



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Untersuchung der Effekte von Gallenpigmenten auf
Caco 2 Zellen mittels SCGE Assay

Verfasserin

Barbara Pfleger Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt.

A 066 838

Studienblatt:

Studienrichtung lt.

Ernährungswissenschaften

Studienblatt:

Betreuerin / Betreuer:

A.o. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Danksagung

Mein Dank und meine Anerkennung gilt...

...in erster Linie Herrn a.o. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Ermöglichung der Durchführung meiner Masterarbeit und die tolle Betreuung dieser.

... Frau Christine Mölzer für die großartige Unterstützung, das immer offene Ohr für all meine Fragen, die Einschulung in die Zellkultur und nicht zu vergessen der gute Zuspruch und die Bemühungen während meiner ganzen Masterarbeit.

...meiner Laborpartnerin Antonia Roßmann, mit der ich viele lustige Stunden während der letzten 7 Monate im Labor und auch außerhalb erlebt habe.

...natürlich auch der gesamten Spange E für die Hilfe, die Fragen zwischendurch, das nette Arbeitsklima und die gegenseitige Unterstützung.

...ganz besonders meiner Familie, die mir dieses Studium überhaupt ermöglicht haben, mich in jeder Lebenslage unterstützt und vor allem bis hin zu meinem erfolgreichen Abschluss immer an mich geglaubt haben. Für ihre Motivation mit der sie mich die letzten Jahre stets gestärkt und begleitet haben.

... Herrn Dober Werner, der mich während meines Studiums immer unterstützt hat. Danke für das Vertrauen in mich und die vielen aufbauenden Worte, die mir einiges leichter gemacht haben.

...meinen Freundinnen, die immer ein offenes Ohr für mich haben und den guten Zuspruch ihrerseits.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERBLICK	3
2.1. Historischer Hintergrund	3
2.2. Gallenfarbstoffe	4
2.2.1. Allgemeines	4
2.2.2. Hämbiosynthese	7
2.2.3. Störungen der Hämbiosynthese	7
2.3. Getestete Gallenfarbstoffe	8
2.3.1. Bilirubin	8
2.3.1.1. Allgemeines	8
2.3.1.2. Störungen des Bilirubinstoffwechsels	11
2.3.1.3. Wirkungen von Bilirubin	13
2.3.1.4. Nachweismethoden im Plasma	15
2.3.2. Bilirubin Dimethylester	15
2.3.3. Bilirubin Konjugat (Ditaurat)	16
2.3.4. Protoporphyrin IX	18
2.4. SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) – Comet Assay	20
2.4.1. Prinzip	21
2.5. Zielsetzung	23
3. MATERIAL UND METHODEN	25
3.1. Chemikalien	25
3.2. Laborzubehör	26
3.3. Technische Geräte	27
3.4. Gallenpigmente	28
3.5. Herstellung von Lösungen und Gemischen	28
3.6. Studiendesign	29
3.7. Prätests	31
3.8. Durchführung der Experimente im Überblick	31
3.9. Zellpassage	32

3.10.	Medienwechsel	33
3.11.	Zellen einfrieren	34
3.12.	Zellen auftauen	34
3.13.	Vorbereitung der Zellen für die	35
	Einzelzellgelelektrophorese	35
3.13.1.	Aussaat der Caco 2 Zellen	35
3.13.2.	Trypanblau – Test	35
3.13.3.	Inkubation mit Gallenpigmenten	37
3.14.	SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) – Comet Assay	39
3.14.1.	Praktische Durchführung	39
3.14.2.	Elektrophorese	41
3.15.	Auswertung der Ergebnisse	41
3.16.	Statistische Auswertung	43
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
4.1.	Ergebnisse SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) – Comet Assay	44
4.2.	Effekte von Bilirubin (alpha) auf DNA-Strangbrüche	45
4.3.	Effekte von Bilirubin Konjugat (Ditaurat) auf DNA- Strangbrüche	47
4.4.	Effekte von Bilirubin Dimethylester auf DNA-Strangbrüche	49
4.5.	Effekte von Protoporphyrin IX auf DNA-Strangbrüche	51
4.6.	Gesamtüberblick	53
4.7.	Diskussion	55
5.	SCHLUSSBETRACHTUNG	62
6.	ZUSAMMENFASSUNG	64
7.	SUMMARY	65
8.	LITERATURVERZEICHNIS	66
9.	WEBVERZEICHNIS	72

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: pH-Wert abhängige Löslichkeit von Bilirubin in wässriger Tris Base [Brodersen, 1979]</i>	5
<i>Abbildung 2: Abbau von Häm zu Bilirubin [Dennergy et al., 2001]</i>	6
<i>Abbildung 3.: Strukturformel von Bilirubin [http://de.wikipedia.org/wiki/Bilirubin]</i>	8
<i>Abbildung 4: Abbau von Bilirubin zu Stercobilin [Löffler&Petrides, 2007]</i>	10
<i>Abbildung 5.: Strukturformel Bilirubin Dimethylester [http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB5338582_EN.htm]</i>	16
<i>Abbildung 6: Strukturformel von Bilirubin Konjugat (Ditaurat) [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB0685386.htm]</i>	18
<i>Abbildung 7: Strukturformel von Häm [http://www.chemie.unibas.ch/~team2008/CErker/Molek%FCle.html]</i>	20
<i>Abbildung 8: Strukturformel von PP IX [http://nl.wikipedia.org/wiki/Bestand:Protoporphyrin_IX.png]</i>	20
<i>Abbildung 9: Prinzip der Einzelzellektrophorese [http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx]</i>	21
<i>Abbildung 10: Beschädigte Zelle mit Schweif aus DNA Bruchstücken</i>	22
<i>Abbildung 11: Caco 2 Zellen</i>	30
<i>Abbildung 12: Inkubation der Zellen bei 37°C</i>	33
<i>Abbildung 13: Trypanblau</i>	36
<i>Abbildung 14: Countess Zellcounter</i>	36
<i>Abbildung 15: Probenschemainnerhalb einer 6 Well Platte</i>	38
<i>Abbildung 16: Schematischer Überblick–Auszählverfahren</i>	42
<i>Abbildung 17: Screenshot Komet 5.5 – beschädigte Caco 2 Zelle</i>	43

Abbildung 18: Ergebnis Comet Assay von zwei unabhängigen Versuchen nach einer 24-stündigen Inkubation von Caco 2 Zellen mit Bilirubin. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert _____ 45

Abbildung 19: Ergebnis Comet Assay von zwei unabhängigen Versuchen nach einer 24-stündigen Inkubation von Caco 2 Zellen mit Bilirubin Konjugat (ditaurat). Das dargestellte Balkendiagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert _____ 47

Abbildung 20: Ergebnis Comet Assay von zwei unabhängigen Versuchen nach einer 24-stündigen Inkubation von Caco 2 Zellen mit Bilirubin Dimethylester. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert _____ 49

Abbildung 21: Ergebnis Comet Assay von zwei unabhängigen Versuchen nach einer 24-stündigen Inkubation von Caco 2 Zellen mit Protoporphyrin IX. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert _____ 51

Abbildung 22: Gesamtüberblick der 4 Gallenpigmente Bilirubin (alpha), Bilirubin ditaurat (conjugat), Bilirubin dimethyl ester und Protoporphyrin IX nach einer 24 stündigen Inkubation mit Caco 2 Zellen (nur Lyse). Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die Abweichungen der getesteten Konzentrationen von der hier Null gesetzten Negativkontrolle. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert _____ 53

Abbildung 23: Gesamtüberblick der 4 Gallenpigmente Bilirubin (alpha), Bilirubin ditaurat (conjugat), Bilirubin dimethyl ester und Protoporphyrin IX nach einer 24 stündigen Inkubation mit Caco 2 Zellen (t-BOOH Zugabe). Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die Abweichungen der getesteten Konzentrationen von der hier Null gesetzten Negativkontrolle. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert _____ 54

Abbildung 24: (A) Bilirubin Injektion i.p. in BALB/c Mäuse mit 25mg/kg zweimal täglich, bis zum Erreichen eines konstanten Plasmabilirubin Levels von 30-40 μ M nach 3 Tagen.

(B) Die Injektionen von Bilirubin in BALB/c Mäusen mit 25mg/kg zweimal täglich reduzierte das HRT-18 Tumorwachstumsrisiko signifikant. Das Diagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,001$ definiert ($n= 6$ pro Gruppe) [ÖLLINGER et al., 2007] _____ 57

Tabellenverzeichnis

Tabelle1.: Wirkungen der tierischen Galle _____	3
Tabelle 2: Löslichkeit von Bilirubin in verschiedenen Lösungsmitteln bei 25°C [mod. nach Brodersen, 1979] _____	4
Tabelle 3: Zusammenhang zwischen Plasma Bilirubin Levels und Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen [mod. nach Verma et al., 2005] _____	14
Tabelle 4: Benötigte Energie für die Bildung von Bilirubin Ditaurat [mod. nach Wiwanitkit, 2007] _____	17
Tabelle 5: In der Studie verwendete Chemikalien _____	25
Tabelle 6: In der Studie verwendetes Laborzubehör _____	26
Tabelle 7: In der Studie verwendete technische Geräte _____	27
Tabelle 8: getestete Gallenpigmente _____	28
Tabelle 9: Arbeitsschema _____	31
Tabelle 10: Summenformel und Molekulargewicht der 4 getesteten Gallenfarbstoffe _____	37
Tabelle 11: Konzentration der Stocklösungen und finale Konzentration der getesteten Gallenpigmente _____	37
Tabelle12: Signifikante Unterschiede ($p<0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer 24 stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin _____	45

Tabella 13: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen unter Einfluss des Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid nach einer 24 stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin (alpha) _____ 45

Tabella 14: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin Konjugat (Ditaurat) _____ 47

Tabella 15: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen unter Einfluss des Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin Konjugat (Ditaurat) _____ 47

Tabella 16: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin Dimethylester _____ 49

Tabella 17: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen unter Einfluss des Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin Dimethylester _____ 49

Tabella 18: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Protoporphyrin IX _____ 51

Tabella 19: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen unter Einfluss des Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Protoporphyrin IX _____ 51

1. Einleitung

„Dosis sola facit venenum“- Wie schon Paracelsus 1538 erkannte, sind toxischen Substanzen nicht immer nur negative Auswirkungen zuzuschreiben - im Gegenteil, „die Dosis macht das Gift“. Diesem Motto getreu rückten auch Gallenpigmente in den letzten 20 Jahren verstärkt in das Licht der Wissenschaft.

Während diese Pigmente, insbesondere das Bilirubin, in der indischen und traditionellen chinesischen Medizin schon vor tausenden von Jahren zur Therapie für ganz bestimmte Erkrankungen wie Epilepsie, Fieber, Asthma, Bronchitis, Stress bedingten Hypersensibilitäten, aber auch als Abtreibungs- und Potenzmittel eingesetzt wurden [Bulmer et al., 2008], galten Gallenpigmente in unseren Breiten lange Zeit als unbrauchbare, toxische Abbauprodukte des menschlichen Organismus. Demnach waren sie eher im Kontext mit der Behandlung angeborener Stoffwechselerkrankungen wie beispielsweise dem Gilbert's Syndrom (Morbus Meulengracht) und damit verbundenen Hyperbilirubinämien interessant.

Gallenpigmente stellen heutzutage ein großes und wichtiges Forschungsgebiet für die Wissenschaft dar. So konnten bisher wertvolle Erkenntnisse über ihre antioxidativen [Bulmer et al., 2008], antimutagenen [Arimoto et al., 1995], antiapoptotisch [Dudnik et al., 2001] und antiviralen [McPhee et al., 1996] Eigenschaften gewonnen werden.

Besondere Bedeutung kommt diesen im Zusammenhang mit ihrer nachweislich protektiven Wirkung bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen und dem zentralen Nervensystem in Verbindung mit oxidativem Stress zu. Sogar antikanzerogene Aktivität wird den Gallenpigmenten nach heutigem Wissen zugeschrieben [Hunt, 2001; Liu, 2006; Vitek, 2002].

Jedoch muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass dieses Gebiet dennoch sehr unerforscht ist und weitere Untersuchungen unabdingbar sind.

In Anbetracht der weiter zunehmenden Zahl an Krebserkrankten, gewinnt die Suche nach erfolgreichen Therapie- und Heilungsmöglichkeiten immer mehr Bedeutung.

In diesem Sinne soll die vorliegende Arbeit wertvolle Erkenntnisse liefern und einen weiteren Wissenszuwachs in der Beleuchtung des komplexen Systems der Krebserkrankungen und ihrer Therapie bringen.

Die Arbeit beschäftigt sich mit der *in vitro* Wirkung der Gallenpigmente Bilirubin (alpha), Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX auf menschliche Darmkrebszellen. Diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit meiner Kollegin Antonia Roßmann durchgeführt, die sich auf die entsprechenden Auswirkungen auf menschliche Leberkrebszellen konzentriert hat.

2. Literaturüberblick

2.1. Historischer Hintergrund

In der traditionellen chinesischen Medizin wurde die Galle schon vor tausenden von Jahren als Heilmittel gegen diverse Krankheiten eingesetzt. Gallensteine, sowohl in ihrer gesamten, als auch in pulverisierter Form, wurden zur Behandlung von Epilepsie, Fieberkrämpfen, Wundkrampf und Kiefersperre verabreicht. Man versprach sich von den grünen Gallensteinen, auch „Bovis Calculus“, „Niu Huang“ oder „bezoar“ genannt, unter Voraussetzung einer regelmäßigen Einnahme, eine Verbesserung des Erinnerungsvermögens einerseits und eine Verlängerung des Lebens andererseits [Read, 1976].

Auch die Galle selbst wurde zu therapeutischen Zwecken eingesetzt:

Krankheitsbild	Tierische Galle
Blutvergiftung	Schwein, Fuchs
Krämpfe	Tiger, Rind, Wildschwein
Fieber	Rind, Schwein, Bär
Hämorrhoiden, Impotenz	Rind
Gastrointestinale Störungen	Schaf, Bär

Tabelle1.: Wirkungen der tierischen Galle [mod. nach Read, 1976]

Heute weiß man, dass die unterschiedlichen Gallenfarbstoffe, vor allem Bilirubin, ein hohes Potential im medizinischen Bereich haben und sowohl antioxidativ [Bulmer et al., 2008], antimutagen [Arimoto et al., 1995 und Bulmer et al., 2008], antiapoptotisch [Dudnik et al., 2001] und antiviral [McPhee et al., 1996] wirken.

2.2. Gallenfarbstoffe

2.2.1. Allgemeines

Die Gallenfarbstoffe entstehen beim Abbau von Porphyrinen, vor allem beim Häm-Anteil des Hämoglobins, aber auch anderer Hämproteine, wie Katalase und Cytochrom P450. Sie sind schlecht wasserlöslich, aber gut löslich in DMSO (Dimethylsulfoxid) [Löffler & Petrides, 2007].

Die Löslichkeit von Bilirubin in unpolaren Lösungsmitteln ist niedrig und steigt sowohl mit der Polarität des Lösungsmittels, als auch mit dem pH-Wert. Die Löslichkeit unter Ausschluss von Licht liegt bei 7nMol bei 37°C und einem pH von 7,4 [Brodersen, 1979].

Neue Studien zeigen, dass die Löslichkeit von unkonjugiertem Bilirubin 0,15µM in 27vol% DMSO und 2,2µM in 64vol% DMSO beträgt und mit dem pH-Wert steigt [Mukerjee et al., 2002].

Lösungsmittel	Löslichkeit	Lösungsmittel	Löslichkeit
n-Hexan	0µM	Carbon tetrachlorid	40µM
Cyclohexan	0µM	Xylen	45µM
n-Heptan	0µM	Toluen	50µM
Paraffin (flüssig)	0µM	Pyrrrole	150µM
Methanol	0µM	Pyridine	580µM
Ethanol	0µM	Dichlormethan	1800µM
1-Propanol	0µM	Formamid	2300µM
1-Butanol	0µM	Chloroform	2500µM
Ether	1µM	Wasser	>10 000µM
Aceton	10µM	Dimethylsulfoxid	>10 000µM

Tabelle 2: Löslichkeit von Bilirubin in verschiedenen Lösungsmitteln bei 25°C [mod. nach Brodersen, 1979]

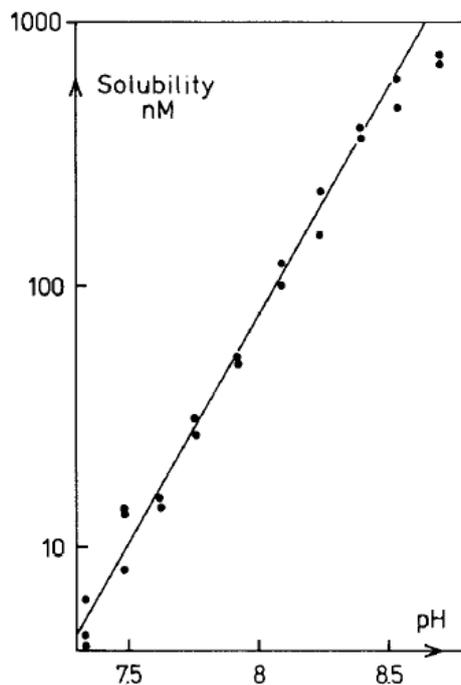


Abbildung 1: pH-Wert abhängige Löslichkeit von Bilirubin in wässriger Tris Base [Brodersen, 1979]

Wässrige pK_a -Werte von unkonjugiertem Bilirubin sind wichtige Bestimmungsgrößen für die Löslichkeit und den Transport. In seiner diaziden Form (H_2B) hat unkonjugiertes Bilirubin eine niedrige Löslichkeit von nur 51nM in Wasser [Mukerjee et al., 2002].

Wie schon der Name besagt werden Gallenfarbstoffe in der Galle gesammelt und sowohl über den Urin, als auch den Stuhl ausgeschieden. Die tägliche Ausscheidung der Gallenfarbstoffe entspricht ungefähr der Menge an Hämoglobin, die täglich gebildet wird. Der Grund hierfür liegt darin, dass Hämoglobin den größten Teil des Häms im Organismus enthält. Durch den Abbau von Hämoglobin und anderer Hämproteine werden Aminosäuren, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Eisen frei, welche im Gegensatz zum Porphyringerüst wiederverwertet werden. Dieses wird von der Leber, der Milz und dem Knochenmark in zwei Reaktionen zunächst oxidativ zu Biliverdin gespalten und im Anschluss zu Bilirubin reduziert [Löffler & Petrides, 2007].

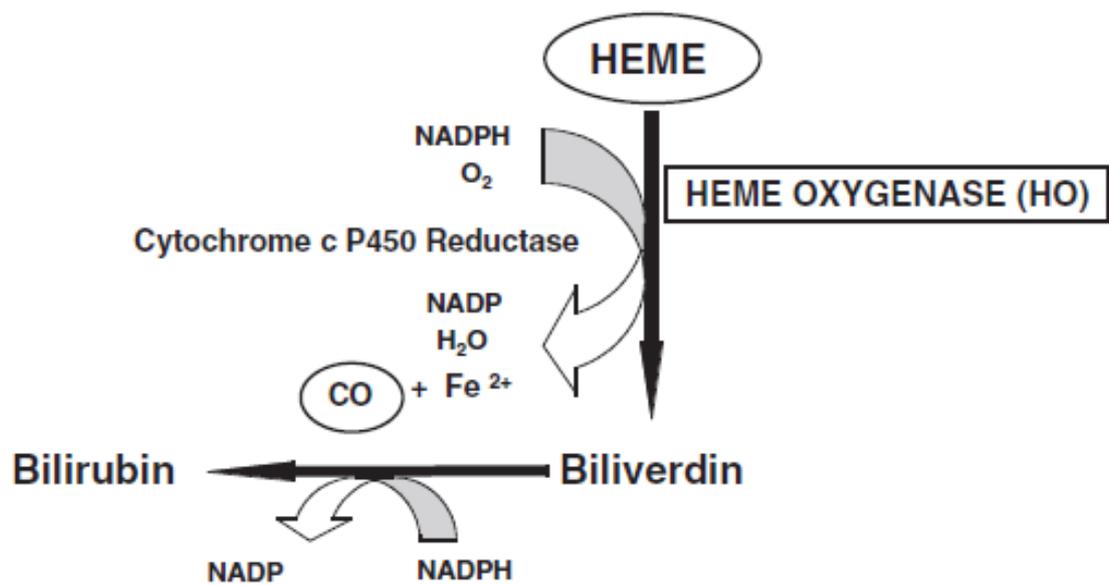


Abbildung 2: Abbau von Häm zu Bilirubin [Dennerly et al., 2001]

Kleine Mengen an Hämoglobin werden aus den Erythrozyten in das Plasma freigesetzt und an α_2 -Haptoglobin gebunden. Das freigesetzte Häm wird im Blut an Hämopexin gebunden und so mit einer Halbwertszeit von etwa 7-8 Stunden eliminiert. Die Funktionen des Häms bestehen im Transport von Sauerstoff und Elektronen, sowie im Abbau von Wasserstoffperoxid.

Ein Erwachsener mit einem Körpergewicht von 70kg setzt circa 6,25g/Tag Hämoglobin um, das entspricht 1,3mmol/kg Körpergewicht/Tag [Löffler & Petrides, 2007].

2.2.2. Hämbiosynthese

Die Bildung des Häms erfolgt zum größten Teil durch die erythrozytären Vorläuferzellen der Erythrozyten im Knochenmark, weil diese auch für die Biosynthese des Hämoglobins verantwortlich sind. Die Erythrozyten-Halbwertszeit beträgt 25-40 Tage [Hermann, 2004].

Die Biosynthese der Hämgruppe wird durch 8 enzymatische Reaktionen katalysiert. Die Hämgruppe, welche ein Bestandteil der Hämproteine (Katalase, Peroxidase, Hämoglobin, Myoglobin, u.a.) ist, wird aus Glycin und Succinyl-CoA gebildet. Die Regulation der Hämbiosynthese geschieht in der Leber und im Knochenmark unterschiedlich, da bei der Bildung von Hämoglobin eine Koordination mit der Synthese der α - und β -Globinketten und dem Eisenstoffwechsel erforderlich ist [Löffler & Petrides, 2007].

2.2.3. Störungen der Hämbiosynthese

Unter einer sogenannten sideroblastischen Anämie versteht man eine Störung des ersten Schrittes der Hämbiosynthese, der δ -ALA-Synthase-2 im Knochenmark. Angeborene genetische Veränderungen von diversen Enzymen der Hämbiosynthese werden als primäre Porphyrinen bezeichnet, erworbene Porphyrinen, als sekundäre. Diagnostiziert werden solche Porphyrinen durch die Analyse von Porphyrin im Harn und Fäzes [Löffler & Petrides, 2007].

2.3. Getestete Gallenfarbstoffe

2.3.1. Bilirubin

2.3.1.1. Allgemeines

Der gelbe Gallenfarbstoff Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Häm-Anteils des Hämoglobins und anderer Hämproteine [Wang et al., 2005].

Häm wird durch verschiedene Hämproteine, wie Hämoglobin, oder Cytochrom P450 abgebaut und durch Häm Oxygenase metabolisiert. Daraus entstehen Kohlenstoffmonoxid (CO), Biliverdin und freies Eisen. Im Anschluss wird Biliverdin durch das Enzym Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert [Kapitulnik, 2004].

Dabei erfolgt eine Umwandlung der Methingruppe in eine Methylengruppe, was am Kohlenstoffatom 10 ersichtlich ist. Biliverdin besitzt dort im Vergleich zu Bilirubin eine zusätzliche Doppelbindung [Löffler & Petrides, 2007].

Bilirubin ist wasserunlöslich, weil die zwei polaren Carboxylgruppen in den Propionat Seitenketten mit den NH-Gruppen und dem in Lactamkonfiguration vorliegenden Sauerstoff der Pyrrolringe intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen bilden [Löffler & Petrides, 2007].

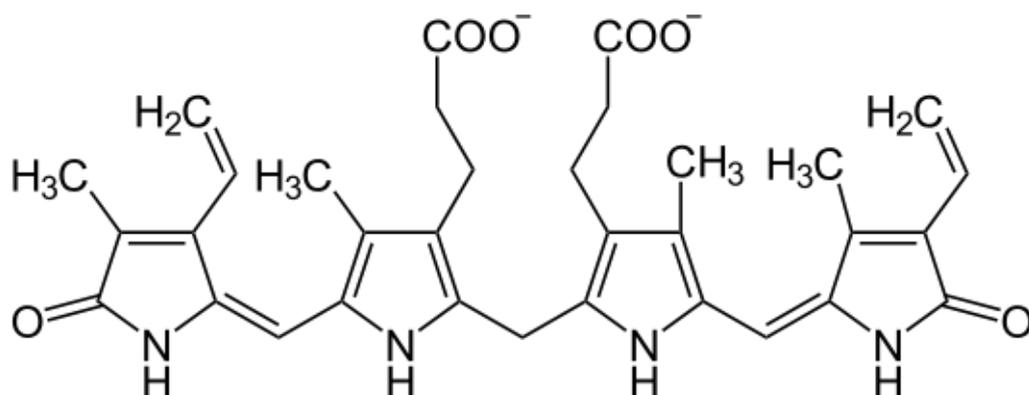
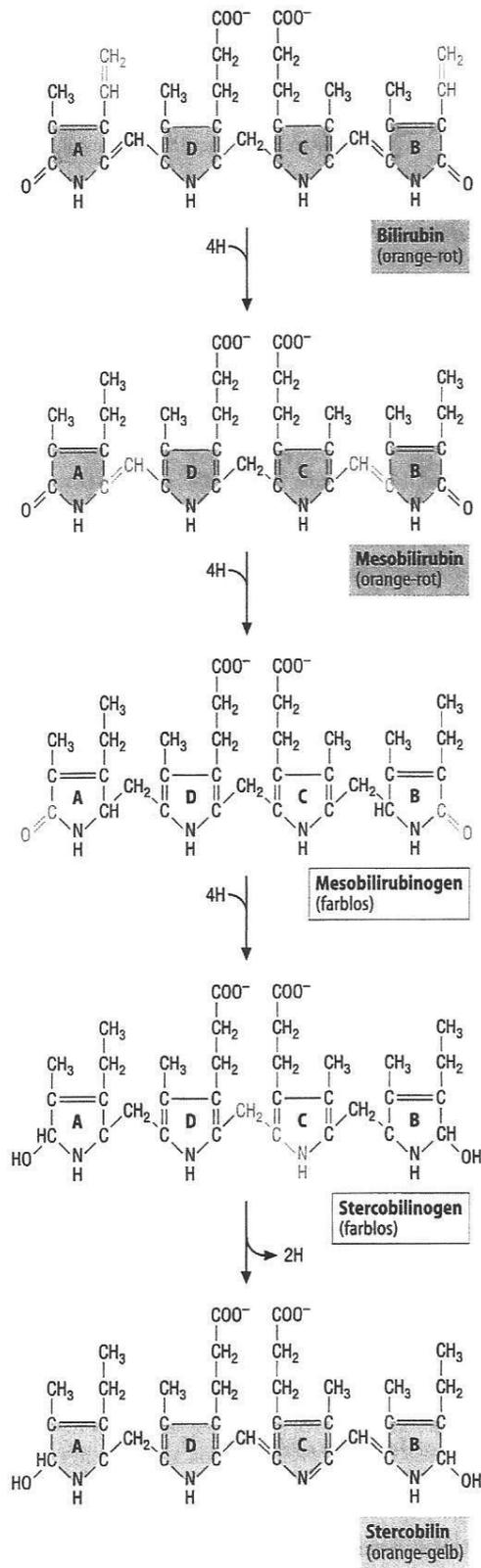


Abbildung 3.: Strukturformel von Bilirubin [<http://de.wikipedia.org/wiki/Bilirubin>]

Unter physiologischen Bedingungen ist Bilirubin unkonjugiert (96%) und an Albumin gebunden, welches durch Verbesserung der Löslichkeit den Gallenfarbstoff zur Leber transportiert. Der Plasmaspiegel des an Albumin gebundenen Bilirubins liegt im Normalfall zwischen 0,1-1,2mg/dl [Wang et al., 2005; Löffler & Petrides].

Dort wird er an Glutathion-S-Transferase gebunden und durch mikrosomale UGT1A1 (uridin diphospho glucuronate glucuronosyltransferase) konjugiert. Die hepatische UGT1A1 Aktivität ist bei der Geburt noch relativ gering, was den vorübergehenden Ikterus bei Neugeborenen erklärt, und reift in den ersten 10 Lebenstagen aus [Löffler&Petrides, 2007].

Der Transport der Bilirubin Glucuronide erfolgt durch die MRP2-Pumpe in die Galle, womit sie in den Darm gelangen. Bilirubin wird im Dickdarm durch anaerobe Bakterien weiter zu Stercobilinogen abgebaut. Als Zwischenprodukte entstehen Mesobilirubin, sowie Mesobilirubinogen. Durch den nächsten Hydrierungsschritt an den Pyrrolringen entsteht Stercobilinogen, das durch Dehydrierung einer Methylengruppe in Stercobilin umgewandelt wird. Ein Teil (20%) der Bilirubin-Abbauprodukte unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf, und ein geringer Prozentsatz wird über das Blut zu den Nieren transportiert, wo es entweder als Urobilin, oder als Urobilinogen mit dem Urin ausgeschieden wird [Wang et al., 2005; Löffler&Petrides, 2007].



aus der Leber kommend

Darm

Darm

Darm

Darm

Abbildung 4: Abbau von Bilirubin zu Stercobilin [Löffler&Petrides, 2007]

Täglich werden ungefähr 4mg/kg Körpergewicht an Bilirubin produziert. Beim Abbau von 1g Hämoglobin entstehen 35mg Bilirubin. Durch den täglichen Hämoglobinabbau entstehen ungefähr 220mg Bilirubin, jedoch kommen durch den Abbau von anderen Hämproteinen noch zusätzliche Mengen an Bilirubin hinzu, sodass sich eine Gesamtproduktion von 250mg Gallenfarbstoffen/Tag ergibt [Wang et al., 2005].

Die molare Konzentration von Albumin (500-700µmol/l) übersteigt im Normalfall die des Bilirubins (3-17µmol/l). Freies, unkonjugiertes Bilirubin wirkt gegenüber verschiedenen Zelltypen toxisch, sobald es im Plasma die molare Konzentration des Albumins übersteigt (Molare Ratio Bilirubin:Albumin > 1), was die Folge einer Bilirubinzephalopathie (Kernikterus) mit sich ziehen kann. Die Toxizität des Gallenfarbstoffes ist unter anderem bei einer neonatalen Hyperbilirubinämie, sowie bei Patienten mit Crigler-Najjar Syndrom sichtbar. Eine leichte Hyperbilirubinämie (Gilbert's Syndrom) hingegen könnte durch die antioxidative Wirksamkeit von Bilirubin zytoprotektive Effekte haben [Wang et al., 2005].

2.3.1.2. Störungen des Bilirubinstoffwechsels

Ab einem Gehalt von 2-3mg/100ml Gesamtbilirubin im Plasma spricht man von einer Hyperbilirubinämie. Hierbei tritt der Gallenfarbstoff in das Gewebe über, und es kommt zu einer Gelbfärbung der Haut und der Skleren. Dieser Zustand wird als Gelbsucht oder Ikterus bezeichnet und kann unter anderem die Folge einer Störung der Bilirubinausscheidung in der Leber sein, oder aus einer erhöhten Bildung resultieren.

Prinzipiell unterscheidet man zwischen einer erworbenen und einer angeborenen Hyperbilirubinämie [Löffler & Petrides, 2007].

Erworbene Hyperbilirubinämie

Aus einem gesteigerten Abbau der Erythrozyten resultiert eine vermehrte Bildung der Gallenfarbstoffe. Sobald mehr Bilirubin gebildet wird als ausgeschieden werden kann, kommt es zu einer Hyperbilirubinämie und zum hämolytisch bedingten Ikterus. Hierbei ist das unkonjugierte Bilirubin im Plasma erhöht. Bei Neugeborenen ist eine Hyperbilirubinämie medizinisch zu vernachlässigen. Innerhalb einer Woche pendelt sich der erhöhte Bilirubinwert auf ein normales Niveau ein [Löffler & Petrides, 2007].

Angeborene Hyperbilirubinämie

Zu den angeborenen Hyperbilirubinämien zählt das sogenannte Gilbert's Syndrom, oder auch Morbus Meulengracht genannt, wobei eine unkonjugierte Hyperbilirubinämie mit Werten bis zu 6mg/100ml ($>17,1\mu\text{mol/L}$) vorliegt. Je nach Bevölkerungsgruppe liegt die Prävalenz bei 3-17%. Das Gesamtbilirubin steigt hierbei oft erst nach körperlicher Anstrengung an. Die Ursache liegt in einer Mutation des UDP-Glucuronyltransferase I-Gens (UGT1A1), wobei die Betroffenen aufgrund dessen, möglicherweise eine höhere Medikamentenempfindlichkeit aufweisen im Vergleich zu nicht Betroffenen. UGT1A1 ist in erster Linie für die Konjugation von Bilirubin verantwortlich und ermöglicht seine Ausscheidung. Wenn alle 5 Exonregionen des Gens von Mutationen betroffen sind, spricht man vom sogenannten Crigler-Najjar-Syndrom ($>335\mu\text{mol/L}$ unkonjugiertes Bilirubin) [Löffler & Petrides, 2007].

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass ein erhöhter Anteil an zirkulierendem Bilirubin eine negative Assoziation in Bezug auf die Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen aufweist [Yoshino et al., 2010; Lin et al., 2010; Ghem et al., 2010; Lin et al., 2006].

Sowohl die totale antioxidative Kapazität, als auch das HDL Cholesterin zeigen bei Personen mit Gilbert´s Syndrom höhere Werte im Vergleich zu Kontrollgruppen. So liegt auch die Prävalenz von koronaren Herzerkrankungen bei betroffenen Personen bei 2%, bei nicht Betroffenen bei 12,1% [Vitek et al., 2002], was eine mögliche kardioprotektive Wirkung von Bilirubin unterstreicht.

Weiters fand man heraus, dass Personen mit Gilbert´s Syndrom signifikant höhere Konzentrationen an unkonjugiertem Bilirubin, TEAC (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) und FRAP (ferric reducing ability of plasma) zeigen. Mit TEAC und FRAP wird die antioxidative Kapazität eines bestimmten Stoffes gemessen und angegeben [Benzie & Strain, 1996].

Zwei weitere Formen angeborener Hyperbilirubinämien sind einerseits das Dubin-Johnson- und andererseits das Rotor-Syndrom, bei denen eine Mutation im MRP2-Gen des Bilirubintransportes durch die Hepatozyten vorliegt. Eine chronische Gelbsucht mit erhöhten Werten des konjugierten oder unkonjugierten Bilirubins charakterisiert das Dubin-Johnson Syndrom, wobei man große Mengen eines gelbbraunen, oder schwarzen Pigments in den hepatischen Lysosomen findet. Beim Rotor-Syndrom liegt eine chronische konjugierte Hyperbilirubinämie vor [Löffler & Petrides, 2007].

2.3.1.3. Wirkungen von Bilirubin

Bilirubin hat aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften zahlreiche physiologisch nachteilige Wirkungen, wie die Bildung von Gallensteinen, die Neurotoxizität und die Notwendigkeit einer weiteren Metabolisierung. Jedoch wurden die Salze des Bilirubins schon vor vielen Jahrhunderten in der chinesischen Medizin als Heilmittel verwendet, was schon damals auf das vielfältige Potential des Gallenfarbstoffes hinwies [Rao et al., 2006].

Heute hat man mehrfach die antioxidativen und antimutagenen Eigenschaften von Bilirubin nachgewiesen.

Gallenpigmente gelten als mögliche Peroxylradikal-Fänger und hemmen die Effekte verschiedener Arten von Mutagenen, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Heterozyklische Amine und Oxidantien [Bulmer et al., 2007].

Viele Studien zeigten, dass die Plasma Bilirubin Konzentration mit der Entwicklung einer Atherosklerose assoziiert ist. Personen mit vorliegender Erkrankung der Schlagadern weisen signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Werte an Plasma Bilirubin, im Vergleich zur Kontrollgruppe, auf [Yang et al., 2009; Perlstein et al., 2008; Ollinger et al., 2007].

Mit steigender Plasma Bilirubin Konzentration sinkt außerdem die Plasma Konzentration von Gesamt-Cholesterol, Triglyzeriden und VLDL Cholesterol. Es erfolgt zusätzlich ein Abfall von 14% in TVD (Triple vessel disease) und 8% in SVD (Single vessel disease) [Verma et al., 2005].

Risiko Faktor	Plasma Bilirubin Level (mg/dl)	
	0,10-0,60 n=130	0,61-1,30 n=120
Gesamtcholesterin im Plasma (mg/dl) (MW)	161,66	152,39 ($p < 0,025$)
Plasma Triglyzeride (mg/dl) (MW)	163,6	152,46 ($p < 0,025$)
VLDL Cholesterin (mg/dl) (MW)	32,72	30,49 ($p < 0,025$)

Tabelle 3: Zusammenhang zwischen Plasma Bilirubin Levels und Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen [mod. nach Verma et al., 2005]

2.3.1.4. Nachweismethoden im Plasma

Die mengenmäßige Bestimmung von Bilirubin erfolgt hauptsächlich über die stabilen Dipyrrolderivate, die in der sogenannten Diazoreaktion gebildet werden. Im Plasma sind zwei Arten von Bilirubin enthalten, wobei eine davon mit dem Diazoreagens innerhalb von Minuten reagiert, die andere nur in Gegenwart von Katalysatoren wie Methanol. Das Bilirubin, das schneller reagiert, wird auch als direkt reagierendes oder konjugiertes Bilirubin bezeichnet und stellt glucuronidiertes Bilirubin dar (10-20%). Das Bilirubin, das langsamer reagiert, oder auch indirekt reagierendes Bilirubin, stellt das an Albumin gebundene oder unkonjugierte Bilirubin im Plasma dar (80-90%) [Löffler & Petrides, 2007].

Weiters kann Bilirubin mittels HPLC (high performance liquid chromatography) nachgewiesen werden, wobei diese Methode sehr zeitintensiv ist [Kazmierczak et al., 2004].

Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer hohen Sensitivität, wodurch die Möglichkeit entsteht auch physiologische Konzentrationen erfassen zu können [Zelenka et al., 2008].

2.3.2. Bilirubin Dimethylester

Bilirubin Dimethylester ist ein Derivat des Bilirubins und macht im Plasma ca. 1,75% des Gesamtbilirubins aus. Durch die Esterase und Glucuronidase-Aktivität wird Bilirubin Dimethylester zu Bilirubin Konjugat umgeformt. Dieser Konjugationsprozess ist notwendig dafür, dass Bilirubin in der Galle gesammelt und ausgeschieden werden kann. Es findet eine Veresterung der Propionsäuregruppen des Bilirubins mit Uronsäure oder Einfachzuckern, wie D-Glucose, oder D-Xylose statt. Bei der synthetischen Herstellung von Bilirubin Dimethylester muss aufgrund der starken Instabilität von Bilirubin im sauren oder basischen Milieu vorsichtig gearbeitet werden.

Die Durchführung einer Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) zeigte, dass am Ring A und D die Lactamform (Amid-Bindung zwischen einer Amino- und einer Carboxygruppe desselben cyclischen Moleküls) seltener vorkommt, als die Lactimform (cyclische Stickstoffverbindungen, mit funktioneller Gruppe ($-N=C-OH-$)) [Hutchinson et al., 1972].

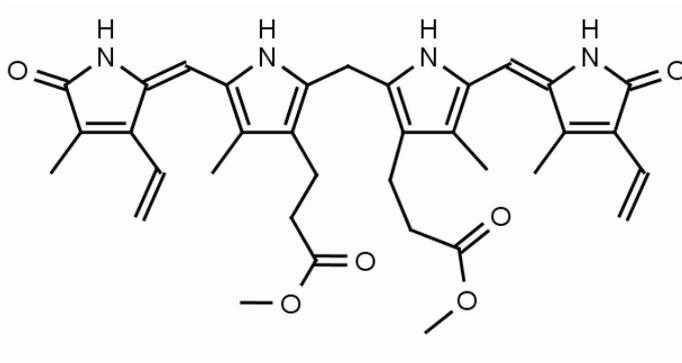


Abbildung 5.: Strukturformel Bilirubin Dimethylester
[http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB5338582_EN.htm]

2.3.3. Bilirubin Konjugat (Ditaurat)

Auch bekannt als ‚Taurobilirubin‘, handelt es sich beim Bilirubin Konjugat im Gegensatz zu den bereits besprochenen Pigmenten um ein synthetisch her- bzw. nachgestelltes Gallenpigment. Da sein physiologisches Pendant, das ‚Bilirubin Diglucuronid‘, welches im menschlichen Organismus als Abbauprodukt des Häm-Moleküls entsteht, zum einen eine sehr labile Verbindung und zum anderen käuflich nicht zu erwerben ist, steht für diesbezügliche *in vitro* Experimente lediglich das synthetische Pigment zur Verfügung [Bulmer et al. 2008].

Bilirubin Diglucuronid entsteht im Zuge des Häm-Abbaus über die Zwischenprodukte Biliverdin und Bilirubin (unkonjugiert), wobei Letzteres, gebunden an Serumalbumin, über die Blutbahn in die Leber transportiert und konjugiert wird.

Dabei reagiert ein Molekül des Bilirubins mit zwei Molekülen der Glucuronsäure. Diese Reaktion findet zwischen einer OH-Gruppe der Propionsäure, welche einen Teil von Bilirubin bildet, und einer CH-Gruppe jeder Glucuronsäure statt [Wiwanitkit, 2007].

Die Energie, die für diese Komplexbildung notwendig ist, beträgt -22kcal/mol. Das auf diese Weise entstandene konjugierte Bilirubin Diglucuronid stellt das wichtige wasserlösliche Endprodukt dieses Stoffwechselweges dar, das letztlich für die Ausscheidung der Gallenpigmente über die Gallenflüssigkeit in den Dünndarm notwendig ist. Von der dort ansässigen Bakterienflora wird das Glucuronid meist noch abgebaut, wobei wiederum zwei neue Stoffwechselstufen der Gallenpigmente entstehen Stercobilin und Urobilin [Bulmer et al., 2008].

Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung des Bilirubin Konjugats, ist seine möglicherweise antimutagene Wirkung zu erwähnen, wobei hier auch auf die antioxidative, antibakterielle und antivirale Aktivität der Gallenpigmente im Allgemeinen zu verweisen ist [Bulmer et al., 2008].

Vorgang	Details
Auflösung von Bindungen (Energieaufnahme)	2 O-H, 2 C-H. 2 C-O
Bildung von Bindungen (Energieabgabe)	4 O-H, 2 C-O
Energieaufnahme	(2 x 111) kcal/mol + (2 x 100) kcal/mol + (2 x 83) kcal/mol
Energieabgabe	(4 x 111) kcal/mol + (2 x 83) kcal/mol
Benötigte Energie (Energieaufnahme-Energieabgabe)	-22kcal/mol

Tabelle 4: Benötigte Energie für die Bildung von Bilirubin Konjugat [mod. nach Wiwanitkit, 2007]

Im Vergleich zu anderen Gallenpigmenten wird Bilirubin Konjugat nach Inkubation mit Caco 2 Zellen nicht abgebaut, und scheint im Gegensatz zu unkonjugiertem Bilirubin nicht toxisch gegen rote Blutkörperchen zu wirken [Bulmer et al., 2008].

Das synthetische Pigment ist in 100g Einheiten als kristallines Aliquot käuflich zu erwerben und ist bei maximal -20 °C zu lagern um seine Eigenschaften und Aktivitäten zu gewährleisten.

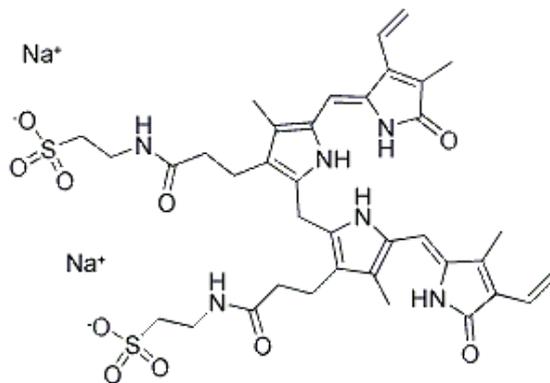


Abbildung 6: Strukturformel von Bilirubin Konjugat (Dithionat)

[http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB0685386.htm]

2.3.4. Protoporphyrin IX

Die Synthese von Protoporphyrin IX erfolgt durch die Protoporphyrinogen-Oxidase aus Protoporphyrinogen IX. Dabei kommt es zur Dehydrierung der Methylengruppen zu Methingruppen. Aus dem vorher nicht konjugierten System mit acht Doppelbindungen ist ein konjugiertes System (Tetrapyrrolsystem) mit 11 Doppelbindungen entstanden. Durch die Ferrochelatase wird im nächsten Schritt ein Eisenatom in das Protoporphyrin eingebaut, und die Häm Biosynthese ist abgeschlossen. Das Enzym Ferrochelatase ist an die innere Mitochondrienmembran gebunden [Löffler & Petrides, 2007].

Protoporphyrin IX ist der farbgebende Bestandteil von Häm [Gossauer, 1994].

Protoporphyrin IX wird mittlerweile erfolgreich in der photodynamischen Diagnose und photodynamischen Therapie (PDH) bei Krebserkrankungen eingesetzt. Die Verwendung von Derivaten des Protoporphyrin IX, wie δ -Aminolävulinsäure, verursachen eine massive Anreicherung der Porphyrine in Krebszellen, bedingt durch die abweichende Häm Biosynthese.

Die photodynamische Therapie wird als alternative Behandlungsmethode gegen Krebsarten, die gegenüber Chemo- und Strahlentherapie resistent sind, eingesetzt.

Der Photosensibilisator Protoporphyrin IX bindet an den apoptoseauslösenden p53-Tumorsuppressor und stört die Interaktion zwischen p53-Tumorsuppressor Protein und seinem negativen Regulator HDM2, was in einer Anreicherung des p53, wie auch Aktivierung der proapoptischen Aktivität resultiert [Zawacka-Pankau et al., 2006].

Unter allen Photosensibilisatoren weisen Porphyrine einerseits die geringste Toxizität auf und andererseits die vielversprechendsten klinischen Resultate. Ihr Nachteil liegt in der Tendenz sich anzureichern [Sznarkowska et al., 2010].

Die Konzentration von Protoporphyrin IX im Blut bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom ist signifikant höher im Vergleich zu Kontrollgruppen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass Protoporphyrin IX als Diagnose Marker für ein kolorektales Karzinom in frühen Stadien herangezogen werden kann [Zeming & Xiaoping, 2009].

Darüber hinaus wurden zytotoxische und proliferative Effekte von Protoporphyrin IX auf HeLa Zellen nachgewiesen. Studien zeigen, dass endogen produziertes Protoporphyrin IX unter Lichteinfluss den Zelltod induzieren kann. Andere Forschungsergebnisse beweisen, auch ohne den Einsatz von Licht, zelluläre Zerstörungen [Bednarz et al., 2007].

Koningsberger et al. zeigten, dass Protoporphyrin IX bei einer Konzentration von 0,5-100 μ g/ml die Zellproliferation der HeLa Zellen auch in dunkler Umgebung hemmt [Koningsberger et al., 1995].

Abhängig von der Konzentration konnte dem Gallenfarbstoff außerdem eine hemmende Wirkung auf die Lipidperoxidation nachgewiesen werden. Diese Wirkung beruht vermutlich darauf, dass Protoporphyrin IX Peroxylradikale (ROO°) beseitigen kann [Williams et al., 1993].

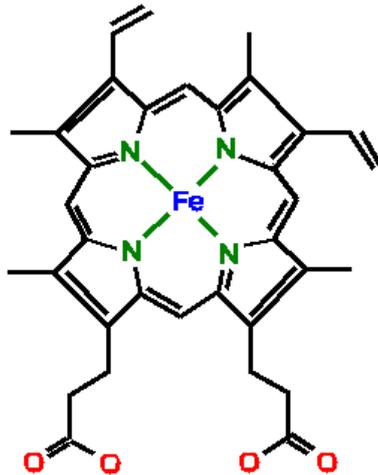


Abbildung 7: Strukturformel von Häm
[<http://www.chemie.unibas.ch/~team2008/CErker/Molek%FCle.html>]

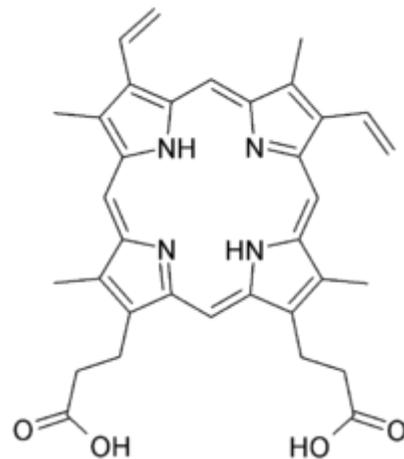


Abbildung 8: Strukturformel von PP IX
[http://nl.wikipedia.org/wiki/Bestand:Protoporphyrin_IX.png]

2.4. SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) – Comet Assay

Durch die Technik der Einzelzellelektrophorese, die auch Comet Assay, oder microgel electrophoresis (MGE) genannt wird, ist es möglich, DNA-Strangbrüche zu detektieren.

Erstmals wurde die Methode 1984 von Östling und Johanson durchgeführt, um Zerstörungen der DNA in verschiedenen Zelltypen sichtbar zu machen [Fairbairn et al., 1994].

Durch Singh et al., im Jahr 1988 und Olive et al., im Jahr 1990, wurde die Methode weiterentwickelt, und findet häufig Anwendung, um die Genotoxizität verschiedener Testsubstanzen nachzuweisen [Choucroun et al., 2001].

Die von Singh und Olive entwickelte alkalische Lyselösung macht es möglich, auch Einzelstrangbrüche nachweisen zu können. Ein hoher pH-Wert über 12,3 ist notwendig, um die Denaturierung, sowie „unwinding-Phase“ zu erleichtern. In dieser Phase wird die DNA im Zellkern entwunden und in Einzelstränge aufgetrennt. Der Vorteil dieser Methode besteht in ihrer leichten und schnellen Durchführung, sowie dem Einsatz auf viele verschiedene Zelltypen [Fairbairn et al., 1994].

2.4.1. Prinzip

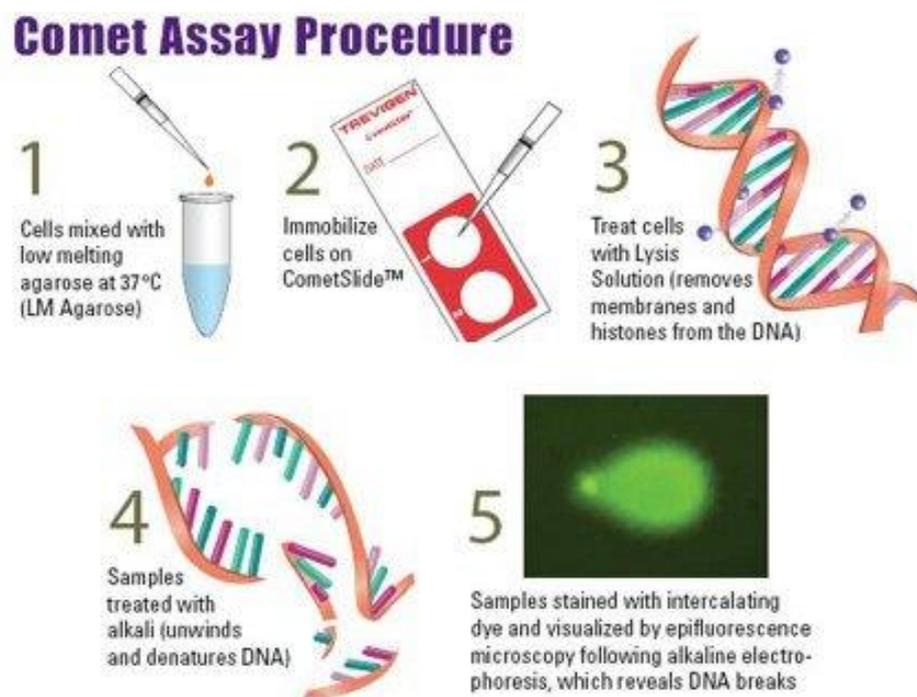


Abbildung 9: Prinzip der Einzelzellelektrophorese [<http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx>]

Die Zellen werden zusammen mit Agarose (Herstellung siehe Kapitel 3.5.) auf die Objektträger aufgetragen, lysiert, um Proteine und Fette zu entfernen, und einem elektrischen Feld ausgesetzt [Mc Namee et al., 1999].

Durch die basische Elektrophoreselösung können sich die Stränge der DNA trennen und im elektrischen Feld vom Minuspol zum Pluspol wandern.

Mit steigender Anzahl von Brüchen wandern die kleinen DNA-Bruchstücke in den Schweif des Kometen, während die intakte DNA zurückgehalten wird [McArt et al., 2009].



Abbildung 10: Beschädigte Zelle mit Schweif aus DNA Bruchstücken

Im Falle einer apoptotischen Zelle sind Kopf und Schweif des Kometen sichtbar voneinander getrennt [Fairbairn et al., 1994].

Das Ausmaß der DNA-Zerstörung wird durch Messung folgender Parameter abgeschätzt: „tail length“, „comet length“, „tail moment“, oder „tail ratio“. Für die Beurteilung der Ergebnisse werden meist nur ein oder zwei Parameter (im Normalfall der tail ratio) herangezogen [Mc Namee et al., 1999].

Tail length: die Distanz der Wanderung der DNA-Bruchstücke ausgehend vom Zellkern

Comet length: die Gesamtlänge der geschädigten Zelle, inklusive Kopf und Schweif

Tail moment: das Produkt aus Schweiflänge und dem Anteil der DNA im Schweif

Tail ratio: % der DNA, die sich im tail (Kometenschweif) befindet (% tail-DNA)

Durch den Farbstoff Ethidiumbromid, welcher sich direkt in die DNA einlagert, ist es möglich, die DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen [McNamee et al., 1999].

2.5. Zielsetzung

Jährlich erkranken in Österreich etwa 36 000 Menschen an Krebs, von denen ungefähr 5000 Tumore im Dickdarm und Enddarm diagnostiziert werden. Das entspricht knapp 13% aller Neuerkrankungen, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen [Statistik Austria, 2011].

Das Ziel der vorliegenden Masterarbeit ist es, den Einfluss von vier verschiedenen Gallenpigmenten (Bilirubin (alpha), Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX) auf menschliche Darmkrebszellen Caco 2 zu demonstrieren und zu diskutieren.

Da an diesem Projekt zahlreiche Mitarbeiter beteiligt waren, war es zunächst notwendig, eine standardisierte Arbeitsweise festzulegen. Diese bezog sich sowohl auf die Zellkultur, die Herstellung von Lösungen, die Durchführung der Einzelzellelektrophorese und vor allem auf das Verfahren der Auswertung. Reproduzierbare, sterile Zellkulturbedingungen gewährleisteten korrekte Ergebnisse, was höchste Priorität in der Forschungsarbeit hat. Durch sorgfältig durchgeführte Vortests konnten schließlich die für diese Arbeit optimalen Gallenpigmentkonzentrationen ermittelt werden. Die Methoden wurden entsprechend der Literatur durchgeführt, teilweise modifiziert und speziell an unsere Versuche angepasst. Als Beispiel hierfür gilt ein zusätzliches Zentrifugieren, oder auch eine verlängerte Verweildauer im Ultraschallbad bei schwer löslichen Pigmenten, wie Bilirubin (alpha) und Protoporphyrin IX.

Diese Arbeit soll eine Grundlagenforschung und das bessere Verständnis des möglichen antikanzerogenen Potentials der Gallenfarbstoffe bieten. Als langfristiges Ziel ist die Bedeutung der Gallenfarbstoffe für die Pharmazeutische Industrie in Form von Supplementen oder Medikamenten anzustreben.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien

Substanz	Firma	Produktnummer
Accutase solution	Sigma Life Science	A6964
DMEM with High Glucose With L-Glutamine	PAA – The Cell Culture Company	E15-810
DMSO: Dimethyl sulfoxide	Sigma Life Science	D4540
Dulbecco´s PBS	PAA – The Cell Culture Company	H15-002
Ethanol	VWR International	070205
Ethylendiaminetetraacetic acid	Sigma Life Science	E6758
Fetal Bovine Serum	PAA – The Cell Culture Company	A15-101
MEM with Earl´s Salts With L-Glutamine	PAA – The Cell Culture Company	E15-825
Penicillin – Streptomycin	Sigma Life Science	P4333
Sodium hydroxide pellets	SIGMA-ALDRICH	1310-73-2
Sodium pyruvate	Sigma Life Science	S8636
Tert-Butyl hydroperoxid	Merck	S4990706811
Triton X-100	Sigma Life Science	X100
Trizma base	Sigma Life Science	93350
Trypan Blue Stain 0,4%	invitrogen	761 866
Ultra Pure LMP Agarose	invitrogen	16520-050
Ultra Pure Agarose	invitrogen	16500-100

Tabelle 5: In der Studie verwendete Chemikalien

3.2. Laborzubehör

Material	Firma	Produktnummer
6 well with Lid well	IWAKI	3810-006
Cell Scrapers	PAA - The Cell Culture Company	PAA90020X
Conical Centrifuge Tubes 15ml	PAA - The Cell Culture Company	PAA50015
Conical Centrifuge Tubes 50ml	PAA - The Cell Culture Company	PAA50050
Deckgläser (20x20mm)	VWR	631-1568
Handschuhe	MICROFLEX	D3578
Micro Centrifuge Tubes for high G-force	VWR	211-0016
Micro Centrifuge Tubes 1,5ml Natural Flat Cap	STARLAB	S1615-5500
Nitrilhandschuhe	MICROFLEX	D6319
Objektträger	Assistent	2406/1
Pasteurpipetten	Assistent	567/2
Pasteurpipetten Plastik	Brand	7477 60
Polystrene Round-Bottom Tube 5ml	FALCON	352058
Reaktionsgefäße 0,6ml farblos	Biozym Scientific GmbH	710300
Universal blue tips	VWR	612-5756
Universal yellow tips	VWR	612-5755

Tabelle 6: In der Studie verwendetes Laborzubehör

3.3. Technische Geräte

Gerät	Firma	Produktnummer
Countess automated cell counter	Invitrogen	C10227
Elektrophoresekammer	VWR	730-1796
Elektrophoresis Power Supply	peqLab	EV231P
Fluoreszenzmikroskop	ZEISS	038-03241
Inkubator	Heraeus INSTRUMENTS	95106058
Mikroskop	Hund WILVERTS	1018306
Mikrowelle	Elta	17MX51
pH-Meter	Metrohm	1827001025358
Ultraschallbad TYP RK100	Bandelin electronic	100063
Vortex	Heidolph	89447364
Waage Type AT201	METTLER	L44443
Wärmeplatte MR 3001K	Heidolph	109409439
Wasserbad	Müller-Schlerr	10673994e

Tabelle 7: In der Studie verwendete technische Geräte

3.4. Gallenpigmente

Farbstoff	Firma	Produktnummer
Bilirubin (alpha)	Frontier Scientific	L1010-3777
Bilirubin Konjugat (Ditaurat)	Frontier Scientific	JH10-3486
Bilirubin Dimethylester	Frontier Scientific	41488
Protoporphyrin IX	Frontier Scientific	LY09-1626

Tabelle 8: Getestete Gallenpigmente

3.5. Herstellung von Lösungen und Gemischen

Agarose

800mg Ultra Pure Agarose / Ultra Pure LMP Agarose
80ml destilliertes Wasser

Lyselösung (pH=10)

146,1g 2,5M NaCl
29,2g 0,1M EDTA
1,211g 10mM Tris Base
1L destilliertes Wasser

Neutralisationspuffer (pH=7,5)

48,44g 0,4M Tris Base
37%ige Salzsäure
1L destilliertes Wasser

Elektrophoreselösung (pH>13)

24g 0,3M NaOH
0,58g 0,001M EDTA
2L destilliertes Wasser

DMEM (komplementiert) – Nährmedium

450ml Basalmedium
50ml Fetal Bovine Serum
1ml Natriumpyruvat
5ml Antibiotikum Streptomycin

Ethidiumbromid – Lösung

(Konzentration: 20µg/ml)

10µl Stocklösung Ethidiumbromid
5ml destilliertes Wasser

Tertiärbutyl Hydroperoxid– Stocklösung

(Konzentration: 300mM)

240,3µl Tertiärbutyl Hydroperoxid
9,7µl destilliertes Wasser

3.6. Studiendesign

Bei der vorliegenden *in vitro* Studie wurden Caco 2 Darmkrebszellen mit vier verschiedenen Gallenpigmenten (Bilirubin (alpha), Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester, Protoporphyrin IX) inkubiert, um die mögliche antikanzerogene Wirkung der Farbstoffe zu testen. Die Inkubationszeit lag bei 24 Stunden und 37°C. Die Gallenfarbstoffe wurden in je 3 unterschiedlichen Konzentrationen (0,5µM, 5µM und 17µM) getestet und pro Pigment eine Positiv- und eine Negativkontrolle ausgesät. Als Positivkontrolle diente Tertiärbutyl Hydroperoxid, um eine Schädigung der Caco 2 Zellen hervorzurufen.

Bei der Caco 2 Zelllinie handelt es sich um eine heterogene Zelllinie, welche 1974 von dem dänischen Arzt J. Fogh aus einem Darmkarzinom isoliert wurde. Der Ursprung dieser Zelllinie liegt in einem kolorektalen Adenokarzinom eines männlichen Kaukasiers.

Die immortalen Zellen differenzieren unter normalen Zellkulturbedingungen aus und bilden einschichtige Epithelien, sogenannte Monolayer [Liu & Chem, 2004].

Caco 2 Zellen können tight junctions, Mikrovilli, verschiedene Enzyme und Proteine, wie zum Beispiel Peptidasen und Esterasen ausbilden und zeigen gleiche Eigenschaften der Differenzierung wie auch intestinale Enterozyten. Sie stellen deshalb ein gut geeignetes Testmodell für den menschlichen Darmtrakt dar [Liu & Chen, 2004; Sambuy et al., 2005].

Die Zellen sind nach 3 Tagen zu 80% konfluent und im Allgemeinen relativ leicht kultivierbar. Darüber hinaus können sie in nur wenigen Arbeitsschritten eingefroren und wieder aufgetaut werden, was bei Bedarf eine rasche Verfügbarkeit gewährleistet (siehe Kapitel 3.11. und 3.12.).

Die Zellen können sich im Laufe der Kultivierung verändern, weshalb wir eine Grenze von 20 Passagen definiert und eingehalten haben. Darüber hinaus wurden alle Experimente bei einer Viabilität der Zellen von mindestens 85% durchgeführt.

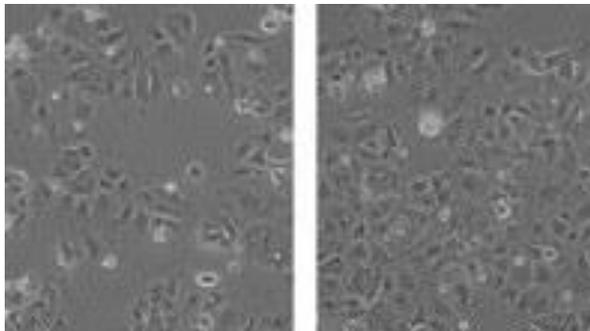


Abbildung 11: Caco 2 Zellen

Um die Genotoxizität der Gallenpigmente nachzuweisen, wurde die Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) verwendet. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche zu detektieren und eine mögliche antikanzerogene Wirkung der vier getesteten Gallenfarbstoffe festzustellen. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit und der Qualitätssicherung wurden alle Versuche im Doppelansatz durchgeführt.

3.7. Prätests

Um für die Tests optimale Bedingungen zu wählen wurden im Vorfeld Prätests durchgeführt, bei denen die optimale Stresskonzentration an Tertiärbutyl Hydroperoxid (*t*-BOOH) ermittelt wurde. Tertiärbutyl Hydroperoxid wurde bei den Laborversuchen als Positivkontrolle verwendet, um eine Zellschädigung hervorzurufen. Die Positivkontrolle diente gemeinsam mit der Negativkontrolle der Dateneinordnung und -interpretation. Die Stocklösung mit der finalen Konzentration 300mM erwies sich im Vergleich zu den Konzentrationen 250mM und 350mM am effektivsten in Bezug auf die Zellschädigung, weshalb wir die gesamte Testreihe mit dieser Konzentration durchgeführt haben (siehe Kapitel 3.8.).

3.8. Durchführung der Experimente im Überblick

Unter Voraussetzung von 80% Konfluenz, wurden die Zellen dreimal pro Woche gesplittet und in neue Kulturflaschen überführt. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Wechsel des Nährmediums DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium).

Um eine Einzelzellgelelektrophorese durchführen zu können, mussten die Zellen zwei Tage vor jedem Test in 6 Well Platten ausgesät werden (Probenschema siehe *Abbildung 13*), wodurch ein Anwachsen ermöglicht werden sollte. Einen Tag vor dem Test wurden die Zellen mit dem entsprechenden Gallenpigment 24 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
Zellpassage Aussaat	Mediumwechsel Inkubation	Zellpassage Comet Assay Aussaat	Mediumwechsel Inkubation	Zellpassage Comet Assay

Tabelle 9: Arbeitsschema

3.9. Zellpassage

Die sich in Zellkulturfläschchen befindenden Caco 2 Zellen werden aus dem Inkubator genommen, die Flaschen außen mit Alkohol (75%) abgesprüht und unter die Sterilbank gelegt. Das Nährmedium wird aus den Kulturfläschchen abgesaugt und die Zellen mit 2ml Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS) gewaschen.

Nach kurzem Schwenken wird das PBS abgesaugt und durch 1ml Akkutase ersetzt. Dabei handelt es sich um einen Enzymmix aus kollagenolytischen und proteolytischen Enzymen, welcher das Ablösen der Zellen von den Kulturflaschen ermöglicht. Anschließend werden diese für 5-10 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation werden in jedes Fläschchen 4ml des auf 37°C erwärmten DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) Nährmediums pipettiert, mehrmals gespült und die Zellsuspension in ein gemeinsames Fläschchen transferiert.

In neue Zellkulturflaschen werden 8ml Nährmedium pipettiert und mit je 1,5ml der Zellsuspension, mit einer Zellzahl von ca. $1,2 \times 10^6$ /ml vermischt.

Die Caco 2 Zellen werden bis zum darauffolgenden Tag bei 37°C vorsichtig in den Inkubator gelegt.



Abbildung 12: Inkubation der Zellen bei 37°C

3.10. Medienwechsel

Das alte Nährmedium wird unter der Sterilbank abgesaugt und durch 8ml eines neuen, erwärmten DMEM - Mediums ersetzt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass sich im Flaschenhals des Kulturfläschchens keine Zell-, oder Medienreste befinden, da diese eine potentielle Infektionsgefahr sein könnten. Durch vorsichtiges Absaugen des Flaschenhalses mit einer Glaspasteurpipette kann das Infektionsrisiko vermindert werden.

3.11. Zellen einfrieren

Das alte Nährmedium wird vorsichtig aus den Kulturflaschen abgesaugt und durch 5ml PBS ersetzt. Nach kurzem Schwenken wird dieses wieder abgesaugt, im Anschluss durch 4ml Akkutase ersetzt und die Zellen für 5 Minuten inkubiert. Nun werden pro Fläschchen 8ml Nährmedium hinzugefügt, mit der Glaspasteurpipette 4-5mal gespült und die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.12.2.). Die restliche Zellsuspension wird in 2 Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 600 rpm und 4°C zentrifugiert. Währenddessen werden Cryovials vorbereitet, mit Datum und Zelllinie beschriftet und je 400µl PBS hinein pipettiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgesaugt und erneut 5ml PBS hinzugefügt. Nach einem weiteren Zentrifugenschritt erfolgt eine erneute Absaugung des PBS und je nach gewünschter Zellzahl wird die entsprechende Menge Medium in die Röhrchen pipettiert. Die gewünschte Anzahl liegt bei 900 000 Zellen pro 500µl Suspension.

Beim Einfrieren der Zellen sollte der Anteil an Fetalem Kälberserum bei 40%, der an Dimethylsulfoxid (DMSO) bei 10% liegen. Die Zellsuspension bildet die restlichen 50%.

3.12. Zellen auftauen

Das Cryovial mit der Zellsuspension wird aus dem Gefrierschrank genommen und mit den Händen solange erwärmt, bis der Inhalt flüssig ist. Dieser wird in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 600 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig abgesaugt und der Rest mit 2ml PBS gewaschen. Dieser Waschschritt ist notwendig, um Rest des zelltoxischen Dimethylsulfoxid's zu entfernen.

Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wird 1ml Medium in das Zentrifugenröhrchen pipettiert und mittels Vortex gemischt.

In eine neue Zellkulturflasche werden 8ml des erwärmten Mediums pipettiert, die Zellsuspension vorsichtig hinzugefügt und die Flaschen bei 37°C inkubiert.

3.13. Vorbereitung der Zellen für die Einzelzellgelelektrophorese

3.13.1. Aussaat der Caco 2 Zellen

Nach der abgeschlossenen Zellpassage wird die restliche Suspension in ein 15ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 5 Minuten, 600 rpm und 4°C zentrifugiert.

Nach der Absaugung des Nährmediums pipettiert man zum entstandenen Pellet 1ml PBS. Aus der Zellsuspension erfolgt die Bestimmung der Zellzahl mittels Countess Automated Cell Counter[®] (siehe Kapitel 3.13.2.).

3.13.2. Trypanblau – Test

Der Trypanblau – Test erfolgt im Zuge der Aussaat der Caco 2 Zellen, sowie bei der finalen Zellvorbereitung für eine Einzelzellgelelektrophorese. Der anionische Diazofarbstoff, der an Proteine bindet, kann in die geschädigten Zellen eindringen und färbt diese dunkelblau. Intakte Zellen werden demnach nicht angefärbt. Die Auswertung des Tests muss aufgrund der Zytotoxizität des Farbstoffes unmittelbar nach seiner Zugabe durchgeführt werden.

Man entnimmt 20µl der Suspension, vermischt diese mit 20µl Trypanblau und trägt davon 10µl in die Kammer des Objektträgers auf. Dieser wird in die Countess geschoben und die Zellzahl automatisch bestimmt.

Der Quotient aus lebenden und toten Zellen (Viability, %) und die Anzahl der lebenden Zellen werden notiert und daraus die passende Menge Suspension berechnet. Ziel ist es, 400 000 Zellen pro Well auszusäen.



Abbildung 13: Trypanblau



Abbildung 14: Countess Zellcounter

In der Zwischenzeit wird die restliche Suspension erneut zentrifugiert, das PBS abgesaugt und durch die entsprechende Menge Medium ersetzt.

In jedes Well der 6 Well Platte pipettiert man 3ml Medium und die berechnete Menge Zellsuspension. Die Platte wird bei 37°C über Nacht inkubiert, um ein Anwachsen der Caco 2 Zellen zu ermöglichen.

3.13.3. Inkubation mit Gallenpigmenten

Die in Tabelle 10 zusammengefassten Gallenfarbstoffe wurden zur Testung herangezogen.

Summenformel			
Molekulargewicht			
Bilirubin (alpha)	Bilirubin conjugat (ditaurat)	Bilirubin dimethyl ester	Protoporphyrin IX
$C_{33}H_{36}N_4O_6$	$C_{37}H_{44}N_6O_{10}S_2Na_2$	$C_{35}H_{40}N_4O_6$	$C_{34}H_{32}N_4O_4$
584,66g/mol	842,55g/mol	612,06g/mol	560,06g/mol

Tabelle 10: Summenformel und Molekulargewicht der 4 getesteten Gallenfarbstoffe

Durch die Zugabe von 4,5ml Nährmedium zu je 4,5µl der entsprechenden Konzentrationen ergibt sich ein Verdünnungsschritt von 1000 und somit die finalen Konzentrationen 0,5µM, 5µM und 17µM.

Gallenpigment	
Stocklösung	Finale Konzentration
0,5mM	0,5 µM
5mM	5µM
17mM	17µM

Tabelle 11: Konzentration der Stocklösungen und finale Konzentration der getesteten Gallenpigmente

Aufgrund der starken Lichtempfindlichkeit der Gallenpigmente mussten sie in einem dunklen Cup eingewogen und in 200µl DMSO gelöst werden. Das Cup mit der Stocklösung (17mM) wird für 5 Minuten bei 37°C auf einer Heizplatte erwärmt und im Anschluss für 3 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt.

Bilirubin und Protoporphyrin IX sind schwer löslich, weshalb die Prozedur wiederholt werden musste. Durch Verdünnen der 17mM Stocklösung mit DMSO werden eine 5mM und eine 0,5mM Lösung hergestellt.

Nun richtet man 4 Zentrifugenröhrchen her, beschriftet (0,5 μ M, 5 μ M, 17 μ M, Negativkontrolle) und befüllt sie mit 4,5ml erwärmtem Nährmedium. In jedes Röhrchen (außer der Negativkontrolle) werden je 4,5 μ l der 3 entsprechenden Konzentrationen pipettiert.

In die Negativkontrolle werden 4,5 μ l DMSO pipettiert. Daraus ergibt sich ein Verdünnungsschritt von 1000 und die finalen Konzentrationen 0,5 μ M, 5 μ M und 17 μ M (siehe *Tabelle 11*).

Danach wird das in der 6 Well Platte enthaltene Nährmedium abgesaugt und 3ml der passenden Konzentration in das dazugehöriges Well pipettiert. Die übrig bleibenden 2 Wells bleiben frei.

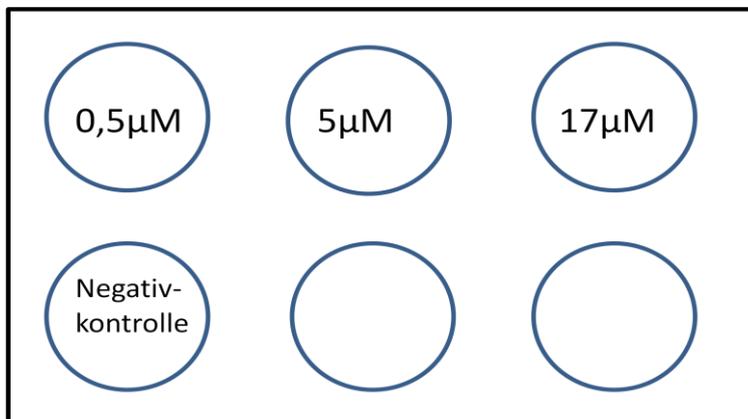


Abbildung 15: Probenschema innerhalb einer 6 Well Platte

Die Inkubation der Platte beläuft sich auf 24 Stunden, um danach den SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) Test (Comet Assay) durchzuführen.

Wichtig dabei sind das sorgfältige Vortexen der Cups und Zentrifugenröhrchen, wie auch das Arbeiten im Dunklen.

3.14. SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) – Comet Assay

Die Einzelzellelektrophorese ist eine Technik, mit der es möglich ist, sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche zu detektieren. Das Prinzip beruht darauf, dass die Caco 2 Zellen mit Agarose auf einem Objektträger fixiert, im Anschluss lysiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt werden. Dabei wandert die negativ geladene DNA zum Pluspol und die bruchstückhafte DNA trennt sich nach Größe auf. Die geschädigte DNA wandert aus dem Zellkern heraus und ist unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anfärben mit Ethidiumbromid als Kometenschweif sichtbar [Collins et al., 2008]. (siehe auch Kapitel 2.4.)

3.14.1. Praktische Durchführung

Die Durchführung des Comet Assays erfolgte nach Singh et al.

Nach abgeschlossener Inkubationszeit der Caco 2 Zellen mit dem jeweiligen Gallenpigment wird das Medium aus den 6 Well Platten in kleine Röhrchen (für jede Konzentration extra) pipettiert, um auch tote Zellen in die Tests mit einbeziehen zu können und damit ein repräsentatives Bild der Zellschädigung durch die Testsubstanzen zu erhalten. Im nächsten Schritt werden die Zellen abgenommen, wofür man in jedes Well 2ml PBS pipettiert, die Platte kurz schwenkt, um Medienreste zu entfernen und mittels Pasteurpipette wieder absaugt. Nach Zugabe von 250µl Akkutase wird die Platte für 5 Minuten in den Inkubator gestellt, um den Zellrasen abzulösen.

Im Anschluss fügt man jedem Well 1ml des vorgewärmten Mediums hinzu und resuspendiert 4-5 Mal. Die Zellsuspension wird in die bereits vorbereiteten entsprechenden Röhrchen pipettiert und für 7 Minuten bei 600 rpm bei 4°C zentrifugiert. Es erfolgt die Abnahme des Überstandes, die Zugabe von 1ml PBS und eine nochmalige fünfminütige Zentrifugation. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt, das restliche PBS abgesaugt und 270µl PBS hinzugefügt.

Dann bestimmt man die Zellzahl und verdünnt die Suspension entsprechend (siehe Kapitel 3.13.2.). Die Zellsuspension wird auf Eis gestellt.

Die beschichteten und beschrifteten Objektträger werden auf ein gekühltes Edelmetalltablett gelegt und die Agarosegele darauf aufgetragen.

Hierfür mischt man 140µl erhitzte low melting point Agarose mit 30µl Zellsuspension und trägt hiervon 2 Mal pro Slide 70µl auf den Objektträger auf. Diese werden für 5-10 Minuten bei 4°C gekühlt, um das Trocknen der Gele zu ermöglichen.

In der Zeit wird die Stocklösung für Tertiärbutyl Hydroperoxid hergestellt (siehe 3.5. Herstellung von Lösungen und Gemischen) und 100µl davon mit 100ml destilliertem Wasser in einer Glaskammer gemischt, sodass eine finale Konzentration von 300µM entsteht. Nach der Trocknungszeit werden die Deckgläser vorsichtig abgezogen und die entsprechenden Slides für 5 Minuten in die Tertiärbutyl Hydroperoxid Glaskammer gestellt.

Inzwischen erfolgt die Mischung von 200ml der vorgefertigten Lyselösung (siehe 3.5. Herstellung von Lösungen und Gemischen) mit 2ml Triton X mit einem Magnetrührer und die gleichmäßige Aufteilung auf zwei Glaskammern.

Die Slides werden getrennt (Slides mit Tertiärbutyl Hydroperoxid und Slides ohne Tertiärbutyl Hydroperoxid) in die Glaskammern gestellt und für mindestens eine Stunde im Kühlhaus bei etwa 4-6°C belassen.

3.14.2. Elektrophorese

Mit einer Wasserwaage tariert man die Elektrophoresekammer und legt die Slides hinein. Die Kammer muss immer vollständig befüllt sein, was eine Ergänzung mit leeren Objektträgern notwendig macht.

Sie wird bis zur vollständigen Benetzung aller Objektträger mit der Elektrophoreselösung (siehe 3.5. Herstellung von Lösungen und Gemischen) befüllt, wobei auf entstehende Luftblasen geachtet werden muss. Während der 20minütigen „unwinding-Phase“ bleibt die Elektrophorese ausgeschaltet.

Im Anschluss wird der Prozess gestartet und mittels Entfernen- oder Hinzufügen der Elektrophoreselösung eine Stromstärke von 300mA eingestellt. Die Laufzeit beträgt genau 30 Minuten.

Nach der abgeschlossenen Elektrophorese taucht man alle Objektträger für 5 Minuten in eine Glaskammer mit Neutralisationspuffer (siehe 3.5. Herstellung von Lösungen und Gemischen) und danach für 5 Minuten in gekühltes destilliertes Wasser. Die fertigen Slides werden über Nacht getrocknet und können ab dem nächsten Tag mittels des Computerprogrammes Komet 5.5. ausgewertet werden.

3.15. Auswertung der Ergebnisse

Da bei der Auswertung der Objektträger mit dem toxischen Phenanthridin-Farbstoff Ethidiumbromid gearbeitet wird, muss vor Beginn darauf geachtet werden Nitrilhandschuhe und einen speziell für diese Arbeit vorgesehenen Labormantel zu tragen. Nach dem Herstellen der Ethidiumbromid Lösung mit einer Konzentration von 20µg/ml werden 30µl davon auf die Mitte jedes Gels pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Die Aufbewahrung des Farbstoffes erfolgt bei ca. 4°C. Der Objektträger mit den nun gefärbten Gelen wird unter das Fluoreszenzmikroskop gelegt und mittels des Computerprogrammes Komet 5.5 ausgewertet.

Das Auszählen der Slides erfolgte nach einem festgesetzten Schema:

- Pro Gel werden 10 Reihen festgelegt.
- Pro Reihe zählt man jede 5. Zelle und insgesamt 5 Zellen pro Reihe.
- Der rechteckige Raster am Bildschirm wird individuell auf die Größe der Zellen angepasst.
- Pro Gel werden 50 Zellen gezählt, pro Treatment 300 Zellen.

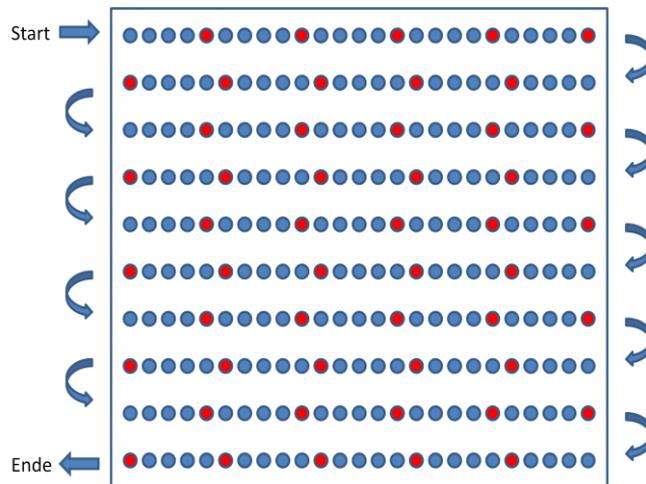


Abbildung 16: Schematischer Überblick - Auszählverfahren

Darüber hinaus müssen bei der Auswertung folgende Punkte beachtet werden:

- An den Rändern des Gels weisen die Zellen stärkere Schäden auf, deshalb wird empfohlen 1-2mm des Gelrandes aus der Auswertung auszuschließen.
- Bei Sichtbarwerden von Kristallen am Computerbildschirm muss die Ethidiumbromid Lösung filtriert werden.
- Die Ethidiumbromid Lösung ist ungefähr ein Jahr lang haltbar, muss jedoch immer bei ca. 4°C gekühlt werden.

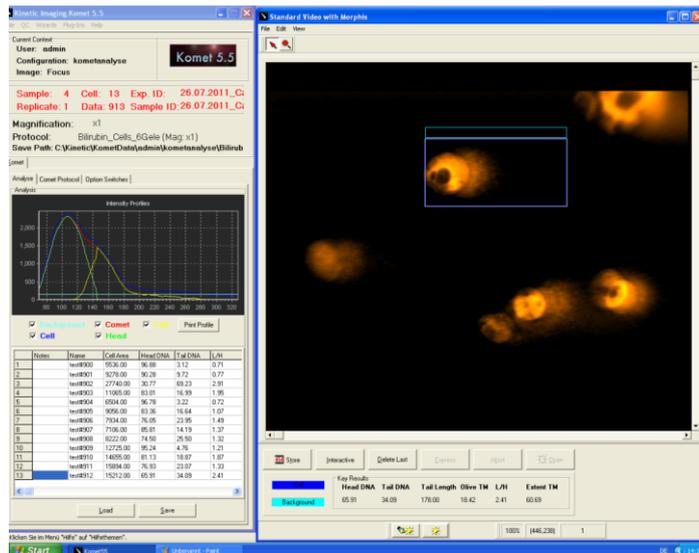


Abbildung 17: Screenshot Komet 5.5 – beschädigte Caco 2 Zelle

3.16. Statistische Auswertung

Die statistischen Tests wurden mittels des Computerprogrammes SPSS Statistics 17.0 durchgeführt. Vor Ausführung der Tests erfolgte eine Ausreißer-Bereinigung, um Extremwerte auszuschließen und eine Prüfung der Daten auf Normalverteilung. Mittels einfaktorieller ANOVA wurden die berechneten Mittelwerte [% DNA im Kometenschweif] miteinander verglichen und die signifikanten Unterschiede der getesteten Konzentrationen mittels Tamhane (keine Varianzgleichheit) aufgezeigt. Zur Qualitätssicherung der Ergebnisse wurden alle Versuche im Doppelansatz durchgeführt. Jedes Pigment wurde somit zweimal an je unterschiedlichen Tagen getestet um die Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Ergebnisse SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) – Comet Assay

Auf Basis bekannter Literatur, in der eine Inkubationszeit von 24 Stunden als optimal in Bezug auf die Zellschädigung beschrieben wird [Aherne et al., 2006; Uhl et al., 2000], erfolgte auch in dieser Studie eine 24 stündige Inkubation der Caco 2 Zellen mit der Testsubstanz (Gallenfarbstoffe).

Im Anschluss wurde der Trypanblau – Test, und eine Einzelzellgelelektrophorese durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA zu detektieren.

In dieser Arbeit wurden die %DNA im Kometenschweif ermittelt. Das ist jener Anteil der DNA, der nur noch aus kleinen DNA Bruchstücken besteht.

Die 4 Gallenfarbstoffe (Bilirubin (alpha), Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX) wurden je in drei unterschiedlichen Konzentrationen getestet (0,5µM; 5µM und 17µM). Die Negativkontrolle bestand aus den lysierten Zellen, die Positivkontrolle aus den Zellen, die einem zusätzlichen Stressfaktor, nämlich dem Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid (t-BOOH), ausgesetzt wurden.

4.2. Effekte von Bilirubin (alpha) auf DNA-Strangbrüche

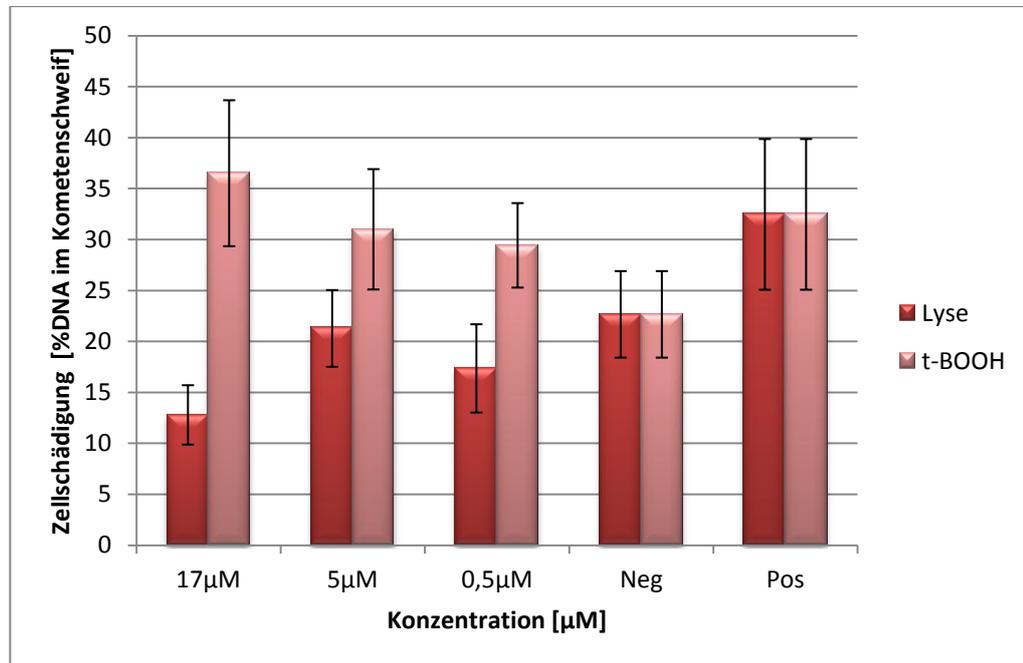


Abbildung 18: Ergebnis Comet Assay von zwei unabhängigen Versuchen nach einer 24-stündigen Inkubation von Caco 2 Zellen mit Bilirubin. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert.

Lyse	17µM	5µM	0,5µM	Negativ	Positiv
Negativ	0,012	-	-	-	-
Positiv	0,007	-	0,025	-	-

Tabelle 12: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer 24 stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin (alpha)

t-BOOH	17µM	5µM	0,5µM	Negativ	Positiv
Negativ	0,034	-	-	-	-
Positiv	-	-	-	-	-

Tabelle 13: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen unter Einfluss des Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid nach einer 24 stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin (alpha)

Trotz der Wiederholung des Versuches mit Bilirubin (alpha) waren Negativ- und Positivkontrolle nicht signifikant voneinander unterschiedlich.

Betrachtet man die Lyse-Effekte zeigt sich, dass durch keine der 3 getesteten Konzentrationen eine zusätzliche Zellschädigung durch das Pigment erreicht wurde, was vermutlich an der sehr hohen Negativkontrolle liegt.

Vergleicht man die Zellen, die zusätzlich mit Tertiärbutyl Hydroperoxid behandelt wurden mit der Positivkontrolle schützt das Pigment, in keiner der Konzentrationen, die Zellen vor einer zusätzlichen Oxidation. Es zeigt sich aber eine starke Konzentrationsabhängigkeit innerhalb der Testsamples mit einem r^2 von 0,91, wobei die geringste Konzentration die geringste Zellschädigung und die Konzentration 17 μ M die größte Zellschädigung hervorbringt.

Zusammengefasst kann man daher sagen, dass Bilirubin in dieser Studie kein zelltoxischer Effekt nachgewiesen werden kann.

4.3. Effekte von Bilirubin Konjugat (Ditaurat) auf DNA-Strangbrüche

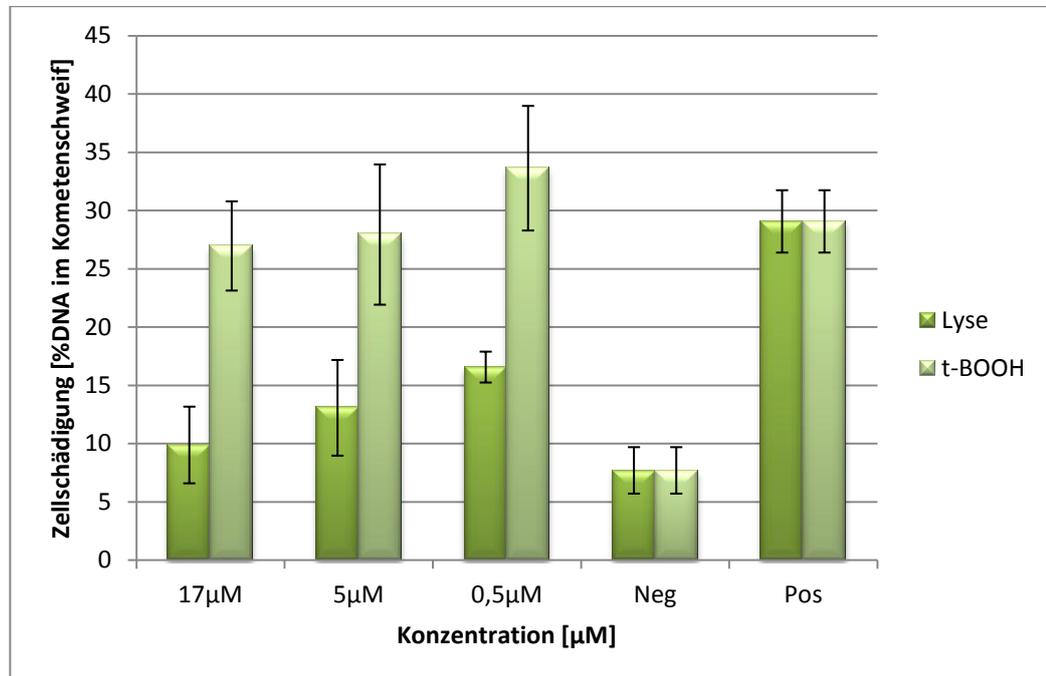


Abbildung 19: Ergebnis Comet Assay von zwei unabhängigen Versuchen nach einer 24-stündigen Inkubation von Caco 2 Zellen mit Bilirubin Konjugat (Ditaurat). Das dargestellte Balkendiagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert.

Lyse	17µM	5µM	0,5µM	Negativ	Positiv
Negativ	-	-	0,000	-	0,000
Positiv	0,000	0,000	0,000	0,000	-

Tabelle 14: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin Konjugat (Ditaurat)

t-BOOH	17µM	5µM	0,5µM	Negativ	Positiv
Negativ	0,000	0,002	0,000	-	0,000
Positiv	-	-	-	0,000	-

Tabelle 15: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen unter Einfluss des Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin Konjugat (Ditaurat)

Bei den Versuchen mit Bilirubin Konjugat (Ditaurat) lag ein signifikanter Unterschied zwischen der Negativ- und der Positivkontrolle vor ($p < 0,05$).

Der Lyse-Effekt zeigt, dass bei der geringsten Konzentration ($0,5\mu\text{M}$) eine signifikant höhere Zellschädigung im Vergleich zur Negativkontrolle vorliegt ($p < 0,05$). Bei den anderen Konzentrationen bleibt dieser Effekt aus.

Bilirubin Konjugat (Ditaurat) in allen 3 Konzentrationen schützt laut statistischem Test die Zellen nicht vor einem zusätzlichen Stressfaktor. Dieses Ergebnis ist am Vergleich der Positivkontrolle Tertiärbutyl Hydroperoxid mit den getesteten Konzentrationen sichtbar.

Auffällig ist, dass bei beiden Treatments eine starke Konzentrationsabhängigkeit gegeben ist, welche bei $0,5\mu\text{M}$ die höchste und bei $17\mu\text{M}$ die geringste Zellschädigung aufweist (Lyse $r^2 = 0,99$; t-BOOH $r^2 = 0,86$).

4.4. Effekte von Bilirubin Dimethylester auf DNA-Strangbrüche

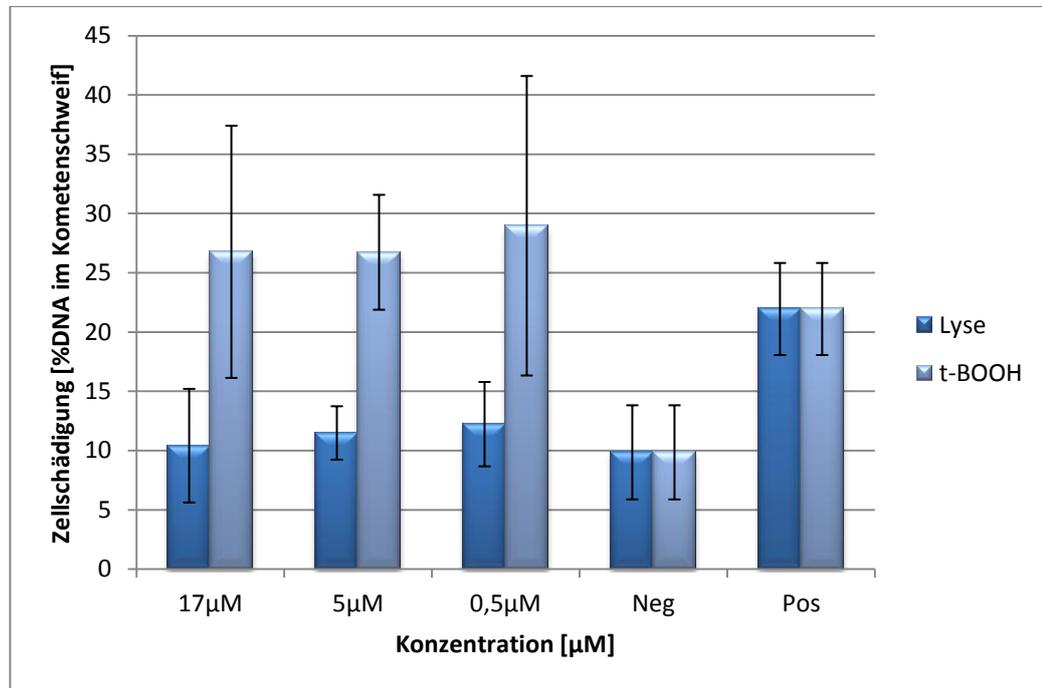


Abbildung 20: Ergebnis Comet Assay von zwei unabhängigen Versuchen nach einer 24-stündigen Inkubation von Caco 2 Zellen mit Bilirubin Dimethylester. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert.

Lyse	17µM	5µM	0,5µM	Negativ	Positiv
Negativ	-	-	-	-	0,003
Positiv	0,011	0,004	0,046	0,003	-

Tabelle 16: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin Dimethylester

t-BOOH	17µM	5µM	0,5µM	Negativ	Positiv
Negativ	-	0,001	-	-	0,003
Positiv	-	-	-	0,003	-

Tabelle 17: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen unter Einfluss des Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin Dimethylester

Bei den Versuchen mit Bilirubin Dimethylester unterscheiden sich Negativ- und Positivkontrolle signifikant voneinander.

Eine Inkubation der Zellen mit dem Gallenfarbstoff zeigt keine zusätzliche Zellschädigung im Vergleich zur Negativkontrolle. Ein schädigender Effekt des Pigmentes auf die Zellen, die nur lysiert wurden bleibt somit aus. Betrachtet man die Konzentrationsabhängigkeit ergibt sich ein r^2 von 0,99, was auf einen sehr starken Zusammenhang hindeutet, wobei die geringste Konzentration von $0,5\mu\text{M}$ die größte Zellschädigung hervorbringt.

Vergleicht man die Positivkontrolle mit den Zellen, die zusätzlich zur Inkubation mit dem Gallenpigment mit Tertiärbutyl Hydroperoxid behandelt wurden, schützt das Pigment laut statistischem Test in keiner der Konzentrationen $0,5\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$ und $17\mu\text{M}$ die Zellen vor dem Prooxidans.

Auch hier zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit ($r^2=0,74$) mit abermals der stärksten Zellschädigung bei der niedrigsten Konzentration, weshalb das Augenmerk für weitere Forschungen auf einen niedrigeren Konzentrationsbereich gelegt werden sollte. Die Konzentration $17\mu\text{M}$ scheint einen gewissen Sättigungseffekt hervorzurufen, bei dem keine zusätzliche Zellschädigung mehr erreicht wird, was sich auch bei den Bilirubin Konjugat (Ditaurat)-Testsamples bestätigte.

4.5. Effekte von Protoporphyrin IX auf DNA-Strangbrüche

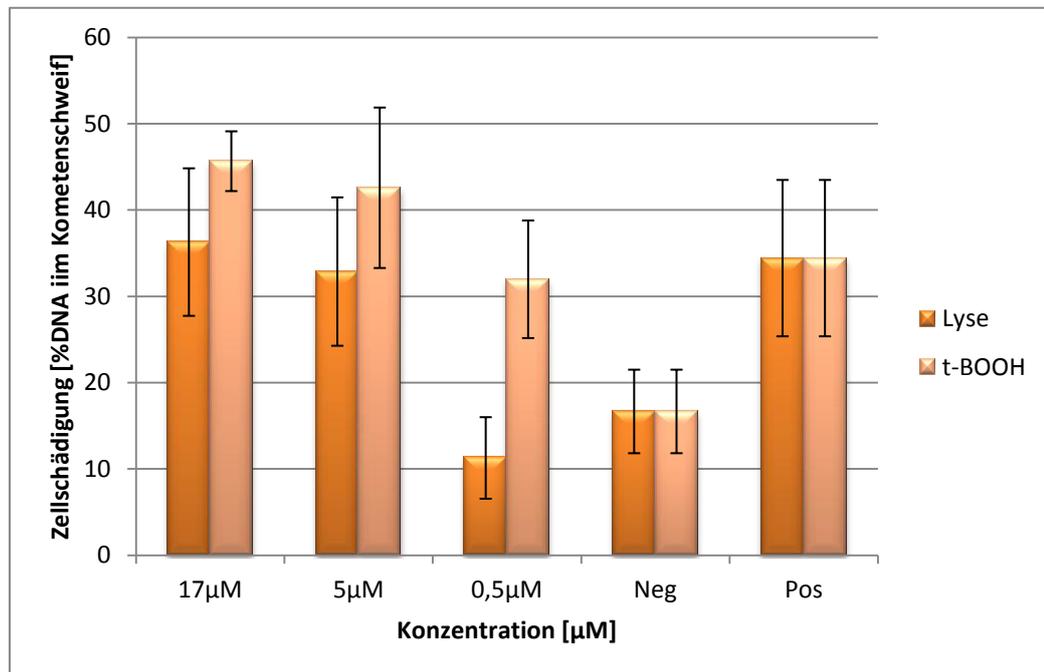


Abbildung 21: Ergebnis Comet Assay von zwei unabhängigen Versuchen nach einer 24-stündigen Inkubation von Caco 2 Zellen mit Protoporphyrin IX. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,05$ definiert.

Lyse	17µM	5µM	0,5µM	Negativ	Positiv
Negativ	0,012	0,039	-	-	0,031
Positiv	-	-	0,007	0,031	-

Tabelle 18: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Protoporphyrin IX

t-BOOH	17µM	5µM	0,5µM	Negativ	Positiv
Negativ	0,000	0,004	0,015	-	0,031
Positiv	-	-	-	0,031	-

Tabelle 19: Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Zellschädigung zwischen Negativ-, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen unter Einfluss des Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid nach einer 24-stündigen Inkubation der Caco 2 Zellen mit Protoporphyrin IX

Die Negativ- und Positivkontrolle unterscheiden sich signifikant bei den Versuchen mit dem Gallenpigment Protoporphyrin IX.

Sowohl bei der Konzentration 17 μ M, als auch 5 μ M kann im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikant höhere Zellschädigung durch Hinzufügen des Pigmentes nachgewiesen werden.

Das Pigment in allen 3 Konzentrationen schützt die Zellen nicht vor einem zusätzlichen Stressfaktor, wie dem Prooxidans Tertiäthbutyl Hydroperoxid, was man am Vergleich der Positivkontrolle mit den 3 getesteten Konzentrationen beobachten kann.

Ansteigend mit der Konzentration ist bei Protoporphyrin IX in beiden Treatments eine Konzentrationsabhängigkeit gegeben (Lyse $r^2=0,85$; t-BOOH $r^2=0,91$).

4.6. Gesamtüberblick

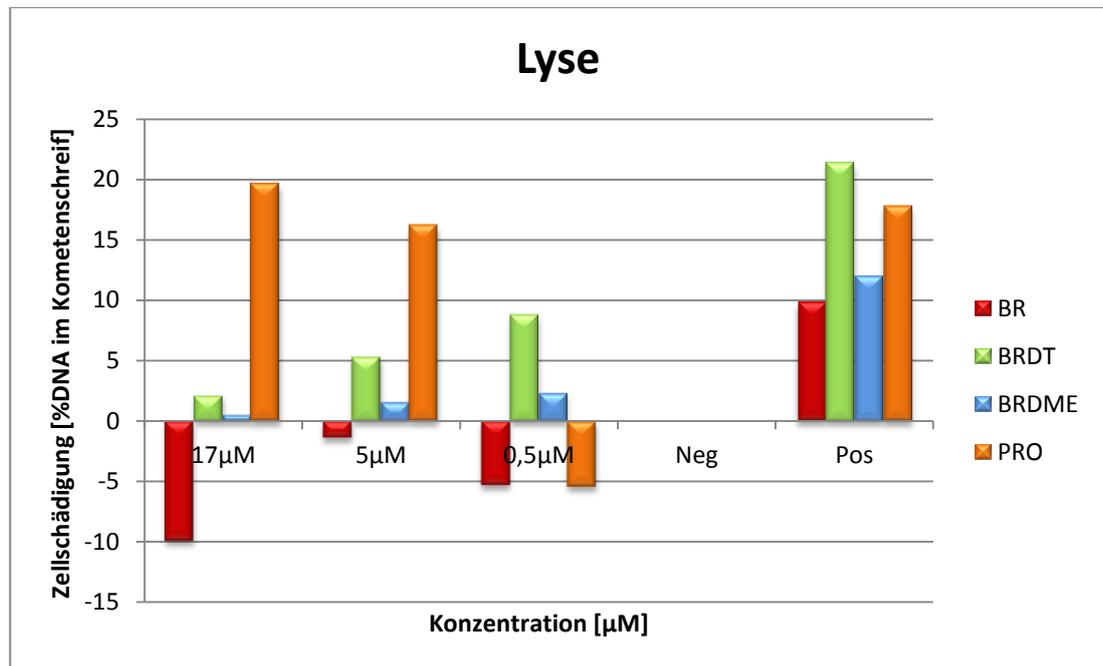


Abbildung 22: Gesamtüberblick der 4 Gallenpigmente Bilirubin (alpha), Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX nach einer 24 stündigen Inkubation mit Caco 2 Zellen (nur Lyse). Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die Abweichungen der getesteten Konzentrationen von der hier Null gesetzten Negativkontrollen.

Von allen Gallenpigmenten zeigt Protoporphyrin IX die deutlichsten Ergebnisse mit den höchsten Werten an DNA Schädigung [%DNA im Kometenschweif] im Vergleich zur Negativkontrolle.

Auch Bilirubin Konjugat (Ditaurat) weist, vor allem bei der Konzentration 0,5µM, große Zellschädigungen im Vergleich zur Negativkontrolle auf.

Eine Behandlung der Darmkrebszellen mit dem Gallenfarbstoff Bilirubin Dimethylester bringt im statistischen Test keine signifikanten Zellschäden hervor.

Durch die Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin wurden die am wenigsten ausgeprägten Ergebnisse erzielt, was aber vermutlich an der sehr hohen Negativkontrolle liegt.

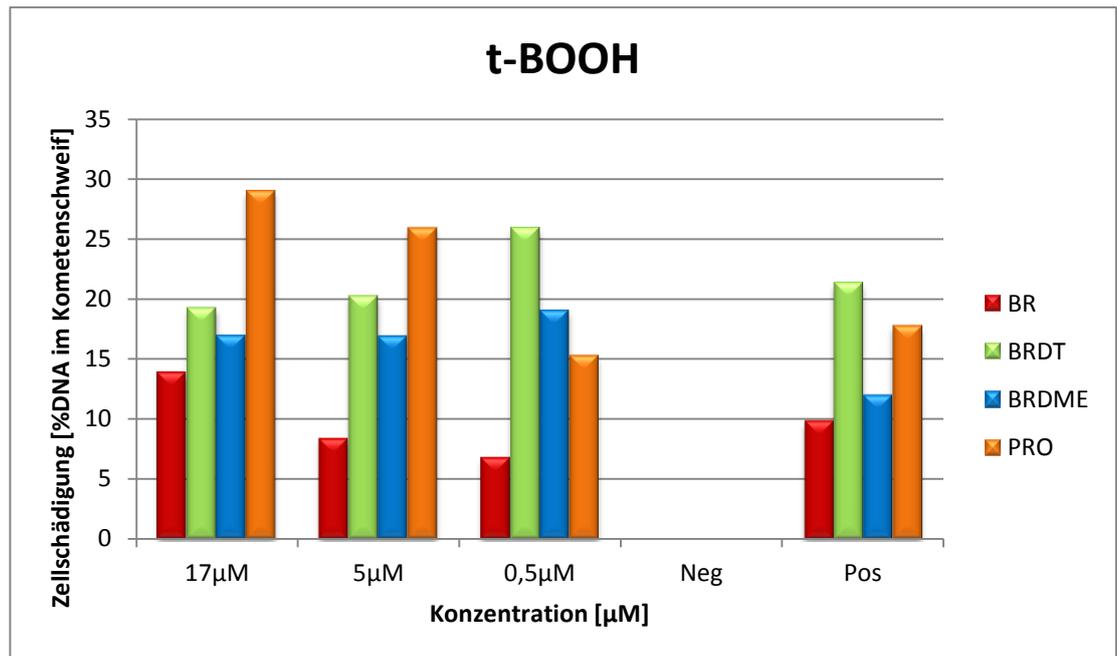


Abbildung 23: Gesamtüberblick der 4 Gallenpigmente Bilirubin (alpha), Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX nach einer 24 stündigen Inkubation mit Caco 2 Zellen (t-BOOH Zugabe). Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die Abweichungen der getesteten Konzentrationen von der hier Null gesetzten Negativkontrollen.

Von allen Gallenpigmenten zeigt Protoporphyrin IX die höchsten Werte an DNA Schädigung [%DNA im Kometenschweif] im Vergleich zur Positivkontrolle, was darauf schließen lässt, dass dieses Gallenpigment die Zellen nicht vor einem zusätzlichen oxidativen Stressfaktor wie Tertiäbutyl Hydroperoxid schützt.

Die größte Zellschädigung durch Bilirubin Dimethylester liegt bei einer Konzentration von 0,5µM, was bedeutet, dass dieser Gallenfarbstoff die Zellen nicht vor einer zusätzlichen Stressung schützt.

Eine Behandlung der Darmkrebszellen mit dem Gallenfarbstoff Bilirubin Dimethylester bringt im statistischen Test keine signifikanten Zellschäden hervor.

Wie bei den Zellen die nur lysiert wurden, brachte die Inkubation der Caco 2 Zellen mit Bilirubin die geringste Zellschädigung im Vergleich zur Positivkontrolle hervor.

4.7. Diskussion

Die Beobachtungen unserer *in vitro* Studie legen einen Grundstein zur Diskussion, da bisher keine vergleichbaren Forschungsarbeiten durchgeführt wurden. Daraus ergibt sich auch die Schwierigkeit der Diskussion und der Vergleichbarkeit mit anderen Studien und Ergebnissen. Im Allgemeinen ist das genotoxische Potential von Gallenfarbstoffen im Comet Assay noch wenig erforscht und es liegen so gut wie keine Daten vor.

Grundsätzlich werden die Daten dahingehend diskutiert, dass eine Erhöhung der DNA Schädigung [%DNA im Kometenschweif] im Comet Assay mit einer antikanzerogenen Wirkung des jeweiligen Gallenpigmentes diskutiert wird. Da sich die geschädigten Caco 2 Zellen im Zustand der Apoptose befanden, nahmen sie nicht mehr an der Tumorgenese teil.

Zucker et al. (2004) beschrieben in ihren Untersuchungen die Beziehung zwischen Serum Bilirubinkonzentrationen, Geschlecht und einem kolorektalen Karzinom. Die Serum Bilirubinkonzentrationen waren bei Männern signifikant höher, korrelierten mit dem Körpergewicht und waren signifikant niedriger bei Rauchern. In dieser Studie wurde festgestellt, dass eine Erhöhung von 1mg/dl an Serum Bilirubin merklich mit einem Rückgang der Prävalenz an kolorektalen Karzinomen in Verbindung steht (OR=0,257).

In einer weiteren epidemiologischen Untersuchung von Zucker et al. (2006) fand man heraus, dass die Zahl an Darmkrebserkrankungen vor allem bei Männern mit steigender Serum Bilirubin Konzentration sinkt. Das Geschlecht gilt allerdings als potentieller Einflussfaktor, da es sowohl mit Serum Bilirubin, als auch mit der Prävalenz an Darmkarzinomen assoziiert war.

Aus diesem Grund ist es ratsam, die Daten geschlechterspezifisch zu analysieren.

Keshavan et al. (2004) arbeiteten ebenfalls mit Darmkrebszellen und erforschten den Effekt von unkonjugiertem Bilirubin auf deren Wachstum und Überleben. Das Ergebnis zeigte, dass Bilirubin die Vitalität aller getesteten Darmkrebszellen abhängig von der Dosis verringerte. Die Zellen waren stark apoptotisch, nachdem sie Bilirubinkonzentrationen zwischen 0-50µM ausgesetzt wurden. Hierbei stellt sich die Frage der Löslichkeit, da nach heutigem Wissen eine Konzentration von 50µM nicht zu lösen ist. In der Studie wird daher beschrieben, dass während den Versuchen eine erhebliche Aggregation von Bilirubin stattgefunden hat und die physiologische Relevanz daher ungewiss ist.

Die Inkubation mit Bilirubin hatte eine Aktivierung der Caspase-9, wie auch eine Erhöhung der mitochondrialen Cytochrom C Freisetzung zur Folge.

Bilirubin stimulierte die Apoptose von Kolon Adenokarzinom Zellen *in vitro* über die Aktivierung des intrinsischen Pathways, offenbar durch direkte Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials.

Da dieser Effekt bei physiologischen Konzentrationen aufgetreten ist, lässt sich vermuten, dass Bilirubin eine physiologische Rolle in der Modulation der Darmtumorgenese spielen könnte.

Öllinger et al. (2007) beschäftigten sich sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* mit der Wirkung von Bilirubin auf diverse Krebszelllinien.

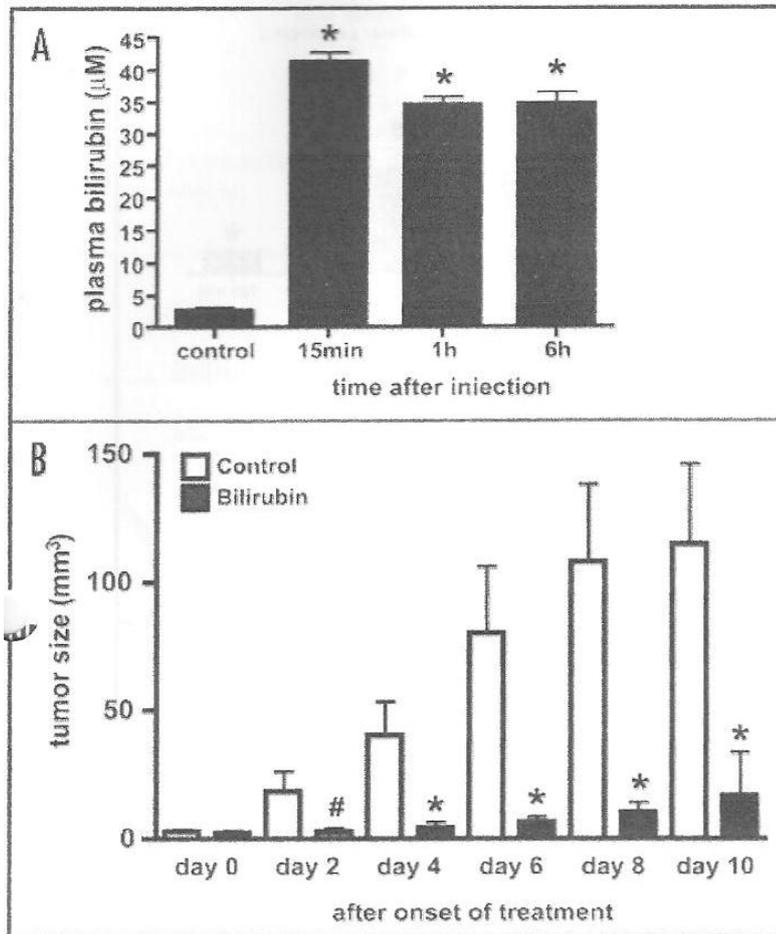


Abbildung 24: (A) Bilirubin Injektion *i.p.* in BALB/c Mäuse mit 25mg/kg zweimal täglich, bis zum Erreichen eines konstanten Plasmabilirubin Levels von 30-40µM nach 3 Tagen.

(B) Die Injektionen von Bilirubin in BALB/c Mäusen mit 25mg/kg zweimal täglich reduzierte das HRT-18 Tumorwachstumsrisiko signifikant. Das Diagramm zeigt Mittelwert \pm Standardabweichung der Ergebnisse. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von $p < 0,001$ definiert ($n=6$ pro Gruppe) [ÖLLINGER et al., 2007]

Die Mäuse die mit Bilirubin behandelt wurden zeigten ein signifikant langsames Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei bei einer Maus nach 10 Tagen der Tumor sogar gänzlich verschwunden war.

Beim Testen der Wirkung von Bilirubin auf das Tumorwachstum wurden verschiedene Zelllinien herangezogen (HRT-18 Zellen, HepG2-Zellen, PANC-1 Zellen, NIH/3T3 Zellen). Man fand *in vitro* eine signifikante Hemmung der Darmkrebszellen bei den Konzentrationen 25µM und 125µM.

Um diese Ergebnisse zu untermauern wurde die Wirkung von Bilirubin auf die Apoptoserate in HRT-18 Zellen untersucht. Nach 24 Stunden konnte eine signifikante Ansammlung der Zellen in der G0/G1 Phase und nach 72 Stunden Bilirubin-Behandlung ein signifikanter Anstieg der Apoptose im Vergleich zu den Kontrollzellen verzeichnet werden [Öllinger et al., 2007].

Interessant ist, dass die durchgeführten Studien Bilirubin einen protektiven Effekt gegenüber Krebs zuschreiben. So scheint dieses Gallenpigment *in vivo*, als auch *in vitro* Darmkrebszellen zu schädigen, was sich mit unseren Forschungsergebnissen nicht gänzlich deckt, was jedoch an der sehr hohen Negativkontrolle liegen kann.

Selbstverständlich darf man die Unterschiede der verschiedenen Zelllinien nicht außer Acht lassen, da die beschriebenen Studien jeweils mit anderen Darmkrebszelllinien durchgeführt wurden. Vermutlich liegt der Grund der ausgebliebenen antikanzerogenen Wirkung von Bilirubin an der hohen Negativkontrolle. Im Vergleich zu den anderen Pigmenten bei denen die Negativkontrolle deutlich niedriger ist (Bilirubin Ditaurat (Konjugat)=7,71%, Bilirubin Dimethylester=9,9%, Protoporphyrin=16,7%) liegt die von Bilirubin (alpha) doch bei 22,7% DNA im Kometenschweif.

In den oben genannten Studien wurde außerdem mit weitaus höheren Bilirubin-Konzentrationen von bis zu 125µM gearbeitet, bei denen Bilirubin nicht löslich und die physiologische Bedeutung somit fraglich ist.

Im Zusammenhang mit der Einzelzellgelelektrophorese liegen keine weiteren Ergebnisse zu den Gallenpigmenten Bilirubin Konjugat (Ditaurat) und Bilirubin Dimethylester vor.

Was jedoch erwähnenswert ist, ist unser durchaus positives Ergebnis mit Bilirubin Konjugat (Ditaurat).

Wir erreichten mit dem oben genannten Pigment eine zusätzliche Zellschädigung von immerhin +8,9% im Vergleich zur Negativkontrolle bei einer physiologischen Konzentration von 0,5 μ M. Außerdem ist sowohl bei den Lyse- als auch bei den Tertiärbutyl Hydroperoxid Treatments eine starke Konzentrationsabhängigkeit gegeben (Lyse $r^2=0,99$ t-BOOH $r^2=0,86$), die bei 0,5 μ M die größte Zellschädigung aufweist. Dem Potential dieses Gallenfarbstoffes sollte durchaus Achtung geschenkt und seine antikanzerogene Wirkung durch weitere Studien bestätigt werden. Basierend auf unseren Forschungsergebnissen, müsste das Hauptaugenmerk auf den niedrigeren Konzentrationsbereich gelegt werden, um einerseits eine gute Löslichkeit des Pigmentes und andererseits physiologisch relevante Ergebnisse zu gewährleisten.

Nennenswert sind außerdem die zahlreichen Studien, die zur Wirkung von Protoporphyrin IX durchgeführt wurden.

So testeten Williams et al. (1993) den Effekt von Protoporphyrin IX auf die Lipidperoxidation in Mikrosomen (Rattenleber) mit und ohne Lichteinfluss. Protoporphyrin IX und Licht stimulierten die Fe^{3+} -ADP/Ascorbat induzierte Lipidperoxidation, wohingegen die Fe^{3+} -ADP/NADPH ausgelöste Lipidperoxidation gehemmt wurde. Bei Abwesenheit von Licht erfolgte eine Hemmung der Lipidperoxidation sowohl durch Protoporphyrin IX, als auch durch Bilirubin in beiden Systemen. Diese Ergebnisse erlauben den Rückschluss, dass die Hemmung der Lipidperoxidation durch die Beseitigung der Peroxylradikale (ROO°) durch Protoporphyrin IX ausgelöst wird.

Bei der Krebsbehandlung gewinnt die Photodynamische Therapie immer mehr an Bedeutung, wofür drei Komponenten gleichzeitig gebraucht werden: Photosensibilisatoren, zellulärer Sauerstoff und Licht.

Durch diese Kombination soll der Zelltod ausgelöst werden, wobei der genaue Mechanismus dahinter noch nicht vollständig geklärt ist.

Aufgrund der Doppelbindungen und aromatischen Ringe in der Struktur von Protoporphyrin IX können diese durch Laserlicht angeregt und somit die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induziert werden. Diese führen in weiterer Folge zu zahlreichen morphologischen und physiologischen Veränderungen der Zellen und letztendlich zu Apoptose oder Nekrose. Es scheint, dass Photosensibilisatoren Prozesse des Zelltodes unter Lichteinfluss induzieren. Um diese Hypothese zu bestätigen testeten Bednarz et al. (2007) den Einfluss des Photosensibilisators Protoporphyrin IX auf den Zelltod von HeLa Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms). Die Verabreichung von Protoporphyrin IX erfolgte entweder exogen oder endogen durch Gabe von δ -Aminolävulinsäure. Die Ergebnisse zeigten eine zelltoxische Wirkung von Protoporphyrin IX bei Konzentrationen zwischen 0,8-20 μ g/ml.

Eine Inkubation mit dem Gallenpigment führte zu morphologischen Veränderungen der Zellen im Vergleich zu nicht-behandelten Zellen. Mittels Trypanblau-Test wurde festgestellt, dass signifikante Veränderungen der Zellmembranpermeabilität erst nach einer 24 stündigen Inkubation mit dem Pigment stattgefunden haben [Bednarz et al., 2007].

Die oben dargestellten Ergebnisse decken sich mit den vorliegenden Daten, da ebenso eine 24-stündige Inkubationszeit gewählt wurde, um eine signifikante Zellschädigung von +19,6% im Vergleich zur Negativkontrolle zu erreichen.

In einer Vielzahl von Studien wurde das Augenmerk auf das Gallenpigment Protoporphyrin IX gelegt, was daran liegen könnte, dass dieses Gallenpigment das größte antikanzerogene Potential verglichen mit anderen Gallenfarbstoffen hat. Diese Annahme würde auch meine Ergebnisse belegen, da mit Protoporphyrin IX die höchsten Werte an DNA Schädigung [%DNA im Kometenschweif] im Vergleich zur Negativkontrolle erreicht wurden.

Der Grund könnte am Porphyrin-Gerüst des Pigmentes liegen, dem scheinbar eine große Bedeutung zukommt. Dass einige Studien mit der chemisch verwandten Verbindung Chlorophyll für die Krebsforschung bedeutsame Ergebnisse zeigen, untermauert diese Hypothese. Eine Vielzahl von epidemiologischen Untersuchungen beschäftigt sich mit der protektiven Wirkung von Chlorophyll gegen Darmkrebs. Die Fragestellung der Studie von de Vogel et al. (2005) war, ob diese protektive Wirkung auf die Hemmung der Häm-induzierten Zytotoxizität im Darm und Hyperproliferation von Epithelzellen zurückzuführen ist. Chlorophyll besteht aus einem derivatisierten Porphyrin-Ring, ist somit strukturell mit Häm verwandt und enthält als Zentralion Mg^{2+} . Häm ist aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Gastrointestinaltrakt schwer löslich. Um die zytotoxischen Metabolite bilden zu können, muss die eisenhaltige Komplexverbindung jedoch gelöst werden. Chlorophyll wirkt dieser Reaktion präventiv entgegen, indem es mit Häm um die Löslichkeit im Gastrointestinaltrakt durch die Bindung an Gallensäuren konkurriert.

Chimploy et al. (2009) demonstrierten, dass Chlorophyllin (CHL), ein wasserlösliches Derivat von Chlorophyll, chemopräventive, wie auch krebstherapeutische Eigenschaften besitzt. Durch Behandlung von menschlichen Darmkrebszellen mit CHL erfolgte eine Anreicherung in der S-Phase des Zellzyklus, was mit einer verminderten Expression von p53 und p21 verbunden war. Gleichzeitig erfolgt eine Erhöhung der Transkriptionsfaktoren E2F1 und E2F4, welche eine erhöhte DNA Bindungsaktivität besitzen. Die Aktivität der Ribonukleotidreduktase, welche eine Schlüsselrolle in der DNA Synthese und –Reparatur spielt wurde, abhängig von der Konzentration, sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* gehemmt. CHL könnte somit eine wichtige Rolle in der Krebsbehandlung spielen, indem Krebszellen gegenüber antikanzerogener Substanzen sensibilisiert werden [Chimploy et al., 2009].

5. Schlussbetrachtung

Gallenfarbstoffe entstehen vor allem beim Abbau von Porphyrinen und sind schlecht wasserlöslich. Sie werden in der Galle gesammelt und über Urin und Stuhl ausgeschieden.

Das Ziel dieser *in vitro* Studie war es, die Wirkung vier verschiedener Gallenfarbstoffe auf menschliche Darmkrebszellen Caco 2 zu testen.

Dazu wurden die Zellen in 6 Well Platten ausgesät und 24 Stunden lang im Inkubator inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen und eine 80%ige Konfluenz zu schaffen. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine 24 stündige Inkubation mit den Gallenfarbstoffen (je nach Testreihe Bilirubin (alpha), Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester, Protoporphyrin IX) in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,5µM, 5µM, 17µM). Im Anschluss wurde der Comet Assay durchgeführt, der Aufschluss über das Ausmaß der Einzel- und Doppelstrangbrüche, gemessen in %DNA im Kometenschweif, geben sollte. Dabei wurden die Zellen getrennt (Zellen mit und ohne Tertiärbutyl Hydroperoxid) lysiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Die geschädigten DNA Bruchstücke waren nach Färbung mit Ethidiumbromid unter einem Fluoreszenzmikroskop als Kometenschweif sichtbar.

Im Comet Assay konnte vor allem durch Protoporphyrin IX (17µM, 5µM) eine signifikant DNA-schädigende Wirkung auf Caco 2 Zellen festgestellt werden ($p=0,012$, $p=0,039$). Auch Bilirubin Konjugat (Ditaurat) zeigt bei der Konzentration 0,5µM signifikante DNA Schäden. Eine Inkubation der Darmkrebszellen mit Bilirubin Dimethylester weist keine zusätzliche Zellschädigung im Vergleich zur Negativkontrolle auf. Das Gallenpigment Bilirubin (alpha) wirkt in keiner der getesteten Konzentrationen DNA-schädigend, was jedoch an der sehr hohen Negativkontrolle von 22,7% DNA im Kometenschweif liegen kann.

Alle 4 Pigmente in allen 3 getesteten Konzentrationen schützen die Zellen nicht vor einem zusätzlichen Stressfaktor, wie Tertiärbutyl Hydroperoxid, welcher als Positivkontrolle fungierte. Das ist ein durchaus wünschenswertes Ergebnis, wenn man bedenkt dass der Schutz von Krebszellen in keinster Weise positiv wäre.

Gallenpigmenten konnten bisher sowohl antioxidative, antimutagene, antibakterielle, als auch antivirale Eigenschaften nachgewiesen werden.

Unsere Hypothese, dass Gallenfarbstoffe auch antikanzerogen auf menschliche Darmkrebszellen wirkt, bestätigte sich abhängig von Pigment und Konzentration, muss jedoch durch weitere Studien noch bestätigt werden. Die Auswirkung auf die Zellen kann nicht auf den gesamten Organismus übertragen werden, da es sich bei *in vitro* Studien um isolierte Systeme handelt. Es bedarf noch zukünftiger Forschungsarbeit um diesbezüglich eine wissenschaftlich fundierte Aussage treffen- und eine Übertragbarkeit auf den Menschen feststellen zu können.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Masterarbeit wurde die Wirkung der Gallenfarbstoffe Bilirubin (alpha), Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX in drei verschiedenen Konzentrationen (0,5µM, 5µM und 17µM) auf Caco 2 Zellen untersucht. Dabei wurde die Methode der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) angewandt, durch die Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden konnten. Während der Elektrophorese wandert die negativ geladene DNA zum Pluspol, wobei nur die geschädigte DNA, aufgrund ihrer kleinen Größe in der Lage ist, aus dem Zellkern herauszuwandern. Je nach Ausmaß einer Toxizität erscheint die bruchstückhafte DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop als Kometenschweif.

Eine 24 stündige Inkubation der Zellen mit Protoporphyrin IX erwies sich, konzentrationsabhängig, als signifikant DNA-schädigend. Eine DNA-schädigende Wirkung konnte auch durch das Pigment Bilirubin Konjugat (Ditaurat) bei einer Konzentration von 0,5µM erzielt werden. Die Behandlung der Darmkrebszellen mit Bilirubin Dimethylester und Bilirubin (alpha) wies keine zusätzliche Schädigung auf. Die ausgebliebene Wirkung von Bilirubin (alpha) liegt vermutlich an der sehr hohen Negativkontrolle. Ein zusätzlicher Stressfaktor, wie Tertiärbutyl Hydroperoxid (=Positivkontrolle) schädigte die Zellen erheblich, wobei als positives Ergebnis keines der 4 Pigmente in der Lage war, die Zellen vor dem Prooxidans zu schützen.

Da sich die Zellen nicht mehr in einem funktionierenden Organismus befinden, sind sie aus Prozessen des Stoffwechsels ausgeschlossen. Aufgrund dessen ergibt sich die Schwierigkeit, die Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können. Die Resultate dieser *in vitro* Studie sind durchaus positiv und haben großes Potential für weitere Forschungsarbeiten.

7. Summary

This master thesis deals with the effect of bile pigments (Bilirubin (alpha), Bilirubin conjugate, Bilirubin dimethyl ester und Protoporphyrin IX) on Caco 2 cells. The samples were tested at three different concentrations (0.5µM, 5µM, 17µM) and the accomplishment was carried out by the single cell gel electrophoresis. Using a so called comet assay it is possible to demonstrate cytotoxic effects. During electrophoresis the negatively charged DNA migrates to the positive pole. Small pieces of damaged DNA are able to migrate out of the cell nucleus and can be visualised by a fluorescence microscope.

Dependent on the concentration, Protoporphyrin IX showed significantly DNA damaging effects on Caco 2 cells. The same was true for Bilirubin conjugate at a concentration of 0.5µM. Bilirubin dimethyl ester and Bilirubin (alpha) provoked no additional DNA damage in comparison to the negative control. No additional effect was observed against the prooxidant tertiary-butyl hydroperoxide which acted as positive control.

In *in vitro* systems, cells are not in a functioning organism, thus they are excluded from metabolic processes. On account of that difficulty arises transferring the results on the human being and the interpretation of the results has to be done carefully. The results of this *in vitro* study are generally positive, but must still be affirmed by future research projects on the anti-carcinogenic effect of bile pigments.

8. Literaturverzeichnis

AHERNE SA, KERRY JP, O'BRIEN NM. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition* 2007;97:321-328

ARIMOTO S, KAN-YAMA K, RAI H, HAYATSU H. Inhibitory effect of hemin, chlorophyllin and related pyrrole pigments on the mutagenicity of benzo[a]pyrene and its metabolites. *Mutat.Res.* 1995;345:127-135

BEDNARZ N, ZAWACKA PANKAU J, KOWALSKA A. Protoporphyrin IX induces apoptosis in HeLa cells prior to photodynamic treatment. *Pharmacological Reports* 2007; 50: 474-479

BENZIE IFF, STRAIN JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power" : The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 1996;239:70-76

BULMER AC, BLANCHFIELD JT, COOMBES JS, TOTH I. In vitro permeability and metabolic stability of bile pigments and the effects of hydrophilic and lipophilic modification of biliverdin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008;16:3616-3625

BULMER AC, BLANCHFIELD JT, TOTH I, FASSETT RG, COOMBES JS. Improved Resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: A mechanism for cardiovascular protection *Elsevier* 2007; 199:390-396

BULMER AC, RIED K, BLANCHFIELD JT, WAGNER KH The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Elsevier* 2007;658:28-41

BRODERSEN R. Bilirubin, Solubility and Interaction with Albumin and Phospholipid. *The Journal of Biological Chemistry* 1979;254:2364-2369

CHIMPLOY K, DIAZ GD, LI Q, CARTER O, WAN-MOHAIZA D, MATHEWS CK, WILLIAMS DE, BAILEY GS, DASHWOOD RH. E2F4 and ribonucleotide reductase mediate S-phase arrest in colon cancer cells treated with chlorophyllin. *Int J Cancer* 2009;125:2086-2094

CHOUCROUN P, GILLET D, DORANGE G, SAWICKI B, DEWITTE JD. Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research* 2001;478:89-96

COLLINS AR, OSCOZ AA, BRUNBORG G, GAIVAO I, GIOVANNELLI L, KRUSZEWSKI M, SMITH CC, STETINA R. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008;23:143-151

DENNERY PA, WENG YH, STEVENSON DK, YANG G. The biology of bilirubin production. *J Perinatol.* 2001;21:17-20;

DUDNIK LB, TSYUPKP AN, KHRENOV AV, ALESSENKO AV. Effect of bilirubin on lipid peroxidation, sphingomyelinase activity, and apoptosis induced by sphingosine and UV irradiation. *Biochemistry (Mosc)* 2001;66:1019-1027

FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL KM. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 1994;339:37-59

GHEM C, SARMENTO-LEITE RE, DE QUADROS AS, ROSSETTO S, GOTTSCHALL CAM. Serum Bilirubin Concentration in Patients With an Established Coronary Artery Disease. *Int Heart J* 2010;51:86-91

GOSSAUER A. Catabolism of Tetrapyrroles. *Chimia* 1994;48:352-361

HERMANN HJ, OHMSTEDE A. Nuklearmedizin. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2004;252

HUTCHINSON DW, JOHNSON B, KNELL AJ. The Synthesis of Esters of Bilirubin. Biochemical Journal 1972;133:493-498

KAPITULNIK J. Bilirubin: An Endogenous Product of Heme Degradation with Both Cytotoxic and Cytoprotective Properties. Molecular Pharmacology 2004;66:773-779

KAZMIERCZAK SC, ROBERTSON AF, BRILEY KP, KREAMER B, GOURLEY GR. Transcutaneous Measurement of Bilirubin in Newborns: Comparison with an Automated Jendrassik–Grof Procedure and HPLC. Clinical Chemistry 2004;50:433-435

KESHAVAN P, SCHWEMBERGER SJ, SMITH DL, BABCOCK GF, ZUCKER SD. Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization. Int J Cancer 2004; 112: 433-445

KONINGSBERGER JC, RADEMARKERS LHIM, VAN HATTUM J, DE LA FAILLE HB, WIEGMAN LJJM, ITALIAANDER E, VAN BERGE HENEGOUWEN GI, MARX JJM Exogenous protoporphyrin inhibits Hep G2 cell proliferation, increases the intracellular hydrogen peroxide concentration and causes ultrastructural alterations. J Hepatol 1995;22:57-65

LIN JP, O'DONNELL CJ, SCHWAIGER JP, CUPPLES LA, LINGENHEL A, HUNT SC, YANG S, KRONEBERG F. Association Between the UGT1A1*28 Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. Circulation 2006;114:1476-1481

LIN JP, VITEK L, SCHWERTNER HA. Serum Bilirubin and Genes Controlling Bilirubin Concentrations as Biomarkers for Cardiovascular Disease. *Clinical Chemistry* 2010;56:1535-1543

LIU Z, CHEN B. Caco-2 cell monolayers and its application in toxicological research. *Wei Sheng Yan Jiu* 2004;33:756-759

LÖFFLER G, PETRIDES PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin 2007; 608-627

MCPHEE F, CALDERA PS, BEMIS GW, MCDONAGH AF, KUNTZ ID, CRAIK CS. Bile pigments as HIV-1 protease inhibitors and their effects on HIV-1 viral maturation and infectivity in vitro. *Biochem. J.* 1996;320:681-686

MCNAMEE JP, MCLEAN JRN, FERRAROTTO CL, BELLIER PV. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research* 1999;466:63-69

MC ART DG, WASSON GR, MC KERR G, SAETZLER K, REED M, HOWARD CV. Systematic random sampling of the comet assay. *Mutagenesis* 2009;24:373-378

MUKERJEE P, OSTROW JW, TIRIBELLI C. Low solubility of unconjugated bilirubin in dimethylsulfoxide-water systems: implications for pK_a determinations. *BMC Biochemistry* 2002;3:1471-2091

MUKERJEE P, OSTROW JD. Review: Bilirubin pK_a studies; new models and theories indicate high pK_a values in water, dimethylformamide and DMSO. Mukerjee and Ostrow *BMC Biochemistry* 2010;11:1-12

ÖLLINGER R, KOGLER P, TROPPEMAYER J, HERMANN M, WURM M, DRASCHE A, KÖNIGSRAINER I, AMBERGER A, WEISS H, ÖFNER D, BACH FH, MARGREITER R. Bilirubin Inhibits Tumor Cell Growth via Activation of ERK. *Cell Cycle* 2007; 6:3078-3085

ÖLLINGER R, YAMASHITA K, BILBAN M, ERAT A, KOGLER P, THOMAS M, CSIZMADIA E, USHEVA A, MARGREITER R, BACH FH. Bilirubin and Biliverdin Treatment of Atherosclerotic Disease. *Cell Cycle* 2007;6:39-43

PERLSTEIN TS, PANDE RL, CREAGER MA, WEUVE J, BECKMAN JA. Serum total bilirubin level, prevalent stroke, and stroke outcomes: National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med* 2008;121:781-788

RAO P, SUZUKI R, MIZOBUCHI S, YAMAGUCHI T, SASAGURI S. Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human adenocarcinoma. *Elsevier* 2006;342:1279-1283

READ BE. Chinese materia medica: Animal drugs. Taipei: Southern Materials Center, Inc.; 1976

SAMBUY Y, DE ANGELIS I, RANALDI G, SCARINO ML, STAMMATI A, ZUCCO F. The Caco 2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005;21:1-26

SZNARKOWSKA A, MALENCZYK K, KADZINSKI L, BIELAWSKI KP, BANECKI B, ZAWACKA-PANKAU J. Targeting of p53 and its homolog p73 by protoporphyrin IX. *Elsevier* 2010;585:255-260

UHL M, HELMA C, KNASMÜLLER S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research* 2000;468:213-225

VITEK L. Impact of Serum Bilirubin on Human Diseases. Official Journal of the American Academy of Pediatrics 2005; 115: 1411-1412

VITEK L, JIRSA M, BRODANOWÁ M, KALAB M, MARECEK Z, DANZIG V, NOVOTNÝ L, KOTAL P Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. Atherosclerosis 2002;160:449-56

VERMA VK, RAMESH V, TEWARI SATYENDRA, GUPTA RK, SINHA NAKUL, PANDEY CM Role of Bilirubin, Vitamin C and Ceruloplasmin as Antioxidants in coronary artery disease [Cad]. Indian Journal of Clinical Biochemistry 2005;20 (2):68-74

WANG X, CHOWDHURY JR, CHOWDHURY NR. Bilirubin metabolism: Applied physiology. Elsevier 2005;16:70-74

WILLIAMS M, KROOTJES BBH, VAN STEVENINCK J, VAN DER ZEE J. The pro- and antioxidant properties of protoporphyrin IX. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1993;1211 310-316

WIWANITKIT V. Energy change in the formation of conjugated bilirubin: A possible responsive mechanism for liver cell pathology. Ref Esp Enferm Dig 2007;99:94-96

YANG XF, CHEN YZ, SU JL, WANG FY, WANG LX. Relationship between Serum Bilirubin and Carotid Atherosclerosis in Hypertensive Patients. Inter Med 2009;48: 1595-1599

YOSHINO S, HAMASAKI S, ISHIDA S, KATAOKA T, YOSHIKAWA A, OKETANI N, SAIHARA K, OKUI H, SHINSATO T, ICHIKI H, KUBOZONO T, KUWAHATA S, FUJITA S, KANDA D, NAKAZAKI M, MIYATA M, TEI C. Relationship Between Bilirubin Concentration, Coronary Endothelial Function, and Inflammatory Stress in Overweight Patients. J Atheroscler Thromb 2011;18:403-412

ZAWACKA-PANKAU J, ISSAEVA N, HOSSAIN S, PRAMANIK A, SELIVANOVA G.

PODHAJSKA AJ. Protoporphyrin IX interacts with Wild-type p53 Protein *in vitro* and Induces Cell Death of Human Colon Cancer Cells in a p53-dependent and - independent Manner. The Journal of Biological Chemistry 2006;282:2466-2472

ZEMING J, XIAOPING W. Concentration of protoporphyrin IX in cancer tissues and blood in patients with colorectal cancer at early stage. J Cent South Univ (Med Sci) 2009;34:846-849

ZUCKER SD, BENEDICT M, SHERMAN KE. Serum bilirubin and risk of colorectal cancer. Aliment Pharmacol Ther 2006; 24: 1257-1267

ZUCKER SD, HORN PS, SHERMAN KE. Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. Hepatology 2004; 40: 827-835

9. Webverzeichnis

AMS Biotechnology (Europe) Ltd

Internet:

<http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx> (Stand: 2011)

Chemical Book

Internet:

http://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB5338582_EN.htm

(Stand: 2008)

Chemical Book

Internet:

http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB0685386.htm

(Stand: 2009)

Physikalisch-Technische Bundesanstalt. Prinzip der Laser-Durchflusszytometrie

Internet:

<http://www.ptb.de/cms/index.php?id=laser-durchfl-zytometrie> (Stand: 14.04.2010)

Statistik Austria, die Informationsmanager. Dickdarm, Enddarm

Internet:

http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enddarm/index.html (Stand: 13.10.2011)

Universität Basel, Department Chemie

Internet:

<http://www.chemie.unibas.ch/~team2008/CErker/Molek%FCle.html> (Stand: 2011)

WIKIPEDIA Die freie Enzyklopedie. Bilirubin

Internet:

<http://de.wikipedia.org/wiki/Bilirubin> (Stand: 10.07.2011)

WIKIPEDIA Die freie Enzyklopedie. Protoporphyrin IX

Internet: http://nl.wikipedia.org/wiki/Bestand:Protoporphyrin_IX.png

(Stand: 30.09.2006)

LEBENS LAUF**Angaben zur Person**

Name Bakk.rer.nat. Barbara Pfleger
 Adresse Hauptstraße 25/1
 3362 Mauer
 Telefon (0676) 95 18 601
 E-Mail barbara_pfleger@gmx.at
 Staatsangehörigkeit Österreich
 Geburtsdatum u. -ort 09.08.1987, Amstetten (NÖ)

**Schul- und Berufsbildung**

seit 10/2010

Universität Wien - Masterstudium**Ernährungswissenschaften**

Studienzweig: Molekulare Ernährung

Titel der Abschlussarbeit:

Der Einfluss der Gallenfarbstoffe auf humane

Darmkrebszellen

Geplantes Studienende: Dezember 2011

10/2008 – 10/2010

Universität Wien - Umstieg auf Bakkalaureatsstudium

Titel der Abschlussarbeit:

Botulinumtoxin – Tödliches Nervengift und medizinisches

Heilmittel

10/2005 – 10/2008

Universität Wien – Diplomstudium**Ernährungswissenschaften**

09/1997 – 07/2005

Bundesgymnasium Amstetten

Matura: Schwerpunkt Fremdsprachen

Berufserfahrung und studienrelevante Praktika

01/2011-02/2011

**Universität Wien – Department für
Ernährungswissenschaften**

Mitarbeit am österreichischen Ernährungsbericht 2012
Durchführung der Bioimpedanzanalyse, Blutaufarbeitung

seit 10/2010

**Universität Wien – Department für
Ernährungswissenschaften**

Tutorium bei der Lehrveranstaltung „Übungen zur Diätetik“
– Betreuung der Studenten

08/2010

Agrana Fruit Austria GmbH

Durchführung der Endkontrolle von Fruchtzubereitungen,
Erstellung von UWEB Schulungen und Arbeitsanweisungen
(ISO 9001: 2008), Teilnahme an Hygienerundgängen

07/2010

IMP (Research Institute of Molecular Pathology)

Abteilung “Library Maintenance” des Vienna Drosophila
RNAi Center

03/2010- 07/2010

**Universität Wien - Department für
Ernährungswissenschaften**

Teilnahme an einer klinischen Humanstudie an Personen
mit Gilbert Syndrom – Blutaufarbeitung

10/2008 – 06/2010

Ordination Dr. Brita Biron

Geringfügige Anstellung als Ordinationsassistentin
Bürotätigkeiten, Patientenbetreuung

seit 01/2007 **M&P Werbeagentur GmbH**
Ernährungsberatung bei Supermarktketten, sowie Mitarbeit
am 25. Ernährungskongress

seit 08/2005 **ZGS Schülerhilfe GmbH**
Unterricht in Französisch, Latein und Chemie

Ferialpraktika

seit 08/2003 Diverse Ferialpraktika:
Lisec Glastechnische Industrie GmbH, Firma Leitner

Sprachliche Kenntnisse

Deutsch als Muttersprache

Englisch verhandlungssicher in Wort und Schrift

Französisch fließend in Wort und Schrift

EDV und methodische Kenntnisse

Sehr gute MS-Office-Kenntnisse, Adobe Photoshop, Adobe
Illustrator, SPSS, USDA, Führerschein der Klasse B

Interessen

Sport: Klettern, Laufen, Radfahren, Wintersport

Reisen: zahlreiche, teils mehrwöchige Reisen in Europa,
Asien, Amerika

Lesen: Romane, Fachliteratur