



universität  
wien

# MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Untersuchung der antikanzerogenen Wirkung von  
Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und  
Urobilin auf HepG2-Zellen

Verfasserin

Ursula Schwarz, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner



## **Danksagung**

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für das Ermöglichen und die Betreuung dieser Masterarbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Mag. Christine Mölzer, Bakk. für die großartige Unterstützung und Betreuung, die von der Einschulung im Labor, über die Durchführung bis hin zum Verfassen dieser Arbeit reichte.

Bei meiner Laborpartnerin Elisabeth Putz möchte ich mich für die tolle Freundschaft während der Labor- und der gesamten Studienzeit bedanken.

Danke an die gesamte Spange E für das nette Arbeitsklima.

Mein größter Dank geht an meine Familie, allen voran an meine Eltern, die mir dieses Studium und auch sonst alles im Leben ermöglicht haben. Danke für eure wunderbare Unterstützung, eure Motivation und die vielen aufbauenden Worte. Danke auch an meine Geschwister, die immer für mich da waren und es immer schafften mich aufzuheitern.

Danke an meine Freunde, die während meiner Studienzeit und besonders während des Verfassens dieser Arbeit, für die nötige Abwechslung gesorgt haben.



# Inhaltsverzeichnis

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung und Fragestellung</b>                                | <b>1</b>  |
| <b>2. Literaturübersicht</b>                                          | <b>3</b>  |
| 2.1. Gallenpigmente allgemein                                         | 3         |
| 2.2. Metabolismus der Gallenpigmente                                  | 4         |
| 2.2.1. Von den Erythrozyten zum Bilirubin                             | 4         |
| 2.2.2. Bilirubin Transport im Plasma und die Aufnahme in die Leber    | 6         |
| 2.2.3. Glucuronidierung                                               | 7         |
| 2.2.4. Ausscheidung von Bilirubin                                     | 7         |
| 2.3. Nachweis von Gallenpigmenten im Blutplasma                       | 8         |
| 2.4. Getestete Tetrapyrrole                                           | 10        |
| 2.4.1. Biliverdin                                                     | 10        |
| 2.4.2. Biliverdin-Dimethylester                                       | 11        |
| 2.4.3. Stercobilin                                                    | 12        |
| 2.4.4. Urobilin                                                       | 13        |
| 2.5. Wirkungen von Gallenpigmenten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> | 14        |
| 2.5.1. Antioxidative Wirkung                                          | 14        |
| 2.5.2. Antiinflammatorische Wirkung                                   | 16        |
| 2.5.3. Antimutagene Wirkung                                           | 17        |
| 2.5.4. Antikanzerogene Wirkung                                        | 18        |
| 2.6. Zytotoxische Effekte von Bilirubin                               | 20        |
| 2.6.1. Erworbene Hyperbilirubinämie                                   | 21        |
| 2.6.2. Angeborene Hyperbilirubinämie                                  | 22        |
| 2.7. Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay)                    | 24        |
| 2.7.1. Vorteile des Comet Assay                                       | 25        |
| 2.7.2. Ablauf des Comet Assay                                         | 25        |
| <b>3. Material und Methoden</b>                                       | <b>28</b> |
| 3.1. Geräte                                                           | 28        |
| 3.2. Verbrauchsmaterialien                                            | 29        |
| 3.3. Chemikalien und Medien                                           | 30        |
| 3.4. Verwendete Tetrapyrrole                                          | 31        |

|                                                      |           |
|------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5. Lösungen .....                                  | 32        |
| 3.6. HepG2-Zellen.....                               | 34        |
| 3.6.1. Charakterisierung der Zellen.....             | 34        |
| 3.6.2. Zellkultur .....                              | 35        |
| 3.7. Comet Assay.....                                | 37        |
| 3.7.1. Prinzip des Comet Assay .....                 | 37        |
| 3.7.2. Aussaat der Zellen .....                      | 37        |
| 3.7.3. Versuchsansätze .....                         | 38        |
| 3.7.4. Zellvorbereitung und Comet Assay .....        | 39        |
| 3.8. Auszählen .....                                 | 41        |
| 3.9. Statistische Auswertung.....                    | 43        |
| <b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>            | <b>44</b> |
| 4.1. Ergebnisse Comet Assay .....                    | 44        |
| 4.2. Auswirkungen von Biliverdin .....               | 45        |
| 4.3. Auswirkungen von Biliverdin-Dimethylester ..... | 47        |
| 4.4. Auswirkungen von Stercobilin .....              | 49        |
| 4.5. Auswirkungen von Urobilin .....                 | 51        |
| 4.6. Gesamtüberblick .....                           | 53        |
| 4.7. Diskussion .....                                | 55        |
| <b>5. Schlussbetrachtung .....</b>                   | <b>62</b> |
| <b>7. Summary .....</b>                              | <b>65</b> |
| <b>8. Literaturverzeichnis .....</b>                 | <b>66</b> |
| <b>9. Lebenslauf.....</b>                            | <b>75</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Abbildung 1: Abbau von Häm [BERLIN und BERK, 1981] .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <i>5</i>  |
| <i>Abbildung 2: Strukturformel von Biliverdin [CHEMSPIDER, 2012].....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                               | <i>11</i> |
| <i>Abbildung 3: Strukturformel von Biliverdin-Dimethylester [CHEMSPIDER, 2012]<br/>.....</i>                                                                                                                                                                                                                                                            | <i>12</i> |
| <i>Abbildung 4: Strukturformel von Stercobilin [CHEMSPIDER, 2012] .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                             | <i>13</i> |
| <i>Abbildung 5: Strukturformel von Urobilin [CHEMSPIDER, 2012].....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <i>14</i> |
| <i>Abbildung 6: Ablauf des Comet Assay [mod. nach [TICE et al., 2000]] .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                        | <i>25</i> |
| <i>Abbildung 7: Geschädigte HepG2-Zelle im Comet Assay.....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <i>27</i> |
| <i>Abbildung 8: HepG2-Zellen [ATCC, 2012] .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <i>35</i> |
| <i>Abbildung 9: Zellkultur: Arbeiten im Laminar Flow .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <i>35</i> |
| <i>Abbildung 10: Auszählverfahren [PFLEGER, 2011].....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <i>42</i> |
| <i>Abbildung 11: Screenshot Komet 5.5 - geschädigte HepG2-Zellen .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                              | <i>42</i> |
| <i>Abbildung 12: Ergebnis des Comet Assay der HepG2-Zellen nach einer<br/>Inkubation (24h) mit Biliverdin. Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm mit<br/>Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung der Ergebnisse. *n bzw. *p kennzeichnet<br/>einen signifikanten Unterschied zur Negativ- bzw. zur Positivkontrolle.....</i>                    | <i>45</i> |
| <i>Abbildung 13: Ergebnis des Comet Assay der HepG2-Zellen nach einer<br/>Inkubation (24h) mit Biliverdin-Dimethylester. Die Abbildung zeigt ein<br/>Balkendiagramm mit Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung der Ergebnisse. *n bzw.<br/>*p kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Negativ- bzw. zur<br/>Positivkontrolle. ....</i> | <i>47</i> |
| <i>Abbildung 14: Ergebnis des Comet Assay der HepG2-Zellen nach einer<br/>Inkubation (24h) mit Stercobilin. Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm mit<br/>Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung der Ergebnisse. *n bzw. *p kennzeichnet<br/>einen signifikanten Unterschied zur Negativ- bzw. zur Positivkontrolle.....</i>                   | <i>49</i> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 15: Ergebnis des Comet Assay der HepG2-Zellen nach einer Inkubation (24h) mit Urobilin. Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm mit Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der Ergebnisse. *n bzw. *p kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Negativ- bzw. zur Positivkontrolle. ....                                                                                            | 51 |
| Abbildung 16: Gesamtüberblick (nur Lyse) der HepG2-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit den 4 Tetrapyrrolen Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die Abweichungen der getesteten Konzentrationen von den Null-gesetzten Negativkontrollen. ....                                                                        | 53 |
| Abbildung 17: Gesamtüberblick (t-BOOH-Zugabe) der HepG2-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit den 4 Tetrapyrrolen Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die Abweichungen der getesteten Konzentrationen von den Null-gesetzten Negativkontrollen. ....                                                                   | 54 |
| Abbildung 18: Reduktion in der Zellproliferation mit Bilirubin nach 48-stündiger Inkubation und Zellzahlbestimmung mit 1% Trypanblau (*p<0,05 kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Positivkontrolle) [RAO et al., 2006] .....                                                                                                                                                        | 56 |
| Abbildung 19: Effekte auf die Zellvitalität von Bilirubin (0-50 $\mu$ M) und Biliverdin (BV, 50 $\mu$ M) nach einer 48-stündigen Inkubation auf zwei verschiedene Darmkrebszelllinien. DMSO diente als Kontrolle (0 $\mu$ M). Dargestellt werden Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (*p>0,0001 kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (DMSO)) [KESHAVAN et al., 2004]. .... | 57 |
| Abbildung 20: Bilirubin hemmt die Proliferation von HepG2-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Drei unterschiedliche Konzentrationen stehen im Vergleich zur Kontrollprobe (*p<0,001) [ÖLLINGER et al., 2007]. ....                                                                                                                    | 58 |



## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Tabelle 1: Geräte .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <i>29</i> |
| <i>Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <i>30</i> |
| <i>Tabelle 3: Chemikalien und Medien .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <i>31</i> |
| <i>Tabelle 4: Verwendete Tetrapyrrole .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <i>31</i> |
| <i>Tabelle 5: Summenformel und molare Masse der getesteten Tetrapyrrole<br/>[SCIENTIFIC, 2012] .....</i>                                                                                                                                                                                                                        | <i>38</i> |
| <i>Tabelle 6: Arbeitsablauf eines typischen Versuchsansatzes .....</i>                                                                                                                                                                                                                                                          | <i>41</i> |
| <i>Tabelle 7: Signifikante Unterschiede (<math>p \leq 0,05</math>) der Zellschädigung zwischen<br/>Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach<br/>einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Biliverdin. ....</i>                                                                              | <i>45</i> |
| <i>Tabelle 8: Signifikante Unterschiede (<math>p \leq 0,05</math>) der Zellschädigung zwischen<br/>Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen bei<br/>zusätzlicher Stressung durch Tertiärbutylhydroperoxid nach einer Inkubation<br/>(24h) der HepG2-Zellen mit Biliverdin. ....</i>                | <i>46</i> |
| <i>Tabelle 9: Signifikante Unterschiede (<math>p \leq 0,05</math>) der Zellschädigung zwischen<br/>Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach<br/>einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Biliverdin-Dimethylester. ....</i>                                                                | <i>47</i> |
| <i>Tabelle 10: Signifikante Unterschiede (<math>p \leq 0,05</math>) der Zellschädigung zwischen<br/>Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen bei<br/>zusätzlicher Stressung durch Tertiärbutylhydroperoxid nach einer Inkubation<br/>(24h) der HepG2-Zellen mit Biliverdin-Dimethylester. ....</i> | <i>48</i> |
| <i>Tabelle 11: Signifikante Unterschiede (<math>p &lt; 0,05</math>) der Zellschädigung zwischen<br/>Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach<br/>einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Stercobilin. ....</i>                                                                            | <i>49</i> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Tabelle 12: Signifikante Unterschiede (<math>p \leq 0,05</math>) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen bei zusätzlicher Stressung durch Tertiärbutylhydroperoxid nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Stercobilin.....</i> | <i>50</i> |
| <i>Tabelle 13: Signifikante Unterschiede (<math>p &lt; 0,05</math>) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Urobilin.....</i>                                                              | <i>51</i> |
| <i>Tabelle 14: Signifikante Unterschiede (<math>p \leq 0,05</math>) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen bei zusätzlicher Stressung durch Tertiärbutylhydroperoxid nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Urobilin. ....</i>   | <i>52</i> |

## 1. Einleitung und Fragestellung

Schon seit Jahrhunderten werden Gallenpigmente, allen voran das Bilirubin, in der chinesischen Medizin eingesetzt. Dort wurde dem Bilirubin heilende Wirkung zugesprochen [RAO *et al.*, 2006].

In der Medizin und der Naturwissenschaft wurden Gallenpigmente lange Zeit als nutzlos oder im schlimmsten Fall sogar als rein toxisch betrachtet. Denn Störungen im Bilirubinstoffwechsel können zu Hyperbilirubinämien führen. Die Auswirkungen reichen von keinen oder harmlosen Beschwerden bis hin zum Tod [BOSMA, 2003].

Schließlich wurde erstmals um 1950 die antioxidative Wirkung von Gallenpigmenten erkannt [BULMER *et al.*, 2007]. Seitdem wurden zahlreiche Studien zu möglichen positiven Effekten von Gallenpigmenten durchgeführt. Nach und nach wurden weitere positive Wirkungen, wie zum Beispiel antikomplementäre [ARRIAGA *et al.*, 1999], antiinflammatorische [ERDOGAN *et al.*, 2006; NOVOTNÝ und VÍTEK, 2003; SCHWERTNER *et al.*, 1994], antiapoptotische [DUDNIK *et al.*, 2001] und antimutagene Aktivität [BULMER *et al.*, 2008; BULMER *et al.*, 2007], entdeckt.

Studien haben gezeigt, dass Menschen mit moderat erhöhten Plasmabilirubinspiegeln, wie sie im Gilbert's Syndrom (Morbus Meulengracht) auftreten, weniger oft an Herzkrankheiten leiden [RYTER, 2012; SCHWERTNER *et al.*, 1994; VERMA *et al.*, 2005; VITEK, 2005]. Auch gibt es Evidenz dafür, dass Gallenpigmente gewisse Verbindungen an der Krebsauslösung hindern. Menschen mit einem erhöhten Bilirubinspiegel sollen weniger häufig an Krebs erkranken [BARANANO *et al.*, 2002]. Die Wirkmechanismen, wonach Gallenpigmente und andere Tetrapyrrole vor Krebs schützen, sind allerdings noch unklar.

Die Krebsentstehung und die Krebstherapie sind seit Jahren große und bedeutsame Forschungsgebiete. Deshalb ist es auch erforderlich, einer antikanzerogenen Wirkung von Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen auf den Grund zu gehen und die Effekte dahingehend gründlicher zu erforschen. Da Gallenpigmente physiologische Substanzen sind und im Körper hergestellt werden, könnte eine antikanzerogene Wirkung äußerst relevant für die Krebsbekämpfung sein.

Ziel dieser Studie war es, herauszufinden wie sich die Tetrapyrrole Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin auf humane Krebszellen auswirken. Die Studie wurde *in vitro*, anhand von humanen Zellkulturen, durchgeführt und der Laborteil für diese Masterarbeit wurde in Zusammenarbeit mit meiner Kollegin Elisabeth Putz durchgeführt. Wir verwendeten beide dieselben Tetrapyrrole, allerdings untersuchte sie die Auswirkungen auf Caco2-Zellen (Darmkrebszellen), während ich mit HepG2-Zellen (Leberkrebszellen) arbeitete. Das Ausmaß der Zellschädigung, das gleichgesetzt wurde mit einer antikanzerogenen Wirkung, wurde mittels Comet Assay erfasst.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Gallenpigmente allgemein

Gallenpigmente kommen ubiquitär in menschlichen Zellen vor, vor allem aber in der Leber, der Gallenblase und im Magen-Darm-Trakt [BULMER *et al.*, 2008]. Sie gehören einer Gruppe von Tetrapyrrolen (aufgrund der gemeinsamen Grundstruktur der vier Pyrrolringe) an, die als Endprodukte des Abbaus von Hämoglobin entstehen. Über das Plasma gelangen sie in die Leber. Den Körper verlassen sie im Stuhl und in geringerem Umfang auch im Urin [KLATSKIN, 1961].

Gallenpigmente werden längst nicht mehr nur als Nebenprodukte des Häm-Abbaus, sondern als zusehends physiologisch relevant angesehen. Studien belegen antioxidative [HATFIELD und BARCLAY, 2004; STOCKER, 2004; STOCKER *et al.*, 1987], antiinflammatorische [ERDOGAN *et al.*, 2006; NOVOTNÝ und VÍTEK, 2003; SCHWERTNER *et al.*, 1994], antikomplementäre [ARRIAGA *et al.*, 1999], antiapoptotische [DUDNIK *et al.*, 2001] und antimutagene [BULMER *et al.*, 2008; BULMER *et al.*, 2007] Wirkung.

Bei erhöhter Produktion oder fehlerhafter Ausscheidung können sich Gallenpigmente allerdings toxisch auf die Körperzellen auswirken. Durch Anhäufung der Pigmente kommt es zu unterschiedlichen Formen und Schweregraden der Hyperbilirubinämie. Ernsthafte Erkrankungen in Form eines Kernikterus können auftreten, wenn die Pigmente ins Gehirn gelangen, besonders in der neonatalen Periode [KLATSKIN, 1961].

## 2.2. Metabolismus der Gallenpigmente

### 2.2.1. Von den Erythrozyten zum Bilirubin

Das Gallenpigment Bilirubin entsteht als Endprodukt des Häm-Abbaus. Das rote Häm ist Bestandteil einiger Plasmaproteine, die am Sauerstofftransport im Blut und Metabolismus beteiligt sind. Beispiele hierfür sind Hämoglobin, Myoglobin und Enzyme wie das Zytochrom P450. Letztere sind Redoxsysteme die vorwiegend, aber nicht ausschließlich in der Leber vorkommen [BERLIN und BERK, 1981].

Der größte Teil (70-80%) an täglich anfallendem Bilirubin entsteht durch den Abbau [MÜLLHAUPT, 2004] von etwa 120 Tage alten Erythrozyten [KLATSKIN, 1961], die gemeinsam mit dem enthaltenen Hämoglobin abgebaut werden. Die verbleibenden 20-30% stammen aus der Synthese von anderen Hämproteinen und Enzymen in der Leber (Catalasen, Zytochrom Oxidasen) [MÜLLHAUPT, 2004].

Die Bildung eines Hämoglobin-Moleküls kann in jeder retikuloendothelialen Makrophage des Körpers stattfinden, egal ob in der Haut, der Milz, in den Zysten oder sonstigen Geweben [JAMES, 1955]. Hämoglobin aus Erythrozyten wird in den Makrophagen der Milz, der Leber und des Knochenmarks gebildet. Freies Hämoglobin und Haptoglobingebundenes Hämoglobin werden in den Hepatozyten abgebaut [MÜLLHAUPT, 2004].

Das Häm-Molekül besitzt vier Pyrrolringe, die durch Methan-Brücken verbunden sind. Durch eine katalytische Reaktion der mikrosomalen Häm-Oxygenase wird die  $\alpha$ -Methen-Brücke gespalten. Bei dieser Reaktion entsteht grünes Biliverdin und ein Mol Kohlenmonoxid (CO). Außerdem kommt es zur Freisetzung von Eisenmolekülen. Die Reaktion verbraucht 3 Moleküle Sauerstoff und benötigt NADPH als Reduktionsmittel [WANG *et al.*, 2006]. Das Kohlenmonoxid dient als neuronaler Messenger und als ein wesentlicher kardiovaskulärer Regulator

[KAPITULNIK, 2004]. Des Weiteren hat das Kohlenmonoxid selbst antioxidative Wirkung. Diese zytoprotektiven Effekte zeigen sich auch bei niedrigen Konzentrationen [KOBAYASHI *et al.*, 2007]. Das freie Eisen ist auf Grund seiner prooxidativen Eigenschaft, die Bildung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu bewirken, an der zellulären Toxizität beteiligt [KAPITULNIK, 2004]. Das Eisen kann im Protein Ferritin wiedergewonnen und somit für die Biosynthese von neuen Häm-Molekülen wiederverwertet werden [GOSSAUER, 1994].

Durch die Aktivität der NADPH-abhängigen Biliverdin-Reduktase wird Biliverdin schließlich zu gelbem Bilirubin reduziert [KLATSKIN, 1961]. Täglich werden auf diese Weise 300-500mg Bilirubin im erwachsenen menschlichen Körper produziert [GOSSAUER, 1994].

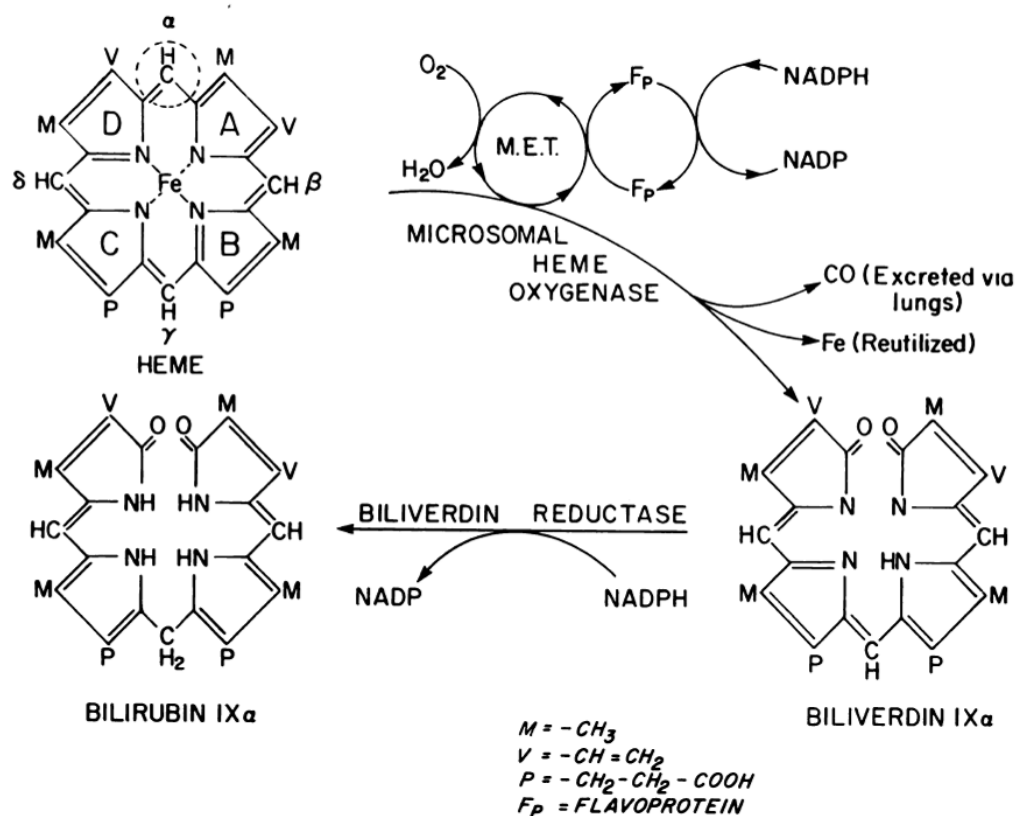


Abbildung 1: Abbau von Häm [BERLIN und BERK, 1981]

### 2.2.2. Bilirubin Transport im Plasma und die Aufnahme in die Leber

Bilirubin ist praktisch unlöslich in Wasser (7nM) beim pH-Wert des Blutes (pH: 7,4) [BRODERSEN, 1979], deshalb wird es an Albumin gebunden in Plasma transportiert [GOSSAUER, 1994]. Die Bindung von Bilirubin an Albumin hält Bilirubin in Lösung, neutralisiert seine toxischen Wirkungen und transportiert so das Pigment in die Leber [WANG *et al.*, 2006]. Unter physiologischen Bedingungen binden zwei Moleküle Bilirubin-Dianion an ein Molekül Albumin [STOCKER *et al.*, 1987]. Der Bilirubinplasmaspiegel hängt von der Menge an Bilirubin ab, die in den Kreislauf gelangt und diesen wieder verlässt. Normalerweise beträgt die Konzentration des Bilirubins im Plasma zwischen 8,5-17µM (0,5 und 1,0mg/100ml) [KLATSKIN, 1961]. Die durchschnittliche Bilirubinkonzentration im Gewebe beträgt 0,02-0,05µM (20-50nm) [BARANANO *et al.*, 2002]. Unter normalen Stoffwechselbedingungen ist das Bilirubin im Plasma zu ~96% unkonjugiert [WANG *et al.*, 2006] (siehe auch Kapitel 2.2.3).

Durch spezielle Transportproteine, wie das organische Anionen-Transportprotein 2 (OATP2), wird das Bilirubin in die Hepatozyten transportiert [MÜLLHAUPT, 2004]. Der Transport von Bilirubin erfordert Anionen, wie den Austausch von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , und ist nicht energieaufwendig. Bilirubin löst sich vom Albumin an der Oberfläche der Hepatozyten durch erleichterte Diffusion [WANG *et al.*, 2006].

In den Hepatozyten bindet das Bilirubin an die Gluthation-S-Transferase. Dieses Enzym katalysiert die Aufnahme und die vorübergehende Speicherung von Bilirubin im Cytoplasma der Hepatozyten. Dadurch wird die Netto-Aufnahme von Bilirubin, durch Verringerung des Ausflusses aus der Zelle, erhöht [WANG *et al.*, 2006].



### 2.2.3. Glucuronidierung

Die Glucuronidierung ist nötig für die effiziente biliäre Ausscheidung von Bilirubin [WANG *et al.*, 2006]. Das heißt unkonjugiertes Bilirubin wird im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten zu Bilirubin-Monoglucuronid und Bilirubin-Diglucuronid umgewandelt, bevor es schließlich in die Galle abgegeben wird [BERLIN und BERK, 1981]. Die Glucuronidierung wird durch eine spezifische Isoform der Uridindiphosphoglucuronat-Glucuronosyltransferase, der UGT1A1 katalysiert [RITTER *et al.*, 1992].

Die hepatische UGT1A1-Aktivität ist bei der Geburt sehr gering und steigert sich während der ersten zehn Lebenstage. Da die UGT1A1 die einzige UGT-Isoform zur Glucuronidierung von Bilirubin ist, kann eine verminderte Aktivität zu unkonjugierter Hyperbilirubinämie führen. Eine verzögerte Entwicklung von UGT1A1 ist die Hauptursache für eine neonatale unkonjugierte Hyperbilirubinämie [WANG *et al.*, 2006], eine ungefährliche Form des Neugeborenenikterus. Dieser bildet sich aufgrund zunehmender UGT1A1-Aktivität nach wenigen Tagen zurück [MÜLLHAUPT, 2004].

### 2.2.4. Ausscheidung von Bilirubin

#### Ausscheidung von konjugiertem Bilirubin

Konjugiertes Bilirubin wird in die Gallenkanälchen abgesondert. Dieser Prozess verläuft gegen den Konzentrationsgradienten und verbraucht daher Energie. Die Energie wird durch die ATP-Hydrolyse eines speziellen Membranproteins bereitgestellt. Dieses Protein nennt sich „Multidrug resistance-related protein-2“ (MRP2) [WANG *et al.*, 2006].

#### Bilirubin im Gastrointestinaltrakt

Bilirubin wird im Dickdarm durch intestinale Bakterien weiterabgebaut, wobei Glucuronatreste durch eine  $\beta$ -Glucuronidase abgespalten werden. Durch die erste Hydrierung der Vinylgruppen zu Ethylgruppen entsteht Mesobilirubin. Die

zweite Hydrierung der Methingruppen zu Mesobilirubinogen hat einen Verlust der Farbe zu Folge. Bei der dritten Hydrierung entsteht das Zwischenprodukt Stercobilinogen, welches schließlich durch Dehydrierung der Methylengruppe zu einer Methingruppe, zu orange-braunem Stercobilin wird. Ein Teil des Stercobilins wird durch bakterielle Enzyme zu Dipyrrolen abgebaut. Stercobilin und die Dipyrrole sind verantwortlich für die Farbgebung des Stuhls [LÖFFLER *et al.*, 2007].

Etwa 20% der aus Bilirubin im Darm entstehenden Produkte werden reabsorbiert und gelangen über die Pfortader in die Leber, wo sie erneut ausgeschieden werden. Man spricht vom enterohepatischen Kreislauf. Ein geringer Teil gelangt über das Blut in die Nieren und ist schließlich im Harn als gelb-oranges Urobilin oder Urobilinogen nachweisbar [WANG *et al.*, 2006].

## 2.3. Nachweis von Gallenpigmenten im Blutplasma

Die Plasmakonzentration von Bilirubin stellt ein Gleichgewicht zwischen neu synthetisiertem Bilirubin im Plasma und dem Anteil an unkonjugiertem Bilirubin, das in der Leber irreversibel abgebaut wird, dar. Im sogenannten „steady state“ entspricht der Anteil des neu gebildeten, der Menge des abgebauten Bilirubins. Dieser Parameter nennt sich Plasma-Bilirubinsatz („plasma bilirubin turnover“ BRT) und wird in Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag (mg/kg KG/d) angegeben. Der Plasma-Bilirubinsatz kommt der gesamten Bilirubinproduktion zwar nahe, identisch sind die Werte allerdings nicht. Denn ein kleiner Anteil an Bilirubin kommt direkt aus dem Umsatz von hepatischen mikrosomalen Häm-Enzymen. Dieser Anteil gelangt direkt in die Galle und somit nicht in das Plasma. Deshalb sollten Techniken, welche die gesamte Bilirubinproduktion oder den gesamten Häm-Umsatz erfassen, eine Überschätzung des Plasma-Bilirubinsatzes von 5-10% berücksichtigen [BERLIN und BERK, 1981].

Bei gesunden Erwachsenen mit einem normalen Volumen an Erythrozyten, beträgt die Obergrenze an unkonjugiertem Plasmabilirubin  $17\mu\text{M}$  ( $1,0\text{mg/dl}$ ). Erhöhte Werte über  $17\mu\text{M}$  ( $1,0\text{mg/100ml}$ ) und unter  $68\mu\text{M}$  ( $4,0\text{mg/100ml}$ ) können durch eine erhöhte Bilirubinproduktion, eine verringerte Bilirubin-Clearance oder durch eine Kombination der beiden bedingt sein.

Eine Nachweismethode für Bilirubin im Blutplasma ist die quantitative Bestimmung über stabile Dipyrrolderivate. Diese werden in einer Diazoreaktion gebildet [LÖFFLER *et al.*, 2007], wie sie in ähnlicher Form 1916 von Van den Bergh beschrieben wurde. Bei dieser Reaktion werden Bilirubin-Tetrapyrrole an der zentralen Kohlenstoffbrücke gespalten, dabei entstehen violette Dipyrrol-Azopigmente, die spektrophotometrisch erfasst werden können [BERLIN und BERK, 1981]. Schnell reagierendes Bilirubin (konjugiertes Bilirubin) zeigt innerhalb von Minuten eine Reaktion. Indirekt reagierendes Bilirubin (unkonjugiertes Bilirubin) zeigt zwar mit der gleichen Geschwindigkeit eine Reaktion, allerdings nur in Gegenwart von Beschleunigern (z.B. Methanol). Normalerweise sind 10-20% konjugiertes Bilirubin und 80-90% unkonjugiertes Bilirubin an Albumin gebunden im Blutplasma [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Die maximale Farbe zeigt sich nach etwa 30 Minuten und sie stellt ein Maß für die gesamte Bilirubin-Plasmakonzentration dar [BERLIN und BERK, 1981].

Eine weitere (in der Klinik übliche) Bestimmungsmethode von unkonjugiertem Bilirubin ist die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). Dazu werden  $40\mu\text{l}$  Serum und  $160\mu\text{l}$  der mobilen Phase ( $0,1\text{M}$  Di-n-octylaminsäure in Methanol:Wasser (95:5)) gemischt, zentrifugiert und  $50\mu\text{l}$  des Überstandes in die HPLC-Säule (C18) eingespritzt. Die Analyse erfolgt bei  $\sim 450\text{nm}$  und einer Temperatur von  $\sim 34^\circ\text{C}$ . Die Durchflussmenge beträgt  $0,75\text{mL/min}$  [BROWER *et al.*, 2001].

## 2.4. Getestete Tetrapyrrole

### 2.4.1. Biliverdin

#### Bildung

Biliverdin entsteht als Zwischenprodukt beim Abbau von Hämoglobin zu Bilirubin. Durch den Häm-Oxygenase-Komplex (HO bzw. HMOX) wird die  $\alpha$ -Methen Brücke einer der vier Pyrrol-Ringe abgespalten. Das Reduktionsmittel für diese Reaktion bildet NADPH/H<sup>+</sup> [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Es gibt drei bekannte Isoformen der Häm-Oxygenase (HO). Die ubiquitäre und hauptsächlich katalytisch aktive Isoform HO-1 wird durch Häm und Stress induziert. HO-2 ist ein konstitutives Protein, welches hauptsächlich im Gehirn und in den Hoden vorkommt. HO-3 hat eine sehr geringe katalytische Aktivität und übernimmt überwiegend die Funktion eines Häm-bindenden-Proteins [WANG *et al.*, 2006].

Durch die Häm-Oxygenase, die beim Menschen vorkommt, entsteht als Produkt Biliverdin IX $\alpha$ . Charakteristisch für Biliverdin ist seine grüne Farbe [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Zusätzlich zum Biliverdin entsteht bei dieser Reaktion noch ein Mol CO und ein Eisenmolekül [WANG *et al.*, 2006]. Das wasserlösliche Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase (BLVRA) zu Bilirubin reduziert [BARANANO *et al.*, 2002].

#### Nachweis von Biliverdin im Blutplasma

Biliverdin ist *in vivo* während des normalen menschlichen Häm-Metabolismus schwer nachweisbar [MCDONAGH, 2010], allerdings mit HPLC möglich [BROWER *et al.*, 2001]. Das könnte daran liegen, dass Biliverdin sehr rasch durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin oxidiert wird [WEGIEL und OTTERBEIN, 2012]. Außerdem gibt es keine experimentelle Evidenz, dass es sich bei der grünlichen Verfärbung einer Prellung um Biliverdin handelt. Somit gibt es keinen physiologischen Beweis für eine Anhäufung von Biliverdin während des normalen menschlichen Häm-Metabolismus [MCDONAGH, 2010].

### Antioxidative Wirkung von Biliverdin

Erste Evidenz für eine antioxidative Aktivität von Biliverdin und Bilirubin entstammt Studien, in denen sich zeigte, dass eine kleine Menge an Bilirubin die Vitamine A und  $\beta$ -Carotin, während der intestinalen Aufnahme stabilisiert [STOCKER, 2004]. Biliverdin ist neben Bilirubin ein Antioxidans, das Gewebe vor oxidativem Stress schützt [WANG *et al.*, 2006]. Die Rolle von HO-1 und dem Endprodukt Bilirubin beim Schutz vor oxidativem Stress, wurde schon in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien erkannt. Deswegen gelten HO-1 und Bilirubin als relevant in der menschlichen Pathophysiologie [TOMARO und BATLLE, 2002]. Die Biliverdin-Reduktase wirkt als physiologischer Zellschutz [BARANANO *et al.*, 2002].

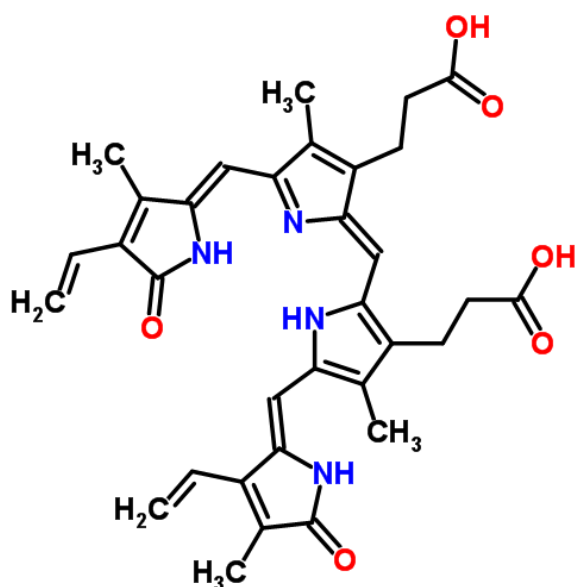


Abbildung 2: Strukturformel von Biliverdin [CHEMSPIDER, 2012]

#### 2.4.2. Biliverdin-Dimethylester

Biliverdin-Dimethylester ist ein Derivat des Gallenpigments Biliverdin [MACLEAN *et al.*, 2008].

Die antioxidative Aktivität von Biliverdin-Dimethylester hängt stark von der intramolekularen Wasserstoffbindung ab [MACLEAN *et al.*, 2008]. Diese findet

sich zwischen N-H-Gruppen und den Ester-Carbonyl-Gruppen [CHEPELEV *et al.*, 2006]. Beeinflusst wird diese antioxidative Aktivität durch die Struktur der Pyrrole, die Art der Radikale und die ionisierende Fähigkeit des Lösungsmittels [MACLEAN *et al.*, 2008].

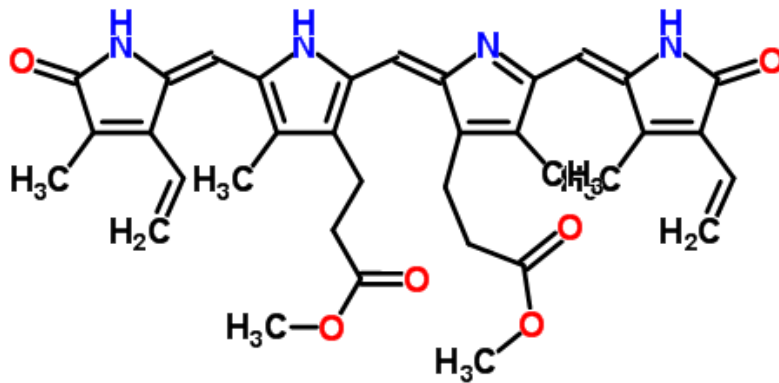


Abbildung 3: Strukturformel von Biliverdin-Dimethylester [CHEMSPIDER, 2012]

### 2.4.3. Stercobilin

Erstmals wurde Stercobilin 1932 aus dem Fäzes isoliert und dabei wurde festgestellt, dass es sich von Urobilin unterscheidet [KAY *et al.*, 1963]. Stercobilin ist das Endprodukt des intestinalen Bilirubinabbaus [JAMES, 1955]. Im Dickdarm wird Bilirubin durch anaerobe Bakterien verstoffwechselt. Dabei entsteht bei der Abspaltung von Glucuronatresten durch die  $\beta$ -Glucuronidase Stercobilinogen. Dieses wird durch die Dehydrierung der Methylengruppe zu Stercobilin oxidiert [LÖFFLER *et al.*, 2007].

80-90% der gesamten fekalen und renalen Stercobilin-Ausscheidung ergeben sich aus dem Abbau von Erythrozyten [JAMES, 1955]. Stercobilin ist ein braunes Pigment [NAKAMURA *et al.*, 2006], das dem Stuhl seine natürliche Farbe gibt [LÖFFLER *et al.*, 2007].

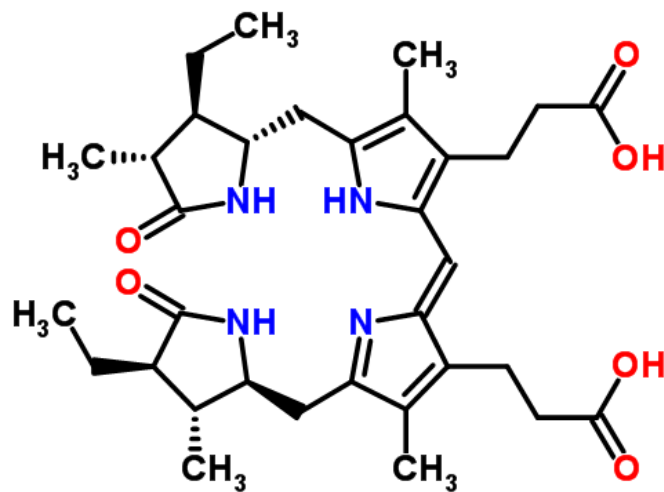


Abbildung 4: Strukturformel von Stercobilin [CHEMSPIDER, 2012]

#### 2.4.4. Urobilin

##### Bildung

Bilirubin wird durch die intestinale Mikroflora im Darm zu einem farblosen Pigment reduziert, dem Urobilinogen. Urobilin ist ein Oxidationsprodukt von Urobilinogen [NAKAMURA *et al.*, 2006]. Ein geringer Teil der aus Bilirubin entstandenen Abbauprodukte gelangt über das Blut zu den Nieren und ist schließlich als Urobilin oder Urobilinogen nachweisbar [LÖFFLER *et al.*, 2007].

Urobilinogen wurde jahrelang als Marker in klinischen Tests eingesetzt, um eine Beeinträchtigung hepatischer Funktionen zu erfassen [NAKAMURA *et al.*, 2006].

##### Antioxidative Wirkung von Urobilin

Die strukturelle Ähnlichkeit von Urobilinogen und Urobilin führt zu der Annahme, dass beide ähnliche antioxidative Aktivität besitzen. Urobilinogen unterdrückt die Bildung der Linolsäure-Peroxide bei der Lipidperoxidation. Außerdem soll Urobilinogen die Oxidation von Nahrungsbestandteilen durch freie Radikale im Darm effektiv unterdrücken. Dadurch wird der Schaden an der Darmwand reduziert. Zunächst wird Wasserstoff des Urobilinogens zur Stabilisierung des

Lipidperoxyradikals abgespalten, wodurch das Urobilinogenradikal gebildet wird. Dieses kann entweder regeneriert werden oder es reagiert mit einem weiteren Lipidradikal und stabilisiert dieses [NAKAMURA *et al.*, 2006].

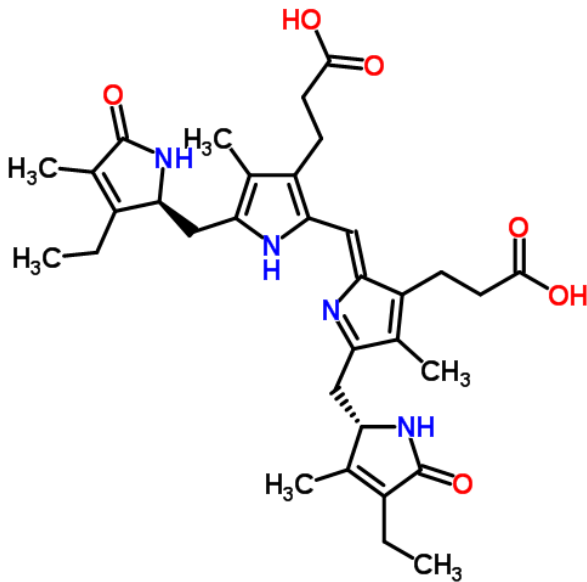


Abbildung 5: Strukturformel von Urobilin [CHEMSPIDER, 2012]

## 2.5. Wirkungen von Gallenpigmenten *in vitro* und *in vivo*

Gallenpigmente weisen eine Vielzahl von präventiven Wirkungen auf. Sie wirken als Antioxidans gegen die Oxidation von Lipiden und Proteinen. Außerdem haben sie antiinflammatorische, antikomplementäre, antiapoptotische und antimutagene Eigenschaften [BULMER *et al.*, 2008].

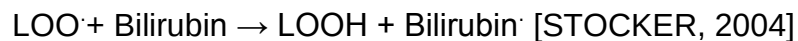
### 2.5.1. Antioxidative Wirkung

Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von freien Radikalen und Antioxidantien. Dieser wird mit einer Vielzahl an Schäden molekularer Spezies in Verbindung gebracht [VERMA *et al.*, 2005]. Sogenannte reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (engl. –reactive oxygen- and nitrogen species, RO(N)S) spielen eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen wie der DNA-Replikation, der Zellproliferation, antimikrobiellen



Reaktionen des Immunsystems und der Signaltransduktion. Allerdings können reaktive Sauerstoffspezies auch die DNA, Proteine und Lipide schädigen, was in weiterer Folge zur Entstehung von Krebs, Alterung, Tumorpromotion, chronischen Entzündungen, Herzerkrankungen und parasitären Infektionen führen kann [STOCKER, 2004].

Bilirubin enthält ein erweitertes System aus konjugierten Doppelbindungen und einem Paar reaktiver Wasserstoffatome. Die reaktiven Wasserstoffatome sind wahrscheinlich an der antioxidativen Aktivität beteiligt. Zum Beispiel wird H an ein freies Radikal wie Lipid-Peroxyl-Radikal ( $\text{LOO}^\cdot$ ) abgegeben und dabei entsteht Lipid-Hydroperoxid ( $\text{LOOH}$ ) und ein Bilirubin-Radikal ( $\text{Bilirubin}^\cdot$ ):



Die antioxidative Aktivität des Biliverdin kommt wahrscheinlich durch die Bildung eines resonanzstabilen Radikals, durch die Zugabe eines Radikals wie  $\text{LOO}^\cdot$  zu Biliverdin, zustande.



#### Unkonjugiertes Bilirubin, konjugiertes Bilirubin und Biliverdin

Laut Literatur kann jedes Bilirubin-Molekül 1,9 und jedes Biliverdin-Molekül 4,7 Moleküle an Peroxyl-Radikalen beseitigen. Biliverdin und Bilirubin können beide 1e- und 2e-Oxidantien abfangen. Viele andere Oxidantien sind im Vergleich dazu, nur gegen eine Oxidantienklasse effektiv [STOCKER, 2004].

#### Albumin-gebundenes Bilirubin

Albumin-gebundenes Bilirubin ist ein effizienter Peroxyl-Radikalfänger und schützt Fettsäuren, die mit dem Albumin transportiert werden, vor oxidativen Schäden [STOCKER *et al.*, 1987]. Auch Proteine werden durch Albumin-gebundenes Bilirubin vor den verschiedenen RONS geschützt [STOCKER, 2004]. Jedes Albumin-Bilirubin-Molekül (Alb-BR) kann zwei Wasserstoffatome

abgeben um zwei Peroxyl-Radikal-Moleküle abfangen. Als Endprodukt entsteht dabei Albumin-gebundenes Biliverdin (Alb-BV).



#### Biliverdin-Reduktase (BLVRA):

Die Biliverdin-Reduktase regeneriert Bilirubin in einem katalytischen Zyklus und bietet antioxidativen Zellschutz. Der Zyklus ist Teil der Stressantwort, die ausgelöst wird, wenn die Zellen mit toxischen Stoffen gereizt werden. Wird das System gestört, steigt der oxidative Stress an und Zellen werden geschädigt [BARANANO et al., 2002].

### 2.5.2. Antiinflammatorische Wirkung

Schwertner et al. fanden in deren Studie bereits 1994 einen signifikanten Zusammenhang zwischen niedriger Bilirubinkonzentration im Plasma und einem erhöhten Risiko für koronare Herzerkrankungen [SCHWERTNER et al., 1994].

Niedrige Bilirubinkonzentrationen könnten mit erhöhten oxidierten Lipiden und Lipoproteinen assoziiert werden [SCHWERTNER et al., 1994].

Die Studie von Verma et al. zeigte einen inversen Zusammenhang zwischen der Bilirubinkonzentration im Plasma und dem Cholesterin, den Triglyceriden und dem VLDL-Cholesterin im Serum. Hier zeigte sich, dass Bilirubin als Antioxidans eine schützende Rolle bei Patienten mit moderaten koronaren Herzerkrankungen spielt [VERMA et al., 2005].

Novotny et al. haben einen negativen Zusammenhang zwischen Bilirubin im Plasma und der Schwere einer Artherosklerose gefunden [NOVOTNÝ und VÍTEK, 2003]. Ein Bilirubinplasmaspiegel im oberen physiologischen Bereich ist mit dem Schutz vor Artherosklerose assoziiert [ERDOGAN et al., 2006].

### 2.5.3. Antimutagene Wirkung

Gallenpigmente haben eine antimutagene Wirkung gegenüber einer Vielzahl von Mutagenen. Diese variieren von sehr effektiven (Tertiärbutylhydroperoxid, *t*-BOOH; Benzo[ $\alpha$ ]pyren, B[ $\alpha$ ]P; 2,4,7-Trinitro-9H-fluoren, TNFone; 2-Aminofluoren, 2-AF; Nitroarene) bis relativ unwirksamen (6-Hydroxymethylbenzo[ $\alpha$ ]pyrene, HMBP) Mutagenen im Salmonella-Mutagenitätstest. Biliverdin hemmt die Mutation in kultivierten Säugetierzellen. Allerdings liegt noch sehr wenig Information über die Antimutagenität von Gallenfarbstoffen vor. Durch Studien an strukturell verwandten Porphyrinen, ist man zu dem Ergebnis gekommen, dass sich die antimutagene Wirkung durch eine direkte Interaktion mit Mutagenen, einer Modulation der metabolischen Aktivierung und durch antioxidative Effekte erklären lassen [BULMER *et al.*, 2008].

*Arimoto et al.* beschäftigten sich mit dem hemmenden Effekt von Hämin auf mutagene Wirkungen von Karzinogenen im Salmonella-Mutagenitätstest. Bilirubin und Biliverdin zeigten eine antimutagene Wirkung gegenüber Benzo[ $\alpha$ ]pyren (B[ $\alpha$ ]P). Bilirubin wurde im Vergleich zu Biliverdin schon bei niedrigeren Konzentrationen wirksam [ARIMOTO *et al.*, 1980].

Die Studie von *De Flora et al.* untersuchte 88 organische Verbindungen aus den unterschiedlichsten chemischen Klassen, auf ihre Antimutagenität gegenüber 4-Nitroquinoline 1-Oxid (4NQO) im Salmonella-Mutagenitätstest. Auch die Gallenpigmente Bilirubin und Biliverdin wurden getestet. Die antimutagene Wirkung von Bilirubin war größer als jene von Biliverdin und die Ergebnisse zeigten eine strukturelle Basis für antimutagene Effekte [DE FLORA *et al.*, 1994].

Eine Studie von *Bulmer et al.* untersuchte die Effekte der Gallenpigmente Bilirubin, Biliverdin und Bilirubinditaurat, in Anwesenheit von genotoxischen Verbindungen (Benzo[ $\alpha$ ]pyren, B[ $\alpha$ ]P; 2 Aminofluoren, 2-AF; 2,4,7-Trinitro-9H-fluoren, TNFone; Tertiärbutylhydroperoxid, *t*-BOOH). Die Gallenpigmente

Bilirubin und Biliverdin hemmen den mutagenen Effekt von B[α]P, wobei Biliverdin effektiver war als Bilirubin. Die antimutagenen Effekte der Gallenpigmente auf TNF $\alpha$  und 2-AF folgten dem allgemeinen Trend, nämlich Bilirubin  $\geq$  Bilirubinditaurat  $>$  Biliverdin für TNF $\alpha$  und Biliverdin  $\geq$  Bilirubinditaurat  $\geq$  Bilirubin für 2-AF. Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass Bilirubin und Biliverdin einen *t*-BOOH induzierten DNA-Schaden vermindern. Es wurde postuliert, dass Bilirubin und Biliverdin Mutationen, die durch oxidativen Stress verursacht werden, besser vorbeugen können als viele andere Antioxidantien [BULMER *et al.*, 2007].

#### 2.5.4. Antikanzerogene Wirkung

Moderate Hyperbilirubinämie kann der Literatur zufolge einen protektiven Effekt gegenüber der Krebsentstehung haben. Des Weiteren besteht ein inverser Zusammenhang zwischen dem Bilirubinplasmaspiegel und der Mortalität durch Krebs [BARANANO *et al.*, 2002].

Die Krebsentstehung ist äußerst komplex und kann unterschiedlichste Auslöser haben. Es kann zu unkontrollierten Neubildungen von Zellen kommen, wenn zelleigene Kontrollinstanzen (z.B. Zellzyklus, Checkpointproteine, anti-Onkogene, etc.) versagen. Eine wesentliche physiologische Rolle und eine wichtige Kontrollinstanz angeschlossen an den Zellzyklus hat die Apoptose.

Apoptose ist ein kontinuierlicher physiologischer Prozess der selektiv zum kontrollierten (und programmierten) Zelltod führt. Durch diesen Zelltod werden unerwünschte Zellen entfernt. Die Apoptose umfasst eine DNA-Fragmentierung, Chromatin-Kondensation, Membranbläschenbildung, Zellschrumpfung und einen Abbau in Membran-umschlossene Vesikel (apoptotische Körperchen).

Die Apoptose wird durch die Aktivität von Effektor-Proteasen den sogenannten Pro-/Caspasen ausgelöst. Ablaufen kann sie über verschiedene Wege,

einschließlich der Wege die abhängig und unabhängig von den Mitochondrien sind (extrinsisch/intrinsisch). Nach der Spaltung der chromosomalen DNA schnürt die Zelle sich selbst in Membran-umschlossene Vesikel ab, welche von phagozytotischen Zellen entfernt werden [SCHULTZ und HARRINGTON JR, 2003].

Keshavan *et al.* haben gezeigt, dass unkonjugiertes Bilirubin Apoptose bei Dickdarmkrebszellen induziert. Ausgelöst wird diese Apoptose durch einen Mechanismus, der die direkte Polarisierung der zellulären Mitochondrien miteinbezieht. Bilirubin (0-50µM) hat die Vitalität der Krebszelllinie *in vitro* gesenkt [KESHAVAN *et al.*, 2004].

Die Häm-Oxygenase-1 (HO-1) spielt eine Rolle in verschiedenen Tumorzellen, wie Adenokarzinomen, Hepatomen, Sarcomen, Glioblastomen, Melanomen und Plattenepithelkarzinomen. Fang *et al.* gingen der Rolle der HO-1 im Zellwachstum, insbesondere in der Tumorzellproliferation, auf den Grund [FANG *et al.*, 2004]. HO-1 hat eine wichtige Rolle im raschen Tumorwachstum, wegen ihrer antioxidativen und antiapoptotischen Wirkung [TANAKA *et al.*, 2003]. Die Hemmung der HO-1-Aktivität durch Zink-Protoporphyrin (ZnPP) führte zu einer erhöhten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies und diese führten wie bereits oben erwähnt zur Apoptose. Die gezielte Hemmung der HO-1 in Tumorzellen, könnte somit einen neuen Ansatz in der Krebstherapie darstellen [FANG *et al.*, 2004].

Gallensäuren induzierten Apoptose und Nekrose in menschlichen Leberkrebszellen, den HepG2-Zellen, bei Rolo *et al.* Das Prinzip dahinter ist die Öffnung der mitochondrialen Transitions-pore [ROLO *et al.*, 2004]. Bilirubin und seine Vorstufe Biliverdin haben eine biologische Bedeutung im Zusammenhang mit Cu(II) und der DNA [ASAD *et al.*, 2002].

Rao *et al.* haben die antikanzerogene Wirkung von Bilirubin auf humane Adenokarzinome untersucht. Im Comet Assay zeigte sich die DNA nach der

Behandlung mit Bilirubin geschädigt, während sie in der Kontrolle und nach Urobilinverabreichung intakt blieb. Die Ergebnisse zeigten einerseits die antioxidativen Effekte von Bilirubin, andererseits aber auch seine prooxidative Wirkung. Bilirubin entfaltete seine Wirkung durch eine drastische Steigerung der intrazellulären Radikale. Dieser rasche Anstieg könnte durch den erhöhten Level an intrazellulären freien Radikalen zu oxidativem Stress geführt haben [RAO *et al.*, 2006]. Durch diesen oxidativen Stress öffnete sich durch eine verringerte Funktion der Mitochondrien die mitochondriale Transitions-pore. Ein erhöhter Spiegel an freien Radikalen schädigte außerdem die DNA-Struktur und veränderte die Genexpression [ROLO *et al.*, 2004]. Erkennbar waren diese Veränderungen im Kometenschweif des Comet Assay und durch die Unfähigkeit der Zelle in die synthetische Phase des Zellzyklus überzugehen (G2 Zellzyklusarrest). Des Weiteren hat sich in dieser Studie gezeigt, dass die Entscheidung ob Bilirubin antioxidativ oder antikanzerogen wirkt, von der jeweiligen Zelllinie abzuhängen scheint. Allerdings ist die antioxidative Funktion scheinbar häufiger als die prooxidative. Diese Tests wurden auch mit Urobilin und Stercobilin durchgeführt, diese hatten allerdings keinen Effekt *in vitro* [RAO *et al.*, 2006].

## 2.6. Zytotoxische Effekte von Bilirubin

Plasmakonzentrationen von Bilirubin die größer sind als 300µM werden mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von neurologischen Dysfunktionen in Verbindung gebracht [STOCKER, 2004]. Bei einer normalen Plasmakonzentration an Erythrozyten wurde die Obergrenze für unkonjugiertes Bilirubin im Plasma bei 17µM (1,0mg/100ml) festgelegt [BERLIN und BERK, 1981]. Erhöhte Bilirubin-Plasmakonzentrationen entstehen, wenn das unkonjugierte Bilirubin so stark ansteigt, dass es die Bindungskapazität von Albumin übersteigt. Freies unkonjugiertes Bilirubin kann leicht durch passive Diffusion in die Zellen gelangen und dort toxisch wirken. Sehr anfällig hierfür ist das zentrale Nervensystem [KAPITULNIK, 2004], denn unkonjugiertes freies Bilirubin kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden [SHAPIRO, 2003].

Neugeborene sind besonders gefährdet für den sogenannten Kernikterus, da bei ihnen die Bindungskapazität für unkonjugiertes Bilirubin an Plasmaalbumin geringer und die Blut-Hirn-Schranke nicht voll ausgereift ist [OSTROW und TIRIBELLI, 2003].

### 2.6.1. Erworbene Hyperbilirubinämie

#### Gelbsucht:

Die Gelbsucht, auch Ikterus genannt, tritt in Folge einer Hyperbilirubinämie auf. Es kommt zu einer Gelbfärbung der Haut und der Skleren. Gründe für die Entstehung der Gelbsucht können eine gesteigerte Bildung von Bilirubin, eine Störung der Bilirubinkonjugation bzw. -ausscheidung oder ein Verschluss der ableitenden Gallenwege sein [LÖFFLER *et al.*, 2007].

#### Neugeborenenengelbsucht:

Bei gesunden Neugeborenen erreichen die Prozesse der hepatischen Aufnahme, Speicherung, Konjugation und biliären Sekretion von Bilirubin mit einem Lebensmonat beinahe das Ausmaß eines Erwachsenen. Bei verzögerter Reifung der hepatischen Transportprozesse kommt es zu einer Retention von unkonjugiertem Bilirubin, auch bei gesunden Säuglingen [OSTROW *et al.*, 2003]. Die Störung legt sich aber innerhalb weniger Tage wieder [MÜLLHAUPT, 2004].

#### Bilirubinenzephalopathie (Kernikterus)

Bei zu hohem Bilirubinspiegel, gelangt freies unkonjugiertes Bilirubin über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn. Dort reichert es sich in verschiedenen Hirnarealen an, wie zum Beispiel an die Basalganglien und verursacht eine selektive Schädigung des zentralen Nervensystems und auch des Kleinhirns. Die Defizite umfassen irreversible Abnormalitäten in der Motorik (zerebrale Lähmung), der Sensorik (Taubheit oder Schwerhörigkeit, Beeinträchtigung des Blickes nach oben) und eine Störung kognitiver Funktionen. Unterschieden wird

zwischen der akuten und der chronischen Bilirubinenzephalopathie [SHAPIRO, 2003].

## 2.6.2. Angeborene Hyperbilirubinämie

### Gilbert's Syndrom

Das Gilbert's Syndrom, auch bekannt als Morbus Meulengracht, wird vererbt und etwa 3-10% der Bevölkerung sind davon betroffen. Personen mit dem Gilbert's Syndrom haben eine leichte, chronisch unkonjugierte Hyperbilirubinämie [OWENS und EVANS, 1975] ( $50-150\mu\text{M}$ ) [STRASSBURG, 2010] in der Abwesenheit von Lebererkrankungen oder manifester Hämolyse [OWENS und EVANS, 1975]. Das Gesamtbilirubin steigt oft erst unter Belastung, durch Nahrungskarenz (was auch ein wichtiges diagnostisches Kriterium darstellt), Infekte oder Medikamente an [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Für Erwachsene ist das Gilbert's Syndrom harmlos, auch wenn der Befund einer Hyperbilirubinämie das Risiko für Lebererkrankungen erhöhen kann [BOSMA *et al.*, 1995].

Das Gilbert's Syndrom entsteht durch eine gesteigerte Anzahl der TATA Wiederholungen in der UDP-Glucuronosyltransferase (UDPGT) Promotorregion [SHAPIRO, 2003]. Die Aktivität der UDPGT, beträgt bei Patienten mit dem Gilbert's Syndrom durchschnittlich nur 30% der normalen Aktivität [BOSMA *et al.*, 1995].

### Crigler-Najjar Syndrom

Das Syndrom ist durch eine lebenslange chronisch unkonjugierte Bilirubinämie gekennzeichnet. Verursacht wird es durch einen Defekt der UGT1A1-Isoform des UDPGT Gens [SHAPIRO, 2003]. Es gibt zwei Typen dieses Syndroms, die sich durch ihre fehlende bzw. eingeschränkte Enzymaktivität unterscheiden [BOSMA, 2003]. Im Unterschied zum Gilbert's Syndrom, stellt diese Erkrankung einen lebensbedrohlichen Zustand dar [LÖFFLER *et al.*, 2007].



Das Crigler-Najjar Syndrom Typ I wird autosomal-rezessiv vererbt [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Dieser Typ I ist durch eine komplette Abwesenheit der Aktivität von UGT1A1 bedingt [SHAPIRO, 2003], denn die residuelle Enzymaktivität liegt bei <1% [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Unbehandelt liegt der Bilirubinspiegel demnach bei 340-765µM (20-45mg) [SHAPIRO, 2003]. Es handelt sich um eine schwere Erkrankung, die unbehandelt tödlich verläuft. Phototherapie und Lebertransplantation verbessern die Prognose erheblich [BOSMA, 2003].

Das Crigler-Najjar Syndrom Typ II wird im Unterschied zu Typ I autosomal-dominant vererbt [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Patienten mit dem Crigler-Najjar Syndrom Typ II haben eine herabgesetzte UGT1A1-Aktivität [SHAPIRO, 2003], die residuelle Enzymaktivität liegt bei <10%. Die Plasmabilirubinwerte liegen bei 102-340µM (6-20mg) [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Sie leiden an einer weniger schweren Hyperbilirubinämie und sprechen gut auf das Arzneimittel Phenobarbital an, welches den Bilirubinspiegel, durch eine Induktion der enzymatischen Aktivität der UGT1A1, senkt [SHAPIRO, 2003].

#### Lucey-Driscoll Syndrom

Eine Mutation im UDPGT-Gen der Schwangeren, führt zu einer Hemmung der UGT1A1 im maternalen Serum und somit zu einer verzögerten Entwicklung der UGT1A1-Aktivität. Dieses Syndrom kann eine längere Dauer der Säuglingshyperbilirubinämie verursachen und zu einem Kernikterus führen [WANG *et al.*, 2006].

#### Dubin-Johnson Syndrom

Das Dubin-Johnson Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt und ist durch eine chronische konjugierte Hyperbilirubinämie [KEITEL *et al.*, 2003] und durch große Mengen eines gelbbraunen oder schwarzen Pigments in den hepatischen Lysosomen charakterisiert [LÖFFLER *et al.*, 2007].

Dieses Syndrom entsteht durch Mutationen im MRP2-Gen des Bilirubintransports in den Hepatozyten [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Die Bilirubinwerte liegen bei 50-100µM. Die Symptome wie Schwäche und Bauchbeschwerden sind unspezifisch. Das Dubin-Johnson Syndrom ist eine gutartige Erkrankung, welche keiner Behandlung bedarf. Eine Diagnose ist allerdings wichtig, um andere hepatische Störungen auszuschließen [STRASSBURG, 2010].

### Rotor Syndrom

Das Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt [STRASSBURG, 2010] und ist durch eine chronische konjugierte Hyperbilirubinämie gekennzeichnet [LÖFFLER *et al.*, 2007]. Der Plasmabilirubinspiegel liegt bei 50-100µM [STRASSBURG, 2010].

Die genaue genetische Grundlage ist aber noch nicht bekannt. Es handelt sich um eine gutartige Erkrankung, die keine Therapie erfordert. Allerdings soll das Syndrom diagnostiziert werden, um es von anderen ernsthaften Lebererkrankungen abzugrenzen [STRASSBURG, 2010].

## 2.7. Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay)

Die „Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)“ ist auch unter dem Namen Comet Assay bekannt. Erstmals wurde der Comet Assay im Jahr 1984 von Ostling und Johanson beschrieben. Im Laufe der Jahre wurde diese Methode weiter entwickelt und verbessert [CHOUKROUN *et al.*, 2001].

Mit Hilfe des Comet Assay lassen sich DNA-Schäden auf Zelniveau erfassen. Sowohl DNA-Einzelstrangbrüche als auch DNA-Doppelstrangbrüche sind feststellbar [YUSUF *et al.*, 2000]. Unter neutralen Bedingungen ist nur eine Erfassung von Doppelstrangbrüchen möglich, während unter alkalischen Bedingungen auch Einzelstrangbrüche gemessen werden können [ROJAS *et al.*, 1999].

### 2.7.1. Vorteile des Comet Assay

Der Comet Assay ist eine empfindliche Methode, mit deren Hilfe auch geringe DNA-Schäden erfasst werden können. Es wird nur eine kleine Anzahl eukaryotischer Zellen für eine Probe benötigt. Die Methode ist sehr flexibel, einfach in der Anwendung und kostengünstig. Studien die den Comet Assay inkludieren, lassen sich mit relativ geringen Mengen an Testsubstanz durchführen. Auch der Zeitraum für solche Studien kann relativ kurz gehalten werden [TICE *et al.*, 2000].

### 2.7.2. Ablauf des Comet Assay

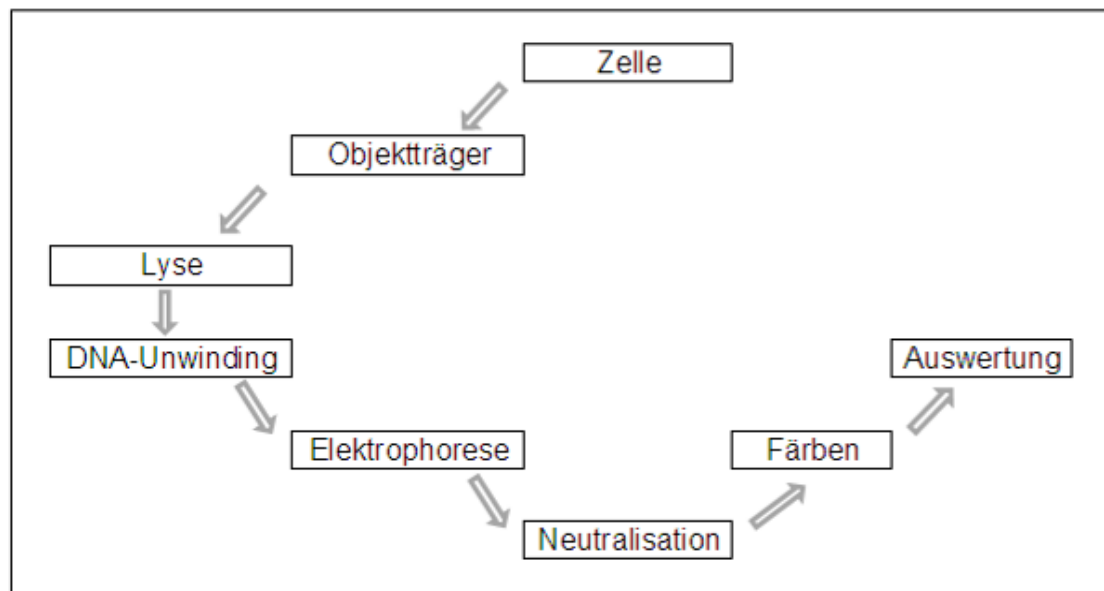


Abbildung 6: Ablauf des Comet Assay [mod. nach [TICE *et al.*, 2000]]

Das Prinzip basiert auf der Fähigkeit der denaturierten DNA-Fragmente während der Elektrophorese aus der Zelle zu wandern [YUSUF *et al.*, 2000]. Die exakte Durchführung der einzelnen methodischen Schritte ist wichtig für reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse [TICE *et al.*, 2000].

### Zellvorbereitung

Die Zellen werden mit verflüssigter Agarose gemischt und in zwei Gelen auf die Objektträger aufgetragen. Die Konzentration der Zellen in der Agarose und die Konzentration der Agarose selbst sind wichtig für eine erfolgreiche Analyse und Datenqualität [TICE *et al.*, 2000].

### Lyse

Die Objektträger werden für mindestens eine Stunde der Lyse ausgesetzt [TICE *et al.*, 2000]. Die Zellen lysieren, das heißt die DNA trennt sich von den anderen Bestandteilen (Proteine, RNA, Membranen, zytoplasmatische und nukleoplasmatische Bestandteile) ab und bleibt übrig (für die Herstellung der Lyse-Lösung siehe auch Kapitel 3.5 Lösungen).

### Unwinding

Vor der Elektrophorese werden die Objektträger für 20 Minuten in die alkalische Elektrophoreselösung (pH-Wert > 13) gelegt für die „Unwinding“-Phase. Unter den alkalischen Bedingungen wird der DNA-Doppelstrang denaturiert und es entstehen DNA-Einzelstränge [TICE *et al.*, 2000] (für die Herstellung der Elektrophoreselösung siehe auch Kapitel 3.5. Lösungen).

### Elektrophorese

Nach dieser „Unwinding“-Phase werden die DNA-Einzelstränge der Elektrophorese ausgesetzt [TICE *et al.*, 2000]. In diesem elektrischen Feld, wandert die geschädigte DNA aus dem Zellkern. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld zur Anode. Die Fähigkeit der DNA zu wandern, hängt von der Größe der DNA-Fragmente ab. Die sogenannten Comets entstehen. Die Länge des Schweifs („Tail“) nimmt bei steigendem DNA-Schaden zu. Im Extremfall ist der Kopf („Head“) der Zelle vom Schweif der Zelle getrennt. Es wurde postuliert, dass es sich hierbei um eine apoptotische Zelle handelt [FAIRBAIRN *et al.*, 1995].

### Neutralisation

Die Objektträger werden in einem Puffer (Trizma, pH-Wert: 7,5) neutralisiert und zum Trocknen aufgelegt [TICE *et al.*, 2000] (für die Herstellung des Neutralisationspuffers siehe auch Kapitel 3.5. Lösungen).

### DNA-Färbung und Auswertung

Die Gele auf den Objektträgern werden am häufigsten mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden die Gele mittels der Software Komet 5.5 ausgewertet. Erfasst wird die Länge des DNA-Schweifes in Prozent [TICE *et al.*, 2000] (siehe auch Kapitel 3.5.4. Zellvorbereitung und Comet Assay und 3.6. Auszählen).

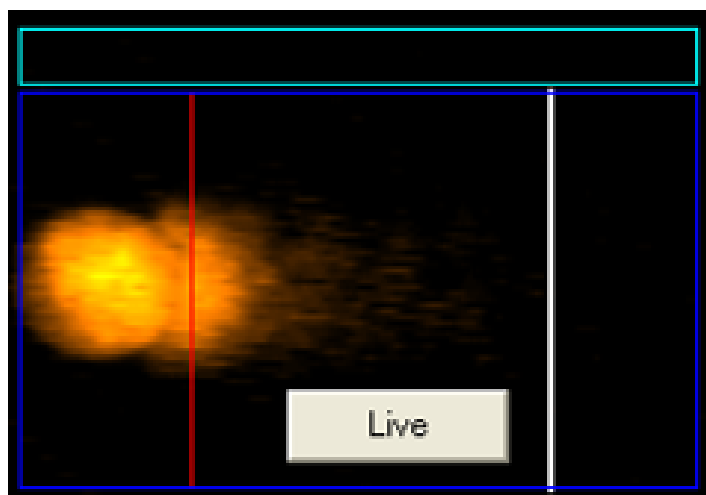


Abbildung 7: Geschädigte HepG2-Zelle im Comet Assay

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Geräte

| Gerät                                    | Hersteller                                              | Typ             |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Countess – Automated Cell Counter</b> | Invitrogen                                              | 354900          |
| <b>Eismaschine</b>                       | Scotsman                                                | Labin AF-10     |
| <b>Elektrophoresekammer</b>              | BioZym                                                  | CSL-COM40       |
| <b>Electrophoresis Power Supply</b>      | PeqLab                                                  | EV231           |
| <b>Fluoreszenzmikroskop</b>              | Zeiss Germany                                           | Axioscop 20     |
| <b>Geschirrspüler</b>                    | Miele Professionals                                     | G7883           |
| <b>Inkubator</b>                         | Heraeus Instruments                                     | Function Line   |
| <b>Kühlschrank</b>                       | AEG Elektrolux                                          | Öko_Santo       |
| <b>Laminar Flow</b>                      | EuroClone Division                                      | S@femate 1.8    |
| <b>Mikrowelle</b>                        | Elta                                                    |                 |
| <b>pH-Meter</b>                          | Metrohm AG                                              | 827 ph lab      |
| <b>Pipettierhilfe</b>                    | Jencons                                                 | PowerPette Plus |
| <b>Sterilisator</b>                      | bartelt Gesellschaft<br>m.b.H., Labor &<br>Datentechnik | WTB binder      |
| <b>Tiefkühler</b>                        | Forma Scientific                                        | Bio Freezer     |
| <b>Trockenschrank</b>                    | Heraeus Instruments                                     | T6200           |
| <b>Ultraschallbad</b>                    | Bandelin Sonorex                                        | RK 100          |
| <b>UV Lampe</b>                          | Prior                                                   | Lumen 200       |
| <b>Vakuumpumpe</b>                       | Barrelet GmbH                                           | MZ2C            |
| <b>Vortex</b>                            | Heildolph                                               | REAX2000        |
| <b>Waage</b>                             | Mettler                                                 | AT201           |
| <b>Waage, max. 4800g</b>                 | Satorius AG Göttingen                                   | LC4801P         |
| <b>Wärmeplatte</b>                       | Heidolf                                                 | MR 3001 K       |
| <b>Wasserbad</b>                         | GFL                                                     | 1002            |

|                     |              |               |
|---------------------|--------------|---------------|
| <b>Zentrifuge</b>   | Heraeus      | Megafuge 1.OR |
| <b>ZK Mikroskop</b> | Hund Wetzlar | Wilowert 30   |

*Tabelle 1: Geräte*

### 3.2. Verbrauchsmaterialien

| <b>Verbrauchsmaterial</b>                                              | <b>Hersteller</b>           | <b>Produktnummer</b> |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| <b>6-Well Platten (Tissue Culture Test Plate)</b>                      | SPL Life Sciences           | PAA30006X            |
| <b>Cell counting chamber slides</b>                                    | Invitrogen                  | C10283               |
| <b>Cell Culture Flask, 25cm<sup>3</sup></b>                            | SPL                         |                      |
| <b>Deckgläser 20x20mm</b>                                              | VWR                         | ECN 631-1568         |
| <b>Dry Heat Indicator Tape</b>                                         | 3M Health Care              | 1226                 |
| <b>Glas Pasteurpipetten, 230 mm</b>                                    | Hecht Assistent             | 567/2                |
| <b>Handschuhe</b>                                                      | MicroFlex Corporation       | XC-INT-M             |
| <b>Objektträger</b>                                                    | Hecht Assistent             | 2406/1               |
| <b>Nitrilhandschuhe</b>                                                | MicroFlex Corporation       | SU-INT-S             |
| <b>Parafilm</b>                                                        | American National Can<br>TM | CT06836              |
| <b>Pipettenspitzen blau</b>                                            | VWR                         | 612-5756             |
| <b>Pipettenspitzen gelb</b>                                            | VWR                         | 612-5755             |
| <b>Plastik Pasteurpipetten</b>                                         | VWR                         | 612-1681             |
| <b>Polyethylene Round-Bottom-Tube, 5ml</b>                             | Becton Dickinson<br>Labware | 4-2063-1             |
| <b>Reaktionsgefäße, 1,6ml, amber, (graduiert, mit Druckverschluss)</b> | Biozym Scientific<br>GmbH   | 710169               |
| <b>Tape, autoclave</b>                                                 | Sigma Aldrich Chemie        | A2549-6EA            |

|                                       |                   |       |
|---------------------------------------|-------------------|-------|
| <b>indicator</b>                      | GmbH              |       |
| <b>Watte</b>                          | DM Drogeriemarkt  |       |
| <b>Zentrifugenröhrchen,<br/>15 ml</b> | SPL Life Sciences | 50015 |

*Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien*

### 3.3. Chemikalien und Medien

| <b>Substanz</b>                                   | <b>Hersteller</b>         | <b>Produktnummer</b> |
|---------------------------------------------------|---------------------------|----------------------|
| <b>Accutase, 100ml</b>                            | PAA Laboratories GmbH     | L11-007              |
| <b>Destilliertes Wasser</b>                       |                           |                      |
| <b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>                    |                           |                      |
| <b>Ethanol</b>                                    | VWR Ethanol               | UN1170               |
| <b>Ethidiumbromid 10mg/ml</b>                     | Sigma Aldrich GmbH        | E1510                |
| <b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA 0,1 M)</b>  | Sigma Aldrich Chemie GmbH | E6758-500G           |
| <b>Fetal Bovine Serum (FBS)</b>                   | PAA Laboratories GmbH     | A15-101              |
| <b>MEM non-essential amino acid solution 100x</b> | Sigma Aldrich Chemie GmbH | M7145                |
| <b>MEM with Earle's Salts with L-Glutamine</b>    | PAA Laboratories GmbH     | E15-825              |
| <b>Natriumchlorid (NaCl)</b>                      | Sigma Aldrich Chemie GmbH | SZB 9329A            |
| <b>Natriumhydroxid (NaOH 0,3 M)</b>               | Sigma Aldrich Chemie GmbH | SZB A 2940V          |
| <b>Natrium-Pyruvat (Na-Pyruvat, 100ml, 100mM)</b> | Sigma Aldrich Chemie GmbH | S8636                |



|                                          |                           |               |
|------------------------------------------|---------------------------|---------------|
| <b>PBS (Phosphat buffered saline)</b>    | Sigma Aldrich Chemie GmbH | D8537         |
| <b>Penicillin/Streptomycin/Neomycin</b>  | Sigma Aldrich Chemie GmbH | P4083         |
| <b>Salzsäure (HCl 37%)</b>               | Riedel-deHaen             | 30721         |
| <b>Tertiärbutylhydroperoxid (t-BOOH)</b> | Merck                     | S4990706      |
| <b>Triton X 100</b>                      | Sigma Aldrich Chemie GmbH | CAS 9002-93-1 |
| <b>Trizma Base</b>                       | Sigma Aldrich Chemie GmbH | 9 3350        |
| <b>Trypanblau</b>                        | Invitrogen                | T10282        |
| <b>Ultra Pure™ Agarose</b>               | Invitrogen                | 16500-100     |
| <b>Ultra Pure™ LMP Agarose</b>           | Invitrogen                | 16520-050     |

*Tabelle 3: Chemikalien und Medien*

### 3.4. Verwendete Tetrapyrrole

| <b>Tetrapyrrol</b>             | <b>Hersteller</b>   | <b>Produktnummer</b> |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Biliverdinhydrochlorid</b>  | Frontier Scientific | B655-9               |
| <b>Biliverdindimethylester</b> | Frontier Scientific | B610-9               |
| <b>Stercobilinhydrochlorid</b> | Frontier Scientific | S594-9               |
| <b>Urobilinhydrochlorid</b>    | Frontier Scientific | U590-9               |

*Tabelle 4: Verwendete Tetrapyrrole*

### 3.5. Lösungen

#### Medium

450ml Minimum Essential Medium Eagle (MEM)

50ml Fetal Bovine Serum (FBS)

1ml Natriumpyruvat

5ml nicht-essentielle Aminosäuren

5ml Penicilin/Streptomycin/Neomycin

Wenn im MEM selbst kein L-Glutamin enthalten ist, muss 1ml L-Glutamin zugesetzt werden.

#### Elektrophoreselösung

24g NaOH-Plättchen

0,58g EDTA

Beides in einem 1000ml Becherglas mit destilliertem Wasser mit einem Magnetrührer lösen. Der pH-Wert der Lösung muss 13 oder höher sein. Die Lösung in einen 2000ml Messkolben überführen und mit destilliertem Wasser auffüllen.

#### *t*-BOOH-Stocklösung (300mM)

240,3µl destilliertes Wasser

9,7µl Tertiärbutylhydroperoxid (*t*-BOOH)

#### *t*-BOOH-Lösung (300µM)

100ml destilliertes Wasser

100µl *t*-BOOH-Stocklösung

### Lyse-Lösung

146,1g 2,5M NaCl

29,2g 0,1M EDTA

1,211g 10mM Trizma Base

NaCl und Trizma Base in einem 1000ml Becherglas auf dem Magnetrührer zusammenführen und 500ml destilliertes Wasser dazugeben. 20ml NaOH, danach EDTA und 4ml NaOH zugeben und solange rühren bis eine klare Lösung entsteht. pH-Wert messen und langsam NaOH dazugeben, bis der pH-Wert genau 10 beträgt (+/- 0,01). In einen 1000ml Messkolben überführen, mit destilliertem Wasser auffüllen und in eine dunkle Flasche abfüllen. Die Lyse-Lösung im Kühlraum bis zur Verwendung lagern.

Letzter Arbeitsschritt:

200ml Lyse-Lösung in ein Becherglas füllen und mit 2ml Triton X 100 auf dem Magnetrührer vermischen.

### Neutralisationspuffer

96,88g 0,4M Trizma Base

ca. 110ml konz. HCl (37%)

Mit der konzentrierten HCl den pH-Wert auf 7,5 einstellen.

### Normal Melting Agarose (NMA)

1%-ige NMA-Lösung für die Beschichtung herstellen:

1,0g NMA

100ml destilliertes Wasser

In der Mikrowelle dreimal aufkochen und zwischenzeitlich umrühren. Die Lösung muss am Ende klar und frei von Klumpen sein.

Zum Beschichten die Objektträger einmal kurz in die Lösung eintauchen, die Unterseite mit Papier abwischen und die Objektträger zum Trocknen auflegen.

#### Low Melting Agarose (LMA)

1%-ige LMA-Lösung für das Auftragen der Gele herstellen

200mg LMP Agarose

20ml PBS

Die LMA Agarose in PBS in der Mikrowelle lösen und im Kühlraum lagern.

Vor der Verwendung die Agarose zum Auftragen der Gele in der Mikrowelle verflüssigen und ins Wasserbad bei 37°C stellen.

#### Ethidiumbromid

10µl Ethidiumbromid Stocklösung

5ml destilliertes Wasser

Die Herstellung von Ethidiumbromid erfolgt unter dem Abzug (toxisch!). Nitrilhandschuhe verwenden! Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

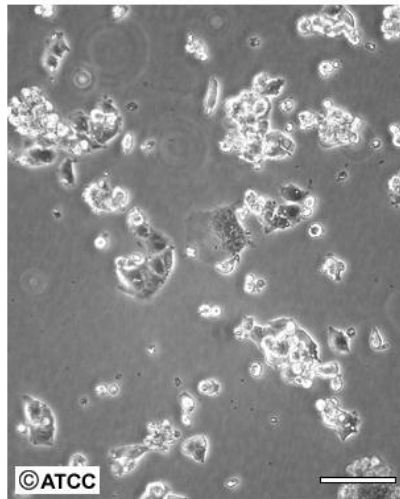
### 3.6. HepG2-Zellen

#### 3.6.1. Charakterisierung der Zellen

Für diese Arbeit wurden menschliche Leberkarzinomzellen, sogenannte HepG2-Zellen, verwendet.

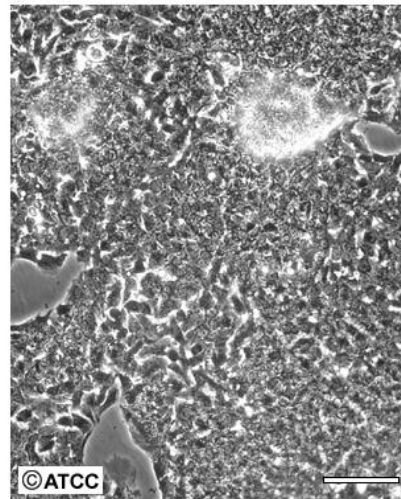
Diese Zellen wurden 1975 bei einer Lebertumorbiopsie während einer Lobektomie von einem 15-jährigen Jungen aus Argentinien gewonnen [ADEN *et al.*, 1979]. HepG2-Zellen werden häufig bei Studien zum Nachweis von Mutagenität eingesetzt. Besonders ausschlaggebend hierfür ist vor allem die noch vorhandene Aktivität der Phase I Enzyme der Hep G2-Zellen. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Entgiftung von genotoxischen Prokarzinogenen [KNASMÜLLER *et al.*, 1998].

ATCC Number: **HB-8065**  
Designation: **Hep G2**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Abbildung 8: HepG2-Zellen [ATCC, 2012]

### 3.6.2. Zellkultur

Bei den Arbeitsschritten der Zellkultur ist auf eine sterile Arbeitsweise zu achten und die meisten Arbeitsschritte erfolgen im Laminar Flow.



Abbildung 9: Zellkultur: Arbeiten im Laminar Flow

### Zellen auftauen

- Die Zellen aus dem Tiefkühler auftauen, zentrifugieren und den flüssigen Inhalt absaugen.
- Mit 1ml PBS versetzen, wieder zentrifugieren und mit 1ml Medium in einem Zentrifugenröhrchen resuspendieren.
- In ein Kulturfläschchen 8ml Medium vorlegen, danach den Inhalt des Röhrchens dazupipettieren und in den Inkubator stellen.

### Mediumwechsel

Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

- Das alte Medium aus den Kulturfläschchen absaugen.
- 8ml frisches Medium dazu pipettieren. Es dürfen keine Zell- bzw. Medienreste im Flaschenhals bleiben, da diese zu Infektionen führen können.
- Fläschchen wieder in den Inkubator (37°C) stellen.

### Passage

Alle drei Tage wurden die Zellen passagiert.

- Das alte Medium entfernen und mit 2ml PBS waschen.
- Zum Ablösen der Zellen 1ml Accutase zu den Zellen geben und für 10 Minuten in den Inkubator stellen. Die Accutase ist ein Enzymkomplex, der das Ablösen der Zellen ermöglicht.
- Zwei neue Fläschchen wie folgt beschriften: Zelllinie, neue Passagezahl, Datum und Name. In die beiden Fläschchen je 8ml Medium vorlegen.
- Die Fläschchen aus dem Inkubator nehmen und gegen die Unterseite und die Seiten klopfen, um die Zellen von der Wand zu lösen. Unter dem Mikroskop betrachten, ob die Zellen abgelöst sind.
- Je 4ml Medium in die Fläschchen geben und mehrmals gegen den Rand sprühen. Den Inhalt beider Fläschchen zu einem Fläschchen vereinigen.

- Je 1,4 – 2,0ml aus dem vereinigten Inhalt in die neuen Fläschchen geben und in den Inkubator stellen.

### 3.7. Comet Assay

#### 3.7.1. Prinzip des Comet Assay

Der Comet Assay oder auch Single cell gel electrophoresis (SCGE) ist eine schnelle, empfindliche und billige Methode um DNA-Strangbrüche auf Zellniveau zu erfassen [OSTLING und JOHANSON, 1984]. Es können sowohl DNA-Einzelstrangbrüche als auch DNA-Doppelstrangbrüche erfasst werden [VAMVAKAS *et al.*, 1997]. Das Prinzip beruht darauf, dass Fragmente der denaturierten DNA während der Elektrophorese aus der Zelle wandern [YUSUF *et al.*, 2000]. Die Zellen werden mit Agarose gemischt, auf einem Objektträger aufgetragen und der Lyse ausgesetzt. Durch die Lyse werden die meisten zellulären Komponenten entfernt, außer der DNA. Die negativ geladene DNA wandert zur Anode, während die unbeschädigte DNA im Zellkern bleibt [FAIRBAIRN *et al.*, 1995] (siehe auch 2.7. Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay)).

#### 3.7.2. Aussaat der Zellen

Die Aussaat der Zellen für den Comet Assay erfolgte jeweils zwei Tage vor dem Comet Assay. Die Inkubation betrug 24 Stunden, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen.

- Nach der Passage die restlichen Zellen aus dem Fläschchen in ein Zentrifugenröhrchen pipettieren und zentrifugieren. (600 G, Zeit: 4 Minuten, Temperatur: 4°C)
- 6-Well-Platte beschriften: Zelllinie, Passagezahl, Pigment, Name, Datum und die jeweilige Konzentration (0,5µM, 5µM, 17µM, negativ).

- Das Medium aus dem Zentrifugenröhrchen absaugen und 1ml PBS auf das Zellpellet pipettieren.
- Zellzahl bestimmen mittels Trypanblau-Test: Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, welcher von geschädigten Zellen aufgenommen wird und diese dunkelblau einfärbt. Intakte Zellen hingegen nehmen den Farbstoff nicht auf.  
20µl der Zellsuspension und 20µl Trypanblau in einem PCR-Cup vereinen und davon 10µl in die Kammer des Countess-Slides pipettieren. Die Zellzahl durch die Countess bestimmen und die Zellzahl der lebenden Zellen („Live“) und Vitalität („Viability“) notieren. Pro Well werden ca. 300.000 Zellen benötigt.
- 3ml Medium in die vier Wells vorlegen, die ausgerechnete Menge an Zellsuspension dazu pipettieren und die Platte in den Inkubator stellen.

### 3.7.3. Versuchsansätze

Inkubiert wurde mit dem jeweiligen Tetrapyrrol exakt 24 Stunden vor dem Comet Assay. Folgende Tetrapyrrole wurden getestet: Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin.

|                     | <b>Biliverdin<br/>(hydrochlorid)</b> | <b>Biliverdin-<br/>Dimethylester</b> | <b>Stercobilin<br/>(hydrochlorid)</b> | <b>Urobilin<br/>(hydrochlorid)</b> |
|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| <b>Summenformel</b> | $C_{33}H_{35}ClN_4O_6$               | $C_{35}H_{38}N_4O_6$                 | $C_{33}H_{47}ClN_4O_6$                | $C_{33}H_{43}ClN_4O_6$             |
| <b>Molare Masse</b> | 619,12g/mol                          | 610,66g/mol                          | 631,22g/mol                           | 627,17g/mol                        |

*Tabelle 5: Summenformel und molare Masse der getesteten Tetrapyrrole  
[SCIENTIFIC, 2012]*

- Das jeweilige Pigment in ein dunkles Cup einwiegen.
- Einwaage für eine 17mM Stock-Konzentration: 2,108mg Biliverdin, 2,076mg Biliverdin-Dimethylester, 2,15mg Urobilin, 2,13mg Stercobilin
- Zur Einwaage 200µl DMSO zugeben, um eine 17mM Lösung zu erhalten.



- 5min unter einem lichtundurchlässigen Schutz aus Alufolie auf die Wärmeplatte (37°C) und danach 3min ins Ultraschallbad stellen. Beides wiederholen, bis sich das Pigment gelöst hat.
- Das DMSO in die Cups vorlegen (0,5mM, 5mM) und die berechnete Menge an Tetrapyrrol dazu geben.
- Vier Zentrifugenröhrchen mit den Konzentrationen 0,5µM, 5µM, 17µM und negativ beschriftet und 4ml Medium hineinpipettieren.
- In die Negativkontrolle kommen 4µl DMSO und in die restlichen drei Röhrchen jeweils 4µl Tetrapyrrol aus den Cups. Daraus ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 1000.
- Das alte Medium aus der 6-Well-Platte absaugen und je 2,5ml aus den Röhrchen in die entsprechenden Wells pipettieren.
- Die Inkubationszeit im Inkubator beträgt genau 24 Stunden.

### 3.7.4. Zellvorbereitung und Comet Assay

Die Zellvorbereitung fand am Tag des Comet Assay statt.

#### Zellvorbereitung

- 6-Well-Platte aus dem Inkubator nehmen und das Medium aus den einzelnen Wells in die entsprechend beschrifteten Facs-Röhrchen pipettieren.
- 250µl Accutase in jedes Well geben und für 10min in den Inkubator stellen.
- 1ml Medium in jedes Well pipettieren und die Zellen ablösen. Danach die Suspension aus den einzelnen Wells in die jeweiligen Facs-Röhrchen geben.
- Zentrifugieren: 600G, 7min, 4°C; Das Medium absaugen und 1ml PBS dazu pipettieren.
- Zentrifugieren: 600G, 5min, 4°C; PBS absaugen und 1ml PBS dazu pipettieren. Erneut zentrifugieren.
- PBS absaugen, 270µl PBS dazu pipettieren und die Zellzahl von der Negativkontrolle und den drei Konzentrationen bestimmen. Es werden

1.000.000 Zellen/ml benötigt. Bei zu hoher Zellzahl entsprechend verdünnen.

- Die FACS-Röhrchen auf Eis stellen und die Objektträger wie folgt beschriften: Datum, Zelllinie, Pigment, Konzentration (1, 2, 3, neg./pos.) und Lyse (2x) bzw. *t*-BOOH (2x). Pro Comet Assay werden 16 Objektträger benötigt.
- 140µl Agarose und 30µl Zellsuspension in einem Cup mischen, pro Objektträger zweimal 70µl der Mischung auftragen und mit Deckgläsern abdecken.
- Für 10min in den Kühlraum zum Trocknen stellen.
- Die Deckgläser entfernen, die *t*-BOOH-Objektträger für 5min in die *t*-BOOH-Lösung stellen und danach kurz in destilliertes Wasser tauchen.

### Lyse

- Alle Objektträger für 1h in die Lyse-Lösung stellen. Es gibt eine Lyse-Lösung für die Objektträger mit *t*-BOOH und eine für jene ohne *t*-BOOH.
- Elektrophorese im Kühlraum aufstellen und die Objektträger auflegen. 200ml der Elektrophoreselösung zur Seite stellen und mit dem Rest die Elektrophorese befüllen. Die Objektträger sollen bedeckt sein und es dürfen keine Luftblasen unter ihnen bleiben.

### Unwinding

- 20min unwinding-Phase: Die Objektträger sind für 20min in der Elektrophoreselösung, ohne dass Strom fließt.

### Elektrophorese

- Elektrophoreseeinstellungen: manuell, 25 Volt Spannung, 1000mA Strom, 150 Watt Leistung, 00:30h. Die Stromstärke sollte 300+/-10mA betragen. Wert durch Zugabe oder Wegnahme von Elektrophoreselösung anpassen. Elektrophorese erneut einschalten.

### Neutralisation

- Nach Ablauf der Elektrophorese alle Objektträger für 5min in den Neutralisationspuffer und danach für 5min in destilliertes Wasser stellen.

### Lagerung

- Die Objektträger zum Trocknen auflegen und bis zum Auszählen im Kühlraum lagern.

| Montag             | Dienstag      | Mittwoch    | Donnerstag    | Freitag     |
|--------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| <b>Zellpassage</b> | Mediumwechsel | Zellpassage | Mediumwechsel | Zellpassage |
| <b>Aussaat</b>     | Inkubation    | Aussaat     | Inkubation    | Comet Assay |
|                    |               | Comet Assay |               |             |

*Tabelle 6: Arbeitsablauf eines typischen Versuchsansatzes*

## 3.8. Auszählen

Die Auswertung der Gele erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener UV-Lampe. Mittels der Software Komet 5.5 wurden die einzelnen Zellen auf den Gelen erfasst. Pro Tetrapyrrol und Konzentration wurden 6 Gele ausgezählt. Auf jedem Gel wurden systematisch über das ganze Feld 50 Zellen gezählt (siehe Schema Abb. 10).

- Zuerst die UV-Lampe 5-10 Minuten einschalten und vorwärmen.
- Speziellen Mantel und Nitrilhandschuhe tragen.
- 30µl Ethidiumbromid (giftig) auf das Gel auftragen und ein Deckglas darauf legen.
- Das Gel unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachten.
- In 10 Reihen über das gesamte Feld fahren und pro Reihe 5 Zellen zählen. Je nach Dichte der Zellen, jede 20-30. Zelle zählen.

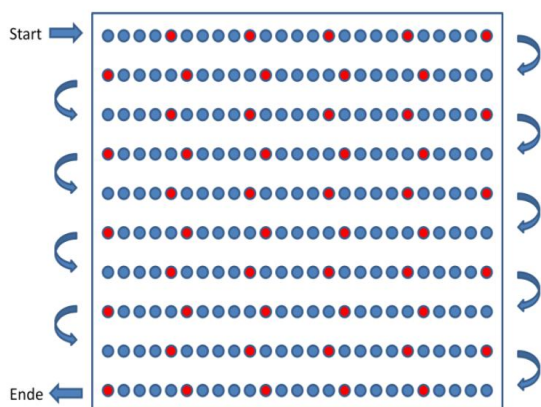


Abbildung 10: Auszählverfahren [PFLEGER, 2011]

- Zelle zählen: Den rechteckigen Raster über die Zelle legen und durch einen Klick der rechten Maustaste erfassen. Wichtig ist, die Zellen vor jeder Messung zu fokussieren und den Raster individuell an die Zelle anzupassen.
- Gemessen wird die DNA-Schädigung in Prozent. Im Kopf („Head“) der Zelle befindet sich die intakte und im Schweif („Tail“) die geschädigte DNA.
- 300 Werte erhält man durch das Auszählen von 6 Gelen in einer Excel-Tabelle. Für jedes einzelne Gel den Mittelwert in Excel berechnen und die 6 Mittelwerte notieren.

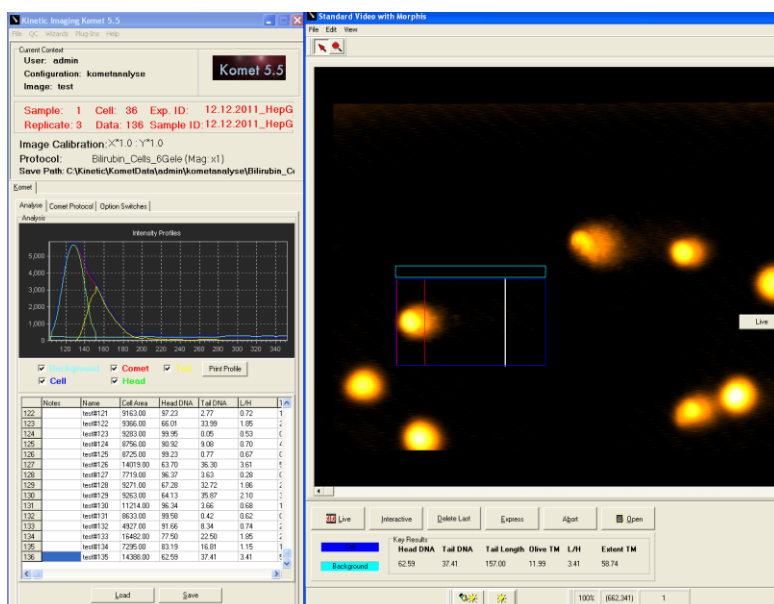


Abbildung 11: Screenshot Komet 5.5 - geschädigte HepG2-Zellen

### 3.9. Statistische Auswertung

Die Mittelwerte der prozentuellen DNA-Gehalte im Schweif von jedem ausgezählten Gel wurden in SPSS PASW Statistics 17.0 und Microsoft Office Excel 2007 eingegeben.

- Aus diesen Werten die Mittelwerte und die Standardabweichungen der einzelnen Konzentrationen in Excel berechnen, sofern die Daten normalverteilt sind.
- Mittels Kolmogorov-Smirnov die Daten in SPSS für jedes Pigment für Lyse und *t*-BOOH auf Normalverteilung testen. Durch eine Ausreißerbereinigung werden Ausreißer erkannt und entfernt.
- Unterschiede in der DNA-Schädigung durch eine einfaktorielle ANOVA (Post-Hoc: Dunnett-T3) bestimmen. Das Signifikanzniveau wurde bei einem p-Wert von  $\leq 0,05$  gewählt.
- Bei normalverteilten Daten bivariate Korrelationen (Pearson) berechnen

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Ergebnisse Comet Assay

Getestet wurde die Auswirkung der Tetrapyrrole Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin auf HepG2-Zellen.

Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit den Tetrapyrrolen wurde der Comet Assay durchgeführt.

Für jedes Tetrapyrrol wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt. Drei physiologisch relevante Konzentrationen (0,5µM, 5µM, 17µM) wurden mit einer Negativ- und einer Positivkontrolle verglichen. Durch die drei Konzentrationen, lässt sich gegebenenfalls ein konzentrationsabhängiger Effekt ermitteln. Die Negativkontrolle wurde nur der Lyse, während die Positivkontrolle zusätzlich dem Tertiärbutylhydroperoxid (*t*-BOOH) ausgesetzt wurde.

Ermittelt wurde die Schädigung der DNA durch ihren prozentuellen Gehalt im Kometenschweif. Dabei handelt es sich um jenen Teil der aus dem Zellkern austritt.

## 4.2. Auswirkungen von Biliverdin

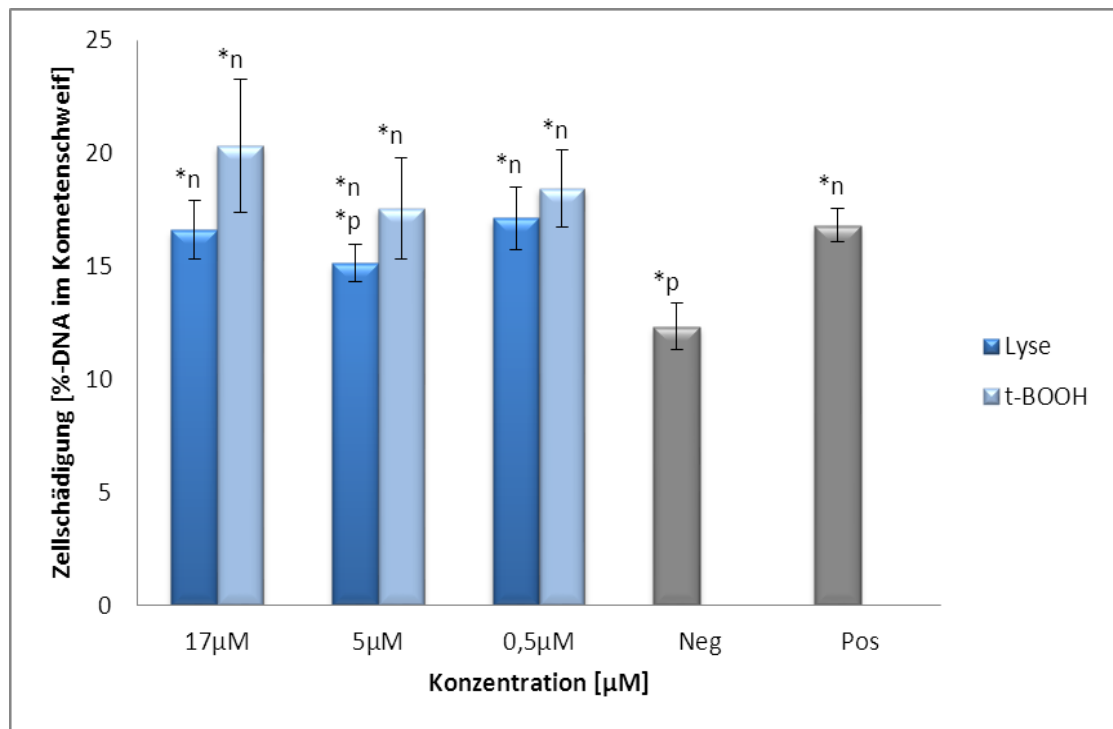


Abbildung 12: Ergebnis des Comet Assay der HepG2-Zellen nach einer Inkubation (24h) mit Biliverdin. Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Ergebnisse. \*n bzw. \*p kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Negativ- bzw. zur Positivkontrolle.

| Lyse    | 17µM  | 5µM   | 0,5µM | Negativ | Positiv |
|---------|-------|-------|-------|---------|---------|
| Negativ | 0,001 | 0,005 | 0,001 | -       | 0,000   |
| Positiv | -     | 0,040 | -     | 0,000   | -       |

Tabelle 7: Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Biliverdin.

| <b><i>t</i>-BOOH</b> | <b>17µM</b> | <b>5µM</b> | <b>0,5µM</b> | <b>Negativ</b> | <b>Positiv</b> |
|----------------------|-------------|------------|--------------|----------------|----------------|
| <b>Negativ</b>       | 0,017       | 0,010      | 0,000        | -              | 0,000          |
| <b>Positiv</b>       | -           | -          | -            | 0,000          | -              |

*Tabelle 8: Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen bei zusätzlicher Stressung durch Tertiärbutylhydroperoxid nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Biliverdin.*

Die Negativ- und die Positivkontrolle unterscheiden sich signifikant voneinander, das heißt die Positivkontrolle weist eine signifikant höhere DNA-Schädigung auf.

Biliverdin in der getesteten Konzentration von 0,5µM verursacht eine signifikant höhere DNA-Schädigung verglichen mit unbehandelten Zellen (Negativkontrolle). Dasselbe gilt für die Zellen die zusätzlich mit *t*-BOOH (Positivkontrolle) behandelt wurden.

Bei einer Konzentration von 5µM zeigt Biliverdin eine signifikant höhere DNA-Schädigung als die Negativkontrolle und eine signifikant niedrigere als die Positivkontrolle. Bei der gleichen Konzentration zeigt Biliverdin, das zusätzlich mit *t*-BOOH versetzt wurde, eine signifikant höhere DNA-Schädigung als die Negativkontrolle.

Biliverdin zeigt bei einer Konzentration von 17µM und auch bei zusätzlicher Behandlung mit *t*-BOOH eine signifikant höhere DNA-Schädigung als die unbehandelten Zellen.



### 4.3. Auswirkungen von Biliverdin-Dimethylester

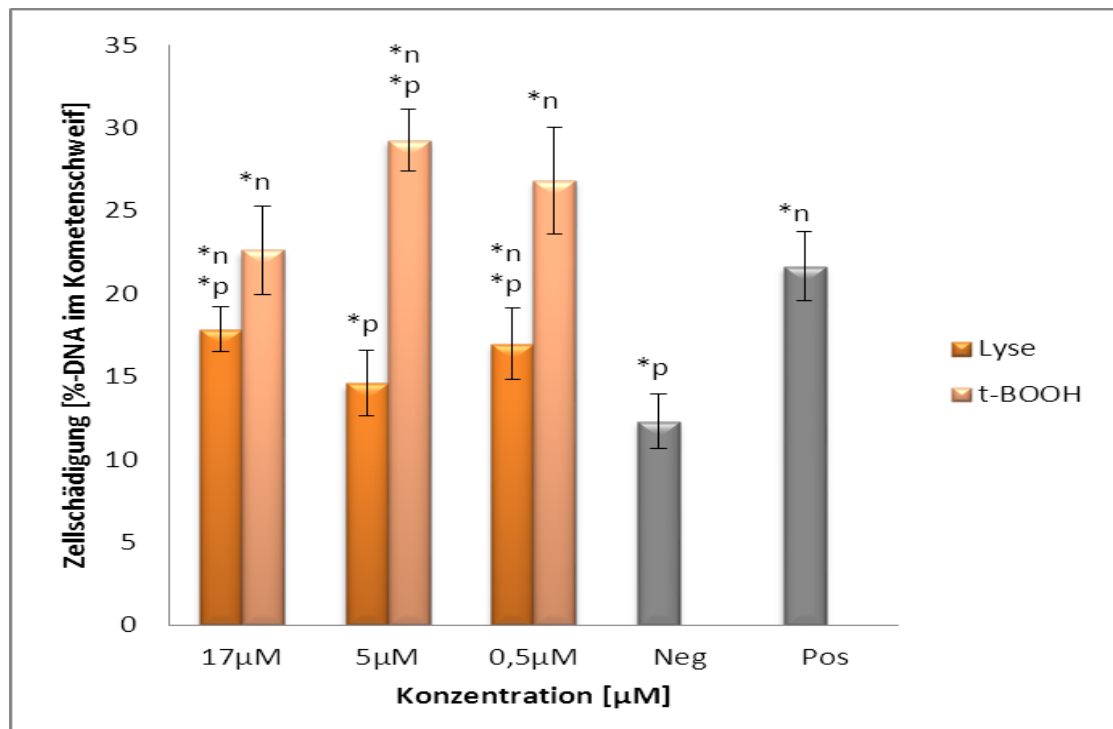


Abbildung 13: Ergebnis des Comet Assay der HepG2-Zellen nach einer Inkubation (24h) mit Biliverdin-Dimethylester. Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Ergebnisse. \*n bzw. \*p kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Negativ- bzw. zur Positivkontrolle.

| Lyse    | 17µM  | 5µM   | 0,5µM | Negativ | Positiv |
|---------|-------|-------|-------|---------|---------|
| Negativ | 0,001 | -     | 0,018 | -       | 0,000   |
| Positiv | 0,042 | 0,001 | 0,029 | 0,000   | -       |

Tabelle 9: Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Biliverdin-Dimethylester.

| <b><i>t</i>-BOOH</b> | <b>17µM</b> | <b>5µM</b> | <b>0,5µM</b> | <b>Negativ</b> | <b>Positiv</b> |
|----------------------|-------------|------------|--------------|----------------|----------------|
| <b>Negativ</b>       | 0,000       | 0,000      | 0,000        | -              | 0,000          |
| <b>Positiv</b>       | -           | 0,001      | -            | 0,000          | -              |

*Tabelle 10: Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen bei zusätzlicher Stressung durch Tertiärbutylhydroperoxid nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Biliverdin-Dimethylester.*

Die Positivkontrolle ist signifikant höher als die Negativkontrolle.

Biliverdin-Dimethylester in der Konzentration von 0,5µM weist eine signifikant höhere DNA-Schädigung auf im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Negativkontrolle). Gleichzeitig ist die Schädigung signifikant niedriger als bei jenen Zellen die mit *t*-BOOH (Positivkontrolle) behandelt wurden. Die Zellen der gleichen Konzentration die zusätzlich mit *t*-BOOH versetzt wurden, haben eine signifikant höhere DNA-Schädigung als die Negativkontrolle.

Die DNA-Schädigung der 5µM Konzentration ist nicht signifikant höher als die Negativkontrolle. Dieselbe Konzentration die dem *t*-BOOH ausgesetzt wurde, zeigt eine signifikant höhere DNA-Schädigung als die Negativkontrolle und als die Positivkontrolle.

Für die 17µM Konzentration zeigt sich eine signifikant höhere DNA-Schädigung als bei der Negativkontrolle und eine signifikant niedrigere als bei der Positivkontrolle. Bei der Konzentration mit zusätzlicher *t*-BOOH-Stressung zeigt sich ein signifikant höherer DNA-Schaden als bei der Negativkontrolle.

#### 4.4. Auswirkungen von Stercobilin

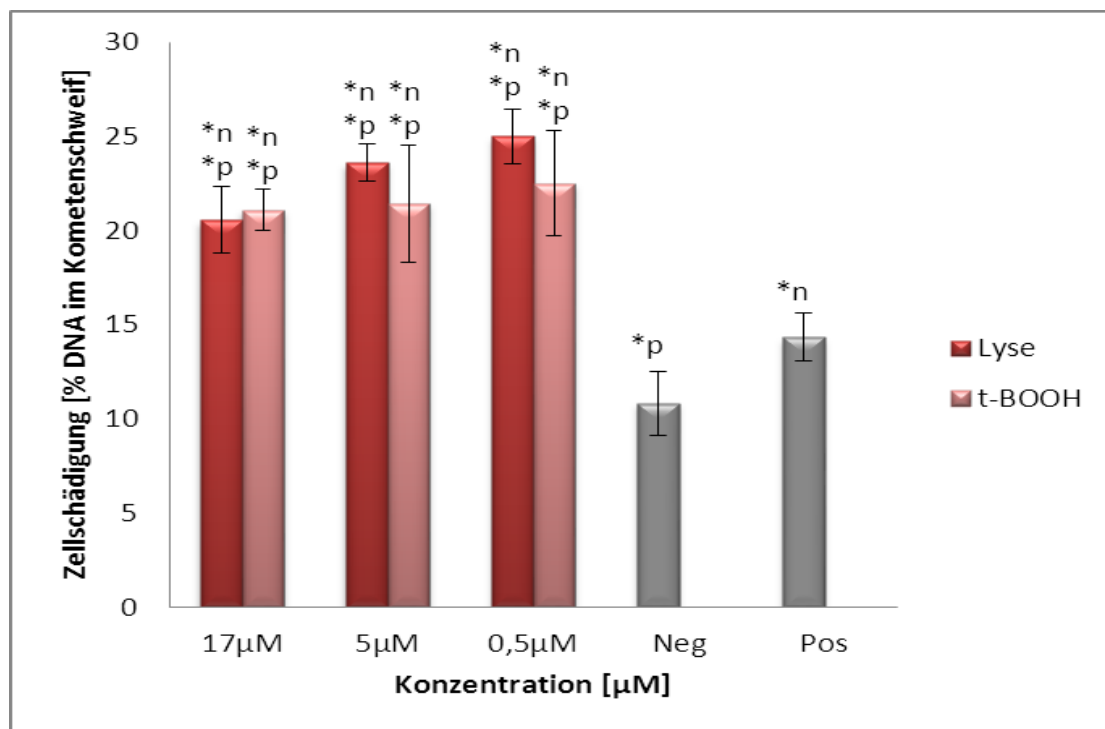


Abbildung 14: Ergebnis des Comet Assay der HepG2-Zellen nach einer Inkubation (24h) mit Stercobilin. Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Ergebnisse. \*n bzw. \*p kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Negativ- bzw. zur Positivkontrolle.

| Lyse    | 17µM  | 5µM   | 0,5µM | Negativ | Positiv |
|---------|-------|-------|-------|---------|---------|
| Negativ | 0,000 | 0,000 | 0,000 | -       | 0,050   |
| Positiv | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,050   | -       |

Tabelle 11: Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Stercobilin.

| <b>t-BOOH</b>  | <b>17µM</b> | <b>5µM</b> | <b>0,5µM</b> | <b>Negativ</b> | <b>Positiv</b> |
|----------------|-------------|------------|--------------|----------------|----------------|
| <b>Negativ</b> | 0,000       | 0,001      | 0,000        | -              | 0,050          |
| <b>Positiv</b> | 0,000       | 0,011      | 0,003        | 0,050          | -              |

*Tabelle 12: Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen bei zusätzlicher Stressung durch Tertiärbutylhydroperoxid nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Stercobilin.*

Die Positivkontrolle ist signifikant höher als die Negativkontrolle.

Stercobilin weist in den drei getesteten Konzentrationen (0,5µM, 5µM, 17µM) eine signifikant höhere DNA-Schädigung, gegenüber den unbehandelten Zellen (Negativkontrolle) und auch gegenüber jenen, die mit *t*-BOOH behandelt wurden (Positivkontrolle), auf. Es zeigt sich ein inverser konzentrationsabhängiger Zusammenhang ( $R^2=0,956$ ). Mit zunehmender Konzentration nimmt die DNA-Schädigung ab.

Auch alle drei Konzentrationen von Stercobilin, die zusätzlich mit *t*-BOOH behandelt wurden, weisen einen signifikant höheren DNA-Schaden als die Negativ- und Positivkontrolle auf. Auch hier zeigt sich ein inverser konzentrationsabhängiger Zusammenhang ( $R^2=0,9164$ ).

#### 4.5. Auswirkungen von Urobilin

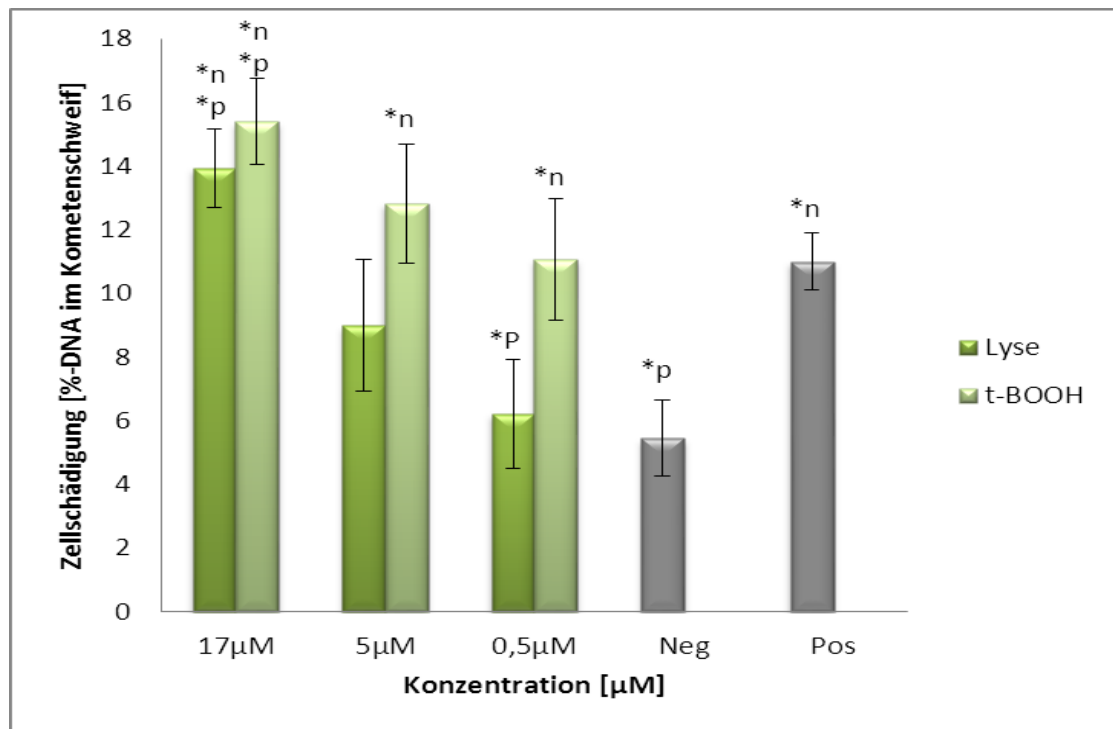


Abbildung 15: Ergebnis des Comet Assay der HepG2-Zellen nach einer Inkubation (24h) mit Urobilin. Die Abbildung zeigt ein Balkendiagramm mit Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Ergebnisse. \*n bzw. \*p kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Negativ- bzw. zur Positivkontrolle.

| Lyse    | 17µM  | 5µM | 0,5µM | Negativ | Positiv |
|---------|-------|-----|-------|---------|---------|
| Negativ | 0,000 | -   | -     | -       | 0,000   |
| Positiv | 0,009 | -   | 0,003 | 0,000   | -       |

Tabelle 13: Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Urobilin.

| <b><i>t</i>-BOOH</b> | <b>17µM</b> | <b>5µM</b> | <b>0,5µM</b> | <b>Negativ</b> | <b>Positiv</b> |
|----------------------|-------------|------------|--------------|----------------|----------------|
| <b>Negativ</b>       | 0,000       | 0,001      | 0,002        | -              | 0,000          |
| <b>Positiv</b>       | 0,001       | -          | -            | 0,000          | -              |

*Tabelle 14: Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) der Zellschädigung zwischen Negativkontrolle, Positivkontrolle und den getesteten Konzentrationen bei zusätzlicher Stressung durch Tertiärbutylhydroperoxid nach einer Inkubation (24h) der HepG2-Zellen mit Urobilin.*

Die Positivkontrolle ist signifikant höher als die Negativkontrolle.

Urobilin in der getesteten Konzentration von 0,5µM zeigt einen signifikant niedrigeren DNA-Schaden als die mit *t*-BOOH behandelten Zellen (Positivkontrolle). Bei zusätzlicher Behandlung mit *t*-BOOH ist der DNA-Schaden signifikant höher als bei den unbehandelten Zellen (Negativkontrolle).

Bei einer Konzentration von 5µM bei zusätzlicher Stressung mit *t*-BOOH ist die DNA-Schädigung signifikant höher als die der Negativkontrolle.

Der DNA-Schaden der 17µM Konzentration ist signifikant höher als die Negativkontrolle und auch als die Positivkontrolle. Dasselbe gilt für die Konzentration, die mit *t*-BOOH behandelt wurde.

Es zeigt sich für alle 3 Konzentrationen sowohl für die Lyse ( $R^2=0,9724$ ) als auch für *t*-BOOH ( $R^2=0,9879$ ) ein positiver konzentrationsabhängiger Zusammenhang. Die Zellschädigung nimmt von der niedrigsten Konzentration zur höchsten Konzentration zu.

## 4.6. Gesamtüberblick

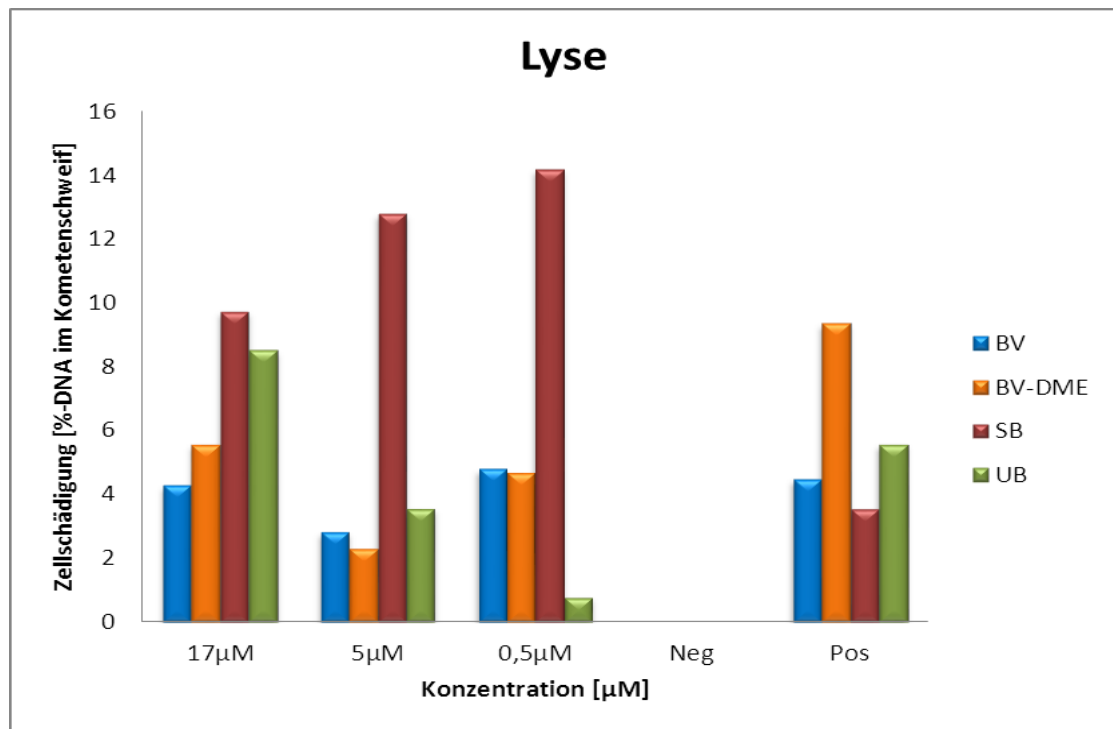


Abbildung 16: Gesamtüberblick (nur Lyse) der HepG2-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit den 4 Tetrapyrrolen Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die Abweichungen der getesteten Konzentrationen von den Null-gesetzten Negativkontrollen.

Stercobilin weist in allen drei Konzentrationen die höchste DNA-Schädigung im Vergleich zu den unbehandelten (Negativkontrolle), den mit *t*-BOOH behandelten Zellen (Positivkontrolle) und den anderen Pigmenten auf. Die DNA-Schädigung stieg zwischen 9,7% und 14,2% an (abhängig von der Konzentration) verglichen mit der Negativkontrolle.

Biliverdin zeigt auch in allen drei Konzentrationen eine signifikante DNA-Schädigung im Vergleich zur Negativkontrolle.

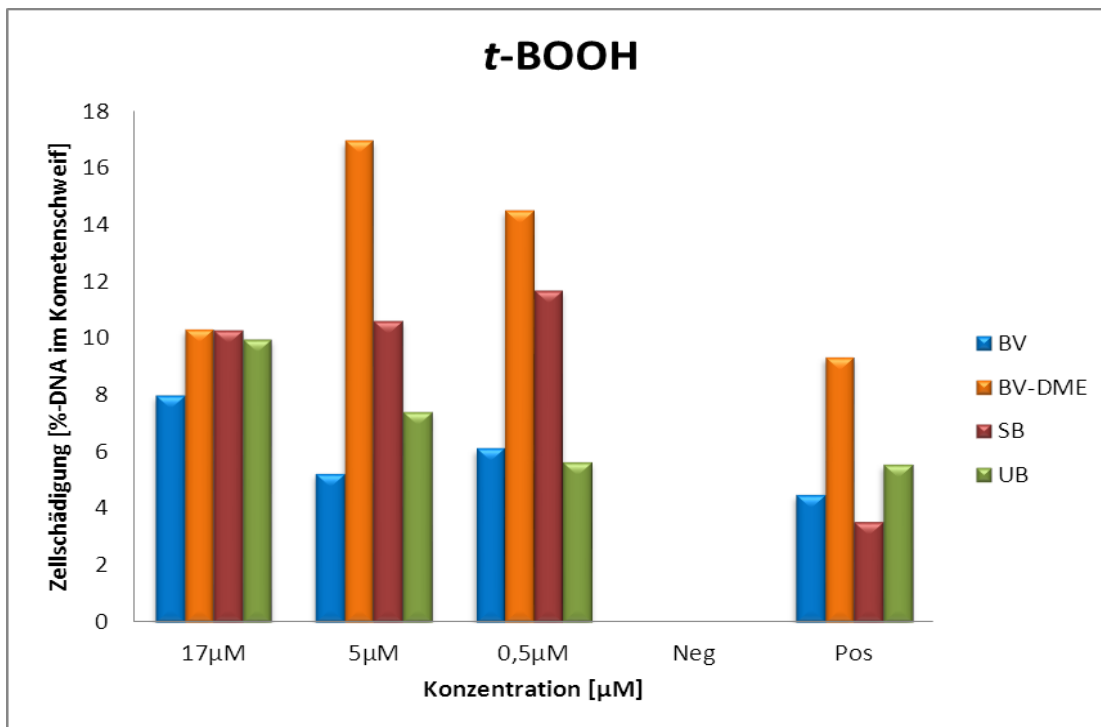


Abbildung 17: Gesamtüberblick (*t*-BOOH-Zugabe) der HepG2-Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit den 4 Tetrapyrrolen Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die Abweichungen der getesteten Konzentrationen von den Null-gesetzten Negativkontrollen.

Biliverdin-Dimethylester (0,5µM, 5µM) weist eine deutlich höhere DNA-Schädigung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Negativkontrolle), den mit *t*-BOOH behandelten Zellen (Positivkontrolle) und den anderen Pigmenten auf. Bei 0,5µM liegt die DNA-Schädigung +14,5% über jener der Negativkontrolle. Bei 5µM sind es +17,0%.

Stercobilin zeigt in allen drei getesteten Konzentrationen (0,5µM, 5µM, 17µM) eine deutlich höhere DNA-Schädigung als die mit *t*-BOOH behandelten Zellen (Positivkontrolle). Die DNA-Schädigung beträgt zwischen +10,3% und +11,7% abhängig von der jeweiligen Konzentration.



## 4.7. Diskussion

Diese *in vitro* Studie erfasste das antikanzerogene Potential von vier Tetrapyrrolen.

Die DNA-Schädigung der HepG2 Zellen wurde durch %DNA im Kometenschweif im Comet Assay ermittelt. Das Ausmaß der Zellschädigung gibt einen Hinweis auf eine antikanzerogene Wirkung.

Die antikanzerogene Wirkung von Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen ist generell noch wenig erforscht, weshalb vergleichbare Ergebnisse begrenzt vorhanden sind. Ähnliche Studien finden sich vor allem mit dem Gallenpigment Bilirubin. Die in der vorliegenden Studie getesteten Tetrapyrrole Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin wurden wenn überhaupt, eher am Rande behandelt. Dadurch ist die Diskussion und Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Studie mit anderen Ergebnissen schwierig, weshalb bei der Interpretation auf ähnliche Strukturen und andere Zelllinien zurückgegriffen wird.

Rao *et al.* haben den antikanzerogen Effekt von Bilirubin, Urobilin und Stercobilin auf menschliche Adenokarzinomzellen untersucht. Als Kontrolle wurde PBS verwendet. Nach einer 48-stündigen Inkubation mit Bilirubin zeigte sich eine Reduktion von  $\approx 50\%$  in der Zellpopulation. Urobilin und Stercobilin hingegen zeigten keine Veränderung (siehe Abb.18). Bilirubin hemmte die Zellproliferation und hinderte die Zellen am Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus, welche für die Zellproliferation essentiell ist. Bei Urobilin zeigte sich hingegen kein Effekt auf den Tumorzellzyklus. Ein Comet Assay wurde durchgeführt, um Effekte auf die DNA zu bestimmen. Betrachtet wurden die Auswirkungen unter dem Fluoreszenzmikroskop. 50-60% der Zellen zeigten eine DNA-Schädigung in Form des Kometenschweifs nach der Behandlung mit Bilirubin. Urobilin und Stercobilin zeigten keinen nennenswerten Effekt auf die Krebszelllinien (Magenkrebszellen TMK-1, HepG2 Zellen). Bilirubin hat

Apoptose in den Zellen ausgelöst, während Urobilin keine apoptotische Wirkung zeigte [RAO *et al.*, 2006].

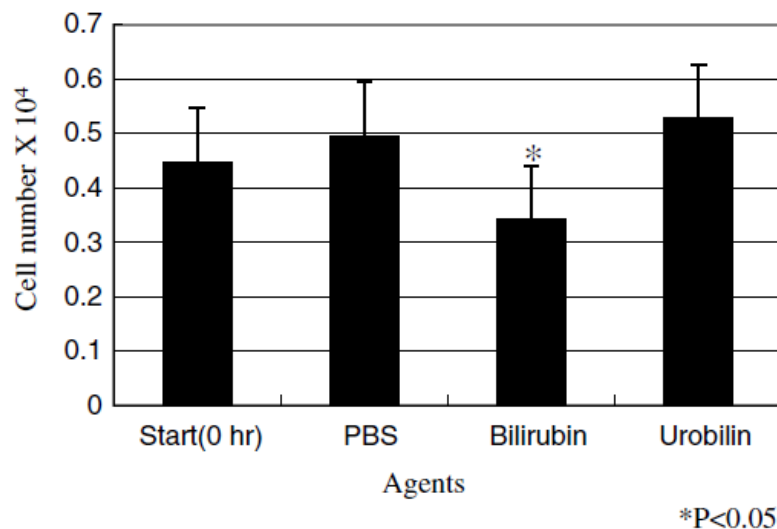


Abbildung 18: Reduktion in der Zellproliferation mit Bilirubin nach 48-stündiger Inkubation und Zellzahlbestimmung mit 1% Trypanblau (\* $p < 0,05$  kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Positivkontrolle) [RAO *et al.*, 2006]

Anders als bei der Studie von Rao *et al.* hat Urobilin in der vorliegenden Studie Auswirkungen auf die Krebszellen gezeigt. Allerdings war nur in der getesteten Konzentration von 17  $\mu\text{M}$  eine erhöhte Zellschädigung sichtbar. Außerdem schützte Urobilin die Zellen in der 5  $\mu\text{M}$  und 17  $\mu\text{M}$  Konzentration nicht vor dem Prooxidans *t*-BOOH, was positiv zu bewerten ist. Die Zellschädigung nimmt mit steigender Konzentration zu, weshalb hier ein Fokus auf die höheren physiologischen Konzentrationen gelegt werden sollte.

Auch Stercobilin zeigte, anders als in der Studie von Rao *et al.*, für alle drei Konzentrationen eine erhöhte Zellschädigung. Wobei die größte Schädigung jeweils bei der niedrigsten Konzentration auftrat. Stercobilin schützte in allen drei Konzentrationen die Zellen nicht vor *t*-BOOH.

Sowohl Urobilin als auch Stercobilin wiesen in unserer Arbeit abhängig von der jeweiligen Konzentration, einen antikanzerogenen Effekt auf. Vor allem aber bei

Stercobilin war diese Wirkung sehr ausgeprägt und in allen drei Konzentrationen signifikant.

Ergebnisse von Keshavan *et al.* zeigten, dass Bilirubin in physiologischen Konzentrationen Apoptose in Dickdarmkrebszellen auslösen kann. In dieser Studie wurden die Auswirkungen von Bilirubin, Biliverdin und Bilirubin-Ditaurat getestet. Bilirubin reduziert in physiologischen Konzentrationen von 0-50  $\mu\text{M}$  die Vitalität der Darmkrebszellen *in vitro*. Biliverdin (50  $\mu\text{M}$ ) und Bilirubin-Ditaurat (50  $\mu\text{M}$ ) hingegen, führten zu keiner Veränderung der Zellvitalität (siehe Abb. 19) [KESHAVAN *et al.*, 2004].

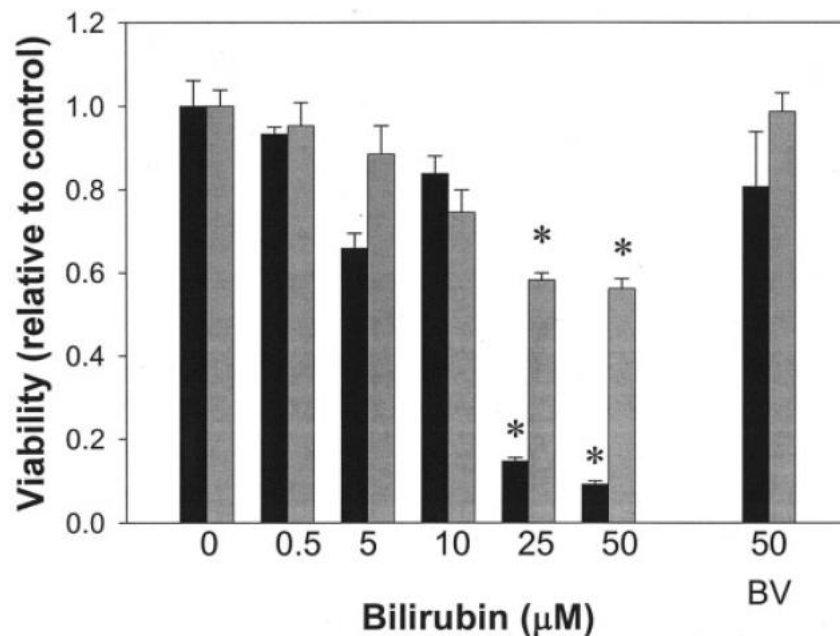


Abbildung 19: Effekte auf die Zellvitalität von Bilirubin (0-50  $\mu\text{M}$ ) und Biliverdin (BV, 50  $\mu\text{M}$ ) nach einer 48-stündigen Inkubation auf zwei verschiedene Darmkrebszelllinien. DMSO diente als Kontrolle (0  $\mu\text{M}$ ). Dargestellt werden Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (\* $p > 0,0001$  kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (DMSO)) [KESHAVAN *et al.*, 2004].

Im Gegensatz zu der Studie von Keshavan *et al.* zeigten sich in unserer Studie Effekte bei der Behandlung der Tumorzellen mit Biliverdin. Biliverdin führte zu

einem signifikant höheren DNA-Schaden in allen drei getesteten Konzentrationen. Es scheint zudem die Zellen nicht vor *t*-BOOH zu schützen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die höhere, nicht physiologische Konzentration (50µM) und die verschiedenen Krebszelllinien (unterschiedliche Darmkrebszellen) in der Studie von Keshavan *et al.* begründet sein.

Bei Biliverdin-Dimethylester zeigte sich eine zellschädigende Wirkung bei der niedrigsten und der höchsten Konzentration. Auch bietet eine Konzentration von 5µM keinen Schutz vor dem Prooxidans *t*-BOOH.

Die Studie von Öllinger *et al.* untersuchte die Effekte von Bilirubin auf das Wachstum von Krebszellen (unter anderem auch auf HepG2). Bei den HepG2-Zellen zeigten sich auch bei der niedrigsten Konzentration von 5µM Effekte auf das Tumorzellwachstum, während bei anderen Zelllinien erst höhere Konzentrationen (25µM, 125µM) Wirkung zeigten (siehe Abb. 20) [ÖLLINGER *et al.*, 2007].

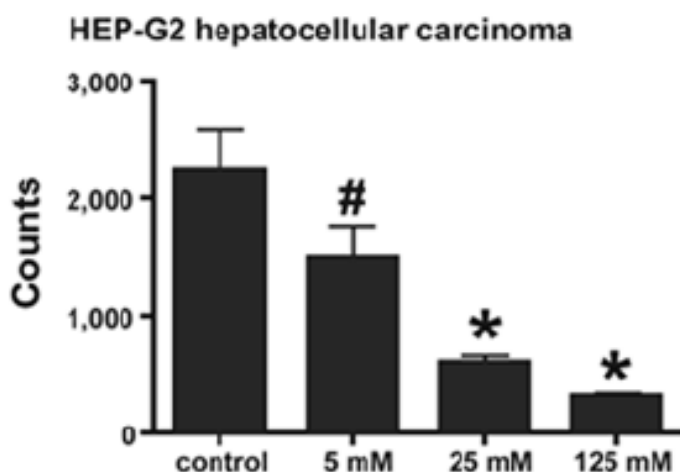


Abbildung 20: Bilirubin hemmt die Proliferation von HepG2-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Drei unterschiedliche Konzentrationen stehen im Vergleich zur Kontrollprobe (\* $p < 0,001$ ) [ÖLLINGER *et al.*, 2007].

Die Ergebnisse von Öllinger et al. lassen darauf schließen, dass Bilirubin antiproliferative Wirkung auf Krebszellen ausübt. Diese zeigte sich *in vitro* abhängig von der Zelllinie und der Konzentration [ÖLLINGER et al., 2007].

Protoporphyrin gehört, wie die in dieser Arbeit verwendeten Tetrapyrrole, ebenfalls zu dieser Strukturgruppe, zu den Porphyrinen. Protoporphyrin IX (PpIX) wird als Photosensibilisator bei der photodynamischen Therapie (PDT) verwendet [BEDNARZ et al., 2007]. PDT kann zur Behandlung von Krebs eingesetzt werden. Drei Komponenten werden für die Therapie benötigt: ein Photosensitizer, zellulärer Sauerstoff und Licht. Diese Therapie greift Krebszellen an durch die Schädigung von Organellen und die Beeinträchtigung von Stoffwechselwegen [ACKROYD et al., 2001].

Koningsberger et al. untersuchten die Auswirkungen von Protoporphyrin auf die Zellproliferation von HepG2-Zellen. Protoporphyrin IX und Hematoporphyrin IX wurden in Konzentrationen von 0,5-100µg/ml eingesetzt. Beide hemmten die Zellproliferation abhängig von der Konzentration und der Inkubationsdauer. Bei Protoporphyrin zeigte sich bei einer Konzentration von 20µg/ml ein zytotoxischer Effekt. Morphologische Veränderungen haben sich beim PpIX bei einer Konzentration von 5µg/ml nach einer Inkubation von 48 und 72 Stunden gezeigt. Darunter zeigten sich keine Effekte. Bei einer 24-stündigen Inkubation bei einer Konzentration von 10µg/ml wird die Membranintegrität der Zellen beeinträchtigt [KONINGSBERGER et al., 1995].

In der Studie von Bednarz et al. wurde der Einfluss von PpIX auf HeLa-Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) untersucht. Bei Konzentrationen von 0,8-20µg/ml wurde eine zytotoxische Wirkung von PpIX festgestellt. Jene Zellen die mit PpIX behandelt wurden, zeigten nach 24-stündiger Inkubation morphologische Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Es kam zu signifikanten Veränderungen der Membranpermeabilität. Die höhere Membranpermeabilität ist eine Folge von Zelltod und beeinträchtigter Zellmembranstruktur. Die Ergebnisse des Comet Assay weisen darauf hin, dass

PpIX eine Kondensation und Fragmentierung der HeLa-Zellen auslöst. Es konnte ein Apoptose abhängiger Zelltod bei HeLa-Zellen gezeigt werden [BEDNARZ *et al.*, 2007].

Pankau *et al.* konnten ebenfalls eine antikanzerogene Wirkung von Protoporphyrin IX aufzeigen. Untersucht wurde dieser Effekt an Kolonkrebszellen. Es interagiert mit dem p53 Tumorsuppressorprotein, welches Auslöser für die Tumorbildung sein kann [ZAWACKA-PANKAU *et al.*, 2007]. Dieses Protein dient als Regulator für das Überleben von Zellen und die Zellproliferation [SCHULTZ und HARRINGTON JR, 2003].

Eine Post-hoc Studie von Temme *et al.* beschäftigte sich mit dem Zusammenhang zwischen der Serum-Bilirubinkonzentration und dem Mortalitätsrisiko in einer repräsentativen Stichprobe der belgischen Bevölkerung. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass eine höhere Serum-Bilirubinkonzentration mit einer niedrigeren Krebsmortalität assoziiert ist. Außerdem sind Personen mit einem hohen Bilirubinspiegel in dieser Studie jünger, schwerer (gilt nur für die Männer) und größer. Des Weiteren hatten jene Personen mit einem hohen Bilirubinspiegel eine höhere Bildung und rauchten weniger. Auch in der Ernährung zeigten sich Unterschiede. Männer mit dem höchsten Bilirubinspiegel, hatten ein um 58% geringeres Risiko an Krebs zu erkranken im Vergleich zu Männern mit dem niedrigsten. Bei Frauen war das Risiko um 24% geringer, aber nicht signifikant [TEMME *et al.*, 2001].

Zucker *et al.* erkannten in ihrer Studie, dass der Serum-Bilirubinspiegel in der US-Bevölkerung einen Gender-Effekt und eine inverse Korrelation mit Darmkrebs aufweist. Es zeigte sich außerdem ein Zusammenhang zwischen dem Bilirubinspiegel, der Rasse und dem Rauchverhalten. Die durchschnittliche Bilirubinkonzentration ist bei Männern signifikant höher als bei Frauen. Steigt die Bilirubinkonzentration im Serum um 1,0mg/dl, sinkt die Prävalenz für Darmkrebs (OR=0,257) [ZUCKER *et al.*, 2004].

Wie sich in den Studien von Temme *et al.* und Zucker *et al.* zeigte, gibt es geschlechterspezifische Unterschiede den Bilirubinspiegel betreffend. Deshalb wäre es erforderlich eine antikanzerogene Wirkung geschlechtergetrennt zu erforschen. Weitere Einflussfaktoren wie Ernährung, Alter und Rauchverhalten wären zu berücksichtigen.

Bei den Studien zu Bilirubin und anderen chemischen Verwandten wie dem Protoporphyrin zeigt sich eine durchaus antikanzerogene Wirkung. Eine direkte Vergleichbarkeit ist allerdings aufgrund der unterschiedlichen Strukturen und Zelllinien nicht möglich. Allerdings zeigt sich auch in der vorliegenden Studie abhängig vom Gallenpigment und der Konzentration eine antikanzerogene Wirkung.

## 5. Schlussbetrachtung

Gallenpigmente kommen in menschlichen Zellen vor, hauptsächlich in der Leber, der Gallenblase und im Magen-Darm-Trakt. Sie gehören zur Gruppe der Tetrapyrrole und sind schlecht wasserlöslich. Gallenpigmente entstehen durch den Abbau von Hämoglobin. Sie gelangen über das Plasma in die Leber und verlassen den Körper im Stuhl und im Urin.

Ziel dieser *in vitro* Studie war es, herauszufinden wie sich vier ausgewählte Tetrapyrrole auf humane Krebszellen auswirken. Eine mögliche antikanzerogene Wirkung von Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin wurden mittels Comet Assay erfasst.

Die Zellen wurden in einer 6-Well-Platte ausgesät und schließlich 24 Stunden inkubiert, um ein Anwachsen zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die Gallenpigmente in drei verschiedenen Konzentrationen (0,5µM, 5µM, 17µM) hinzugefügt und die Zellen für genau 24 Stunden inkubiert. Durch die Anwendung des Comet Assay konnten DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche erfasst werden. Die Zellen wurden jeweils mit und ohne dem Prooxidans *t*-BOOH behandelt. Sie wurden getrennt lysiert und schließlich der Elektrophorese ausgesetzt. Durch die Färbung mit Ethidiumbromid konnte die DNA-Schädigung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfasst werden. Über das Ausmaß der Schädigung gibt der Prozentanteil der DNA im Kometenschweif Aufschluss. Für jedes Gallenpigment wurden zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

Stercobilin und Biliverdin zeigten in allen drei Konzentrationen eine DNA schädigende Wirkung auf die HepG2 Zellen. Vor allem Stercobilin zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle die deutlichsten Effekte. Biliverdin-Dimethylester induzierte in der geringsten Konzentration (0,5µM) und der höchsten Konzentration (17µM) DNA-Schädigung. Bei Urobilin zeigte sich nur bei einer Konzentration von 17µM DNA schädigende Wirkung.



Die vier getesteten Tetrapyrrole konnten die HepG2-Zellen nicht vor dem Prooxidans *t*-BOOH schützen. Bei Stercobilin war dieses Ergebnis in allen drei Konzentrationen signifikant.

Studien belegen bereits antioxidative, antiinflammatorische, antikomplementäre, antivirale, antiapoptotische und antimutagene Wirkung von Gallenpigmenten und diversen Tetrapyrrolen. In der vorliegenden Studie konnte abhängig von dem jeweiligen Tetrapyrrol und der jeweiligen Konzentration eine antikanzerogene Wirkung aufgezeigt werden. Allerdings muss diese durch weitere Studien noch untermauert werden. Auch dürfen die Ergebnisse nicht auf den gesamten Organismus übertragen werden, da es sich bei dieser *in vitro* Studie um isolierte Systeme handelt. Weiterführende Forschungsarbeit in diesem Bereich ist erforderlich um fundierte Aussagen treffen zu können.

## 6. Zusammenfassung

In Rahmen dieser Masterarbeit wurde die antikanzerogene Wirkung der Tetrapyrrole Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin auf HepG2-Zellen untersucht. Getestet wurden sie jeweils in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,5µM, 5µM, 17µM).

Die HepG2-Zellen wurden für 24 Stunden mit den Tetrapyrrolen inkubiert. Zur Ermittlung der DNA-Schäden durch die Tetrapyrrole wurde die Einzelzellgelelektrophorese (Single cell gel electrophoresis, Comet Assay) eingesetzt. Dadurch lassen sich sowohl DNA-Einzelstrang- als auch Doppelstrangbrüche nachweisen. Die negativ geladene DNA wandert während der Elektrophorese zur Anode, während die unbeschädigte DNA im Zellkern bleibt. Fragmente der denaturierten DNA wandern aus der Zelle. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ist das Ausmaß der DNA-Schädigung sichtbar. Erfasst wird die Schädigung durch den Prozentanteil der DNA im Kometenschweif.

Stercobilin und Biliverdin zeigten in allen drei Konzentrationen eine signifikante DNA-Schädigung im Vergleich zur Negativkontrolle. Biliverdin-Dimethylester wirkte in den Konzentrationen 0,5µM und 17µM DNA schädigend. Urobilin hingegen zeigte nur bei einer Konzentration von 17µM schädigende Wirkung auf die DNA. Durch Stressung mit dem Prooxidans *t*-BOOH, wurden die Zellen zusätzlich geschädigt. Positiv zu bewerten ist, dass keines der getesteten Tetrapyrrole die Zellen vor einer zusätzlichen Stressung schützen konnte.

Die Ergebnisse dieser *in vitro* Studie zeigen ein antikanzerogenes Potential der vier Tetrapyrrole, abhängig von der jeweiligen Konzentration.

## 7. Summary

Within this master thesis the anticancerogenic effect of the tetrapyrroles biliverdin, biliverdin dimethylester, stercobilin and urobilin on HepG2 cells was investigated. The tetrapyrroles were tested in three different concentrations (0.5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 17 $\mu$ M).

To measure DNA single and double strand breaks influenced by the bile pigments, the single cell electrophoresis (comet assay) was applied. The negatively charged DNA migrates to the anode, while the undamaged DNA remains in the nucleus during the electrophoresis. Under the fluorescence microscope the DNA damage can be measured as the percentage of DNA in the comet tail.

Stercobilin and Biliverdin showed significant DNA damaging properties in all three concentrations compared to the negative control. Biliverdin dimethylester had DNA damaging effects at the concentrations of 0.5 $\mu$ M and 17 $\mu$ M. Urobilin showed DNA damage only at the concentration of 17 $\mu$ M. In additional experiments cells were stressed with the pro-oxidant *t*-BOOH which induced DNA damage. None of the tested tetrapyrroles was able to protect the cells against the additional *t*-BOOH stress.

The results of this *in vitro* study show an anticancerogenic potential of the four tetrapyrroles, depending on the concentration applied.

## 8. Literaturverzeichnis

1. ACKROYD R, KELTY C, BROWN N, REED M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy¶. Photochemistry and Photobiology 2001;74(5):656-69. doi: 10.1562/0031-8655(2001)0740656thopap2.0.co2.
2. ADEN DP, FOGEL A, PLOTKIN S, DAMJANOV I, KNOWLES BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature 1979;282(5739):615-6.
3. ARIMOTO S, NEGISHI T, HAYATSU H. Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. Cancer Letters 1980;11(1):29-33. doi: 10.1016/0304-3835(80)90125-1.
4. ARRIAGA SM, MOTTINO AD, ALMARÁ AM. Inhibitory effect of bilirubin on complement-mediated hemolysis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1999;1473(2–3):329-36. doi: 10.1016/s0304-4165(99)00201-9.
5. ASAD SF, SINGH S, AHMAD A, HADI SM. Bilirubin/biliverdin–Cu(II) induced DNA breakage; reaction mechanism and biological significance. Toxicology Letters 2002;131(3):181-9. doi: 10.1016/s0378-4274(02)00031-0.
6. ATCC. Internet: <http://www.atcc.org/Attachments/1967.jpg> (accessed 27.06. 2012).
7. BARANANO DE, RAO M, FERRIS CD, SNYDER SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2002;99(25):16093-8. doi: 10.1073/pnas.252626999.

8. BEDNARZ N, ZAWACKA-PANKAU J, KOWALSKA A. Protoporphyrin IX induces apoptosis in HeLa cells prior to photodynamic treatment. *Pharmacol Rep* 2007;59(4):474-9.
9. BERLIN N, BERK P. Quantitative aspects of bilirubin metabolism for hematologists. *Blood* 1981;57(6):983-99.
10. BOSMA PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *Journal of Hepatology* 2003;38(1):107-17. doi: 10.1016/s0168-8278(02)00359-8.
11. BOSMA PJ, CHOWDHURY JR, BAKKER C, et al. The Genetic Basis of the Reduced Expression of Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome. *New England Journal of Medicine* 1995;333(18):1171-5. doi: 10.1056/NEJM199511023331802.
12. BRODERSEN R. Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid. *Journal of Biological Chemistry* 1979;254(7):2364-9.
13. BROWER JO, LIGHTNER DA, MCDONAGH AF. Aromatic congeners of bilirubin: synthesis, stereochemistry, glucuronidation and hepatic transport. *Tetrahedron* 2001;57(37):7813-27. doi: 10.1016/s0040-4020(01)00773-6.
14. BULMER AC, RIED K, BLANCHFIELD JT, WAGNER KH. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutation research* 2008;658(1-2):28-41. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.05.001.
15. BULMER AC, RIED K, COOMBES JS, BLANCHFIELD JT, TOTH I, WAGNER KH. The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2007;629(2):122-32. doi: 10.1016/j.mrgentox.2007.01.008.
16. CHEMSPIDER. Internet: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10628548.html> (accessed 26. April 2012).

17. CHEMSPIDER. Internet: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.22857732.html?rid=a63d5ea6-0afd-4043-9867-afea63cb73fb> (accessed 26. April 2012).
18. CHEMSPIDER. Internet: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16736732.html> (accessed 26. April 2012).
19. CHEMSPIDER. Internet: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4938471.html?rid=c2fed34e-cf2c-4a63-aa1c-70de8d5ddf3f> (accessed 26. April 2012).
20. CHEPELEV LL, BESHARA CS, MACLEAN PD, et al. Polypyrroles as antioxidants: kinetic studies on reactions of bilirubin and biliverdin dimethyl esters and synthetic model compounds with peroxy radicals in solution. Chemical calculations on selected typical structures. J Org Chem 2006;71(1):22-30. doi: 10.1021/jo051359e.
21. CHOUCROUN P, GILLET D, DORANGE G, SAWICKI B, DEWITTE JD. Comet assay and early apoptosis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 2001;478(1–2):89-96. doi: 10.1016/s0027-5107(01)00123-3.
22. DE FLORA S, ROSENKRANZ HS, KLOPMAN G. Structural basis of antimutagenicity of chemicals towards 4-nitroquinoline 1-oxide in Salmonella typhimurium. Mutagenesis 1994;9(1):39-45.
23. DUDNIK LB, TSYUPKO AN, KHRENOV AV, ALESSENKO AV. Effect of Bilirubin on Lipid Peroxidation, Sphingomyelinase Activity, and Apoptosis Induced by Sphingosine and UV Irradiation. Biochemistry (Moscow) 2001;66(9):1019-27. doi: 10.1023/a:1012329911696.
24. ERDOGAN D, GULLU H, YILDIRIM E, et al. Low serum bilirubin levels are independently and inversely related to impaired flow-mediated vasodilation and increased carotid intima-media thickness in both men

- and women. *Atherosclerosis* 2006;184(2):431-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2005.05.011.
25. FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation research* 1995;339(1):37-59.
  26. FANG J, AKAIKE T, MAEDA H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004;9(1):27-35. doi: 10.1023/B:APPT.0000012119.83734.4e.
  27. GOSSAUER A. Catabolism of Tetrapyrroles. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 1994;48(9):352-61.
  28. HATFIELD GL, BARCLAY LR. Bilirubin as an antioxidant: kinetic studies of the reaction of bilirubin with peroxy radicals in solution, micelles, and lipid bilayers. *Org Lett* 2004;6(10):1539-42. doi: 10.1021/ol040016k.
  29. JAMES GW. Stercobilin and Hematopoiesis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1955;3(1):64-71.
  30. KAPITULNIK J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. *Mol Pharmacol* 2004;66(4):773-9. doi: 10.1124/mol.104.002832.
  31. KAY IT, WEIMER M, WATSON CJ. The Formation in Vitro of (±)-Stercobilin from Bilirubin. *Journal of Biological Chemistry* 1963;238(3):1122-3.
  32. KEITEL V, NIES AT, BROM M, HUMMEL-EISENBEISS J, SPRING H, KEPPLER D. A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2). *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2003;284(1):G165-G74. doi: 10.1152/ajpgi.00362.2002.
  33. 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(3):433-45. doi: 10.1002/ijc.20418.
34. KLATSKIN G. Bile pigment metabolism. *Annu Rev Med* 1961;12:211-50. doi: 10.1146/annurev.me.12.020161.001235.
  35. KNASMÜLLER S, PARZEFALL W, SANYAL R, et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1998;402(1–2):185-202. doi: 10.1016/s0027-5107(97)00297-2.
  36. KOBAYASHI A, ISHIKAWA K, MATSUMOTO H, KIMURA S, KAMIYAMA Y, MARUYAMA Y. Synergetic Antioxidant and Vasodilatory Action of Carbon Monoxide in Angiotensin II–Induced Cardiac Hypertrophy. *Hypertension* 2007;50(6):1040-8. doi: 10.1161/hypertensionaha.107.097006.
  37. KONINGSBERGER JC, RADEMAKERS LHPM, VAN HATTUM J, et al. Exogenous protoporphyrin inhibits Hep G2 cell proliferation, increases the intracellular hydrogen peroxide concentration and causes ultrastructural alterations. *Journal of Hepatology* 1995;22(1):57-65. doi: 10.1016/0168-8278(95)80260-6.
  38. LÖFFLER E, PETRIDES PE, HEINRICH PC. *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007;8. Auflage:621-7.
  39. MACLEAN PD, CHAPMAN EE, DOBROWOLSKI SL, THOMPSON A, BARCLAY LRC. Pyrroles As Antioxidants: Solvent Effects and the Nature of the Attacking Radical on Antioxidant Activities and Mechanisms of Pyrroles, Dipyrinones, and Bile Pigments. *The Journal of Organic Chemistry* 2008;73(17):6623-35. doi: 10.1021/jo8005073.



40. MCDONAGH AF. The biliverdin-bilirubin antioxidant cycle of cellular protection: Missing a wheel? *Free Radic Biol Med* 2010;49(5):814-20. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.001.
41. MÜLLHAUPT B. Ikterus - Differentialdiagnostische Überlegungen. *Praxis* 2004;93(21):898-903. doi: 10.1024/0369-8394.93.21.898.
42. NAKAMURA T, SATO K, AKIBA M, OHNISHI M. Urobilinogen, as a Bile Pigment Metabolite, Has an Antioxidant Function. *Journal of Oleo Science* 2006;55(4):191-7.
43. NOVOTNÝ L, VÍTEK L. Inverse Relationship Between Serum Bilirubin and Atherosclerosis in Men: A Meta-Analysis of Published Studies. *Experimental Biology and Medicine* 2003;228(5):568-71.
44. ÖLLINGER R, KOGLER P, TROPMAIR J, et al. Bilirubin Inhibits Tumor Cell Growth via Activation of ERK. *Cell Cycle* 2007;6(24):3078-85.
45. OSTLING O, JOHANSON KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1984;123(1):291-8.
46. OSTROW JD, PASCOLO L, SHAPIRO SM, TIRIBELLI C. New concepts in bilirubin encephalopathy. *European Journal of Clinical Investigation* 2003;33(11):988-97.
47. OSTROW JD, TIRIBELLI C. Bilirubin, a curse and a boon. *Gut* 2003;52(12):1668-70.
48. OWENS D, EVANS J. Population studies on Gilbert's syndrome. *Journal of medical genetics* 1975;12(2):152-6.
49. PFLEGER B. Masterarbeit: Untersuchung der Effekte von Gallenpigmenten auf Caco 2 Zellen mittels SCGE Assay. 2011.

50. RAO P, SUZUKI R, MIZOBUCHI S, YAMAGUCHI T, SASAGURI S. Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human adenocarcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* 2006;342(4):1279-83. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.074.
51. RITTER JK, CHEN F, SHEEN YY, et al. A novel complex locus UGT1 encodes human bilirubin, phenol, and other UDP-glucuronosyltransferase isozymes with identical carboxyl termini. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267(5):3257-61.
52. ROJAS E, LOPEZ MC, VALVERDE M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1999;722(1–2):225-54. doi: 10.1016/s0378-4347(98)00313-2.
53. ROLO AP, PALMEIRA CM, HOLY JM, WALLACE KB. Role of Mitochondrial Dysfunction in Combined Bile Acid–Induced Cytotoxicity: The Switch Between Apoptosis and Necrosis. *Toxicological Sciences* 2004;79(1):196-204. doi: 10.1093/toxsci/kfh078.
54. RYTER SW. Bile pigments in pulmonary and vascular disease. *Frontiers in Pharmacology* 2012;3. doi: 10.3389/fphar.2012.00039.
55. SCHULTZ DR, HARRINGTON JR WJ. Apoptosis: Programmed cell death at a molecular level. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2003;32(6):345-69. doi: 10.1053/sarh.2003.50005.
56. SCHWERTNER HA, JACKSON WG, TOLAN G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. *Clinical Chemistry* 1994;40(1):18-23.
57. SCIENTIFIC F. Internet: <http://www.frontiersci.com> (accessed 19. April 2012).
58. SHAPIRO SM. Bilirubin toxicity in the developing nervous system. *Pediatric Neurology* 2003;29(5):410-21.

59. STOCKER R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 2004;6(5):841-9. doi: 10.1089/ars.2004.6.841.
60. STOCKER R, GLAZER AN, AMES BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(16):5918-22.
61. STRASSBURG CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2010;24(5):555-71. doi: 10.1016/j.bpg.2010.07.007.
62. TANAKA S, AKAIKE T, FANG J, et al. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br J Cancer* 2003;88(6):902-9.
63. TEMME E, ZHANG J, SCHOUTEN E, KESTELOOT H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes and Control* 2001;12(10):887-94. doi: 10.1023/a:1013794407325.
64. TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000;35(3):206-21. doi: 10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j.
65. TOMARO ML, BATLLE AM. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(3):216-20.
66. VAMVAKAS S, VOCK EH, LUTZ WK. On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol* 1997;27(2):155-74. doi: 10.3109/10408449709021617.
67. VERMA V, RAMESH V, TEWARI S, GUPTA R, SINHA N, PANDEY C. Role of bilirubin, vitamin C and ceruloplasmin as antioxidants in coronary artery disease [CAD]. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2005;20(2):68-74. doi: 10.1007/BF02867403.

68. VITEK L. Impact of serum bilirubin on human diseases. *Pediatrics* 2005;115(5):1411-2. doi: 10.1542/peds.2004-1796.
69. WANG X, CHOWDHURY JR, CHOWDHURY NR. Bilirubin metabolism: Applied physiology. *Current Paediatrics* 2006;16(1):70-4.
70. WEGIEL B, OTTERBEIN LE. Go green: the anti-inflammatory effects of biliverdin reductase. *Front Pharmacol* 2012;3:47. doi: 10.3389/fphar.2012.00047.
71. YUSUF AT, VIAN L, SABATIER R, CANO JP. In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using Hep G2 cells. *Mutation research* 2000;468(2):227-34.
72. 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. *J Biol Chem* 2007;282(4):2466-72. doi: 10.1074/jbc.M608906200.
73. 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(4):827-35. doi: 10.1002/hep.1840400412.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Ursula Schwarz, Bakk.rer.nat.  
 Adresse: Wallnerhof 7  
 2860 Kirchschlag  
 Geburtsdatum: 16.07.1989  
 Geburtsort: Oberpullendorf  
 Staatsbürgerschaft: Österreich  
 Telefon: 0676/5546657  
 E-Mail: schwarz.ursula@gmx.at



### Ausbildung

seit 10/2010 **Masterstudium Ernährungswissenschaften**  
 Studienzweig: Public Health Nutrition  
 Titel der Masterarbeit: „Untersuchung der antikanzerogenen Wirkung von Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin auf HepG2-Zellen“  
 Geplantes Studienende: Juli 2012

10/2007 – 11/2010 **Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften**

09/2003 – 06/2007 **Bundesoberstufenrealgymnasium unter besonderer Berücksichtigung der sportlichen Ausbildung Wiener Neustadt**  
 Reifeprüfung: 19.06.2007

### Berufserfahrung

01/2012 – 02/2012 **Verein für prophylaktische Gesundheitsarbeit (PGA) – Burgenland**  
 Praktikum in der Gesundheitsförderung. Betreuung der Gesunden Dörfer, Protokollierung, Erstellung von Präsentationen, Recherchearbeit, Öffentlichkeitsarbeit.

seit 01.2011 **SportSolutions Schwarz**  
 Projektmitarbeit beim Schulprojekt „Die Fitte Schule“. Durchführung von sportmotorischen Tests in Volks- und Hauptschulen.

- 10/2010 – 12/2010      **Abteilung für Ernährungsmedizin, Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde, Medizinische Universität Wien**  
Praktikum. Mitarbeit im Rahmen der Studie „The Soy Food Intervention Trial (SOY FIT) for the treatment of children and adolescents with the familial hypercholesterolaemia“.
- 08/2009                    **Kurzentrum Landsknechte GmbH Bad Schönau**  
Praktikum. Begleitung der Diätologin: Organisation und Betreuung von Entschlackungstagen, Erstellen und Halten eines gesamten Vortrag-Konzeptes, Recherchearbeit für Gäste, Teilnahme an Beratungsgesprächen.
- 07/2009, 07/2010        **Schwimmkurs im Burgbad Kirchschlag**  
Mitarbeit bei der Durchführung von Schwimmkursen für Anfänger und Fortgeschrittene.

## Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)  
Englisch (Gute Kenntnisse in Wort und Schrift)  
Französisch (Grundkenntnisse)

## EDV Kenntnisse

MS Office  
SPSS  
EndNote X5  
USDA Datenbank  
Adobe Photoshop, Adobe Illustrator  
Komet 5.5

## Ergänzende Kenntnisse

- Führerschein der Klasse B
- 06/2011                    Dipl. Pilatetrainerin
- 09/2006                    Lehrwart/ Fit Erwachsene

## Interessen

Laufen, Pilates, Snowboarden, Lesen