

Einem molekularen Jungbrunnen auf der Spur Entwicklung einer vollautomatisierten Methode zur Bestimmung von Spermidin in Nahrungsergänzungsmitteln mit Laborrobotern und LC-QTOF

Autoren: Ingo Tausendfreund, Katrin Grammann

Biogene Polyamine sind an der Regulation des Zellwachstums und der Zellteilung beteiligt. Sie sind für die Erhaltung und Erneuerung verschiedener Gewebe und Organe essenziell. Eine wesentliche Rolle kommt dabei den drei Polyaminen Putrescin, Spermidin und Spermin zu. Sie wirken synergistisch, um die Zellproliferation zu unterstützen. Die Zellproliferation ist wichtig für verschiedene biologische Prozesse, insbesondere das Wachstum von Organen während der Entwicklung und bei der Reparatur von beschädigtem Gewebe. Eine fehlerhafte Regulation der Zellproliferation kann zu Krankheiten wie Krebs führen, bei denen die Zellen unkontrolliert und abnorm proliferieren.

In mehreren Studien wurde die Wirkung von Spermidin auf die Lebensdauer und kognitive Leistungsfähigkeit von Mäusen untersucht. Die Forschenden fanden dabei heraus, dass die Zugabe von Spermidin zur Nahrung das Leben der Mäuse signifikant verlängern sowie ihre Lern- und Gedächtnisbildung verbessern konnte. Umfassende Studien, auch an Menschen, folgten und bestätigten die ursprünglichen Erkenntnisse.

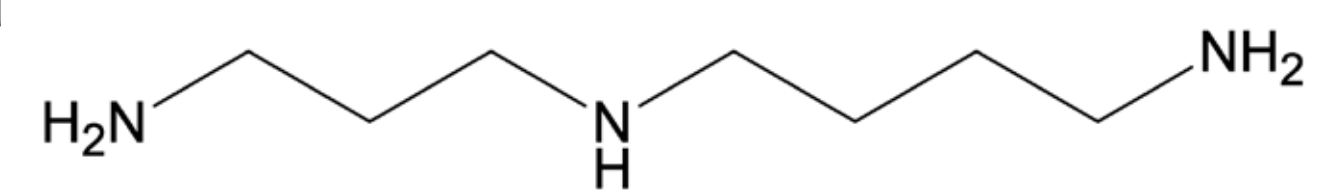


Abb. 1: Spermidin

Für die Suche nach Spermidin in biologischen Proben wurde an der Westfälischen Hochschule unter der Leitung von Prof. Dr. Ingo Tausendfreund eine vollautomatisierte Extraktion mit anschließender hochauflösender Massenspektrometrie (LC-QTOF) entwickelt.



Abb. 2: Automatisierte Extraktion mit einem MPS Robotic-Laborroboter (links) und Flüssigkeitschromatografie und hochauflösender Flugzeitmassenspektrometrie (rechts)

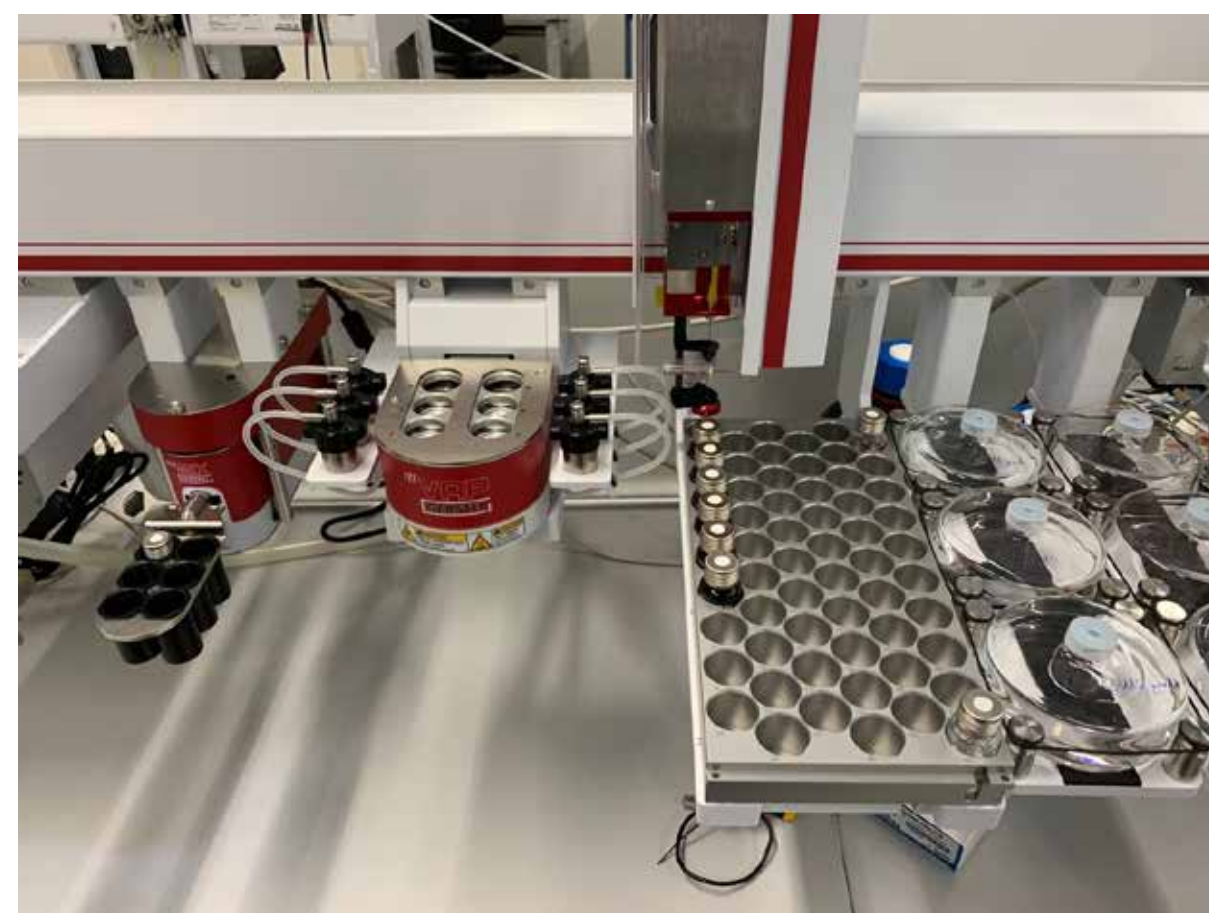


Abb. 3: MPS Robotic von Gerstel zur automatisierten Extraktion von Lebensmitteln

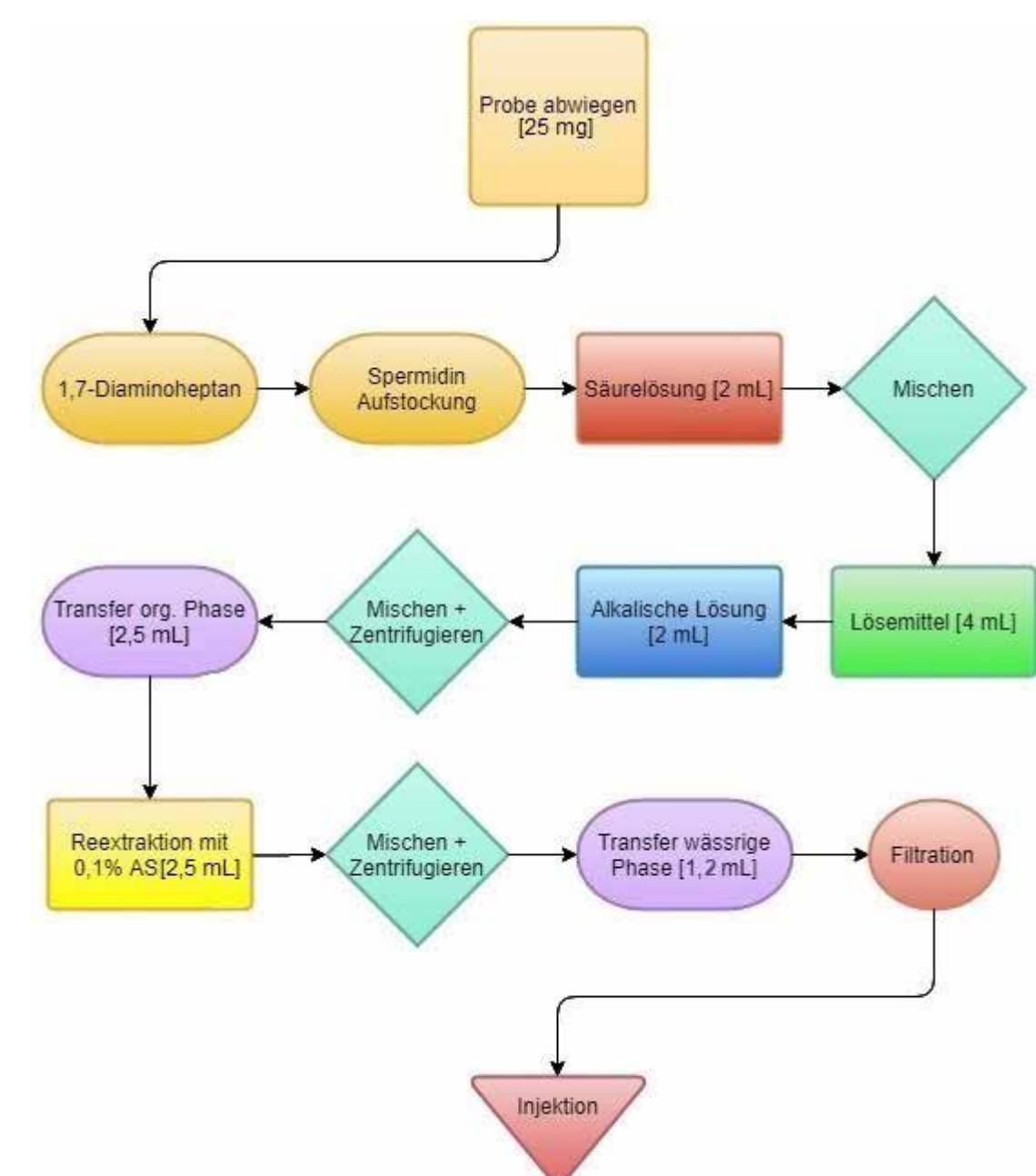


Abb. 4: Ablauf der automatisierten Probenvorbereitung

Bei ihren Analysen fanden die Forschenden schließlich eine Quelle mit ungewöhnlich hohem Spermidin Gehalt: Apilarnil. Bei Apilarnil handelt es sich um gefriergetrocknete und pulverisierte Drohnenlarven. Apilarnil fällt als Nebenprodukt in der Bienenzucht an. Imker entfernen die männlichen Bienenlarven, um den Bienenstock vor Krankheitserregern zu schützen. In Kooperation mit dem API-Zentrum Ruhr und Frau Prof. Dr. Katrin Grammann wurden an der Westfälischen Hochschule Drohnenlarven verschiedener Entwicklungsstadien der automatisierten Analyse unterzogen, um den Zeitpunkt des maximalen Spermidin-Gehalts und damit den optimalen Erntezeitpunkt zu ermitteln. Dabei zeigte sich in allen untersuchten Proben mit durchschnittlich 39 mg pro 100 g Apilarnil ein sehr hoher Massenanteil des Polyamins.

Typische Spermidin-Gehalte in Nahrungsmitteln pro 100 g

- Obst (Ausnahme Birne und Mango): 0,2 bis 1,0 mg
- Avocado: 1,0 mg
- Kartoffeln: 1,2 bis 1,7 mg
- Haselnüsse: 2,1 mg
- Mango: 3,0 mg
- Blumenkohl und Brokkoli: 2,6 bis 3,7 mg
- Birne: 5,2 mg
- Erbsen: 6,5 mg
- Shiitake Pilze: 8,9 mg
- Gereifter Cheddar: 19,9 mg
- Weizenkeime: 24,0 mg
- Apilarnil: 39 mg



Abb. 5: Drohnenlarven
Foto: API-Zentrum Ruhr

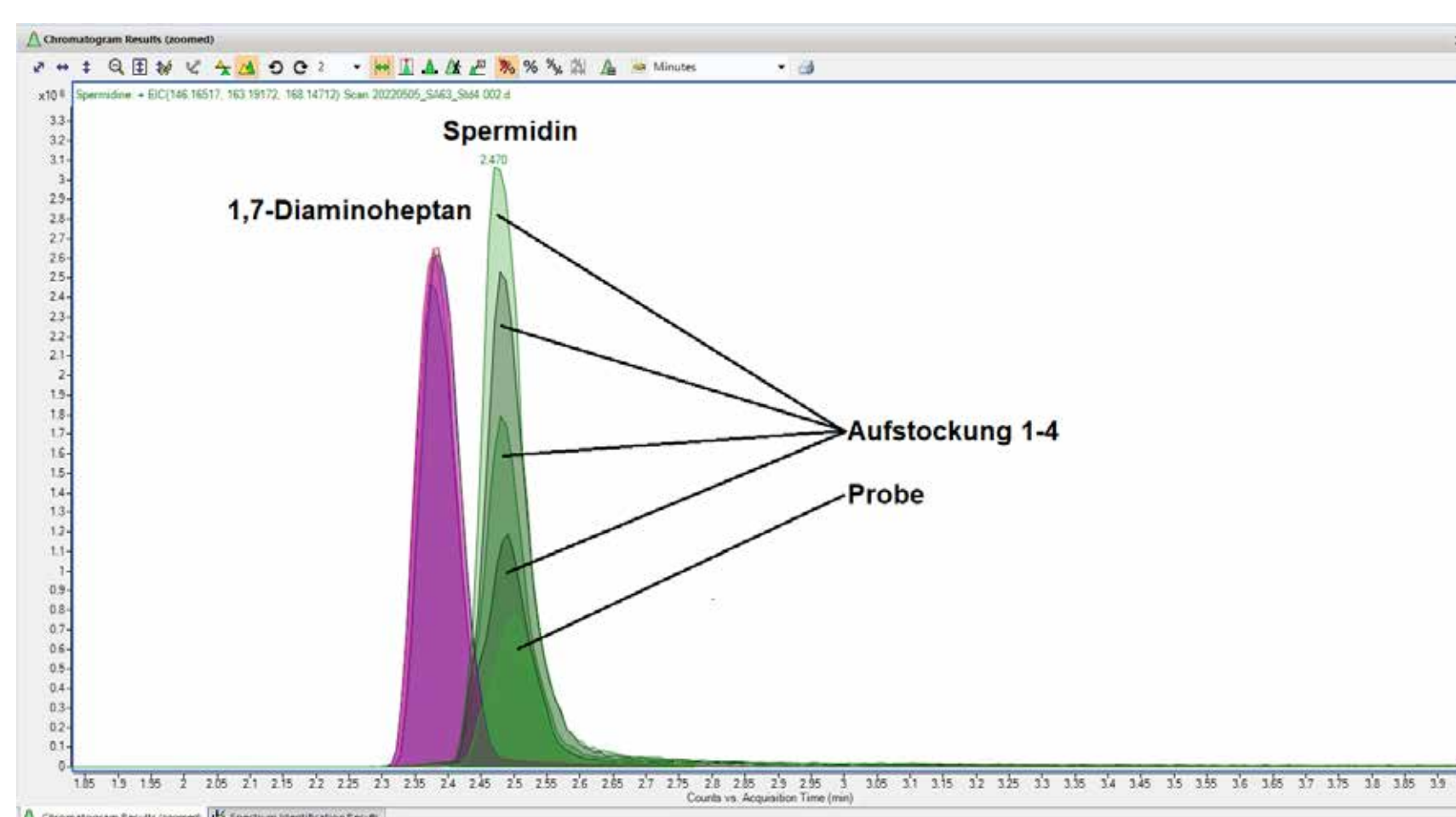


Abb. 6: Automatisierte Extraktion mit einem MPS Robotic-Laborroboter (links) und Flüssigkeitschromatografie und hochauflösender Flugzeitmassenspektrometrie (rechts)

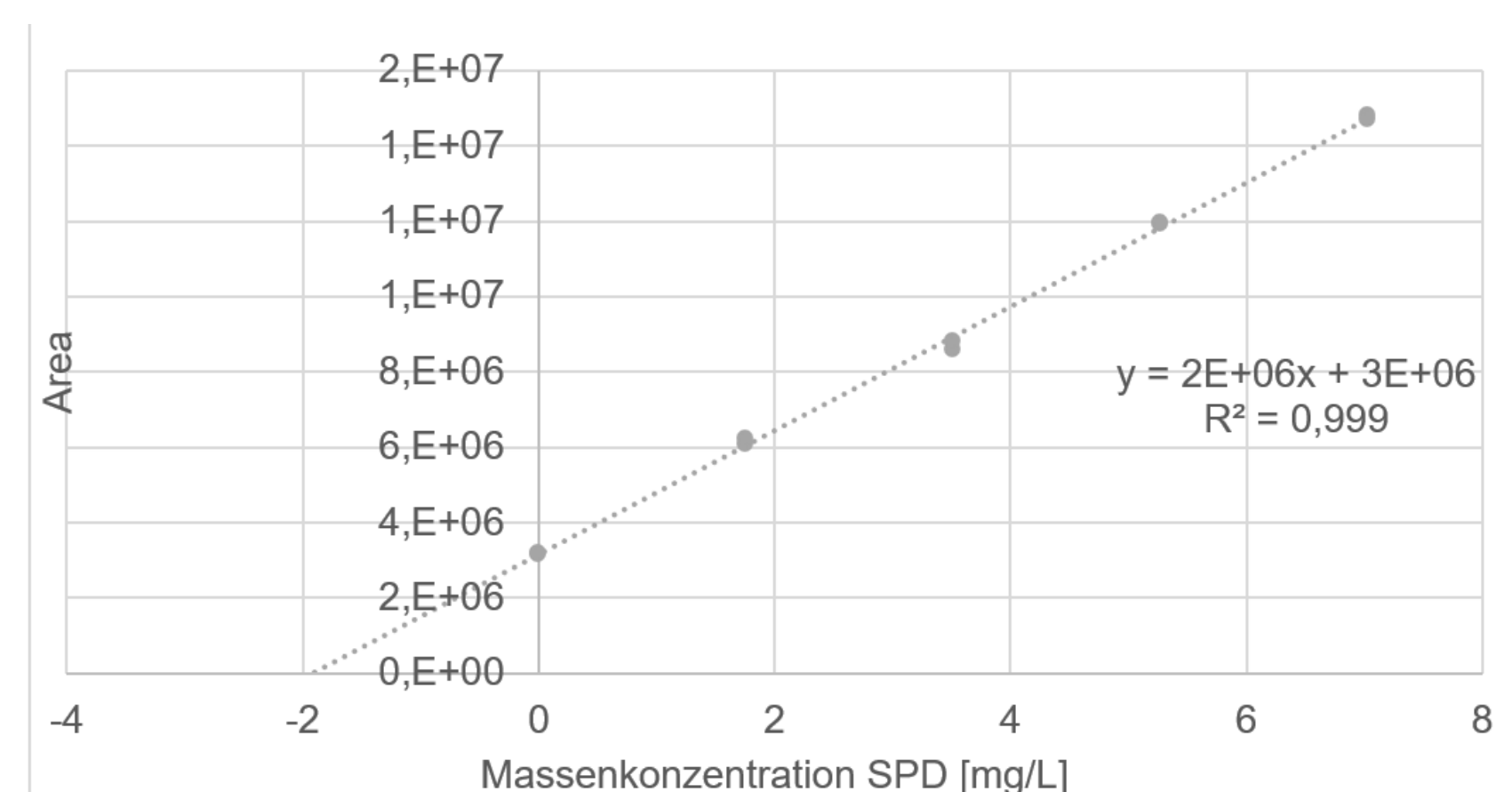


Abb. 7: Regressionsanalyse zur Ermittlung der Spermidin-Massenkonzentration im Apilarnil-Extrakt

Erkennung von handgezeichneten chemischen Strukturen mit DECIMER



Autoren: K. Rajan, H. O. Brinkhaus, A. Zielesny und C. Steinbeck

Die genaue Erkennung handgezeichneter chemischer Strukturen ist von entscheidender Bedeutung für die Digitalisierung handschriftlicher chemischer Informationen, wie sie in traditionellen Labor-Journalen oder bei der stiftbasierten Struktureingabe mittels Tablets oder Smartphones zu finden sind. Die inhärente Variabilität von handgezeichneten Strukturen stellt jedoch eine Herausforderung für die bestehenden Methoden der optischen chemischen Strukturerkennung dar. Um dieses Problem zu lösen, schlagen wir eine weiterentwickelte DECIMER-Architektur vor, die eine Kombination aus neuronalen Faltungsnetzen (*Convolutional Neural Networks* - CNN) und Transformern einsetzt, um die Erkennung von handgezeichneten chemischen Strukturen zu verbessern. Das Modell beinhaltet einen EfficientNetV2-CNN-Encoder, der Merkmale aus handgezeichneten Bildern extrahiert, gefolgt von einem Transformer-Decoder, der diese in das maschinenlesbare SMILES-Strukturformat umwandelt. Unsere Modelle wurden mit synthetischen handgezeichneten Bildern trainiert, die von Randepict, einem Tool zur Darstellung chemischer Strukturen, erzeugt wurden. Um die Leistung des Modells zu bewerten, wurde ein Benchmark mit einem realen Datensatz von handgezeichneten chemischen Strukturen durchgeführt, der an der Westfälischen Hochschule und der Friedrich-Schiller-Universität Jena erstellt wurde. Die Ergebnisse unserer experimentellen Studien zeigen, dass das neue Modell für reale Anwendungen geeignet ist.

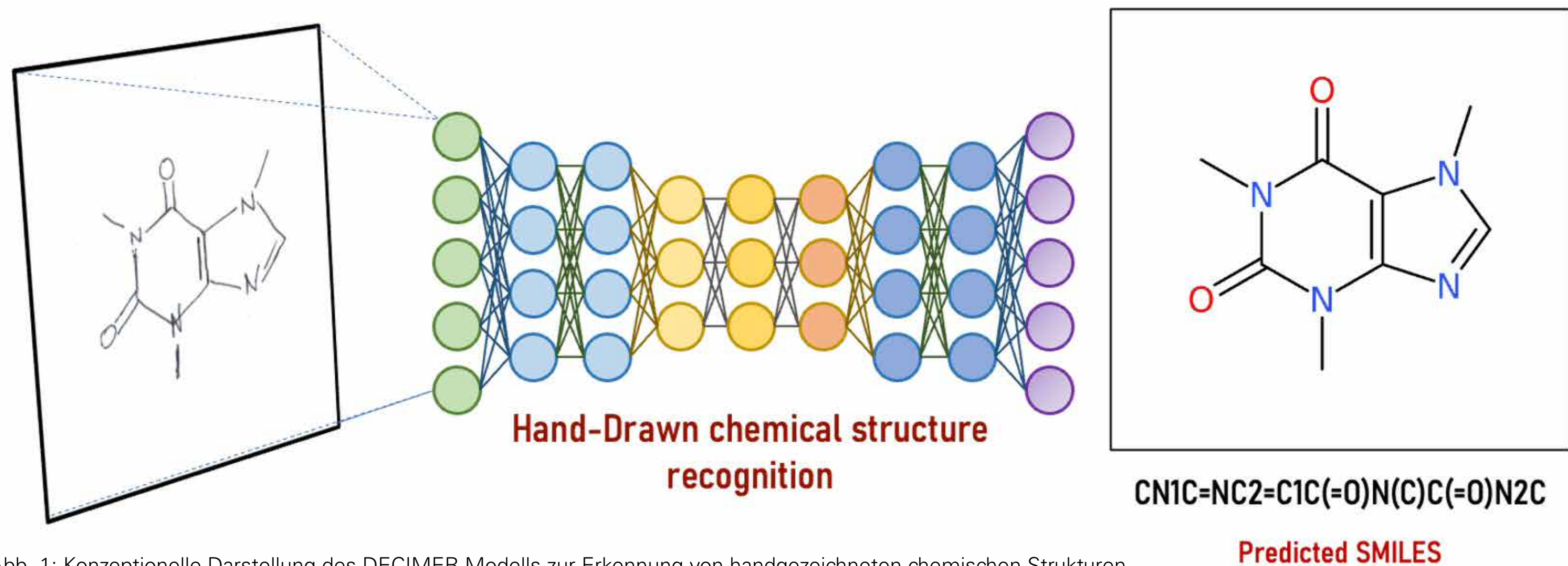


Abb. 1: Konzeptionelle Darstellung des DECIMER-Modells zur Erkennung von handgezeichneten chemischen Strukturen

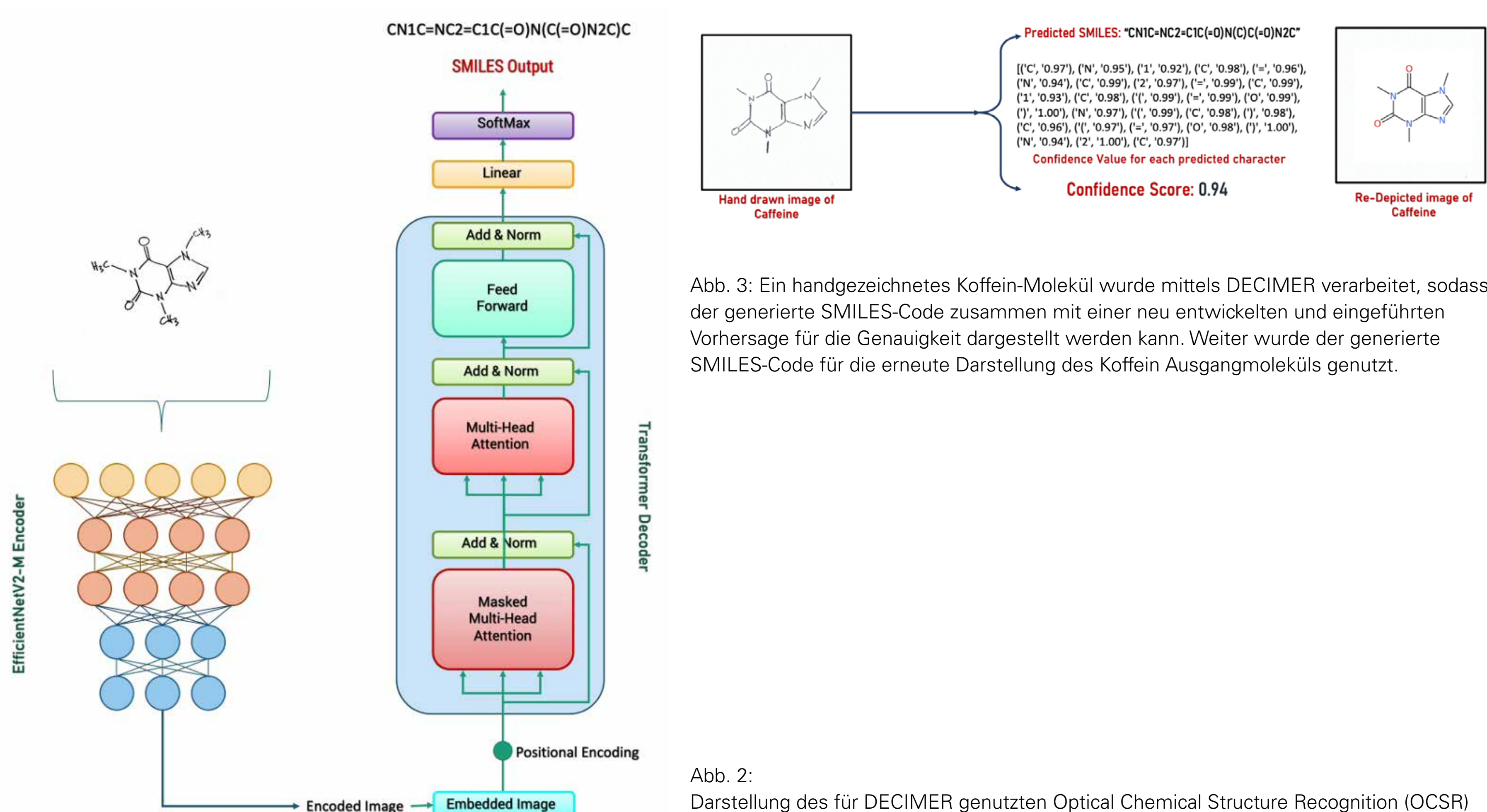


Abb. 3: Ein handgezeichnetes Koffein-Molekül wurde mittels DECIMER verarbeitet, sodass der generierte SMILES-Code zusammen mit einer neu entwickelten und eingeführten Vorhersage für die Genauigkeit dargestellt werden kann. Weiter wurde der generierte SMILES-Code für die erneute Darstellung des Koffein Ausgangsmoleküls genutzt.

Abb. 2: Darstellung des für DECIMER genutzten Optical Chemical Structure Recognition (OCSR) Modells

Weiterentwicklung der Molecule Fragmentation Framework Applikation MORTAR



Autor: Felix Bänsch, Jonas Schaub, Betül Sevindik, Samuel Behr, Julian Zander, Maximilian Rottmann, Christoph Steinbeck, Achim Zielesny

Molekulare Strukturen werden häufig unter reduktionistischen Gesichtspunkten betrachtet, d. h. bestimmte Substrukturen, wie funktionelle Gruppen oder Ringsysteme, werden als bestimmend für die Eigenschaften und Aktivitäten eines Moleküls angesehen. Diese charakteristischen strukturellen Motive müssen von Computerprogrammen identifiziert und extrahiert werden, z. B. als erster Schritt für Anwendungen wie Eigenschafts- und Aktivitätsvorhersagen. Dieser Prozess wird als *in-silico* Molekülfragmentierung bezeichnet. Spezifische Fragmentierungsalgorithmen wurden schon für Substrukturen, wie funktionelle Gruppen, Ringsysteme oder glykosidische Einheiten, entwickelt. Um neue Algorithmen für andere Arten von Strukturmotiven zu entwickeln, durchlaufen Forschende mehrere Iterationen der Definition eines Regelsatzes (Algorithmus), der Anwendung auf einen relevanten Strukturdatensatz, der visuellen Inspektion der identifizierten Substrukturen und der Verfeinerung des Regelsatzes. Dieser Arbeitsablauf erfordert in der Regel eine individuelle Handhabung des Datenimports, der Algorithmusintegration und der Ergebnisvisualisierung. Die offene Java *Rich Client Graphical User Interface* (GUI) Anwendung MORTAR unterstützt die Entwicklung und Implementierung von neuen *in-silico* Molekülfragmentierungsalgorithmen. Darüber hinaus sollen sie nach ihrer Veröffentlichung leicht zugänglich gemacht werden. Dies wird erreicht, indem ein standardisierter und interoperabler Arbeitsablauf für die Integration neuer Fragmentierungsalgorithmen, ihre Anwendung auf molekulare Datensätze und die visuelle Inspektion der Fragmentierungsergebnisse auf verschiedene Weise über die GUI ermöglicht wird. Darüber hinaus können Fragmentierungsalgorithmen in Pipelines kombiniert und nacheinander ausgeführt werden. Die neueste Version von MORTAR unterstützt drei Fragmentierungsalgorithmen: die Extraktion von funktionellen Gruppen, Zuckereinheiten und molekularen *Scaffolds* (Ringsystemen). Zu den zusätzlichen Funktionen, die sich derzeit in der Entwicklung befinden, gehören ein Fragmentierungsschema für die Zerlegung komplexer Alkylstrukturen in kleinere Einheiten und eine Clustering-Funktionalität, mit der die eingegebenen Moleküle auf der Grundlage ihrer identifizierten Substrukturen schnell gruppiert werden können. Alle chemoinformatischen Funktionen in MORTAR sind auf der Grundlage der offenen Java-Bibliothek Chemistry Development Kit (CDK) implementiert.

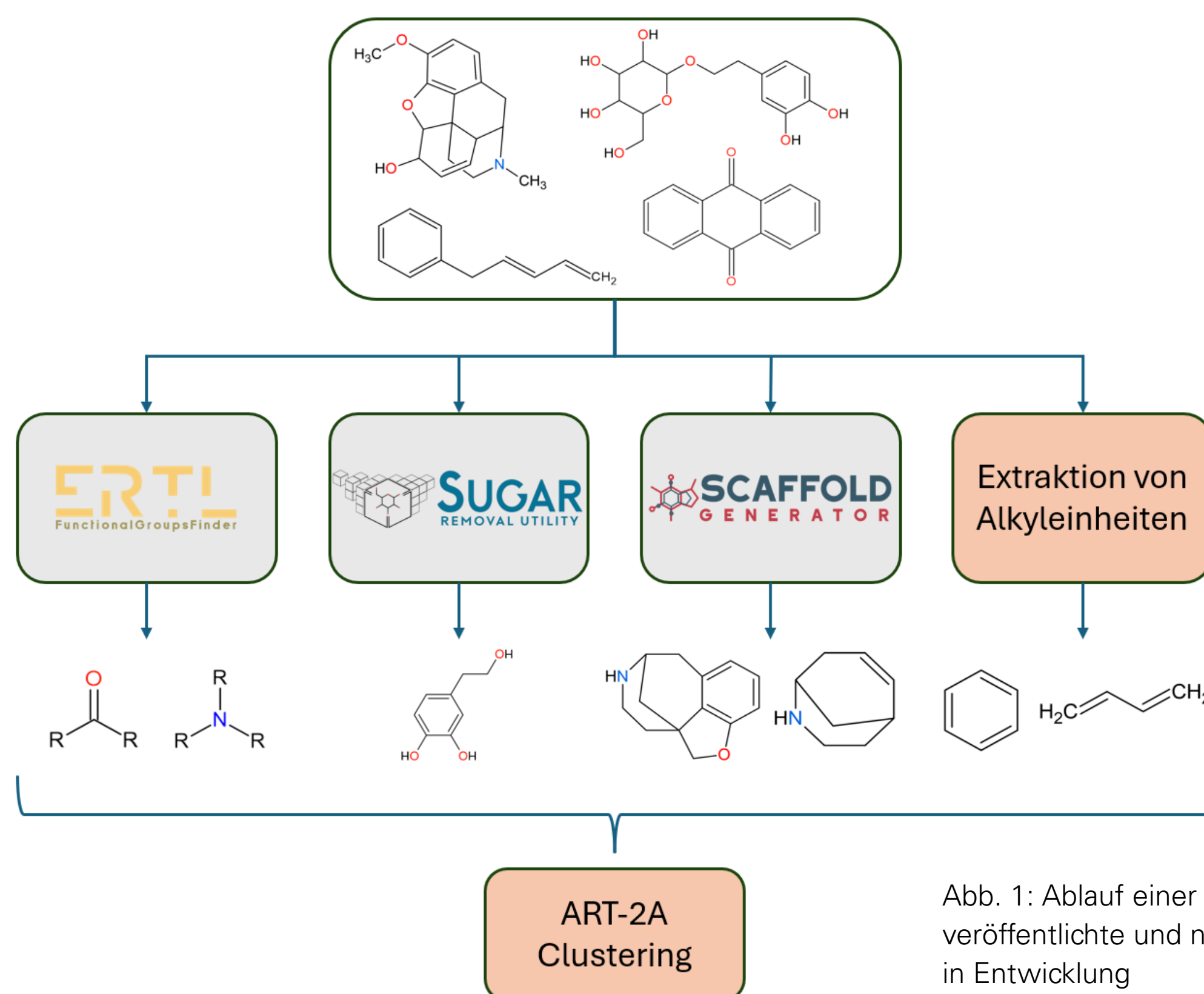


Abb. 1: Ablauf einer Strukturanalyse mit MORTAR; Grau hinterlegt: bereits veröffentlichte und nutzbare Methoden; Orange hinterlegt: neue Methoden in Entwicklung

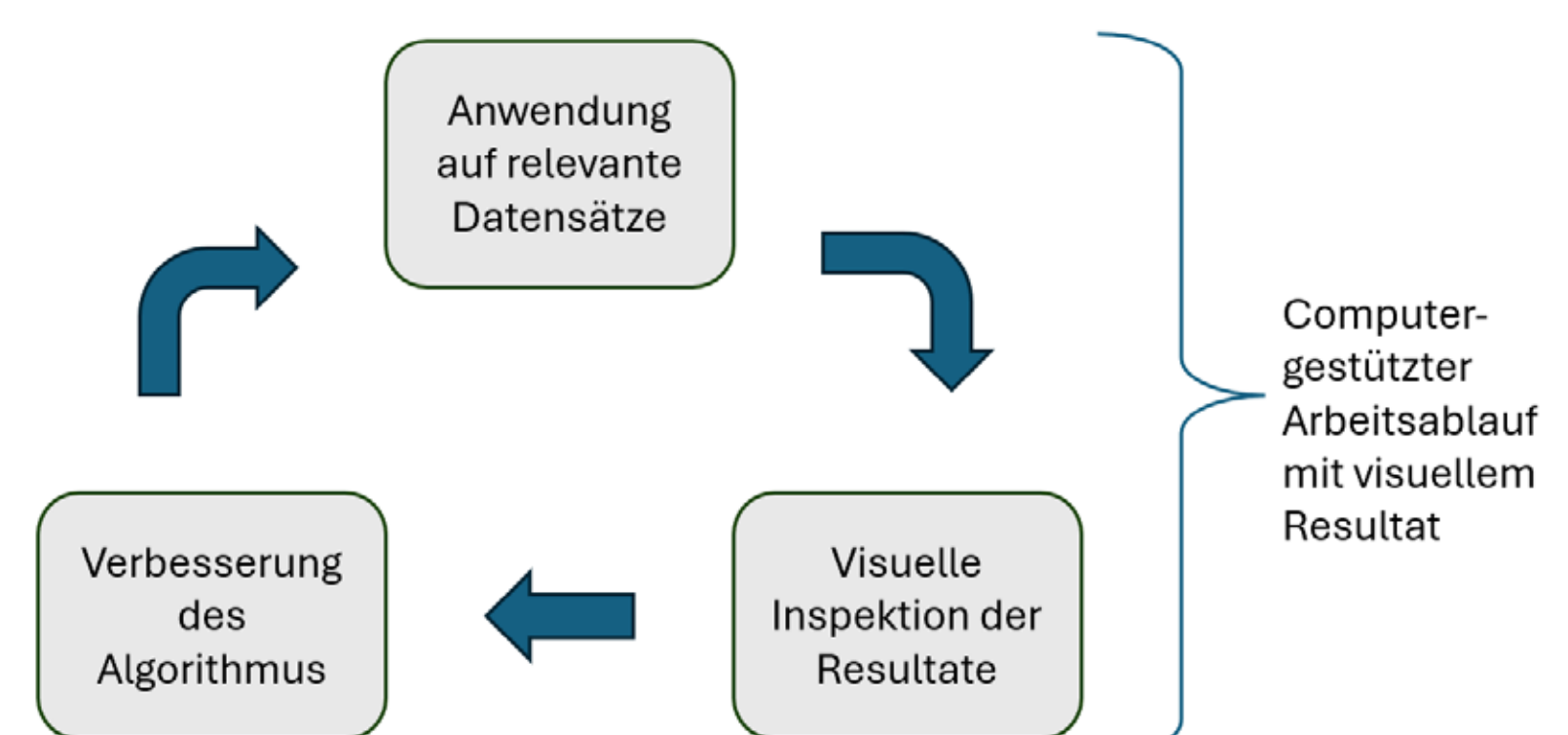


Abb. 2: Ablauf der Entwicklung eines Fragmentierungsalgorithmus mithilfe von MORTAR

| Structure | SMILES | Sample Parent | Sample Pa... | Frequency | Percentage | Molecule Freq... | Molecule Perc... |
|----------------------|-----------------------|---------------|--------------|-----------|------------|------------------|------------------|
| <chem>H3C-CH3</chem> | CC | | Alkyl_Com... | 1 | 11.11% | 1 | 100% |
| | *C(*)* | | Alkyl_Com... | 1 | 11.11% | 1 | 100% |
| | *C(*)(*)* | | Alkyl_Com... | 1 | 11.11% | 1 | 100% |
| | C=CC=C1C2=CC=CC=C2CC1 | | Alkyl_Com... | 1 | 11.11% | 1 | 100% |
| <chem>CH4</chem> | C | | Alkyl_Com... | 5 | 55.56% | 1 | 100% |

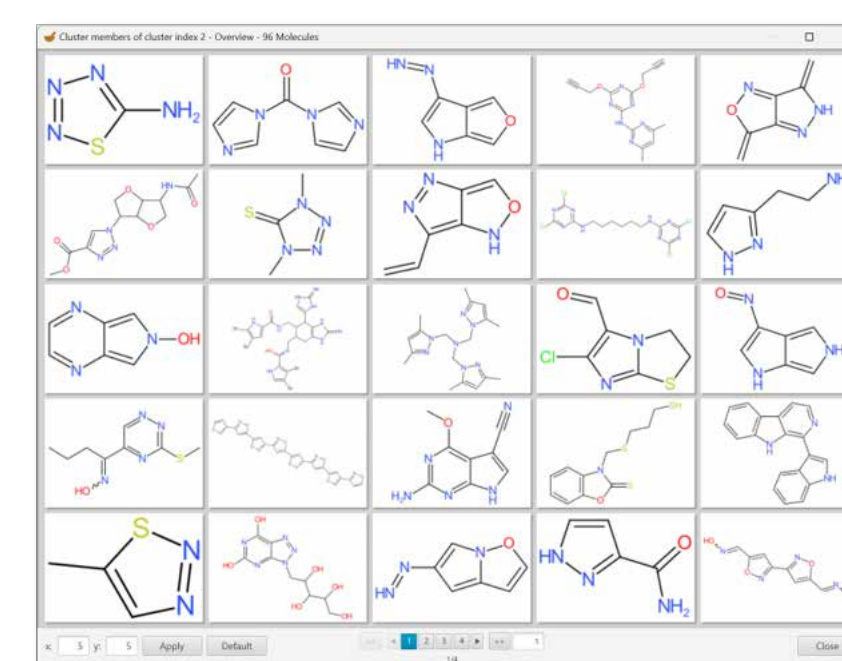


Abb. 4: Teilansicht von als ähnlich eingestuften Moleküle eines in MORTAR durchgeführten Clusterversuchs mit dem neu eingeführten ART-2A Clusteralgorithmus

Abb. 3: MORTAR Ansicht einer beispielhaften Zerlegung eines nur aus Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen bestehenden Moleküls, ein sog. Kohlenhydrat, mit dem neu eingeführten Alkylfragmentierungsalgorithmus

Oberflächenfunktionalisierung medizinischer Implantate zur Unterdrückung unspezifischer Adsorption und Optimierung der gingivalen Integration

Autoren: Chaymae Boukari, Lisa Marie Langner, Axel Prietz, Julian Baron, Evelin Miller, Michael Veith

Medizinische Zahnimplantate und der zugehörige Zahnersatz haben sich in den letzten Jahrzehnten für die orale Rehabilitation zu einer weit verbreiteten Behandlungsoption für teilweise zahnlose Patienten für eine verbesserte mundgesundheitsbezogene Lebensqualität bewährt. Jedoch bergen diese immer noch das Risiko mikrobieller Infektionen durch Plaque-Bildung. Ein Implantat besteht aus dem Implantatkörper, der fest am Knochen verankert ist, dem Abutment, das der Mundhöhle und dem Zahnfleisch ausgesetzt ist, und dem Zahnersatz (vgl. Abb. 1). Daher bilden Zahnimplantate eine Schnittstelle sowohl zum Knochen als auch zum Schleimhautgewebe.

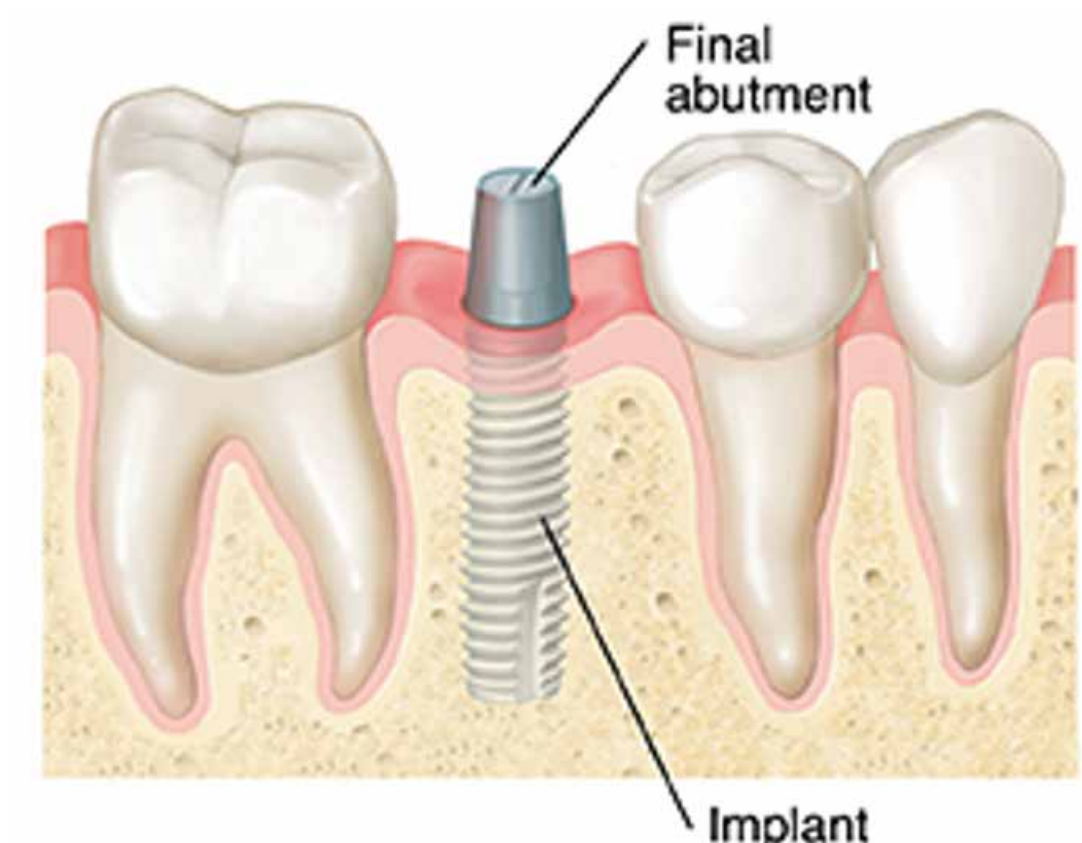


Abb. 1: Implantat-Aufbau [6]

Eine funktionelle Anbindung des Weichgewebes an die Oberfläche des Implantats ist von entscheidender Bedeutung, um das Eindringen von Bakterien in die Implantat-Knochen-Grenzfläche zu verhindern. Daher besteht die Idee, das sogenannte Abutment eines Zahnimplantats mit Streptavidin-Biotin zu funktionalisieren und darauf das Biomolekül Fibronectin zu immobilisieren, mit dem Ziel, anti-adhäsive und integrationsfördernde Eigenschaften zu erhalten (vgl. Abb. 2). Diese Studie baut auf aktuellen Ergebnissen aus der vorliegenden Masterarbeit [5] sowie auf Vorarbeiten zur Biofunktionalisierung von Oberflächen in der AG Biophysik auf [1–4].

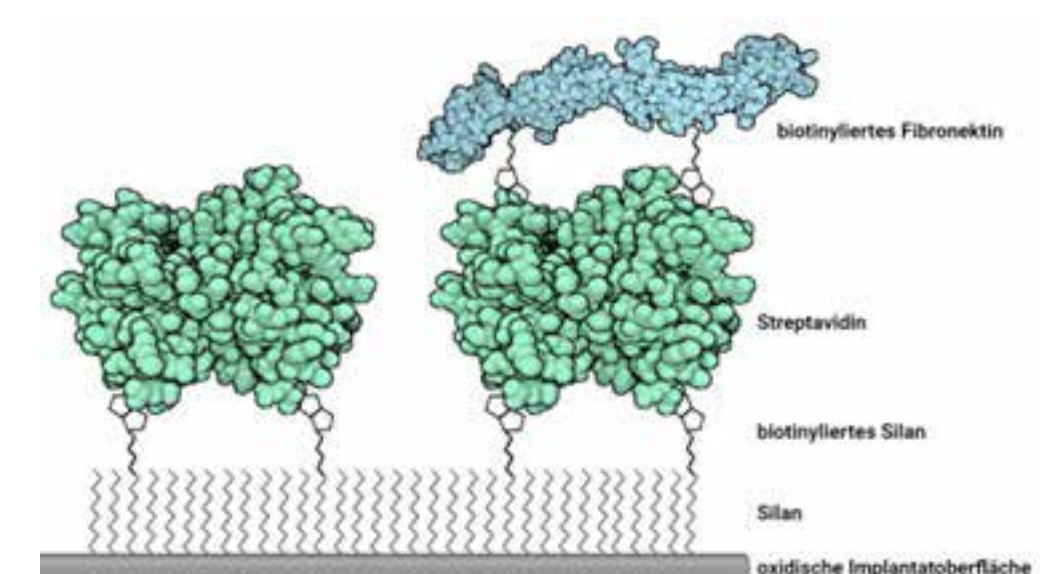


Abb. 2: Aufbau des molekularen Schichtsystems mit Adhäsionsprotein.

Die anti-adhäsiven Eigenschaften wurden mit einem Adhäsionsassay und die Erweiterung zum Multilayersystem mit Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) untersucht [5]. Milchsäurebakterien tragen zum initiierten Schritt der Biofilmbildung bei. Daher wurde der Adhäsionsassay mit Milchsäurebakterien durchgeführt. Es ist eine prozentuale Reduktion um 65 % zu verzeichnen. Der signifikante Unterschied zwischen den beiden Proben konnte mit statistischen Parametern der ANOVA-Analyse belegt werden (vgl. Abb. 3). Die Suppression unspezifischer Adsorption lässt sich auf die nicht-kovalente Bindung zwischen dem Streptavidin und Biotin zurückführen, da im Idealfall die zwei restlichen Bindungstaschen für das Biotin frei vorliegen und nichts weiteres binden kann als das Biotin. Molekulare Monolagen sind nahezu ungeladen, sodass keine elektrostatischen Wechselwirkungen mit Mikroorganismen induziert werden können. Es handelt sich um einen anti-adhäsiven Effekt und nicht um einen antibiotischen Effekt [1]. Um integrationsfördernde Eigenschaften an das Weichgewebe zu induzieren, wird das Adhäsionsprotein Fibronectin immobilisiert, das in der parodontalen Wundheilung und bei der extrazellulären Matrix eine Rolle spielt. Die Adsorption des biotinylierten Fibronectins (bFn) konnte anhand einer SPR-Kinetikmessung in Echtzeit verfolgt werden (vgl. Abb. 4). Die beschriebene Oberflächenfunktionalisierung zeigt einen synergistischen Effekt aufgrund ihrer anti-adhäsiven und integrationsfördernden Eigenschaften.

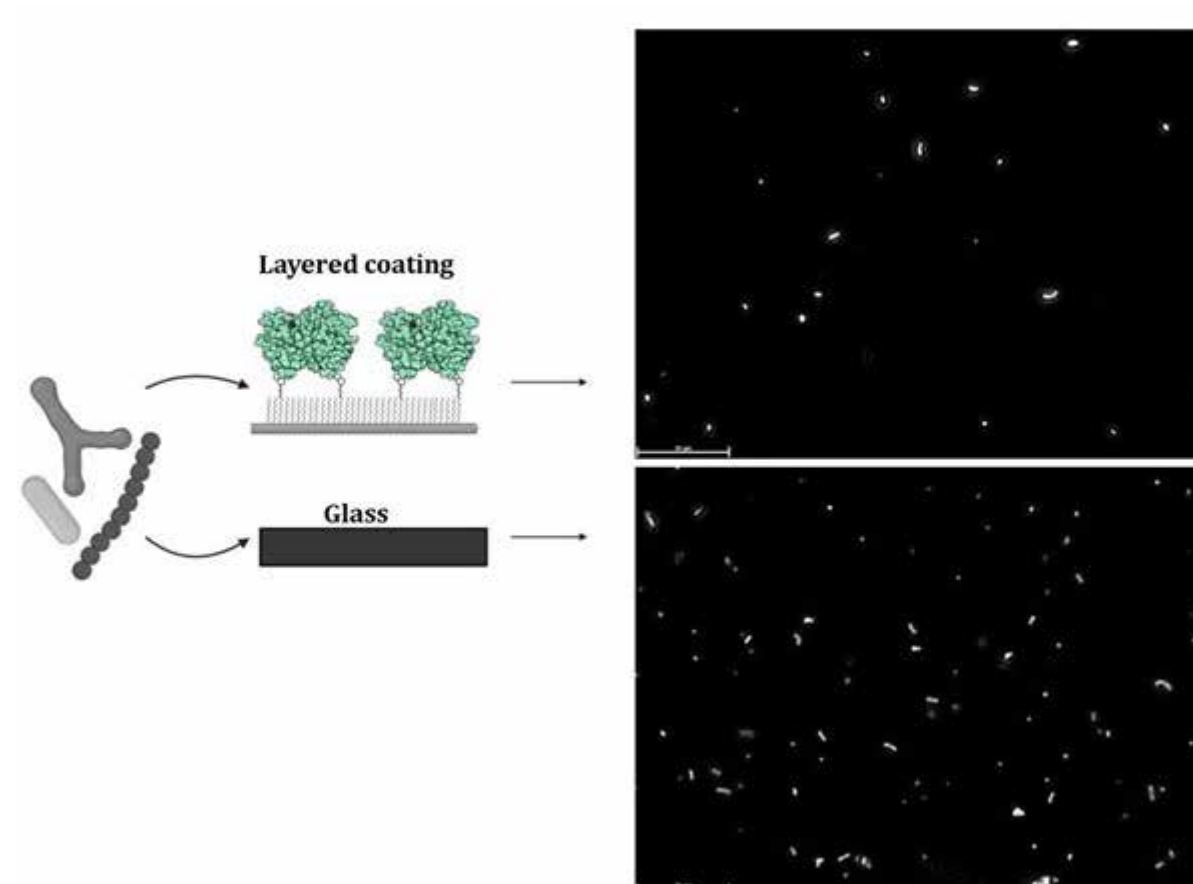


Abb. 3: Adhäsionsassay mit Milchsäurebakterien. Mikroskopische Aufnahmen von adhärenierten Milchsäurebakterien auf einer biofunktionalisierten Oberfläche (oben) und auf nativem Glas (unten).

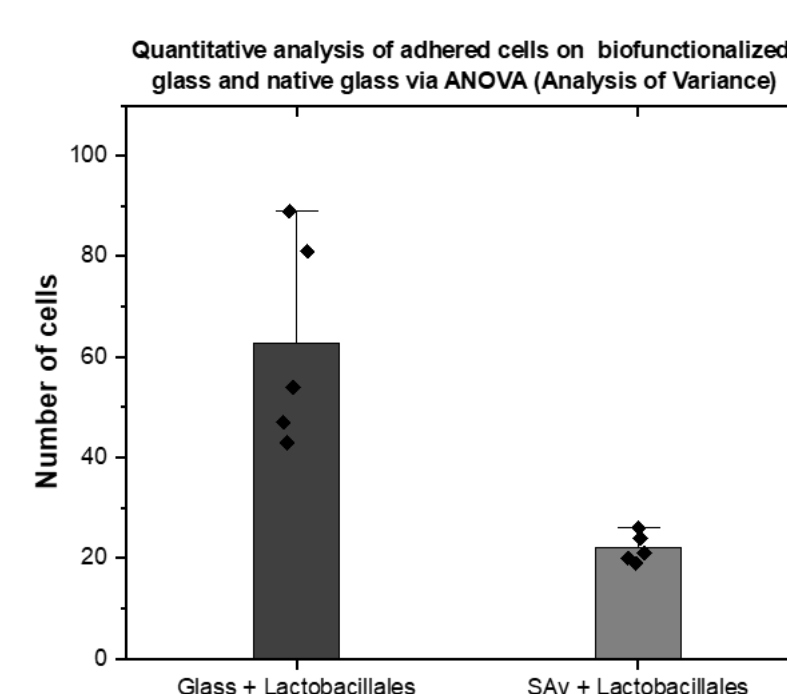


Abb. 4: Reduktion der adhärenierten Zellen auf einer unbehandelten Oberfläche und einer biofunktionalisierten Oberfläche. Die Reduktion wird durch den signifikanten Unterschied sichtbar (p -value= 0.05, ANOVA).

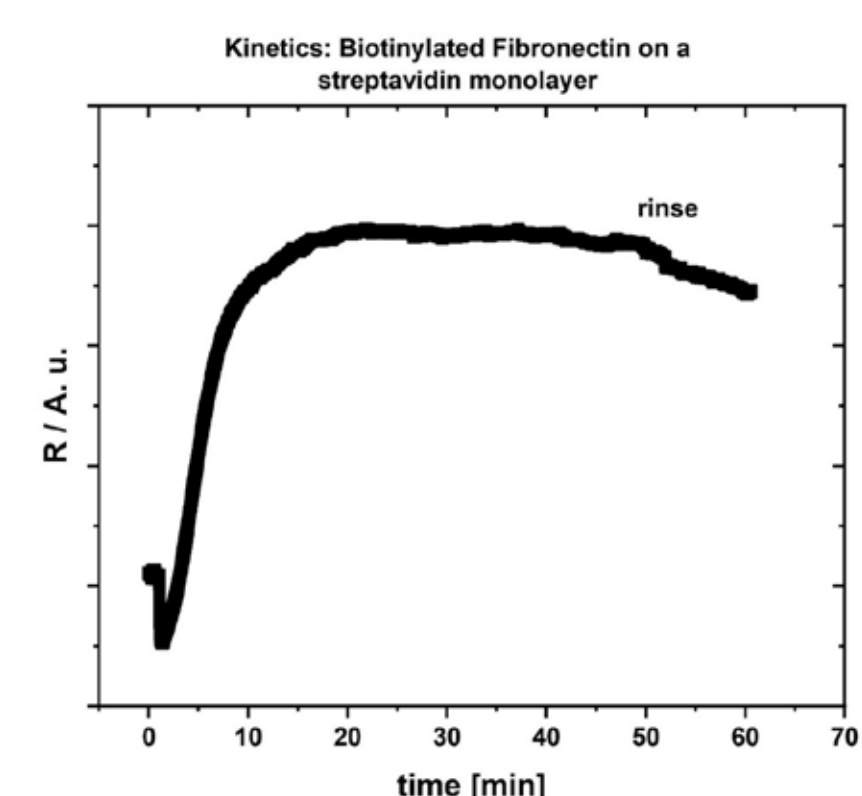


Abb. 5: Adsorptionskinetik von bFn auf einer Streptavidin-Monolage. Nach Zugabe des bFn kommt es zu einem drift-ähnlichen Anstieg der Reflektivität. Nach dem Spülgang kommt es zu einer geringfügigen und vernachlässigbaren Reduktion der Intensität.

Quellen

- [1] Ettl V, Ekart K, Kämmerer PW, Kreikemeyer B, Epple M, Veith M. Streptavidin-coated surfaces suppress bacterial colonization by inhibiting non-specific protein adsorption. *J Biomed Mater Res A* 2018; 106(3): 758–68; [https://doi.org/10.1002/jbm.a.36276][PMID: 29055106]
- [2] Lehnert M, Gorbahn M, Klein M, et al. Streptavidin-coated TiO₂ surfaces are biologically inert: protein adsorption and osteoblast adhesion studies. *J Biomed Mater Res A* 2012; 100(2): 388–95; [https://doi.org/10.1002/jbm.a.33281][PMID: 22083833]
- [3] Lehnert M, Gorbahn M, Rosin C, et al. Adsorption and conformation behavior of biotinylated fibronectin on streptavidin-modified TiO₂ surfaces studied by SPR and AFM. *Langmuir* 2011; 27(12): 7743–51; [https://doi.org/10.1021/la200908h][PMID: 21598954]
- [4] Ettl V, Belitsky A, Lehnert M, Loidl-Stahlhofen A, Epple M, Veith M. Enhanced selective cellular proliferation by multi-biofunctionalization of medical implant surfaces with heterodimeric BMP-2/6, fibronectin, and FGF-2. *J Biomed Mater Res A* 2018; 106(11): 2910–22; [https://doi.org/10.1002/jbm.a.36480]
- [5] Boukari C. Biophysikalische Charakterisierung biofunktionalisierter Dentalimplantatoberflächen: Biophysical characterization of biofunktionalized dental implant surfaces. [Recklinghausen]; [2024].
- [6] https://www.saintlukeskc.org/health-library/dental-implants-placing-abutments-and-making-your-prosthesis

Anwendungsmöglichkeiten

Die Oberflächenmodifikation des Abutments in der präklinischen Phase ermöglicht mittels zahlreicher *in vitro*-Studien initiiierende Schritte zur Kommerzialisierung eines Medizinproduktes in der dentalen Implantologie.

Kontakt

Prof. Dr. Michael Veith
Fachbereich Ingenieur- und Naturwissenschaften
Labor für Molekulare Biophysik
Tel.: +492361915-486, -443
E-Mail: michael.veith@w-hs.de

Westfälische Hochschule
Standort Recklinghausen
August-Schmidt-Ring 10
45665 Recklinghausen
www.w-hs.de

Das Verhalten von Blut auf Biomaterialien

Die ersten Schritte einer medikamentenfreien Verhinderung von In-Stent-Restenosen

Autoren: Evelin Miller, Lisa Marie Langner, Chaymae Boukari, Axel Prietz, Julian Baron, Michael Veith

Stents werden in der Medizin eingesetzt, um Arteriosklerose in Koronararterien zu behandeln. Sie dienen dort als Stützgerüst, damit die Dehnung der Arterie beibehalten werden kann. Jedoch kann genau dieser Fremdkörper zu einem weiteren Krankheitsbild, der In-Stent-Restenose, führen (Abb. 1). Um eine erneute Verengung der Arterie zu verhindern, strebt die AG Molekulare Biophysik eine Stent-Oberflächen-Biofunktionalisierung an. Somit soll in Zukunft die Vernarbung der Stent-Streben verhindert werden. Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob die bereits bekannten Eigenschaften der Oberflächenmodifikation über Streptavidin-Biotin-Interaktion [1-4] auch gegenüber Blut auftreten.

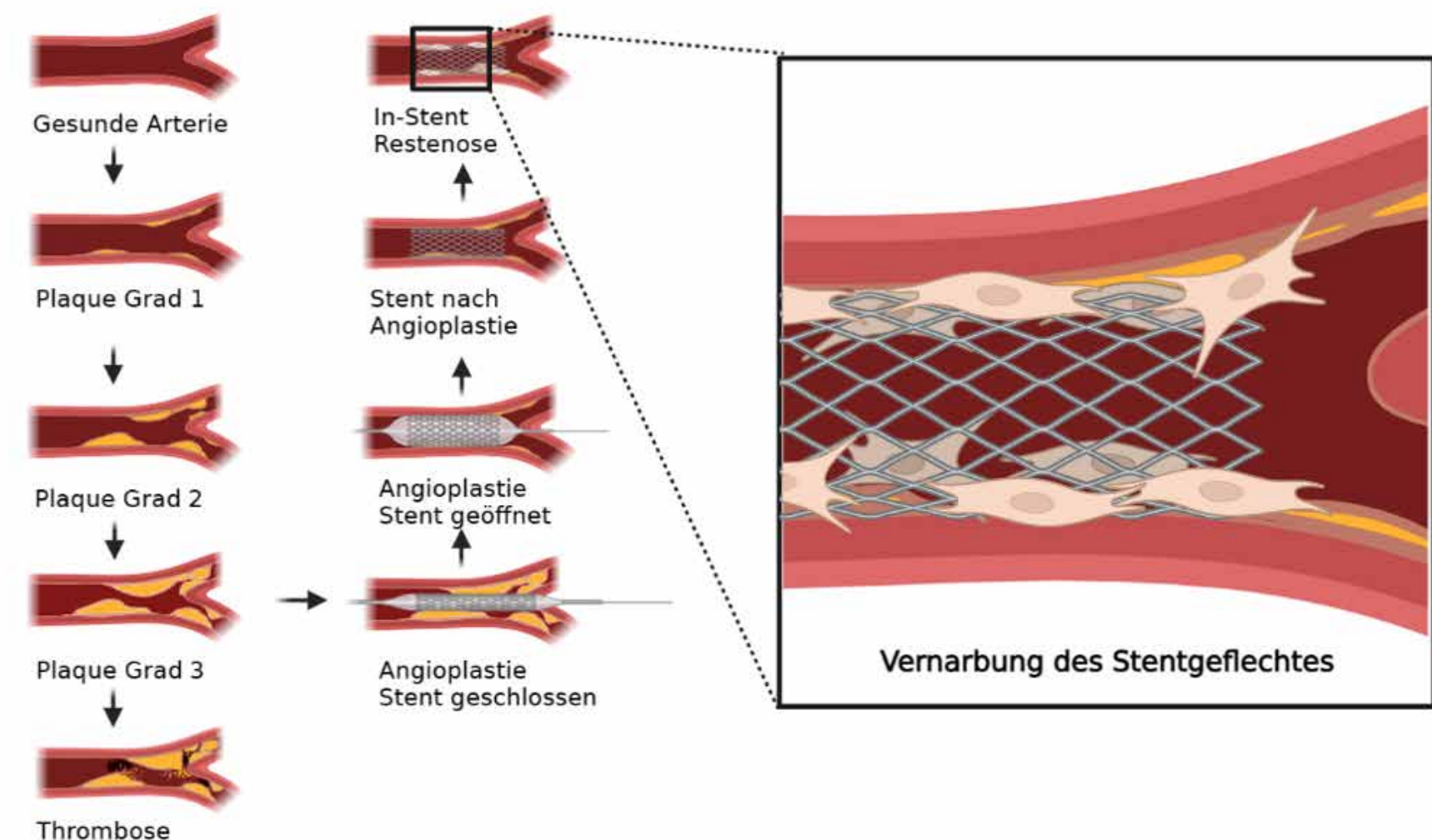


Abb. 1: Krankheitsverlauf einer arteriosklerotisch veränderten Arterie mit folgender In-Stent-Restenose [6].

Die Nutzung eines Biotin-Streptavidin-Nanoschichtsystems bietet den Vorteil, dass neben einer möglichen Biofunktionalisierung, z. B. mit Wachstumsfaktoren, ungewollte nicht-spezifische Protein-Adsorptionsprozesse verhindert werden. Diese Suppression wurde in dieser Studie mit einem Adhäsionsassay in verdünnten Erythrozytenkonzentrat überprüft. Über mikroskopische Aufnahmen konnte die Anzahl an adhärenierten Erythrozyten auf einer unbeschichteten und einer Biotin-Streptavidin beschichteten Implantat-Modelloberfläche bestimmt werden (Abb. 2). Durch die Oberflächenfunktionalisierung wurde die Adhäsion um ungefähr 74 % reduziert. Dadurch könnte die Entstehung einer Stent-Thrombose potenziell verhindert werden [5].

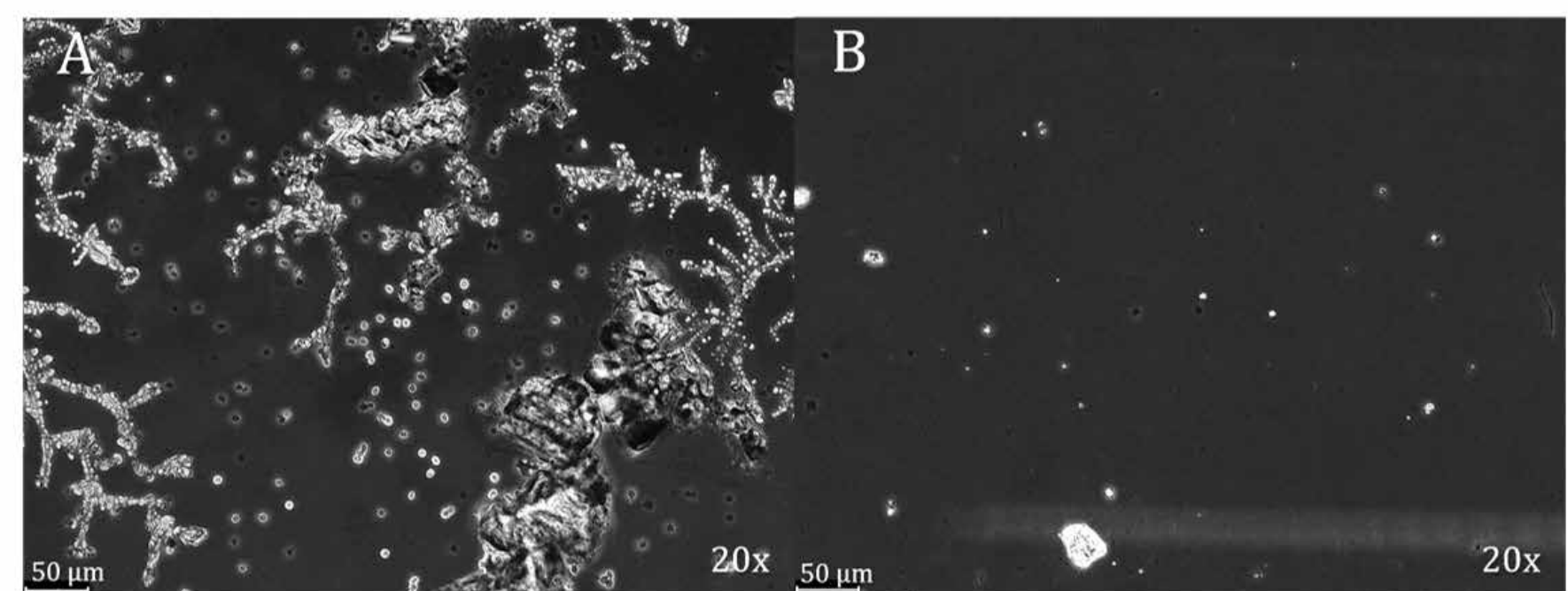


Abb. 2: Adhäsion von Erythrozyten an einer unbeschichteten Implantatmodelloberfläche (A) und einer beschichteten Implantatmodelloberfläche (B).

Um die Adhäsion von Erythrozyten in Zukunft in einem physiologischen Fließverhalten untersuchen zu können, wurden erstmals biophysikalische Messungen mit der Surface Plasmon Resonance (SPR)-Spektroskopie durchgeführt. Mit SPR-Kinetik-Messungen erfolgte „in-situ“ und in Echtzeit – auf molekularer Ebene – die Charakterisierung des Adsorptionsverhaltens einer mit verdünntem Erythrozytenkonzentrat behandelten Titanoxid-Oberfläche (Abb. 3, links). Sowohl die SPR-Kinetik-Messung als auch die beiden SPR-Winkelscan-Messungen (Abb. 3, rechts) zeigen jeweils eine Veränderung der Reflektivität nach dem Spülgang. Mit dieser Methode lässt sich künftig die Adhäsion von Erythrozyten oder Bestandteile dieser biophysikalisch verfolgen und auch ein Bedeckungsgrad abschätzen [5].

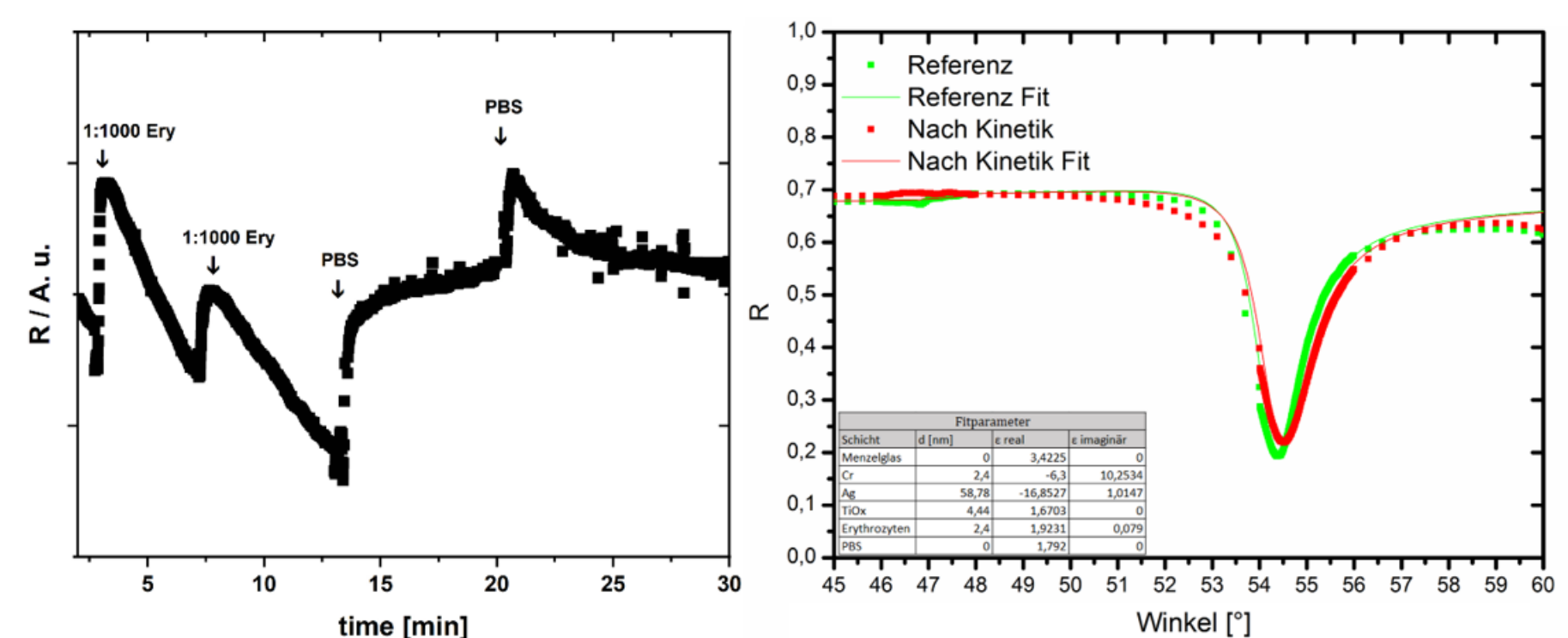


Abb. 3: Kinetische SPR-Messung (links) und Winkelscan-SPR-Messung (rechts) einer Adhäsion von Erythrozyten auf einer Titanoxid-Oberfläche.

Quellen

- [1] Ettelt, V., K. Ekat, P.W. Kämmerer, B. Kreikemeyer, M. Eppler, M. Veith. 2018. Streptavidin-coated surfaces suppress bacterial colonization by inhibiting nonspecific protein adsorption. *J Biomed Mater Res.* 106(3): 758–68. [https://doi.org/10.1002/jbm.a.36276][PMID: 29055106].
- [2] Lehnert, M., M. Gorbahn, M. Klein et al. 2012. Streptavidin-coated TiO₂ surfaces are biologically inert: protein adsorption and osteoblast adhesion studies. *J Biomed Mater Res.* 100(2): 388–95. [https://doi.org/10.1002/jbm.a.33281][PMID: 22083833].
- [3] Lehnert, M., M. Gorbahn, C. Rosin et al. 2011. Adsorption and conformation behavior of biotinylated fibronectin on streptavidin-modified TiO(X) surfaces studied by SPR and AFM. *Langmuir.* 27(12): 7743–51. [https://doi.org/10.1021/la200908h][PMID: 21598954].
- [4] Ettelt, V., A. Belitsky, M. Lehnert, A. Loidl-Stahlhofen, M. Eppler, M. Veith. 2018. Enhanced selective cellular proliferation by multi-biofunctionalization of medical implant surfaces with heterodimeric BMP-2/6, fibronectin, and FGF-2. *J Biomed Mater Res.* 106(11): 2910–22. [https://doi.org/10.1002/jbm.a.36480].
- [5] Evelin Miller. Charakterisierung von biofunktionalisierten Implantatmodelloberflächen für die medizinische Anwendung. Bachelorarbeit Westfälische Hochschule 2023 Sep 29.
- [6] URL: <https://www.biorender.com/>.