einer Aufnahme, werden auch geringe Veränderungen nicht übersehen. Darüber hinaus sind Prozesse entlang einer Zeitachse erheblich besser zu charakterisieren. Dies ist die beste Voraussetzung selbst komplexe Zusammenhänge, die nicht auf den ersten Blick ersichtlich sind, aufzuklären [3]. Voraussetzung ist natürlich immer die Aufnahme möglichst hochwertiger Bilder, welche auch optimal ausgewertet werden können. In der pharmazeutischen Forschung ist die High Content Analyse inzwischen eine der wesentlichen Säulen der Wirkstoffsuche und Toxizitätsbestimmung, die die Zeit von den ersten Experimenten zu klinischen Tests deutlich verkürzt und die Anzahl der notwendigen Tierversuche verringern hilft [2].

Zytotoxizität

Sämtliche Naturstoffextrakte bzw. isolierten oder synthetisierte Verbindungen werden vor ihrer weiteren Verwendung in anderen Testsystemen auf ihre zytotoxische Aktivität getestet. Es existiert eine große Anzahl verschiedener Toxizitäts-Assays, deren Ergebnisse aber allesamt keine Information über Auswirkungen auf Einzelzellebene liefern. Oft setzen sich auch die detektierten Ergebnisse aus einer Summe mehrerer verschiedener Einzelprozesse zusammen. Hier findet sich ein typisches Anwendungsgebiet der High Content Analyse: sie liefert Daten über mehrere Parameter gleichzeitig und das alles für jede einzelne betrachtete Zelle.

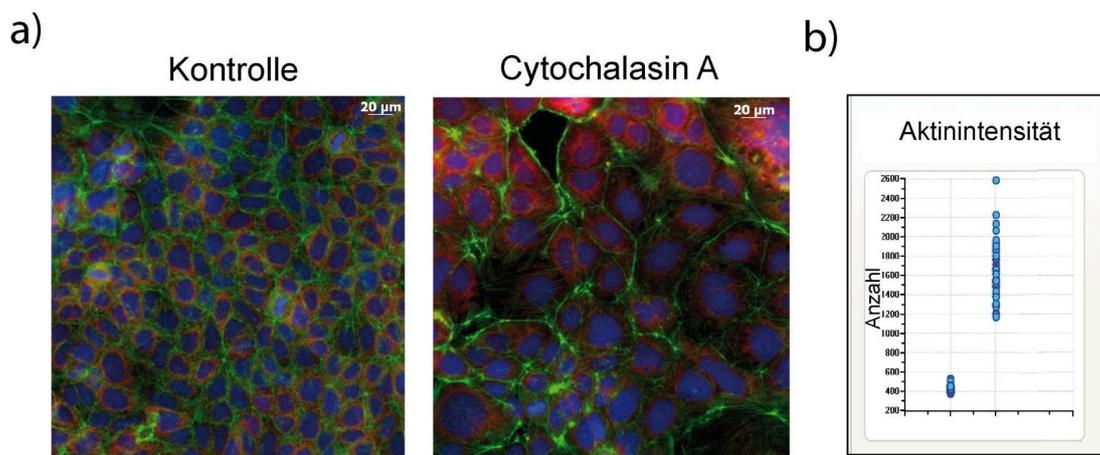


Abbildung 2: (a) Caco-2 Zellen (Coloncancerzellen) mit blauen Zellkernen (Hoechst 33342), grünem Aktin (Alexa 488 Phalloidin) und roten Mitochondrien (Mitotracker red). Links die unbehandelten Kontrollzellen, rechts Zellen die mit 5 µM Cytochalasin A (ein Naturstoff aus Pilzen, verhindert u.a. die Polymerisation von Aktin) behandelt wurden.

(b) Auswertung des Einfluss von Cytochalasin A auf das Aktingerüst der Caco-2 Zellen im Bild nebenan. Es ist ein deutlicher Anstieg in der Intensität der Aktin-Fluoreszenz festzustellen, welcher auf der strukturellen Veränderung des Aktingerüsts durch die Behandlung beruht.

Typische Parameter, die zur Toxizitätsbestimmung herangezogen werden und ganz einfach im Phasenkontrast betrachtet werden können, sind Veränderungen bezüglich der Zellzahl und Morphologie der Zellen. Durch die Verwendung von spezifischen Fluoreszenzmarkern können des Weiteren typische Zellbestandteile wie beispielsweise der Zellkern, die Mitochondrien und auch das Aktingerüst einer Zelle betrachtet werden (Abbildung 2). Diese Parameter ermöglichen bereits detaillierte Aussagen über den Einfluss von Substanzen auf den Zustand der Zelle.

Zellzyklus

Ein normaler Ablauf des Zellzyklus ist wichtig für das Wachstum und die Teilung von Zellen und unterliegt einer strengen Regulierung. Der Zellzyklus von Krebszellen wird beispielsweise nicht mehr durch den Organismus kontrolliert. Die Dauer eines Zellzyklus ist bei ihnen gegenüber normalen Zellen verändert. Wirkstoffe, die einen Einfluss auf den Zellzyklus aufweisen, besitzen vielfältiges therapeutisches Potential, beispielsweise als Krebs-Medikamente.

Das Stadium des Zellzyklus, in dem die Zellen sich befinden, wird anhand der Menge und der Intensität an Fluoreszenz der mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbten DNA im Zellkern bestimmt (Abbildung 3).

Mikrotubuli

Mikrotubuli sind, wie Aktinfilamente, Bestandteil des Zytoskeletts. Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle bei Transportvorgängen in der Zelle und bilden in der Mitose die Teilungsspindel aus. Es ist bereits eine ganze Reihe an Naturstoffen bekannt, die einen Einfluss auf die Polymerisierung oder Depolymerisierung von Tubulin besitzen und als sogenannte Mitosegifte wirken. Hierzu zählen beispielsweise Colchicin aus der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*) oder Paclitaxel (Taxol™) aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), welche als Inhibitoren des

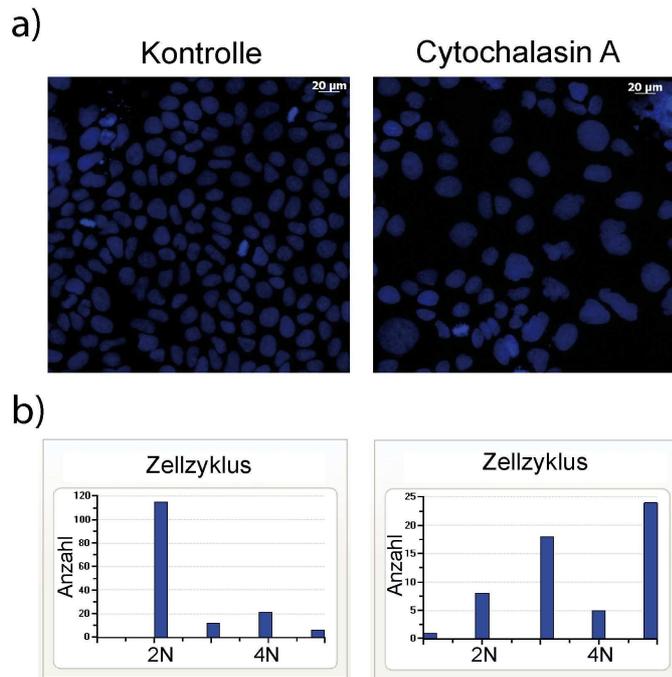


Abbildung 3: Einfluss von Cytochalasin A auf den Zellzyklus von Caco-2 Zellen. (a) Zu sehen sind die Zellkerne (Hoechst 33342) derselben Zellen wie in Abb. 2; links die unbehandelten Kontrollzellen, rechts behandelt mit 5 µM Cytochalasin A. (b) Auswertung des Einfluss von Cytochalasin A auf den Zellzyklus der Caco-2 Zellen. In der unbehandelten Kontrolle besitzt der Großteil der Zellen einen doppelten Chromosomensatz (2N), befindet sich also in der G1-Phase. Ein kleiner Teil der Zellen besitzt einen tetraploiden Chromosomensatz (4N, doppelt soviel DNA), befindet sich also zwischen Ende der S-Phase und Ende der Mitose. Bei den mit Cytochalasin A behandelten Zellen sind die Verhältnisse vollkommen verschoben.

Mikrotubuli Auf- bzw. Abbaus wirken und als Zytostatika verwendet werden. Neue Substanzen mit Einfluss auf Mikrotubuli sind dementsprechend interessant als mögliche Antitumor-Mittel (Abbildung 4).

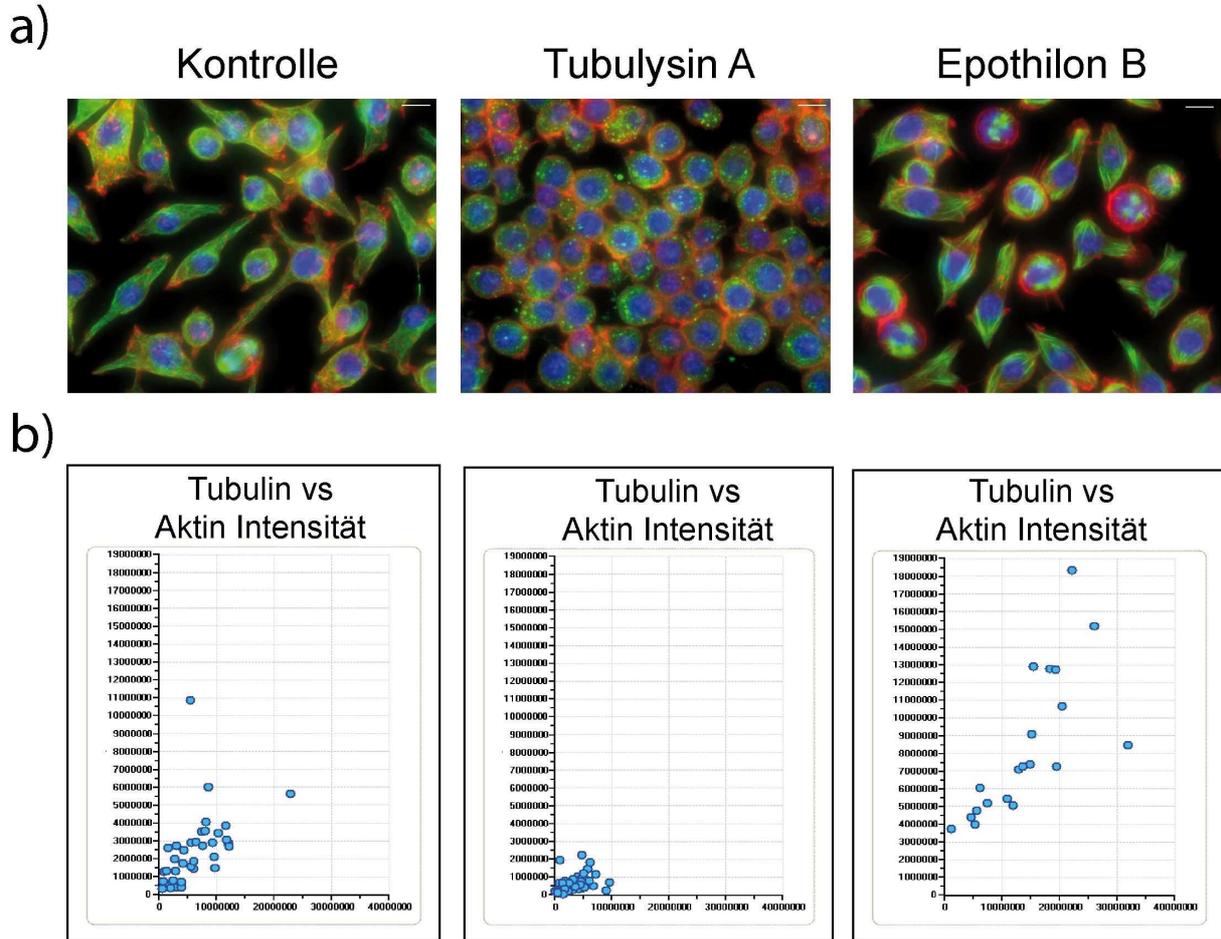


Abbildung 4: Einfluss von Tubulylin A und Epothilon B auf die Mikrotubuli der murinen Mikroglia-Zelllinie N11. Tubulylin A und Epothilon B sind beides Naturstoffe aus Myxobakterien. Tubulylin A verhindert die Polymerisierung von Tubulin und somit den Aufbau von Mikrotubuli. Epothilon B hingegen verhindert die Depolymerisierung von Tubulin, wirkt also Mikrotubuli stabilisierend. (a) N11 Zellen mit blauen Zellkernen (Hoechst, 33342), rotem Aktin (Alexa 568 Phalloidin) und grünem Tubulin (anti Tubulin Alexa 488). Links die unbehandelten Kontrollzellen, in der Mitte mit Tubulylin A, rechts mit Epothilon B behandelte Zellen. (b) Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität von Aktin (X-Achse) gegen die von Tubulin (Y-Achse) aufgetragen. Die Unterschiede zwischen dem Einfluss von Tubulylin A und Epothilon B sind deutlich zu sehen.

Motilität von Zellen

Gerade Immunzellen, aber auch Epithel- und Endothelzellen, zeigen eine ausgeprägte Fähigkeit zur Bewegung. Der Einfluss von Substanzen auf die Bewegungsfähigkeit von Zellen lässt sich mit Hilfe von Imaging-Verfahren leicht bestimmen. Hierbei gibt es zwei verschiedene Assay-Varianten. Einerseits kann eine Zeitreihe der Zellen anhand aufeinander folgender Bilder aufgenommen werden und der von den Zellen zurückgelegte Weg erfasst werden. Hierzu benötigt man allerdings eine Inkubationseinheit am Mikroskop. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Zellen auf einen geschlossenen Rasen aus fluoreszierenden Latexkügelchen ausgesät werden. Durch ihre Bewegung hinterlassen die Zellen kleine Pfade in diesem Rasen, welche analysiert werden

können (Abbildung 5). Diese Methode hat den Vorteil, dass der Assay an sich im Inkubationsschrank abläuft und man nur ein Endbild der Pfade aufnimmt. Allerdings wird nicht sichtbar, ob eine Zelle eventuell zweimal denselben Weg genommen hat.

Neben den vorgestellten Beispielen gibt es natürlich noch eine weitere große Anzahl an Parametern, die gut mittels High Content Analyse untersucht werden können. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen Assays liegt zum einen darin, dass man Resultate auf Einzelzellebene erhält. Zum Anderen liefert jedes einzelne Experiment bereits eine große Menge an Daten. Und aufgrund dieser Datenfülle zeichnen sich die so erhaltenen Informationen als sehr verlässlich aus.

Die High Content Analyse stellt somit für die Pharmazeutische Biologie eine hervorragende Methodik dar, um Aussagen zur Toxizität, aber auch zu anderen Einflüssen von Naturstoffen auf Zellen treffen zu können [4].

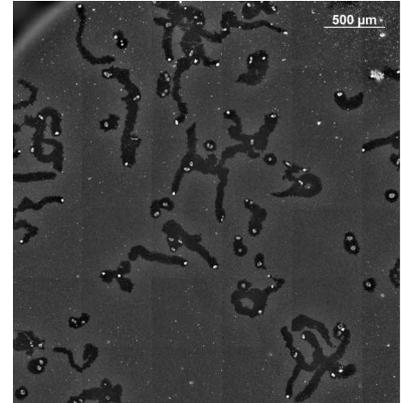


Abbildung 5: Zellen der murinen Mikroglia-Zelllinie BV2 wurden auf einen Rasen von fluoreszierenden Latexkügelchen ausgesät und haben ihre Spuren hinterlassen.

Literatur:

- [1] Petersen, F. and Amstutz R. (Eds.). 2008. Natural Compounds as Drugs. Vol. II, Birkhäuser
- [2] Giuliano, K.A., J.R. Haskins and D.L. Taylor. 2003. Advances in high content screening for drug discovery. Assay Drug Dev Technol 1:565-577.
- [3] Rausch, O. 2005. Use of high-content analysis for compound screening and target selection. IDrugs 8:573-577.
- [4] Kraus, B. and Wolff, H. 2008. High Content Analysis with AxioVision ASSAYbuilder™: Applications in Pharmaceutical Biology. BioTechniques 44(6): 820-823