



MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Effekte von Urobilin, Stercobilin, Biliverdin und
Biliverdindimethylester auf DNA Einzel- und
Doppelstrangbrüche in Caco-2 Zellen“

Verfasserin

Elisabeth Putz, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc.)

Wien, September 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

DANKSAGUNG

In erster Linie gilt mein Dank Herrn Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner, dem Betreuer dieser Masterarbeit, der mir die Möglichkeit gab, dieses überaus interessante Thema zu bearbeiten, den Laborplatz bereitgestellt hat und immer ein geduldiger Ansprechpartner war.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Mag. Christine Mölzer für die Einschulung in die Zellkultur- und Laborarbeiten, die kompetente Betreuung und die vielen guten Ratschläge für das Schreiben der Arbeit. Sie hat weder Zeit noch Mühen gescheut um mir stets fachlich zur Seite zu stehen, meine Fragen zu beantworten und Probleme gemeinsam zu lösen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch Frau Dr. Ruth Quint aussprechen, die mir einen Büroplatz zum Schreiben meiner Arbeit zur Verfügung stellte. Danke für die vielen motivierenden Worte und für die netten Kaffeepausen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Laborpartnerin und Studienkollegin Ursula Schwarz, mit der die gemeinsame Studienzeit zu einem Lebensabschnitt wurde, an den ich mich immer gerne erinnern werde. Du hast mich immer motiviert und warst in allen Lebenslagen für mich da. Wir haben vieles zusammen erlebt und du bist eine Freundin fürs Leben für mich geworden!

Über allem steht natürlich der Dank an meine Eltern, die mich moralisch und finanziell immer unterstützt und meine Ziele niemals in Frage gestellt haben. Auch bedanken möchte ich mich bei meinen Großeltern, meinen Geschwistern, meinen Verwandten und meinen Freunden für die Motivation und den Zuspruch sowie für den Glauben an mich und meine Fähigkeiten. Ihr alle habt zu meinem Erfolg beigetragen!

Danke sagen möchte ich an dieser Stelle auch Thomas, dem wichtigsten Menschen in meinem Leben. Danke für dein Vertrauen und deine bedingungslose Unterstützung!

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung.....	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1. Hintergrund und Aufbau der Arbeit.....	1
1.1.1. Aufteilung der in vitro Studien - Comet Assay.....	1
1.2. Ziel der Arbeit.....	2
2. Literaturübersicht	3
2.1. Comet Assay	3
2.1.1. Prinzip des Comet Assay.....	4
2.2. Zellmodell Caco-2	4
2.3. Gallenpigmente und Tetrapyrrole	5
2.3.1. Verwendete Tetrapyrrole	7
2.3.1.1. Urobilin	7
2.3.1.1. Stercobilin.....	8
2.3.1.1. Biliverdin.....	9
2.3.1.1. Biliverdindimethylester.....	9
2.3.2. Metabolismus.....	10
2.3.3. Störungen des Metabolismus - Hyperbilirubinämie.....	12
2.3.3.1. Bilirubinurie.....	13
2.3.3.2. Kernikterus	13
2.3.3.3. Crigler-Najjar Syndrom	14
2.3.3.4. Lucey-Driscoll Syndrom.....	14
2.3.3.5. Gilbert's Syndrom	14
2.3.3.6. Dubin-Johnson Syndrom	15
2.3.3.7. Rotor-Syndrom	16
2.3.4. Antimutagene Effekte	16
2.3.4.1. Arbeiten mit Salmonella Mutagenitäts Assay	16
2.3.4.2. Zellbiologische Studien.....	18
2.3.4.3. Mutagene Wirkung	19
2.3.5. Antioxidative Effekte	19
2.3.5.1. BR-BV Redox Zyklus.....	21
2.3.6. Wirkung auf Apoptose	23
2.3.7. Anticancerogene Effekte.....	25
2.3.8. Antiinflammatorische und anti-Komplement Effekte	26
2.3.9. Pharmakokinetik und therapeutische Effekte.....	28
3. Material und Methoden.....	29
3.1. Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien	29
3.2. Methoden im Zellkulturlabor	31
3.2.1. Herstellung von Lösungen und Vorbereitungsarbeiten	32
3.2.2. Steriles Arbeiten	34
3.2.3. Zellpflege	34
3.2.3.1. Medienwechsel.....	35
3.2.3.2. Zellpassage	35

3.2.3.3.	Zellzahlbestimmung	36
3.2.3.4.	Auftauen und einfrieren der Zellen	37
3.2.4.	Zellvorbereitung auf den Comet Assay.....	37
3.2.4.1.	Aussaat der Zellen – Tag 1	37
3.2.4.2.	Inkubation mit Pigment – Tag 2.....	38
3.2.5.	Arbeitsablauf Elektrophorese - Tag 3	39
3.2.5.1.	Zellen ablösen und Zellzahl bestimmen	39
3.2.5.2.	Aufbringen auf Objektträger	40
3.2.5.3.	t-BOOH/Lyse Behandlung.....	41
3.2.5.4.	Elektrophorese	41
3.3.	Auswertung	42
3.3.1.	Gefahrenpotential Ethidiumbromid	43
3.4.	Statistische Auswertung	43
3.5.	Arbeitsablauf	44
3.5.1.	Testaufbau.....	44
3.5.2.	Wochenrhythmus.....	44
4.	Ergebnisse und Diskussion	46
4.1.	Effekte der Tetrapyrrole auf Caco-2 Zellen	47
4.1.1.	Urobilin	47
4.1.2.	Stercobilin.....	49
4.1.3.	Biliverdin	51
4.1.4.	Biliverdindimethylester.....	53
4.2.	Ergebnisse - Gesamtgrafiken.....	54
4.2.1.	Lyse	54
4.2.2.	t-BOOH.....	55
4.3.	Korrelationen.....	56
4.4.	Diskussion.....	58
5.	Schlussbetrachtung.....	65
6.	Zusammenfassung.....	67
7.	Summary.....	69
Literaturverzeichnis.....		71
8.	Lebenslauf	77

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufteilung in vitro Studien	1
Abbildung 2: Caco-2 Zellkultur [ATCC, 2012]	5
Abbildung 3: Struktur Urobilin [CHEMSPIDER, 2012].....	8
Abbildung 4: Struktur Stercobilin [CHEMSPIDER, 2012]	8
Abbildung 5: Struktur Biliverdin [CHEMSPIDER, 2012]	9
Abbildung 6: Struktur Biliverdindimethylester [CHEMSPIDER, 2012]	10
Abbildung 7: Häm Katabolismus [RYTER, 2012]	12
Abbildung 8: Biliverdin-Bilirubin Redox Zyklus [SEDLAK und SNYDER, 2004]	22
Abbildung 9: Laminar Flow und Zellpassage	36
Abbildung 10: Zellpassage	36
Abbildung 11: Zellsuspension mit Tetrapyrrol	40
Abbildung 12: Objektträger beschriften.....	40
Abbildung 13: Vorbereitung der Objektträger.....	42
Abbildung 14: Elektrophorese	42
Abbildung 15: Caco-2 Zellen im Auswertungsprogramm Comet 5.5.....	43
Abbildung 16: Arbeitsschema Wochenrhythmus.....	45
Abbildung 17: Effekte von Urobilin im Comet Assay; das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der %tail DNA Gehalte der Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Urobilin von zwei unabhängigen Versuchen (Lyse und t-BOOH Behandlung) im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle. Mit *p und/oder *n gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).....	47
Abbildung 18: Effekte von Stercobilin im Comet Assay; das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der %tail DNA Gehalte der Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Stercobilin von zwei unabhängigen Versuchen (Lyse und t-BOOH Behandlung) im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle. Mit *p und/oder *n gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).....	49
Abbildung 19: Effekte von Biliverdin im Comet Assay; das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der %tail DNA Gehalte der Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Biliverdin von zwei unabhängigen Versuchen (Lyse und t-BOOH Behandlung) im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle. Mit *p und/oder *n gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).....	51
Abbildung 20: Effekte von Biliverdindimethylester im Comet Assay; das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der %tail DNA Gehalte der Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Biliverdindimethylester von zwei unabhängigen Versuchen (Lyse und t-BOOH Behandlung) im Vergleich zu	

Positiv- und Negativkontrolle. Mit *p und/oder *n gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).	53
Abbildung 21: Gesamtübersicht der Ergebnisse aller Tetrapyrrole nach dem Comet Assay – Lyse. Im Balkendiagramm sind die Unterschiede der einzelnen Pigmentkonzentrationen sowie der Positivkontrolle zur hier null gesetzten Negativkontrolle dargestellt. Mit *n und/oder *p gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).	54
Abbildung 22: Gesamtübersicht der Ergebnisse aller Tetrapyrrole nach dem Comet Assay – t-BOOH. Im Balkendiagramm sind die Unterschiede der einzelnen Pigmentkonzentrationen sowie der Negativkontrolle zur hier null gesetzten Positivkontrolle dargestellt. Mit *n und/oder *p gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).	55
Abbildung 23: Effekt von Hämin in verschiedenen Konzentrationen auf DNA Schäden in Caco-2 Zellen, ermittelt durch den Comet Assay. Die Zellen wurden zuvor 6h mit dem Hämin inkubiert. **= $p < 0,01$ [ISHIKAWA et al., 2010]	62

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Geräte	29
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 3: Chemikalien und Medien.....	31
Tabelle 4: Testaufbau	44
Tabelle 5: UB Lyse - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Urobilin.	47
Tabelle 6: UB t-BOOH - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Urobilin und t-BOOH Behandlung. ..	48
Tabelle 7: SB Lyse - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche;; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Stercobilin.	49
Tabelle 8: SB t-BOOH - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche;; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Stercobilin und t-BOOH Behandlung.	50

Tabelle 9: BV Lyse – Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Biliverdin.....	51
Tabelle 10: BV t-BOOH - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Biliverdin und t-BOOH Behandlung. 52	52
Tabelle 11: BVDME Lyse - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche;; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Biliverdindimethylester.....	53
Tabelle 12: BVDME t-BOOH - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche;; Signifikanzen der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Biliverdindimethylester und t-BOOH Behandlung.	54
Tabelle 13: Ergebnisse der Korrelationsanalysen der DNA Schädigung in Caco-2 Zellen; r =Korrelationskoeffizient, Signifikante Korrelation wenn $p < 0,05$;	56

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erklärung
%tail DNA	prozentualer Anteil an DNA im Kometenschweif
*n	signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle
*p	signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle
B[α]P	Benzo[α]pyren
V79 Zellen	Hamster Lungenzellen
BR	Bilirubin
BRDME	Bilirubindimethylester
BRT	Bilirubinditaurat
BV	Biliverdin
BVDME	Biliverdindimethylester
BVR	Biliverdinreduktase
Caco-2 Zellen	humane, colorectale Adenocarcinomzellen
CLP	Chlorophyllin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	Fetal Bovine Serum
HCT-15 Zellen	humane Colonkrebszellen
HeLa Zellen	humane Zervix Carcinomzellen
HepG2 Zellen	humane, hepatozelluläre Carcinomzellen
HO-1,2,3	Häm Oxygenase-1,2,3
HRT-18 Zellen	humane colorectale Adenocarcinomzellen
<i>i.d.</i>	<i>intraduodenal</i>
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
LMA	Low Melting Agarose
NMA	Normal Melting Agarose
P/S	Penicillin Streptomycin (Antibiotikum)
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDT	photodynamische Therapie

PRO	Protoporphyrin
RO(N)S	reaktive Sauerstoff und Stickstoff Spezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SB	Stercobilin
<i>t</i> -BOOH	Tertiärbutyl Hydroperoxid
TMK-1 Zellen	humane Magenadenocarcinomzellen
Tris	Trizma Base
UB	Urobilin
UDP-GT	Uridin Diphosphat – Glucuronosyltransferase
WI38 Zellen	humane Lungenzellen
ZK	Zellkultur

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Hintergrund und Aufbau der Arbeit

Die vorliegende Masterarbeit wurde im Rahmen des internationalen FWF-Projekts Physiological Relevance of Bile Pigments der antiOX Arbeitsgruppe (Emerging Field Oxidative Stress and DNA Stability) an der Universität Wien, Department für Ernährungswissenschaften, durchgeführt. Das 2009 gestartete Projekt findet in Kooperation mit der Griffith University Australien statt.

1.1.1. Aufteilung der *in vitro* Studien - Comet Assay

In diesem Projektteil wurden die Auswirkungen von acht Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen auf Caco-2 (humane, colorectale Adenocarcinomzellen) und HepG2 (humane, hepatozelluläre Carcinomzellen) Zellen mittels Comet Assay untersucht. Getestet wurden die Gallenpigmente und Tetrapyrrole Bilirubin (BR), Bilirubindimethylester (BRDME), Bilirubinditaurat (BRT), Protoporphyrin (PRO), Urobilin (UB), Stercobilin (SB), Biliverdin (BV) und Biliverdindimethylester (BVDME). Daraus entstanden vier Masterarbeiten, die wie in Abbildung 1 gezeigt aufgeteilt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von UB, SB, BV und BVDME auf Caco-2 Zellen getestet.

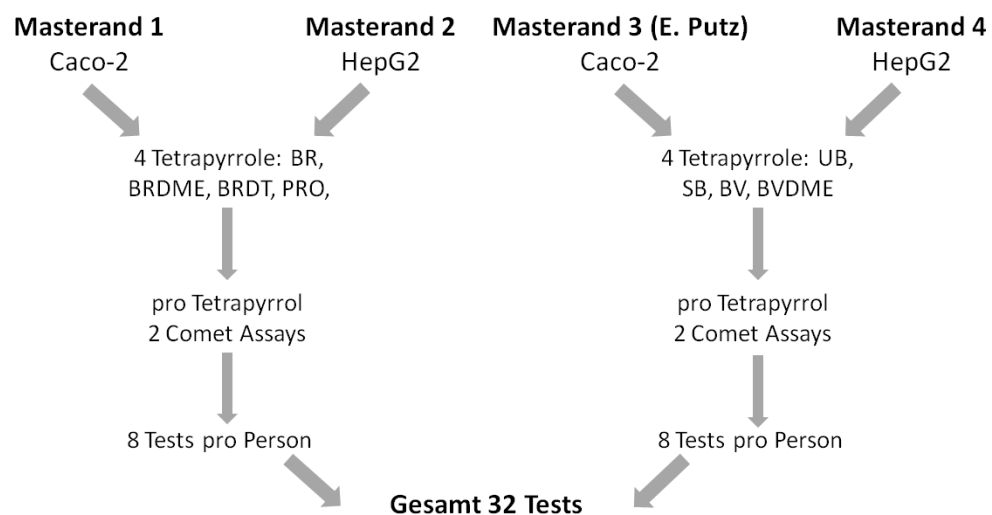


Abbildung 1: Aufteilung der *in vitro* Studien

1.2. Ziel der Arbeit

Man weiß heute, dass Gallenpigmente und die im Stoffwechsel entstehenden Tetrapyrrole eine physiologisch bedeutende Rolle spielen. Diese genauer zu erforschen ist Ziel des FWF-Projekts.

In der Literatur zu Gallenpigmenten und anderen Tetrapyrrolen sind vielfältige *in vivo* und *in vitro* Wirkungen dieser Stoffe dokumentiert, darunter antioxidative, anticancerogene und antimutagene Effekte. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den *in vitro* Einfluss der Tetrapyrrole Urobilin, Stercobilin, Biliverdin und Biliverdindimethylester auf humane Caco-2 Zellen mittels Comet Assay zu untersuchen, da es in diesem Kontext zum Zeitpunkt des Projektstarts noch keine vergleichbaren Studien gab. Die Laborversuche dieser Masterarbeit wurden zusammen mit Ursula Schwarz durchgeführt. Sie testete die Wirkung der oben genannten Tetrapyrrole auf humane HepG2 Zellen.

2. Literaturübersicht

2.1. Comet Assay

Die Grundidee für die Methode des Comet Assay entstand in den 1970er Jahren durch Cook und seine Arbeitsgruppe. Sie untersuchten die Zellkernstruktur von menschlichen Zellen durch eine Lysebehandlung [COLLINS, 2004].

Dieses Prinzip bauten Östling und Johanson 1984 aus und führten erstmals den Comet Assay zur direkten Visualisierung von DNA Schäden durch. Die Methode wurde damals auch als single cell gel assay (SCE) oder microgel electrophoresis (MGE) bezeichnet. Da die Zellen nach der Behandlung visuell Kometen ähnelten, entstand der Name Comet Assay für diese Methode. Östling und Johnson verwendeten für ihre Versuche Zellen von Patienten, die einer Strahlentherapie unterzogen wurden. Mit dieser Methode konnten zunächst nur DNA Einzelstrangbrüche sichtbar gemacht werden. Östling und Johanson verwendeten einen pH-Wert von unter 10 bei ihrer Zelllyse. Diese Variante wird heute als neutraler Comet Assay bezeichnet [FAIRBAIRN *et al.*, 1995]. Die aktuell weitaus häufiger verwendete Variante ist aber der weiterentwickelte alkalische Comet Assay, da mit ihm sowohl Einzel- als auch Doppelstrangbrüche detektiert werden können [COLLINS, 2004].

Heute ist neben Comet Assay der Name single cell gel electrophoresis (SCGE) die übliche Bezeichnung für die Methode. Der Comet Assay entwickelte sich schnell zu einer Standardmethode bei der Erfassung von DNA Schäden und Reparatur in eukaryotischen Zellen aller Art. Er wird in verschiedensten Bereichen, von der Grundlagenforschung bis hin zu humanen Biomonitoring Studien, angewendet. Durch die einfache und schnelle Art, mit der man mit dem Comet Assay sensitive Ergebnisse erhält, erfreut sich die Methode an Beliebtheit und erhält einen großen wirtschaftlichen Pluspunkt [COLLINS, 2004].

2.1.1. Prinzip des Comet Assay

Zur Durchführung des Comet Assay werden die Versuchszellen mit Agarose auf einem Objektträger fixiert und dann einer Lyse unterzogen, die das Zellgerüst entfernt und die DNA in einem kleinen Hohlraum zurücklässt. In der anschließenden Elektrophorese wird die negativ geladene DNA in Richtung Anode gezogen, wobei nur beschädigte DNA in die Agarose wandert und intakte DNA im Hohlraum verbleibt. Es können sowohl DNA Einzelstrangbrüche als auch Doppelstrangbrüche detektiert werden [MCART *et al.*, 2009]. Die DNA wird durch das Färben der Agarose mit einem DNA bindenden Farbstoff, der sich in die DNA einlagert, sichtbar gemacht. Hierzu wird am häufigsten Ethidiumbromid verwendet. Im Anschluss an das Färben können die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop bewertet werden. Es gibt die Möglichkeit verschiedene Parameter, wie die Länge des Kometenschweifes (tail length), die relative Fluoreszenz von Kometenkopf und Schweif (percentage of DNA in tail oder %tail DNA) oder den tail moment (Produkt aus tail length und %tail DNA) zu messen, wobei der Parameter %tail DNA der beste und verlässlichste zur Messung von DNA Schäden ist [COLLINS, 2004].

2.2. Zellmodell Caco-2

Die permanente Caco-2 Zelllinie wurde in den 1970iger Jahren von J. Fogh im Solan Kettering Institute, NY aus einem menschlichen Colonadenocarcinom isoliert [FERRUZZA *et al.*, 2012; FOGH *et al.*, 1977]. Damals wurde diese Isolierung durchgeführt, um Mechanismen im Krebsgeschehen und die Wirkung von Zytostatika mit Hilfe der gewonnenen Zelllinie zu untersuchen. Heute werden Caco-2 Zellen häufig auch als Modell für das intestinale Epithel verwendet, da sie in konfluenter Kultur durch Differenzierung einige morphologische und biochemische Merkmale der Dünndarm Enterozyten ausbilden. Hier wird auf die Caco-2 Zelllinie zurückgegriffen, da es schwierig ist, kulturfähige intestinale Zelllinien aus normalem Gewebe zu gewinnen [SAMBUY *et al.*, 2005].

Caco-2 Zellen sind ein nützliches und häufig verwendetes Forschungsmodell in den Bereichen Ernährung, Pharmakologie und Toxikologie. Um möglichst

vergleichbare Studienergebnisse zu erhalten ist es von großer Bedeutung, auf einheitliche Kulturbedingungen wie Passagezahl, Aussaatdichte und –zahl, Durchführungszeitpunkt oder Medienzusammensetzung zu achten. Diese haben eine erwiesene Bedeutung für die Ausprägung von morphologischen und funktionellen Eigenschaften der Zellen [SAMBUY *et al.*, 2005].

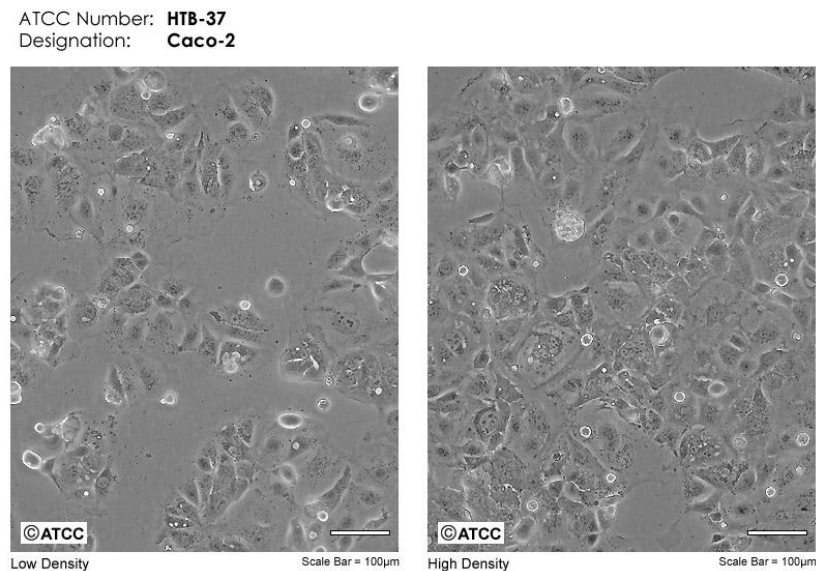


Abbildung 2: Caco-2 Zellkultur [ATCC, 2012]

2.3. Gallenpigmente und Tetrapyrrole

Gallenpigmente sind endogene Stoffe, die zur Klasse der Porphyrine gezählt werden und eine Tetrapyrrolstruktur aufweisen [BULMER *et al.*, 2008]. 1864 isolierte George Stadeler ein dunkelrotes Gallenpigment und gab ihm den Namen Bilirubin. Er erkannte, dass dieses Gallenpigment für die Gelbfärbung der Haut bei Gelbsuchtpatienten verantwortlich ist. Zehn Jahre später zeigte Tarchanoff durch die intravenöse Injektion von Blutfarbstoffen und die daraus resultierende Mehrbildung von Gallenpigmenten, dass Gallenpigmente aus Blutfarbstoffen gebildet werden [BOSMA, 2003].

Vor 1980 war die vorherrschende Meinung, dass Gallenpigmente nur Nebenprodukte des Hämabbaus sind, die bei Akkumulation toxisch wirken können und dass ihnen keine besondere Bedeutung zukommt [BULMER *et al.*, 2008]. Von chinesischen Medizinerinnen hingegen wurden die Salze des

Gallenpigmentes Bilirubin schon in der Antike als Arzneimittel zur Heilung von Krankheiten eingesetzt [RAO *et al.*, 2006]. Hippokrates zählte zu den vier wichtigsten Körperflüssigkeiten die gelbe und die schwarze Galle und auch in der traditionellen indischen Heilkunst, dem Ayurveda, ist die Galle einer der drei wichtigsten Faktoren der Gesundheit. In den vergangenen drei Jahrhunderten wurden die chemische Struktur und der Metabolismus von Bilirubin akribisch untersucht und aufgeklärt [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

Der Produktionsort der Gallenpigmente ist das retikuloendotheliale System in Leber und Milz. Im menschlichen Stoffwechsel werden täglich rund 300mg Gallenpigmente produziert und sowohl über den Faeces als auch, in geringeren Mengen, über den Harn ausgeschieden [STOCKER, 2004]. Die Tatsache, dass Gallenpigmente endogene Verbindungen sind und ubiquitär im gesamten menschlichen Körper sowie konzentriert im Verdauungstrakt in unkonjugierter und konjugierter Form vorkommen, gibt Grund zur Annahme, dass Gallenpigmente eine physiologische Relevanz haben [BULMER *et al.*, 2008].

Besonders in der Neugeborenenphase könnte die antioxidative Wirkung dieser Gallenpigmente eine Rolle spielen, da in dieser Phase das Level an anderen natürlichen Antioxidantien relativ gering ist. Die Absorption von Bilirubin aus dem Intestinaltrakt ist unter Anwesenheit von Muttermilch erhöht, was zur Neugeborenenhyperbilirubinämie beitragen könnte. Bilirubin hat zytoprotektive Effekte, wirkt in höheren Konzentrationen aber toxisch [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

In zahlreichen Studien zeigten Bilirubin und Biliverdin eine Schutzwirkung vor Lipid- und Proteinoxidation. Sie schützen sowohl Zellwände als auch DNA vor oxidativen Schäden [MINETTI *et al.*, 1998; STOCKER, 2004]. Es existieren auch zahlreiche Studien, welche auf weitere physiologische Wirkungen der Gallenpigmente hinweisen. Dazu zählen anti-Komplement Eigenschaften [ARRIAGA *et al.*, 1999; NAKAGAMI *et al.*, 1993], antiinflammatorische [QIN, 2002], antivirale [MORI *et al.*, 1991], antiapoptotische [DUDNIK *et al.*, 2001], anticancerogene [KESHAVAN *et al.*, 2004; RAO *et al.*, 2006] und antimutagene

Wirkungen [BULMER *et al.*, 2007; KATOH *et al.*, 1983], welche die Theorie, dass Gallenpigmente mehr als nur Nebenprodukte des Häm Abbaus sind, bestärken [BULMER *et al.*, 2007]. Darüber hinaus finden sich in der Literatur auch Hinweise, dass Gallenpigmente essentielle Stoffe für den Menschen sind [BULMER *et al.*, 2008].

2.3.1. Verwendete Tetrapyrrole

In diesem FWF-Projektteil wurde mit dem Gallenpigment Biliverdin sowie mit den Tetrapyrrolen Biliverdindimethylester, Urobilin und Stercobilin gearbeitet.

2.3.1.1. Urobilin

Urobilin ist das Oxidationsprodukt vom farblosen Urobilinogen, ist gelb gefärbt und trägt zur normalen Farbgebung von Faeces und Harn bei [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011]. Schon 1869 konnte Jaffe Urobilin als roten Bestandteil im Harn feststellen. Er nahm an, dass das Chromogen des Urobilins aus der Galle stammt [FALK, 1989].

Bilirubin Glucuronide, die den Intestinaltrakt erreichen, werden zum Teil reabsorbiert und zu einem anderen Teil von den intestinalen Bakterien dekonjugiert und somit zu einer Reihe von Urobilinogenen und verwandten Produkten, die nicht glucuronidiert werden, abgebaut. Urobilinogene werden reabsorbiert und über die Galle sowie in geringeren Mengen über den Urin ausgeschieden. Die Abwesenheit von Urobilinogenen im Urin und Faeces deutet auf eine totale Obstruktion der Gallenwege hin, hervorgerufen durch eine schwere Cholestase oder Hepatitis. Bei vielen Lebererkrankungen und bei erhöhter Bilirubin Produktion ist die Urobilinogen Ausscheidung über den Urin erhöht [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

Da bei Neugeborenen die intestinalen Mikroorganismen noch nicht voll entwickelt sind, fehlen die Bilirubin reduzierenden Bakterien. Somit werden in dieser Lebensphase keine Urobilinogene gebildet. Bei Erwachsenen hingegen sind Urobilinogene die Hauptgallenpigmente im Faeces [VÍTEK *et al.*, 2005].

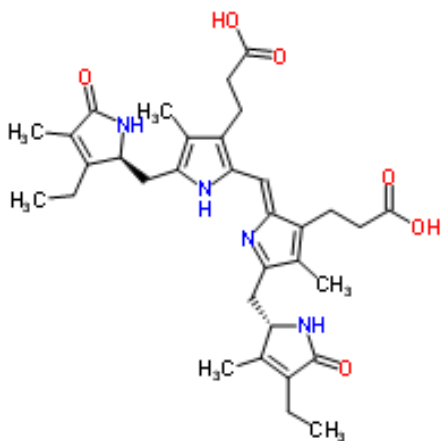


Abbildung 3: Struktur Urobilin [CHEMSPIDER, 2012]

2.3.1.1. Stercobilin

Wie Urobilinogen und Urobiline entstehen auch Stercobilinogen und Stercobilin durch Abbau von Bilirubin im Intestinaltrakt. Dieser Abbau erfolgt durch bakterielle Reduktion des Bilirubins zu Stercobilinogen. Stercobilinogen ist am C10 Atom leicht oxidierbar und wird so mit Hilfe des vorhandenen Sauerstoffs zum Oxidationsprodukt Stercobilin umgebaut [BOIADJIEV und LIGHTNER, 1999].

Bereits 1871 wurde Stercobilin erstmals in der Literatur erwähnt [FALK, 1989], 1932 wurde es in kristalliner Form isoliert und identifiziert. Stercobilin ist braun gefärbt und trägt ebenfalls zur Farbe des Faeces bei [BOIADJIEV und LIGHTNER, 1999].

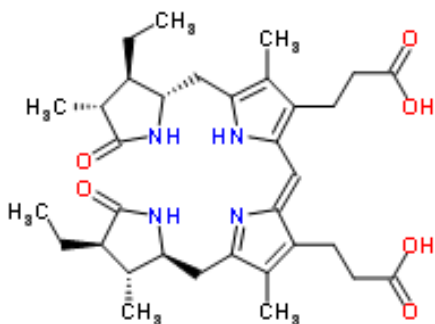


Abbildung 4: Struktur Stercobilin [CHEMSPIDER, 2012]

2.3.1.1. Biliverdin

Das unkonjugierte Gallenpigment Biliverdin ist wie Bilirubin eine Dicarboxylsäure mit dreidimensionaler, Tetrapyrrolstruktur und gehört zur Klasse der Porphyrine [BULMER *et al.*, 2007]. Die vier Pyrrolringe des Biliverdins sind über Methinbrücken miteinander verbunden [FALK, 1989].

Biliverdin entsteht beim Häm-Katabolismus in Wirbeltieren als Vorläufer von Bilirubin und ist wasserunlöslich [MCDONAGH, 2010]. Es kommt unter anderem auch im Körper von Schmetterlingen und Fischen, in der Milch von Büffeln oder in der Schale von Vogeleiern vor [FALK, 1989]. Zahlreiche Studien haben eine antioxidative Wirkung von Biliverdin gezeigt, wodurch dem Gallenpigment eine große physiologische Bedeutung zukommt. Biliverdin entsteht ebenso im menschlichen Stoffwechsel als Zwischenprodukt beim Abbau von Häm und wird sofort zu Bilirubin reduziert, sodass Biliverdin nur in Spuren im Körper detektierbar ist [BULMER *et al.*, 2007; MCDONAGH, 2010]. Biliverdin wirkt im Körper sowohl als starkes Antioxidans als auch entzündungshemmend und scheint Abstoßungsreaktionen nach Herz- und Dünndarmtransplantationen zu verringern [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

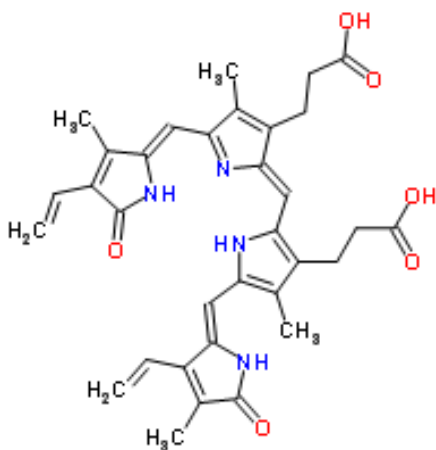


Abbildung 5: Struktur Biliverdin [CHEMSPIDER, 2012]

2.3.1.1. Biliverdindimethylester

Chemisch genau betrachtet ist das Tetrapyrrol Biliverdindimethylester eine Mischung aus zwei Dipyrrol Tautomeren [FALK, 1989]. Es kann über mehrere

Schritte aus Bilirubin hergestellt werden [MATYSIK *et al.*, 1997]. BVDME kann genauso wie BRDME durch Bindung zwischen den N – H Gruppen und durch die Carbonylfunktion der Ester intermolekulare Dimere bilden. Intermolekulare H-Bindungen verhindern die Abgabefähigkeit eines H-Atoms von Antioxidantien. Das heißt, N – H Verbindungen müssen frei sein, damit die Moleküle ihre antioxidative Wirkung entfalten können [CHEPELEV *et al.*, 2006]. BVDME kann als Antioxidans wirken, indem es ein H-Atom intermolekular bindet, wodurch ein stabiles Pyrrolradikal entsteht [MACLEAN *et al.*, 2008].

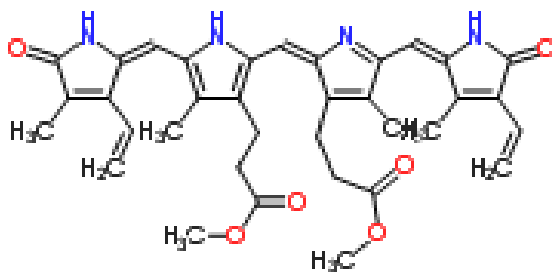


Abbildung 6: Struktur Biliverdindimethylester [CHEMSPIDER, 2012]

2.3.2. Metabolismus

Die unkonjugierten Gallenpigmente Bilirubin und Biliverdin entstehen im menschlichen Stoffwechsel durch den Abbau von Häm. Die Hauptquelle für Häm zur Gallenpigmentsynthese ist Hämoglobin, das aus alternden Erythrozyten sowie aus Häm enthaltenden Enzymen stammt. Häm Abbauort sind die Zellen des retikuloendothelialen Systems sowie das Knochenmark. Eine weitaus geringere Menge an Bilirubin wird in anderen Geweben von Makrophagen während des Turnovers von intrazellulärem Häm sowie Häm enthaltenden Enzymen gebildet [BULMER *et al.*, 2008; MCDONAGH, 2010; ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

Durch den Isoenzymkomplex Häm Oxygenase (HO, hauptsächlich HO-1) wird Häm zu blau-grün gefärbtem Biliverdin oxidiert, Kohlenmonoxid und Eisen werden dabei gebildet. Das Enzym Biliverdinreduktase (BVR) reduziert

Biliverdin zusammen mit NADPH sofort zu gelb gefärbtem, unkonjugiertem Bilirubin. Diese Reduktion findet so schnell statt, dass Biliverdin *in vivo* bei normalem Häm Metabolismus, wenn überhaupt, wie bereits erwähnt nur in Spuren detektierbar ist [MCDONAGH, 2010].

Bilirubin in unkonjugierter Form wird aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften zum Großteil sofort an Plasmaalbumin gebunden und kann so durch den Körper zirkulieren [BULMER *et al.*, 2008; ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011]. Die normale Plasma Konzentration von Bilirubin liegt unter 25µmol/l (1,47mg/dl) [MCDONAGH, 2010]. Über den Blutkreislauf gelangt Bilirubin zur Leber, wo es von den Hepatozyten aktiv und passiv aufgenommen und anschließend von der intrazellulären Glutathion S-Transferase zum endoplasmatischen Retikulum transportiert wird. Dort bildet die Uridindiphosphat Glucuronosyltransferase (UDP-GT) durch Veresterung Glucuronsäure Konjugate. Glucuronsäure, Glucose oder Xylose werden an eine oder an beide Propionylgruppen des Bilirubins konjugiert. So entstehen Bilirubin Mono- oder Diglucuronide, die ausscheidbaren Bilirubinformen. Dieser Schritt ist grundlegend, da ohne ihn toxisches, unkonjugiertes Bilirubin im Körper akkumuliert wird [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

Das nun wasserlösliche Bilirubin wird in dieser Form mit Hilfe des Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2) in die Galle transportiert. Von der Galle aus gelangen die Bilirubin Konjugate durch den Gallengang direkt in den Zwölffingerdarm, wo weitere Transformationen stattfinden. Im Gastrointestinaltrakt bilden bakterielle Enzyme aus den konjugierten Glucuronsäuren unkonjugierte. Von den entstandenen unkonjugierten Bilirubinen wird ein Teil über den enterohepatischen Kreislauf reabsorbiert und wiederausgeschieden [BULMER *et al.*, 2008; ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

Das übrige Bilirubin wird von den intestinalen Bakterien zu Urobilinen (speziell Urobilinogen) und Stercobilinen reduziert, die über den Faeces ausgeschieden werden und für dessen unterschiedliche Färbung verantwortlich sind. Entstandenes Urobilin wird, in geringeren Mengen, auch über den Harn

ausgeschieden [BULMER *et al.*, 2008]. Von den geschätzten 400 verschiedenen Stämmen an Mikroorganismen im menschlichen Darm sind nur wenige dazu fähig, Bilirubin weiter zu reduzieren [VÍTEK *et al.*, 2005].

Konjugiertes Bilirubin ist im Gegensatz zu unkonjugiertem wasserlöslich und nicht stark an Albumin gebunden. Deshalb kann es über den Harn ausgeschieden werden. Bei Menschen mit intaktem enterohepatischen Kreislauf kann die Bilirubin Produktion indirekt über die Menge an Urobilinogen und Stercobilinogen, die über Harn und Faeces ausgeschieden werden, abgeschätzt werden. Eine einfachere Methode ist aber die Messung über injiziertes, radioisotopenmarkiertes Bilirubin [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

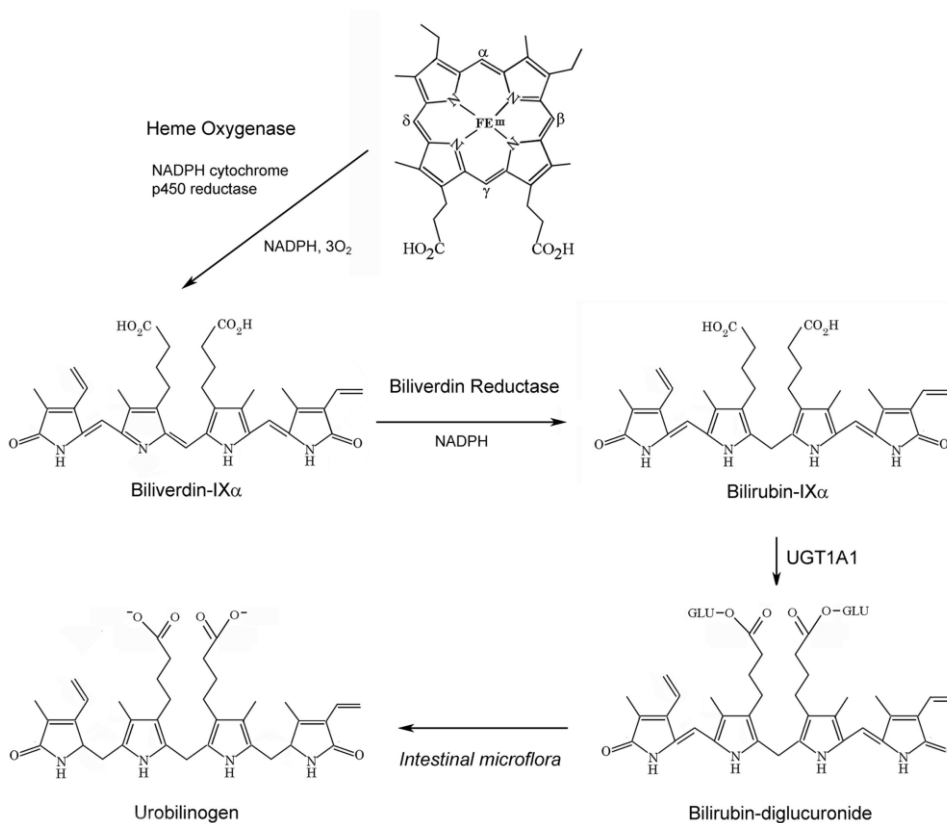


Abbildung 7: Häm Katabolismus [RYTER, 2012]

2.3.3. Störungen des Metabolismus - Hyperbilirubinämie

Wenn Bilirubin dem Blutkreislauf schneller zugeführt wird als es abgebaut werden kann, akkumuliert es im Plasma sowie im Gewebe. Dadurch kommt es,

je nach Bilirubin Konzentration, zu einer Gelbfärbung der Haut, der Sklera sowie der Organe, welche als Gelbsucht oder Hyperbilirubinämie bezeichnet wird. Die normale Plasmabilirubin Konzentration beträgt bis zu $17\mu\text{mol/l}$ ($1,2\text{mg/dl}$). Eine Hyperbilirubinämie kann unter vielen Bedingungen auftreten, allerdings gibt es drei Hauptmechanismen, die alleine oder in Kombination die Ursache sein können [KLATSKIN, 1961].

Diese Mechanismen sind eine erhöhte Bilirubin Produktion, Störung der Leberfunktionen für Bilirubin Aufnahme, Konjugation oder Ausscheidung sowie eine gestörte Regulation der Bilirubin Abgabe von der Galle ins Plasma. Nach diesen drei Störungen im Bilirubin Metabolismus kann die Art der Gelbsucht klassifiziert werden. Da die Art der zugrundeliegenden Störung einer Gelbsucht aber nicht immer bekannt ist, erfolgt die Klassifizierung für klinische Zwecke auf Basis der Pathogenese. Demnach kann der Ursprung entweder hämolytisch, hepatozellulär oder biliär obstruktiv sein. Neugeborene leiden häufig in den ersten Tagen nach der Geburt an Gelbsucht, verursacht durch einen Mangel an den Enzymen UDP-GT und/oder UDPG-Dehydrogenase, wodurch die Ausscheidung des Bilirubins limitiert wird und der Plasmaspiegel ansteigt. Bestimmte Formen der Hyperbilirubinämie sind erblich [KLATSKIN, 1961].

2.3.3.1. Bilirubinurie

Bei normalen Bilirubin Plasmaspiegeln wird kein Bilirubin über den Harn ausgeschieden. Liegt jedoch eine erhöhte Plasmabilirubin Konzentration durch biliär obstruktive oder hepatozelluläre Erkrankungen vor, kann Bilirubin auch renal ausgeschieden werden. Bei hämolytischen Erkrankungen ist das nicht der Fall, da hier das Bilirubin in unkonjugierter Form vorliegt und somit nicht wasserlöslich ist [KLATSKIN, 1961].

2.3.3.2. Kernikterus

Kernikterus, auch Bilirubinenzephalopathie genannt, kommt bei Neugeborenen vor, wenn ihr Plasmaspiegel an unkonjugiertem Bilirubin übermäßig hoch, über $340\mu\text{mol/l}$ ($>20\text{mg/dl}$), ansteigt. Wenn die Konzentration an fettlöslichem unkonjugierten Bilirubin im Blut die Transportkapazität übersteigt, kann es die Blut-Hirn-Schranke, die bei Neugeborenen wahrscheinlich noch nicht voll

ausgereift ist, überschreiten und sich in den Basalganglien und anderen Bereichen des Gehirns ablagern [KLATSKIN, 1961]. Dort kann Bilirubin Astrozyten und Neuronen beeinflussen und direkt die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien behindern, wodurch die normale Energiegewinnung blockiert und Apoptose ausgelöst wird. Die Störung der Zellmembranen verhindert die Übertragung von Neurotransmittern. So werden schwere und bleibende neurologische Schäden verursacht, die unter Umständen zum Tod führen können [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011].

2.3.3.3. *Crigler-Najjar Syndrom*

Bei diesem Syndrom resultiert die Gelbsucht aus einer Blockade der Bilirubin Ausscheidung, verursacht durch einen vererbten Glucuronosyltransferase Mangel der dazu führt, dass Bilirubin nicht konjugiert (glucuronidiert) werden kann [KLATSKIN, 1961]. Es ist eine Form der nicht hämolytischen Hyperbilirubinämie, die unbehandelt meist zum Tod durch Kernikterus in der frühen Kindheit führt. Man unterscheidet die Typen I und II. Typ I spricht nicht auf die medikamentöse Therapie an, bildet keine Bilirubin Glucuronide und führt immer zum Tod wohingegen Typ II medikamentös behandelbar ist und geringe Mengen an Bilirubin Glucuroniden gebildet werden können. Typ II Erkrankte erreichen meist das Erwachsenenalter [BOSMA, 2003]. Eine Behandlungsmöglichkeit des Crigler-Najjar Syndroms ist eine Lebertransplantation, mit der man den Enzymdefekt ausgleichen kann [STRASSBURG, 2010].

2.3.3.4. *Lucey-Driscoll Syndrom*

Hierbei handelt es sich um eine intensive, aber vorübergehende Form der Gelbsucht, die ebenfalls erblich ist. Der Serum Bilirubin Spiegel (unkonjugiert) erreicht in diesem Fall bis zu $1020\mu\text{mol/l}$ (60mg/dl), wodurch sich Kernikterus als häufige Begleiterkrankung ergibt [KLATSKIN, 1961].

2.3.3.5. *Gilbert's Syndrom*

Beim Gilbert's Syndrom handelt es sich um eine erbliche, leichte, chronische, nicht hämolytische Hyperbilirubinämie (unkonjugiert) ohne vorhandene

Lebererkrankung. Oft wird das Gilbert's Syndrom erst im Jugendalter im Rahmen routinemäßiger Blutuntersuchungen erkannt, beginnen kann es aber sowohl im Säuglings- als auch im Erwachsenenalter [KLATSKIN, 1961].

Der Bilirubin Spiegel liegt um $17\mu\text{mol/l}$ (1mg/dl), schwankt aber mit der Zeit und ist erhöht während Krankheit, Stress und Menstruation. Das Gilbert's Syndrom betrifft Männer häufiger als Frauen [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011]. Der Grund für den erhöhten Bilirubin Spiegel bei diesem Syndrom ist eine um bis zu 30% verminderte Aktivität des Enzyms Glucuronosyltransferase in der Leber, hervorgerufen durch eine Mutation in der Promotorregion des Glucuronosyltransferase Gens [BOSMA, 2003].

Das Gilbert's Syndrom ist relativ weit verbreitet, in der kaukasischen Bevölkerung sind 5-10% davon betroffen [OWENS und EVANS, 1975], betrachtet man die gesamte weiße Bevölkerung, sind es durchschnittlich 10%, die diese Genmutation haben [STRASSBURG, 2010]. HO-1 sowie Bilirubin haben vasodilatorische und antioxidative Effekte. Erhöhte Bilirubin Spiegel sind mit einem geringeren Arteriosklerose- und Krebsrisiko assoziiert, gleichzeitig steigt aber das Risiko für neurologische Störungen. In der Farmingham Heart Study war ein erhöhter Bilirubin Spiegel in Kombination mit einer bestimmten Genvariante mit einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert, was eventuell auf die antioxidativen Eigenschaften von Bilirubin zurückzuführen ist. Personen die das Gilbert's Syndrom haben, brauchen keine Behandlung. Bei der Einnahme bestimmter Medikamente ist das Gilbert's Syndrom aber ein Risikofaktor, da diese Medikamente bei betroffenen Menschen nicht so abgebaut werden können und anders wirken als bei gesunden [STRASSBURG, 2010].

2.3.3.6. Dubin-Johnson Syndrom

Das Dubin-Johnson Syndrom äußert sich als chronische, nicht hämolytische, konjugierte Hyperbilirubinämie, die dem Rotor Syndrom (siehe 2.3.3.7) sehr ähnelt [STRASSBURG, 2010]. Hier ist die Ausscheidung des Bilirubins über die Galle blockiert, was zu einer Akkumulation von konjugiertem Bilirubin im Plasma führt. Die Leberenzymfunktionen und -anatomie sind aber normal.

Krankheiten, Schwangerschaft und die Einnahme oraler Kontrazeptiva erhöhen den Bilirubin Spiegel bei Betroffenen weiter [ROY-CHOWDHURY und ROY-CHOWDHURY, 2011]. Das Dubin-Johnson Syndrom kommt eher selten vor und erfordert keine spezielle Behandlung, da es sich um eine gutartige Erkrankung handelt, die asymptomatisch verläuft. Eine Diagnose ist dennoch wichtig, um andere, schwerwiegendere Erkrankungen auszuschließen [STRASSBURG, 2010].

2.3.3.7. Rotor-Syndrom

Wie das Dubin-Johnson Syndrom äußert sich auch das Rotor-Syndrom als chronische, nicht hämolytische, konjugierte Hyperbilirubinämie. Die zugrundeliegende Störung ist eine verminderte Speicherfähigkeit von konjugiertem Bilirubin in der Leber. Das Rotor Syndrom erfordert keine spezielle Therapie. In diesem Fall ist eine Diagnose ebenso wichtig, um andere Erkrankungsformen auszuschließen [STRASSBURG, 2010].

2.3.4. Antimutagene Effekte

Es wird vermutet, dass Gallenpigmente über verschiedene zugrundeliegende, allerdings weitgehend unbekannte Mechanismen, mit Mutagenen interagieren und diese teilweise neutralisieren können und somit eine antimutagene Wirkung entfalten. Dieser Vermutung gingen Bulmer *et al.* nach und veröffentlichten 2008 einen Review über die antimutagenen Eigenschaften von Gallenpigmenten, in dem die Forschungsergebnisse der letzten 20 Jahre zu diesem Thema zusammengefasst wurden. Daraus geht hervor, dass ein Großteil der vorhandenen Studien den *Salmonella* Mutagenitäts Assay, eine etablierte Methode zur Identifizierung anti/mutagener Stoffe, als Versuchsmodell verwendet hat. Studien, in denen die Wirkung von Gallenpigmenten an Kulturzellen getestet wurde, sind beschränkt [BULMER *et al.*, 2008].

2.3.4.1. Arbeiten mit *Salmonella* Mutagenitäts Assay

Arimoto *et al.* untersuchten mit Hilfe des *Salmonella* Mutagenitäts Assays ob die Prophyrine und Tetrapyrrole BR, BV, Hämin und Clorophyllin (CLP) die Mutagenität von B[a]P verhindern bzw. abschwächen können. Dabei zeigten

sowohl BV als auch BR eine antimutagene Wirkung, mit einer Abschwächung von 50% der Mutagenität von B[a]P, wobei BR diese Wirkung bei geringeren Konzentrationen als BV entfaltete [ARIMOTO *et al.*, 1980].

In einer zweiten, später veröffentlichten Studie von Arimoto *et al.* zeigten BR und BV abermals im *Salmonella* Mutagenitäts Assay eine antimutagene Wirkung gegen B[a]P. Hier erwies sich, dass B[a]P durch Behandlung mit BR und BV zu einem geringeren Ausmaß zu genotoxischen Metaboliten aktiviert wurde. Auch ein etwas schwächerer Effekt gegen die Mutagenität der Metaboliten von B[a]P wurde festgestellt. Neben BV und BR wurden auch Hämin u. a. Substanzen getestet, von denen die Gallenpigmente die geringsten Effekte zeigten. Gallenpigmente scheinen die metabolische Aktivierung von B[a]P beeinflussen zu können und üben so antimutagene Wirkung im *Salmonella* Mutagenitäts Assay aus [ARIMOTO *et al.*, 1995]. Cho *et al.* konnten in ihrer Studie an *S. Typhimurium* eine um >50% verringerte Mutagenität von einem der zwei getesteten B[a]P Metaboliten durch Behandlung mit PRO und BV feststellen. Wie auch in den zuvor genannten Studien zeigten in dieser andere Testsubstanzen eine effektivere Wirkung als die Gallenpigmente [CHO *et al.*, 2000]. In einer Arbeit zu den mutagenen Eigenschaften von Zigarettenrauch zeigte BV abermals eine klare antimutagene Wirkung [ROMERT *et al.*, 1994]. Die Wirkung von BV, BR und verwandten Verbindungen auf die Mutagenität von verschiedenen Nitrosanen untersuchten Tang *et al.*, wobei BR effektivere Wirkung als BV zeigte. Insgesamt wirkten die Gallenpigmente in dieser Arbeit mindestens genauso antimutagen wie Hämin oder Chlorophyllin [TANG und EDENHARDER, 1997].

Bulmer *et al.* testeten 2007 die antimutagenen Eigenschaften der unkonjugierten Gallenpigmente BR, BV und des synthetischen BRT anhand des Ames *Salmonella* Test an drei *Salmonella* Stämmen. Ziel der Studie war es herauszufinden, ob die Gallenpigmente die genotoxischen Auswirkungen der Mutagene 2,4,7 Trinitrofluoren, 2-Aminofluoren, Natriumazid und Benzo[a]pyren selektiv inhibieren können. Die Inkubation der *Salmonella Typhimurium* Stämme mit den Gallenpigmenten alleine ergab keine toxischen oder

mutagenen Effekte. Antimutagene Effekte der Gallenpigmente konnten bei allen Mutagenen außer Natriumazid, bei allen getesteten Stämmen beobachtet werden. Mutagenität von 2-Aminofluoren beeinflussten nur BV und BRT. Des Weiteren wurde ein Test zur Wirkung von BR, BV und BRT auf die mittels *t*-BOOH induzierten genotoxischen Effekte durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass BR und BV den genotoxischen Effekt von *t*-BOOH, verursacht durch oxidativen Stress, effektiv verhindern können. BR und BV inhibierten dosisabhängig die induzierte Mutagenität [BULMER *et al.*, 2007].

Es ist bekannt, dass Porphyrine eine Affinität zu planaren, aromatischen Verbindungen haben. Das deutet an, dass Gallenpigmente die Genotoxizität solcher Mutagene durch Interaktion mit ihnen verhindern können, möglicherweise durch π -Stapelung, Wasserstoffbindung oder hydrophobe Wechselwirkungen. Tertiärbutyl Hydroperoxid induziert oxidativen Stress und Mutationen durch die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dem wirken Gallenpigmente entgegen indem sie als Peroxyl-Radikalfänger agieren. BRT kann nicht wie die unkonjugierten Pigmente BR und BV durch Lipidmembranen diffundieren und daher nicht als Radikalfänger wirken [BULMER *et al.*, 2007].

2.3.4.2. Zellbiologische Studien

Die 1983 veröffentlichte Arbeit von Katho *et al.* war die erste, die einen inhibitorischen Effekt von BV auf die Mutagenität von B[a]P auf Säugetierzellen zeigte. V79 Zellen (Hamster Lungenzellen) wurden dabei mit B[a]P sowie Hämin, CHL, BV oder PRO inkubiert. Am effektivsten wirkte auch hier Hämin, gleich darauf folgt BV, gefolgt von PRO und CHL [KATOH *et al.*, 1983]. Cho *et al.* zeigten in ihrer Studie ebenfalls an V79 Zellen eine antimutagene Wirkung von BV, vor PRO und Chlorophyllin, gegen einen B[a]P Metaboliten [CHO *et al.*, 2000]. Ähnliche Studien an anderen Zelllinien könnten interessante Ergebnisse liefern und zur Aufklärung des antimutagenen Potentials von Gallenpigmenten beitragen [BULMER *et al.*, 2008].

2.3.4.3. *Mutagene Wirkung*

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Studienresultaten stehen Ergebnisse einer Arbeit von Lafarge-Frayssinet *et al.* aus dem Jahr 1983. Dabei wies BV einen fördernden Effekt auf die Neubildung von entarteten Leber Epithelzellen, die zuvor mit Aflatoxin B1 behandelt worden sind, auf. Allerdings zeigte eine Behandlung nur mit BV keine mutagenen Effekte, kein stimuliertes Zellwachstum und keine DNA Strangbrüche. Außerdem waren die in der Arbeit verwendeten BV Konzentrationen höher als die physiologische Konzentration [LAFARGE-FRAYSSINET *et al.*, 1983].

2.3.5. *Antioxidative Effekte*

Im Stoffwechsel entstehen kontinuierlich verschiedene reaktive Sauerstoff und Stickstoff Spezies (RO(N)S), die eine wichtige Rolle in biologischen Prozessen wie DNA Replikation, Zellproliferation, antimikrobielle Immunreaktionen und Zellkommunikation spielen. Aber RO(N)S können auch DNA, Proteine und Lipide in Zellwänden schädigen und somit zur Pathogenese von Krebs, chronischer Entzündung und Herzerkrankungen sowie zum Alterungsprozess beitragen. Zur Kontrolle der RO(N)S Produktion im menschlichen Körper dienen verschiedene Antioxidantien [STOCKER, 2004].

Der Wirkungsmechanismus vieler natürlicher Antioxidantien basiert auf einer Deaktivierung schädigender Peroxyl-Radikale durch einen H-Atom Transfer. Über diesen Mechanismus wirken zum Beispiel Vitamin E und andere phenolische Antioxidantien. Bilirubin, Biliverdin sowie andere Tetrapyrrole haben eine gänzlich andere Struktur als phenolische Verbindungen [CHEPELEV *et al.*, 2006], es gibt aber Evidenz dafür, dass Gallenpigmente und Tetrapyrrole eine ebenso starke antioxidative Wirkung im Körper entfalten können [STOCKER, 2004]. Tetrapyrrole besitzen, wie auch phenolische Antioxidantien, ein aktives Wasserstoffatom in einer N – H Bindung, die in ein aromatisches System eingebettet ist. Dadurch können Tetrapyrrole ebenfalls Radikale stabilisieren und antioxidative Wirkung entfalten. Bereits vor mehr als 50 Jahren gab es erste Hinweise auf antioxidative Effekte des Gallenpigments Bilirubin. Dennoch ist der exakte Ablauf des Mechanismus, der hinter der

antioxidativen Wirkung von Tetrapyrrolen steht, bis heute nicht exakt aufgeklärt [MACLEAN *et al.*, 2008].

1987 berichteten Stocker *et al.* über die Radikalfängereigenschaften von Bilirubin. Demnach kann Bilirubin zwei Radikale binden indem es initial ein Wasserstoffatom abgibt, wodurch ein Bilirubin Radikal generiert wird. Dieses Radikal bindet sich an ein weiteres Radikal wobei ein radikalfreier Komplex entsteht. Biliverdin hingegen kann nur ein Elektron aufnehmen und bildet so einen Resonanz stabilisierten Biliverdin-Radikal-Komplex [BULMER *et al.*, 2007; STOCKER, 2004].

2006 fassten Chepelev *et al.* in einer Studie drei zu diesem Zeitpunkt bekannte, mögliche Mechanismen zusammen, über die Bilirubin seine antioxidative Wirkung ausüben könnte. Als ersten Mechanismus geben sie den Transfer eines H-Atoms von der Methylengruppe am C10 Atom auf ein Peroxyl-Radikal an. Der zweite Mechanismus ist die Addition eines Peroxyl-Radikals an Bilirubin und der dritte Mechanismus geht von einem Transfer einzelner Elektronen auf ein Peroxyl-Radikal aus. Die Ergebnisse der Studie von Chepelev *et al.* unterstützen die Theorie des dritten Mechanismus [CHEPELEV *et al.*, 2006]. Maghzal *et al.*, Chepelev *et al.* und Hatfield *et al.* postulierten in ihren Studien, dass von Bilirubin, wenn es als Antioxidans wirkt, ein Wasserstoffatom an der zentralen C10 Methylengruppe abgespalten wird, wobei ein resonanzstabilisiertes Tetrapyrrolradikal entsteht [CHEPELEV *et al.*, 2006; HATFIELD und BARCLAY, 2004; MAGHZAL *et al.*, 2009]. Dabei könnte es zu einer Konformationsänderung und zu einer geringeren Lipophilität des Moleküls kommen, wodurch die passive Diffusion in hydrophile Zellschichten möglich wird. Dort könnte sich das Molekül durch Abspaltung eines weiteren Wasserstoffatoms selbst regenerieren [MAGHZAL *et al.*, 2009].

Im Review von Stocker *et al.* 2004 zeigten die gesammelten Studiendaten, dass sowohl Biliverdin als auch unkonjugiertes und konjugiertes Bilirubin als Peroxyl-Radikalfänger wirken. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Bilirubin und Biliverdin in Synergie mit membrangebundenem α -Tocopherol, dem wichtigsten lipidlöslichen Antioxidans im menschlichen Körper, wirken. Das

könnte über einen Mechanismus geschehen, in dem die Gallenpigmente das entstandene α -Tocopherol Radikal reduzieren, wodurch α -Tocopherol wieder als Radikalfänger wirken kann [STOCKER, 2004].

Wie bereits beschrieben, baut das Enzym Häm Oxygenase (HO), von dem es die Isoformen 1, 2 und 3 gibt, Häm zu Biliverdin um [STOCKER, 2004]. HO-1 ist die einzige induzierbare Form und ist u. a. in der Milz, wo alternde Erythrozyten gesammelt werden, lokalisiert. Das Häm aus den Erythrozyten induziert HO-1. HO-2 hingegen kommt vor allem in Neuronen des Gehirns vor, wo das produzierte Kohlenmonoxid als Neurotransmitter wirkt [SEDLAK und SNYDER, 2004]. Ist die Zelle erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt, wird HO-1 ebenfalls induziert. Dabei entsteht parallel zum antioxidativ wirkenden Biliverdin auch Eisen, das wiederum als Radikal wirkt und den oxidativen Stress theoretisch verstärkt. Die Eisensfreisetzung durch HO-1 ist aber verbunden mit einer vermehrten Synthese des Eisenspeicherproteins Ferritin, sodass Eisen nicht als Radikal zur Wirkung kommt. Auch das beim Häm Abbau entstehende Kohlenmonoxid hat eine Reihe von positiven Effekten und trägt wahrscheinlich zum oxidativen Schutz, der bei der HO-1 Induktion beobachtet werden kann, bei [STOCKER, 2004].

2.3.5.1. *BR-BV Redox Zyklus*

Bilirubin kommt im menschlichen Körper, unter normalen physiologischen Bedingungen, in Plasmakonzentrationen von weniger als 25 μ mol/l vor, die intrazelluläre Konzentration liegt noch weiter darunter. Daher stellt sich die Frage, wie diese geringen Konzentrationen an Bilirubin einen signifikanten Beitrag zum Schutz der Zellen vor Lipidperoxidation und oxidativen Schäden leisten können [MCDONAGH, 2010].

Die potente Wirkung von Bilirubin gegenüber oxidativem Stress in Zellen beschrieben Sedlak *et al.* im Jahr 2004. Diese ist laut den Autoren auf einen Redox Zyklus zwischen Bilirubin und Biliverdin zurückzuführen. Die Hypothese besagt, dass Bilirubin, sobald es als Antioxidans gewirkt hat, selbst wieder zu Biliverdin oxidiert wird. Das entstandene Biliverdin wird anschließend vom ubiquitär vorhandenen Enzym Biliverdin Reduktase (BVR) wieder zu Bilirubin

reduziert. Demnach kann Bilirubin die Zelle vom oxidativen Stress, verursacht durch Wasserstoffperoxid, das in 10.000fach höherer Konzentration vorliegt, schützen [SEDLAK und SNYDER, 2004].

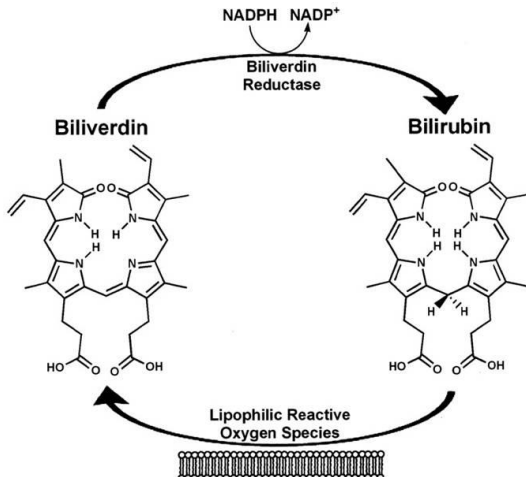


Abbildung 8: Biliverdin-Bilirubin Redox Zyklus [SEDLAK und SNYDER, 2004]

Schon 1999 führten Dore *et al.* eine Studie durch, in der sie Bilirubin in nanomolaren Konzentration zusammen mit Wasserstoffperoxid auf neuronale Zellen wirken ließen. Dabei zeigte sich, dass BR die Zellen vor den toxischen Effekten von H₂O₂ schützte [DORE und SNYDER, 1999]. Ähnliche Effekte konnten auch Baranano *et al.* bei HeLa Zellen (humane Zervixcarcinomzellen) nachweisen [BARANANO *et al.*, 2002]. Durch die von Seldak *et al.* im Jahr 2004 beschriebene Hypothese der Redox Wiederverwertung von BR über BV können die antioxidativen Effekte von BR amplifiziert werden [MCDONAGH, 2010].

Maghzal *et al.* konnten in einer Arbeit aus dem Jahr 2009 die stöchiometrische Umwandlung von BR zu BV und wieder zurück durch Radikalwirkung nicht bestätigen. Demnach entstehen größtenteils nicht BV (30%) sondern unspezifische Oxidationsprodukte (70%) aus BR, die nicht von der BVR wiederverwertet werden können [MAGHZAL *et al.*, 2009]. Auch McDonagh untersuchte 2010 diesen Redox Zyklus in humanem Plasmaalbumin mittels HPLC Analysen und mit 2,2'-Azobis(2-Amidinopropan) Hydrochlorid (AAPH) als Quelle freier Radikale. Er konnte dabei zwei Wirkungswege der Radikale auf BR

beobachten. Erstens die Spaltung des BR in farblose Fragmente, die den Großteil des BR ausmachten und zweitens eine Wasserstoffabspaltung an der zentralen CH₂ Gruppe, was schlussendlich zur Bildung von BV führte. Aus Sicht dieser Studie und den Ergebnissen der Studie von Maghzal *et al.* erscheint die BR-BV Wiederverwertungstheorie, nach der Bilirubin vor großen Mengen H₂O₂ schützen kann, eher unwahrscheinlich, da die Umwandlung von BR zu BV nicht stöchiometrisch ist. Die Menge reicht vermutlich dennoch aus, um den Zyklus zumindest für einige Zeit aufrecht zu erhalten [MAGHZAL *et al.*, 2009; MCDONAGH, 2010].

Sedlak *et al.* zeigten 2009, dass Ausschaltung von BVR *in vitro* zu einem vermehrten Zelltod bei H₂O₂ Behandlung führt [SEDLAK *et al.*, 2009]. Laut Sedlak und Snyder hat der BVR Zyklus eine physiologische und pathophysiologische Bedeutung, was anhand der Ergebnisse zahlreicher Studien zu Bilirubin und kardiovaskulären sowie cerebrovaskulären Krankheiten gezeigt wird [SEDLAK und SNYDER, 2009].

2.3.6. Wirkung auf Apoptose

Unter Apoptose versteht man den Prozess des programmierten und aktiv kontrollierten, nicht entzündlichen Zelltods, der kontinuierlich im menschlichen Körper stattfindet und somit die Entsorgung von alten sowie von krankhaft veränderten (malignen) Zellen gewährleistet. Apoptose ist zusammen mit der Mitose für die natürliche Homöostase der Zellzahl im menschlichen Körper verantwortlich und kann von einer Reihe von Umweltreizen beeinflusst werden. Sie ist sowohl initiiierbar als auch inhibierbar und kann physiologische oder pathologische Ursachen haben [KERR *et al.*, 1972].

Die morphologischen Veränderungen einer Zelle während der Apoptose können grob in zwei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Abschnitt erfolgt eine Kondensation des Cytoplasmas, die Zelle schrumpft, verliert den Kontakt zu benachbarten Zellen und zerfällt in membrangebundene Fragmente, die so genannten Apoptosekörperchen. Das endoplasmatische Retikulum im Cytoplasma erweitert sich, die Zisterne schwillt an und bildet Vesikel. Das Chromatin im Zellkern kondensiert und formt eine dichte Masse. Die

Plasmamembran wird aufgewallt und bildet Bläschen. Im zweiten Abschnitt werden die Apoptosekörperchen von der epithelialen Oberfläche abgestoßen und von anderen Zellen, hauptsächlich von dendritischen Zellen und Makrophagen, phagozytiert. So werden die Apoptosekörperchen durch lysosomale Enzyme abgebaut und aufgelöst [KERR *et al.*, 1972; LY *et al.*, 2003]. Über die Aktivierung von Effektor Proteasen, den sogenannten Caspasen, wird der Zelltod durch Apoptose initiiert. Es gibt zwei unterschiedliche Apoptose Pathways - den extrinsischen und den intrinsischen. Beim extrinsischen Pathway werden apoptotische Signale durch das Binden von Liganden an Transmembranrezeptoren in die Zelle übermittelt. Charakteristisch für den intrinsischen Pathway ist eine Aktivierung der Caspasen durch Störung der Mitochondrien und Freisetzung von Cytochrom C [SCHULTZ und HARRINGTON, 2003].

Den Schwerpunkt ihrer Forschungsarbeit legten Bednarz *et al.* auf die Untersuchung der Auswirkungen einer Inkubation von HeLa Zellen (humane Zervixcarcinomzellen) mit verschiedenen Konzentrationen (0,032-20µg/ml) des Tetrapyrrols Protoporphyrin. PRO wird u. a. als Photosensibilisator in der Photodynamischen Therapie (PDT) eingesetzt, wo es zusammen mit Sauerstoff aus dem Gewebe, aktiviert durch Laserlicht, die Bildung von ROS bewirkt und somit Apoptose von Zellen hervorruft [BEDNARZ *et al.*, 2007].

Die photodynamische Therapie wird in der Behandlung von bösartigem Krebs eingesetzt. Sie ist eine minimal invasive und minimal toxische Methode. Bösartige Zellen werden so beeinflusst und der Zelltod wird gefördert. Das Prinzip beruht auf der Generierung von ROS, die ja bekanntlich zu morphologischen und physiologischen Veränderungen in Zellen beitragen. So können ROS Apoptose oder Nekrose induzieren [ACKROYD *et al.*, 2001; PIETTE *et al.*, 2003].

Aufgrund der Vermutung, dass Protoporphyrin (Photosensibilisator) bereits vor der Lichtaktivierung den Zelltod initiieren kann, wurde die oben genannte Studie von Bednarz *et al.* durchgeführt. Verschiedene Assays zur Beurteilung des Zellzustandes wurden ausgewählt, wobei morphologische Veränderungen

(teilweise und totale Bläschenbildung, Schrumpfung), die zu Apoptose führen, in mit PRO behandelten Zellen (bei allen Konzentrationen) im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden konnten. Diese Veränderungen waren dosisabhängig und vergleichbar mit denen, die man in Zellen nach einer Behandlung mit H_2O_2 beobachten kann. Veränderungen in der Membranstruktur (Annexin V Assay) und DNA Fragmentierungen (Comet Assay) wurden genauer betrachtet. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen, zeigten Zellen sowohl nach H_2O_2 als auch nach PRO Behandlung einen deutlichen Comet tail, bestehend aus kleinen DNA Fragmenten. Mit dem Comet Assay war es hier möglich, ein sehr frühes Stadium der Zellschädigung und somit Hinweise auf eine beginnende Apoptose sichtbar zu machen. Zudem zeigten sich eine Membranassymetrie (Chromatinkondensation und Zellkernfragmentierung) sowie eine veränderte Membranpermeabilität die, wenn sie erhöht ist, ebenfalls auf den Zelltod hinweist. Insgesamt konnten Bednarz *et al.* mit ihrer Studie zeigen, dass PRO auch ohne Lichtaktivierung zu einem Apoptose induzierten Zelltod in HeLa Zellen führen kann [BEDNARZ *et al.*, 2007].

Bereits 1995 konnten Koningsberger *et al.* bei HepG2 Zellen eine verminderte Proliferation nach Behandlung mit PRO im Dunkeln in Konzentrationen zwischen 0,5-20µg/ml feststellen. Die Konzentration von 20µg/ml wirkte zytotoxisch auf die Zellen, ebenso wie bei der Studie von Bednarz *et al.*. Bei der Konzentration von 5µg/ml konnten erste morphologische Veränderungen bei 25% der HepG2 Zellen beobachtet werden, ab der Konzentration 10µg/ml traten verminderte Membranintegrität, Veränderungen im Zytoplasma (anschwellen der ERs) sowie vermehrter Zelltod mit Anzeichen von Degeneration auf [BEDNARZ *et al.*, 2007; KONINGSBERGER *et al.*, 1995].

2.3.7. Anticancerogene Effekte

Rao *et al.* und Keshavan *et al.* zeigten 2006 bzw. 2004 mit den Ergebnissen ihrer Studien anticancerogene Effekte von Bilirubin auf verschiedene Carcinomzelllinien des menschlichen Verdauungstraktes. Rao *et al.* verwendeten neben Bilirubin auch die Tetrapyrrole Urobilin und Stercobilin,

Keshavan *et al.* untersuchten zusätzlich die Effekte Bilirubindiraurat und Biliverdin, die jedoch alle keine Wirkung zeigten. Bilirubin induzierte in diesen Studien Apoptose sowohl in TMK-1 Zellen (humane Magenadenocarcinomzellen), die Untersuchungsmodell von Rao *et al.* waren, als auch in HCT-15 Zellen (humane Colonkrebszellen), die Keshavan *et al.* in ihrer Studie verwendeten. Keshavan konnte außerdem eine durch Bilirubin verursachte verminderte Zellvitalität in anderen Colonadenocarcinomzellen, darunter auch Caco-2 Zellen, beobachten. In HCT-15 Zellen wurde die Apoptose durch Störung des mitochondrialen Membranpotentials von Bilirubin in physiologischer Konzentration verursacht. Bei den TMK-1 Zellen konnte man einen Zellzyklusarrest in der Phase G0/1 durch einen prooxidativen Mechanismus von Bilirubin beobachten [KESHAVAN *et al.*, 2004; RAO *et al.*, 2006]. Außerdem hat das Enzym HO-1 komplexe Auswirkungen auf Apoptose und Zellzyklus in der Cancerogenese und ist somit ein potentielles Ziel in der Krebsprävention [BULMER *et al.*, 2008].

Es ist hier aber zu beachten, dass die oben genannten Ergebnisse aus *in vitro* Studien stammen. Ohne weitere Studien in diesem Bereich können sie nicht auf *in vivo* Bedingungen umgelegt werden. Für das strukturell mit den Gallenpigmenten verwandte Porphyrin Chlorophyll existieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien, die die anticancerogene Wirkung belegen. Diese Studien könnten als Vorbild zur *in vivo* Erforschung der selben Wirkung von Gallenpigmenten dienen [BULMER *et al.*, 2008].

2.3.8. Antiinflammatorische und anti-Komplement Effekte

Erste Evidenz für antiinflammatorische Effekte von Gallenpigmenten gab es bereits 1993. Nakagami *et al.* zeigten mit ihren Studienergebnissen, dass sowohl Biliverdin als auch konjugiertes Bilirubin *in vitro* antiinflammatorische Wirkung entfalten können. BR und BV zeigten bei den Versuchen in mikromolaren Konzentrationen inhibitorische Effekte auf die Komplement Kaskade, insbesondere auf den C1 Schritt des klassischen Weges und wirkten so *in vitro* zusammen mit ihren antioxidativen Eigenschaften schützend auf das untersuchte Gewebe. *In vivo* zeige sich beim Versuch an Schweinen bei oraler

BV Verabreichung vor der Antiserum Injektion eine Schutzwirkung vor dem Tod durch anaphylaktischen Schock [NAKAGAMI *et al.*, 1993].

2002 stellten Arriaga *et al.* in ihrer Arbeit fest, dass unkonjugiertes Bilirubin bei Ratten, *i.v. (intravenös)* injiziert, die komplementvermittelte intravaskuläre Hämolyse einer darauffolgenden Transfusion von Schaf Erythrozyten behindert bzw. abschwächt. Wie zuvor Nakagami konnte auch Arriaga einen dosisabhängigen Effekt von BR auf den klassischen Weg der Komplement Kaskade beobachten [ARRIAGA *et al.*, 2002]. In einer vorangegangenen *in vitro* Studie im Jahr 1999 konnte dieselbe Arbeitsgruppe um Arriaga die inhibitorische Wirkung von Bilirubin auf das Komplementsystem zeigen [ARRIAGA *et al.*, 1999]. Arriaga *et al.* stellen außerdem die Vermutung an, dass eine Hyperbilirubinämie zu einer erhöhten Infektanfälligkeit beiträgt, wenn man bedenkt, dass das Komplement System auch für die Abwehr von Bakterien und Viren verantwortlich ist [ARRIAGA *et al.*, 2002].

Wegiel und Otterbein fassen in ihrem 2012 veröffentlichten Review die momentan bekannten antiinflammatorischen Wirkungen von BV und BR zusammen. Es gibt zahlreiche Tierstudien, die eine positive Wirkung von BV auf das Entzündungsgeschehen ergeben haben, wie eine reduzierte Zellinfiltration und verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Positive Effekte von Gallenpigmenten auf den Genesungsprozess werden auch in Arbeiten zu Transplantationen und Gefäßverletzungen beschrieben. In Transplantationsstudien zeigten BV und BR starke antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkungen auf Makrophagen und T-Zellen. Bei Herztransplantationen vermindern BR und BV die antigenspezifischen Immunantworten und ermöglichen eine dauerhafte Toleranz des Transplantats. Auch die oben genannte Wirkung von BV auf das Komplementsystem wird im Review betrachtet. Assoziationsstudien zu Arteriosklerose und Herzerkrankungen zeigen, dass Patienten mit Gilbert's Syndrom ein vermindertes Erkrankungsrisiko für diese haben. In den im Review betrachteten Studien wird häufig dem zentralen und ubiquitär vorhandenem Enzym BVR eine bedeutende Rolle bei der anti-inflammatorischen Wirkung zugeschrieben, da es

sowohl als Enzym als auch als Signalkinase und Transkriptionsfaktor agieren kann. Genauso wie BVR knockout Mäuse zeigen Menschen mit einer BVR knockout Mutation einen proinflammatorischen Phänotyp, weisen also ein erhöhtes Entzündungsgeschehen im Körper auf. Diesen Mechanismus *in vivo* genau zu erforschen, wird in Zukunft Ziel vieler Studien sein [WEGIEL und OTTERBEIN, 2012].

2.3.9. Pharmakokinetik und therapeutische Effekte

Um eine mögliche therapeutische Wirksamkeit von Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen zu beweisen, ist es wichtig, mehr über die Pharmakokinetik dieser Stoffe zu erfahren. 2011 untersuchten Bulmer *et al.* die *in vivo* Pharmakokinetik von BR, BRDT und BV in unkonjugierter Form in Wistar Ratten. Die Tetrapyrrollösungen wurden den nüchternen Tieren in verschiedenen Konzentrationen unter Lichtschutz *intravenös (i.v.)*, *intraperitoneal (i.p.)* oder *intraduodenal (i.d.)* verabreicht. Zur Überprüfung der Auswirkung der Behandlung sowie des Trägerstoffes auf die Gallenpigmentausscheidung, wurde der Kontrollgruppe jeweils der Trägerstoff allein injiziert. Für diverse Analysen wurden der Darminhalt, Blut, Urin sowie Gallenflüssigkeit der Tiere gesammelt und tiefgefroren. Die Proben wurden mittels HPLC auf den Gallenpigmentgehalt untersucht. Alle drei Tetrapyrrole waren *i.p.* bioverfügbar. Nur BR und BRDT waren *i.d.* bioverfügbar. Das weist darauf hin, dass enteral verabreichtes BR die zirkulierende Konzentration erhöht und so vor inflammatorischen und/oder oxidativen Effekten schützen könnte. Nach *i.v.* Verabreichung der drei Tetrapyrrole sank die Plasmakonzentration kontinuierlich, folglich erschienen unveränderte und metabolisierte Tetrapyrrole in der Gallenflüssigkeit [BULMER *et al.*, 2011].

Da BR und BV natürliche Substanzen sind und ihr Metabolismus im Körper weitgehend bekannt ist, sind klinische Studien zur Pharmakokinetik und Pharmakodynamik relativ unkompliziert. Somit sind BR, BV und das Schlüsselenzym BVR in zahlreichen Studien Untersuchungsziel zur Entwicklung neuer therapeutischer Methoden [WEGIEL und OTTERBEIN, 2012].

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

Geräte

Gerät	Hersteller	Typ
Countess – Automated Cell Counter	Invitrogen	354900
Eismaschine	Scotsman	Labin AF-10
Electrophoresis Power Supply	PeqLab	EV231
Elektrophorese Kammer	BioZym	
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Germany	Axioscop 20
Geschirrspüler	Miele Professional	G7883
Inkubator	Heraeus Instruments	Function Line
Laminar Flow	EuroClone Division	S@femate 1.8
Mikrowelle	Elta	
pH-Meter	Metrohm AG	827 ph lab
Pipettierhilfe	Jencons	PowerPette Plus
Tiefkühler	Forma Scientific	Bio Freezer
Trockenschrank	Heraeus Instruments	T6200
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex	RK 100
UV Lampe	Prior	Lumen 200
Vakuumpumpe	Barrelt GmbH	MZ2C
Vortex	Heidolph	REAX2000
Waage	Mettler	AT201
Waage, max. 4800g	Satorius AG Göttingen	LC4801P
Wärmeplatte	Heidolph	MR 3001 K
Wasserbad	GFL	1002
Zentrifuge	Heraeus	Megafuge 1.OR
ZK Mikroskop	Hund Wetzlar	Wilowert 30

Tabelle 1: Geräte

Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Produktnummer
6-Well Platten (Tissue Culture Test Plate)	SPL Life Sciences	
Cell counting chamber slides	Invitrogen	C10283
Cell Culture Flask, 25cm ³	SPL	
Deckgläser 20x20mm	VWR	ECN 631-1568
Dry Heat Indicator Tape	3M Health Care	1226
Dry Heat Indicator Tape	Sigma Aldrich Chemie GmbH	A2549-6EA
Glas Pasteurpipetten, 230 mm	Hecht Assistent	567/2
Handschuhe	MicroFlex Corporation	XC-INT-M
Nitrilhandschuhe	MicroFlex Corporation	SU-INT-S
Objektträger	Hecht Assistent	2406/1
Parafilm	American National Can TM	CT06836
Pipettenspitzen blau	VWR	612-5756
Pipettenspitzen gelb	VWR	612-5755
Plastik Pasteurpipetten	VWR	612-1681
Polyethylene Round-Bottom-Tube, 5ml	Becton Dickinson Labware	4-2063-1
Watte	DM Drogeriemarkt	
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	SPL Life Sciences	50015

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Medien

Substanz	Hersteller	Produktnummer
Accutase	PAA Laboratories GmbH	L11-007
Biliverdindimethylester	Frontier Scientific	B610-9

Biliverdinhydrochlorid	Frontier Scientific	B655-9
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich GmbH	D4540
EDTA 0,1 M	Sigma Aldrich GmbH	E6758-500G
Ethanol	VWR Ethanol	UN1170
Ethidiumbromid 10mg/ml	Sigma Aldrich GmbH	E1510
Fetal Bovine Serum	PAA Laboratories GmbH	A15-101
HCl 37%	Riedel-deHaen	30721
Medium (DMEM) mit Glutamin	PAA Laboratories GmbH	E 15-810
NaCl	Sigma Aldrich GmbH	SZB 9329A
NaOH 0,3 M	Sigma Aldrich GmbH	SZB A 2940V
Na-Pyruvat, 100ml	Sigma Aldrich GmbH	S8636
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Sigma Aldrich GmbH	D8537
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich GmbH	P4333
Stercobilinhydrochlorid	Frontier Scientific	S594-9
Tertiärbutylhydroperoxid	Merck	S4990706
Triton X 100	Sigma Aldrich GmbH	CAS 9002-93-1
Trizma Base	Sigma Aldrich GmbH	9 3350
Trypanblau	Invitrogen	T10282
Ultra Pure™ Agarose	Invitrogen	16500-100
Ultra Pure™ LMP Agarose	Invitrogen	16520-050
Urobilinhydrochlorid	Frontier Scientific	U590-9

Tabelle 3: Chemikalien und Medien

3.2. Methoden im Zellkulturlabor

Die verwendeten Caco-2 Zellen wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bestellt und im Zellkulturlabor kultiviert. Die für diese Masterarbeit benötigten Tetrapyrrole UB, SB, BV und BVDME wurden im Rahmen des FWF-Projekts Physiological Relevance of Bile Pigments bei der Firma Frontier Scientific in England angefordert und zu diesem Zweck synthetisiert. Mittels HPLC Analyse wurde die Reinheit der

gelieferten Tetrapyrrole am IfEW überprüft. Des Weiteren wurden Löslichkeitsexperimente in DMSO mit photometrischer Messung vor dem Start der Versuche durchgeführt.

3.2.1. Herstellung von Lösungen und Vorbereitungsarbeiten

Alkohol 75%

- 1000ml Messzylinder: 750ml Ethanol absolut + 250ml Wasser

Medium

- 450ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- 50ml FBS
- 1ml Na-Pyruvat und 5ml P/S dazu pipettieren

Normal Melting Agarose (NMA) für Objektträger Beschichtung

- 200mg Ultra PureTM Agarose in 100ml Becherglas einwiegen
- 20ml bidestilliertes Wasser zugeben, aufkochen, umrühren
- wiederholen, bis Lösung klar und ohne Klumpen ist
- mit Parafilm verschließen und im Kühlschrank lagern
- zur Verwendung aufkochen, den Rest wieder im Kühlraum lagern; maximal 3-4 mal wiederverwenden

Low Melting Agarose (LMA) zum Auftragen der Zellsuspension

- 200mg Ultra PureTM LMP Agarose in 50ml Becherglas einwiegen
- in 20ml PBS lösen, in der Mikrowelle erwärmen und mit Spatel umrühren
- mit Parafilm verschlossen im Kühlschrank lagern
- vor Verwendung in der Mikrowelle auf niedrigster Stufe verflüssigen und im Wasserbad bei 37°C warm halten
- Rest im Kühlraum lagern; maximal 3-4 mal wiederverflüssigen

Lyselösung (1l)

Lyselösung auf Vorrat herstellen. Fertige Lösung in dunklen Flaschen im Kühlraum lagern.

- 146,1g NaCl 2,5M; 29,2g EDTA 0,1M; 1,211g Tris 10mM
- Chemikalien separat einwiegen
- NaCl und Tris in 1000ml Becherglas vereinen und 500ml Aqua dest. zugeben
- mittels Magnetrührer mischen
- 20ml NaOH mit Pasteurpipette zufügen (Schutzbrille!)
- erst dann EDTA und weitere 4ml NaOH zugeben
- rühren, bis eine klare Lösung entsteht
- pH-Wert messen, langsam NaOH zutropfen, bis pH-Wert genau 10 beträgt
- Lösung in 1l Messkolben überführen und mit Aqua dest. auffüllen

Elektrophoreselösung

Elektrophoreselösung am Tag vor dem Test herstellen und im 2000ml Messkolben verschlossen im Kühlraum lagern (nicht länger als 24 Stunden).

- 24g NaOH einwiegen
- 0,58g EDTA einwiegen
- beides in 2000ml Becherglas mit Aqua dest. zusammenführen und auf Magnetrührer stellen
- pH-Meter – Messgenauigkeit prüfen
- pH-Wert der Lösung messen, dieser muss 13 oder höher sein
- Lösung in 2000ml Messkolben überführen, Becherglas noch einmal mit Aqua dest. spülen und in Messkolben überführen, auf 2000ml auffüllen

t-BOOH (Tertiärbutyl Hydroperoxid) Stocklösung (300mM)

- 240,3µl Aqua dest. in Cup pipettieren
- 9,7µl Tertiärbutyl Hydroperoxid dazu pipettieren

- Cup im Kühlraum maximal eine Woche lang lagern

Ethidiumbromid Lösung (20mg/l)

- 10µl Ethidiumbromid Stocklösung (10mg/ml)
- 5ml Aqua dest.

Objektträger beschichten

- NMA Lösung herstellen oder vorbereitete Lösung verwenden
- Objektträger einmal kurz eintauchen, Unterseite mit Papier reinigen
- Objektträger auf Papier über Nacht trocknen lassen
- in geeignete Aufbewahrungsbox einsortieren

Sterile Glaswaren:

- gewaschene, trockene Pipetten
- Watte mit Pinzette in oberes Ende stopfen
- Pipetten in Metallbox legen
- Pasteurpipetten (Glas) in Metallbox füllen
- Metallbox verschließen und mit Indikator verkleben
- bei 160°C 4 Stunden in Sterilisator stellen

3.2.2. Steriles Arbeiten

Die Arbeiten im Zellkulturlabor wurden nach den allgemeinen Richtlinien des sterilen Arbeitens durchgeführt. Gearbeitet wurde mit Labormantel, Latex- oder Nitrilhandschuhen und ggf. mit Laborbrille als Schutzkleidung. Zur Desinfektion wurden sowohl Hände als auch alle unter dem Laminar Flow benötigten Arbeitsmaterialien mit Ethanol abgesprüht. Vor Arbeitsbeginn und nach Arbeitsende wurden die Flächen des Laminar Flows ebenfalls mit Ethanol gereinigt und zusätzlich für 30 Minuten mit UV Licht desinfiziert.

3.2.3. Zellpflege

Die Caco-2 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit einem Gehalt von 10% FBS und unter Zusatz von Penicilin/Streptomycin sowie Na-Pyruvat in 25cm³ Zellkulturfläschchen kultiviert. Die Lagerung erfolgte im

Inkubator bei 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5%. Bei allen Arbeitsschritten mit den Tetrapyrrolen, von der Einwaage bis nach der Inkubationszeit von 24 Stunden, wurde der Lichtkontakt weitestgehend ausgeschlossen.

3.2.3.1. Medienwechsel

- Medium im Wasserbad bei 37°C erwärmen
- ZK Fläschchen aus dem Inkubator nehmen und Zellzustand unter dem Mikroskop kontrollieren
- ZK Fläschchen in Laminar Flow stellen, altes Medium mit Vakuumpumpe und Glaspasteurpipette absaugen, auch aus dem Flaschenhals; den Zellrasen dabei nicht berühren!
- 8ml frisches Medium hinein pipettieren, nicht auf den Zellrasen zielen
- Tropfen aus dem Flaschenhals absaugen, um Infektionsrisiko zu minimieren
- Fläschchen wieder in den Inkubator legen; Vorsicht - Medium soll nicht in den Filter gelangen

3.2.3.2. Zellpassage

- Medium im Wasserbad bei 37°C erwärmen
- ZK Fläschchen aus dem Inkubator nehmen und Zellzustand unter dem Mikroskop kontrollieren
- Medium absaugen und dabei den Zellrasen nicht berühren
- 2ml PBS zum Waschen dazu, Fläschchen in die Hand nehmen und ein paar Mal kippen
- PBS wieder absaugen
- 1ml Accutase hinein pipettieren
- Fläschchen für 10 Minuten in Inkubator stellen, damit Enzym wirken kann; Wichtig: Accutase gut verteilen, Fläschchen mit der Hand etwas hin und her kippen
- In 2 neue, sterile Fläschchen jeweils 8 ml Medium vorlegen; Passagezahl und Ziellinie auf die Fläschchen schreiben
- Fläschchen aus Inkubator holen, auf den Boden und die Seiten klopfen, um alle Zellen von der Wand zu lösen

- 4ml Medium in jedes der zwei Fläschchen pipettieren
- jeweils 5 Mal Medium wieder aufsaugen und direkt auf den Zellrasen sprühen
- Zellsuspension in einem Fläschchen vereinen; Zellen durch leichtes schütteln/schwenken gleichmäßig verteilen
- 1-1,4ml der Zellsuspension (abhängig vom Zellzustand) in jedes der beiden neuen ZK Fläschchen pipettieren
- restliche Zellsuspension für anschließenden Comet Assay verwenden bzw. verwerfen
- ZK Fläschchen wieder in Inkubator legen und einige Male eine kreuzförmige Bewegung mit den Fläschchen beschreiben, um die Zellen gleichmäßig zu verteilen



Abbildung 9: Laminar Flow und Zellpassage



Abbildung 10: Zellpassage

3.2.3.3. Zellzahlbestimmung

- nach Zellpassage 20µl Zellsuspension entnehmen und in Cup für Zellzahlbestimmung pipettieren
- 20µl Trypanblau dazupipettieren, resuspendieren
- 10µl der Suspension in Countess Slide pipettieren → Vorsicht, es darf keine Flüssigkeit außerhalb der Kammer sein
- Slide in Countess stecken, Bild scharf stellen und „Count Cells“ wählen
- für uns wichtige angezeigte Werte (Live und Viability) notieren

Die Zellvitalität (Viability, %) sollte möglichst hoch sein, um 90%. Mit diesem Wert kann der momentane Zellzustand beurteilt werden. Im Gegensatz zu gesunden Zellen kann Trypanblau in Zellen mit nicht vollständig intakter Membran eindringen. Der Live Wert sagt aus, wie viele Zellen pro ml Zellsuspension intakt sind.

3.2.3.4. Auftauen und einfrieren der Zellen

Auftauen

Zur Inkulturnahme müssen Zellen möglichst rasch aufgetaut werden.

- Zellen im Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C erwärmen
- Suspension in Zentrifugenröhrchen mit 5ml vorgelegtem Medium pipettieren
- zentrifugieren, 7 Minuten, 600G, 4°C
- Überstand verwerfen, Zellen mit 1ml Medium aufnehmen und in ZK Fläschchen mit 8ml vorgelegtem Medium pipettieren

Einfrieren

Zur längerfristigen Lagerung kann man Zellen einfrieren.

- 1ml mit Accutase abgelöste Zellen in Kryoröhrchen pipettieren
- 10% DMSO, 40% FBS, 50% antibiotikafreies Zellkulturmedium und Gefrierschutz dazu pipettieren
- 24 Stunden bei -20°C einfrieren, danach bei -80°C
- zur längerfristigen Lagerung werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt

3.2.4. Zellvorbereitung auf den Comet Assay

3.2.4.1. Aussaat der Zellen – Tag 1

- Zellsuspension, die nach Zellpassage (siehe 3.2.3.3) übrig geblieben ist, in Zentrifugenröhrchen pipettieren; 5 Minuten (600G, 4°C) zentrifugieren

- 6-Well Platte im Laminar Flow mit Pigment Konzentrationen, Zelllinie und Passagezahl beschriften
- Medium aus zentrifugiertem Röhrchen absaugen. VORSICHT – Zellpellet am Röhrchenboden!
- 1ml PBS auf Pellet pipettieren → vortexen
- Zellzahl bestimmen (siehe 3.2.3.3.), Live & Viability notieren → pro Well müssen 300 000 Zellen ausgesät werden
- wenn Zellzahl zu niedrig ist: noch einmal zentrifugieren, PBS absaugen und mit weniger PBS verdünnen; Zellzahl erneut bestimmen
- 3ml Medium in jedes Well pipettieren
- danach in jedes Well 0,..ml (Menge aus dem Live-Wert berechnen!) Zellsuspension pipettieren
- im Inkubator sanft kreuzförmige Bewegung mit der Platte beschreiben

3.2.4.2. Inkubation mit Pigment – Tag 2

In dieser Arbeit wurden die Gallenpigmente und Tetrapyrrole Urobilin (UB), Stercobilin (SB), Biliverdin (BV) und Biliverdindimethylester (BVDME) jeweils in den Konzentrationen 17mM, 5mM und 0,5mM verwendet. Die jeweilige Einwaagemenge an Tetrapyrrol, gelöst in 200µl DMSO, für die Stockkonzentration 17mM, wurde pro Tetrapyrrol berechnet.

- 3 dunkle Cups mit den Konzentrationen beschriften
- Pigment in 17mM Cup laut Berechnung einwiegen
- 200µl DMSO in Cup pipettieren
- Cup 5 Minuten auf Wärmeplatte stellen (unter Lichtschutz), vortexen, dann 3 Minuten ins Ultraschallbad stellen, vortexen; diese Schritte noch einmal wiederholen, damit sich Pigment vollständig löst
- jetzt aus der Konzentration 17mM nach folgendem Schema die anderen Konzentrationen herstellen, nach jedem Schritt gut vortexen:
$$5\text{mM} \rightarrow 5/17 \cdot 200 = 59\mu\text{l von } 17\text{mM} \quad +141\mu\text{l DMSO} = 200\mu\text{l}$$
$$0,5\text{mM} \rightarrow 0,5/5 \cdot 200 = 20\mu\text{l von } 5\text{mM} \quad +180\mu\text{l DMSO} = 200\mu\text{l}$$
- 4 Zentrifugenröhrchen mit den 3 Konzentrationen und Negativkontrolle beschriften

- In jedes der 4 Röhrchen 4ml Medium pipettieren, in Negativkontrolle 4µl DMSO und die drei anderen Röhrchen jeweils 4µl aus dem Cup mit entsprechender Konzentration, vor der Entnahme gut vortexen → so ergeben sich die Endkonzentrationen 17µM, 5µM und 0,5µM
- 6-Well Platte (am Vortag ausgesät) aus dem Inkubator holen und altes Medium absaugen
- 2,5ml aus jedem Röhrchen in entsprechendes Well pipettieren, davor jedes Röhrchen vortexen → Zeit notieren - genau 24 Stunden im Inkubator inkubieren

3.2.5. Arbeitsablauf Elektrophorese - Tag 3

In dieser Arbeit wurde die alkalische SCGE (Comet Assay), mit einem Lyse pH-Wert von 10 und einem Elektrophorese pH-Wert von 13 verwendet.

3.2.5.1. Zellen ablösen und Zellzahl bestimmen

- 4 Zentrifugenröhrchen mit Konzentrationen beschriften
- nach 24 Stunden Inkubation 6-Well Platte aus Inkubator nehmen und Medium in entsprechendes Zentrifugenröhrchen pipettieren
- 250µl Accutase in jedes Well pipettieren, 5-10 Minuten in Inkubator stellen
- Zellablösung mittels Lichtmikroskop kontrollieren und wenn nötig etwas auf den Plattenboden klopfen
- 1ml Medium in jedes Well pipettieren; einige Male wieder aufsaugen und auf den Zellrasen sprühen – Suspension in entsprechendes Röhrchen pipettieren
- eventuell noch einmal Ablösung unter dem Mikroskop kontrollieren
- Röhrchen zentrifugieren: 7 Minuten, 600G, 4°C
- ab jetzt wieder mit Licht arbeiten – Medium absaugen
- 1ml PBS in jedes Zentrifugenröhrchen, vortexen
- 5 min zentrifugieren → absaugen, 1ml PBS dazu, vortexen
- 5 min zentrifugieren → absaugen
- 270µl PBS in jedes Röhrchen → vortexen

- Zellzahl von jedem Zentrifugenröhrchen bestimmen → soll ca. $1,0 \times 10^6$ pro Röhrchen sein; Wenn Zellzahl abweicht, entsprechend verdünnen bzw. weiteren Zentrifugationsschritt durchführen
- Röhrchen auf Eis stellen



Abbildung 11: Zellsuspension mit Tetrapyrrol

3.2.5.2. Aufbringen auf Objektträger

Objektträger wie im Beispiel in Abbildung 12 beschriftet und Deckgläser griffbereit vorbereiten

	01.07.2011 CaCo2 UB K1 Lyse	Datum
		Zelllinie
		Pigment
		Konzentration (1, 2, 3, neg/pos)
		Lyse/t-BOOH (je 2x pro Konzentration)

Abbildung 12: Objektträger beschriften

- LMA aus dem Kühlraum in der Mikrowelle verflüssigen und im Wasserbad bei 37°C warm halten
- 140µl Agarose + 30µl Zellsuspension in Cup pipettieren und mischen → auf entsprechendem Objektträger auftragen; pro Objektträger 2 mal 70µl (2 Gele) auftragen, Deckgläser darauf
- 10 Minuten trocknen im Kühlraum – Deckgläser vorsichtig abnehmen

3.2.5.3. *t*-BOOH/Lyse Behandlung

- *t*-BOOH Lösung fertig stellen: 100µl *t*-BOOH Stocklösung gut mit 100ml Aqua dest. mischen
- Lyse Lösung fertig stellen: 200ml Lyse Lösung in Becherglas auf Magnetrührer stellen und langsam 2ml Triton X 100 zutropfen
- Lösung auf 2 Behälter aufteilen und beschriften (einmal Lyse *t*-BOOH, einmal nur Lyse)
- *t*-BOOH Objektträger für 5 Minuten in die Lösung stellen, danach kurz in Wasser tauchen
- *t*-BOOH Objektträger in Lysebehälter für *t*-BOOH stellen – 1 Stunde
- restliche Objektträger in normalen Lysebehälter stellen – 1 Stunde

3.2.5.4. Elektrophorese

- Elektrophoresekammer mit Powersupply Gerät im Kühlraum vorbereiten
- Objektträger aus der Lyse und falls nötig, leere Objektträger auflegen, damit Kammer vollständig gefüllt ist
- ca. 200ml Elektrophoreselösung in Becherglas beiseite stellen, Rest in die Elektrophoresekammer gießen, so dass alles mit Lösung bedeckt ist
- es dürfen keine Luftblasen unter den Objektträgern bleiben – vorsichtig aufheben und wieder senken
- Deckel schließen - 20 Minuten unwinding Phase (hierbei wird die doppelsträngige DNA im Zellkern in ihre Einzelstränge entwunden)
- Elektrophorese einschalten (25 Volt, 1000mA, 150 Watt, 30 Minuten)
- Stromstärke (mA) wird gezählt, muss zwischen 290 und 310mA liegen
- der Wert der Stromstärke ist regulierbar durch Zugabe von Elektrophoreselösung aus dem beiseite gestellten Becherglas bzw. durch Entnahme von Lösung aus der Kammer
- danach zuerst alle Objektträger für 5 Minuten in Neutralisationspuffer stellen, dann 5 Minuten in Wasserbehälter stellen
- danach Objektträger auf Papier zum Trocknen auflegen
- am folgenden Tag Objektträger in geeignete Box einsortieren und bis zur Auswertung im Kühlraum lagern

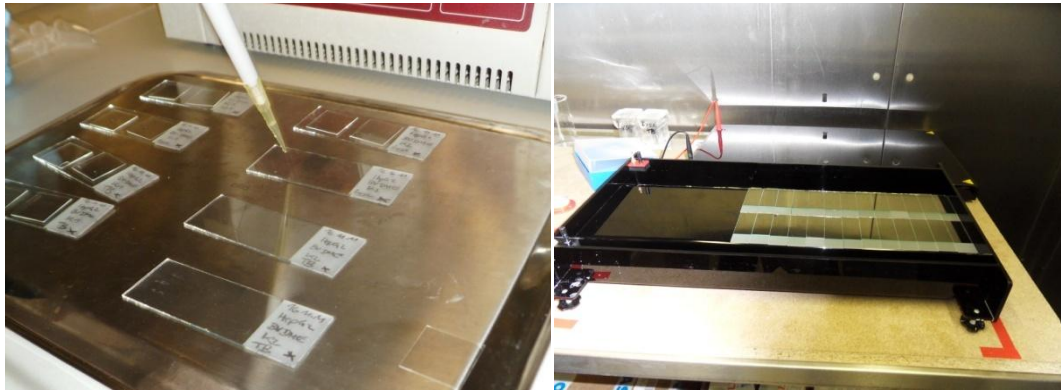


Abbildung 13: Vorbereitung der Objektträger
Abbildung 14: Elektrophorese

3.3. Auswertung

Die Auswertung der Gele erfolgte EDV gestützt, dazu kam die Software Comet 5.5 zum Einsatz. Die Gele auf den Objektträgern wurden einzeln mit der Ethidiumbromid Stocklösung gefärbt und ins Fluoreszenzmikroskop mit Kamera eingespannt. Unter Berücksichtigung eines Auszählschemas wurden pro Gel 50 Zellen gezählt. Von den 8 Gelen pro Konzentration (jeweils 4 für Lyse und 4 für *t*-BOOH) wurden mindestens 6 ausgezählt. Die Vorgehensweise bei der Auswertung sah folgendermaßen aus:

- Objektträger aus dem Kühlraum holen, Schutzkleidung anziehen, PC und Programm starten
- 30µl Ethidiumbromid Lösung vorsichtig auf Gel pipettieren und Deckglas darauf geben
- Objektträger unter Fluoreszenzmikroskop einspannen und laut Schema 50 Zellen zählen
- NICHTS ohne Schutzhandschuhe und Mantel berühren!

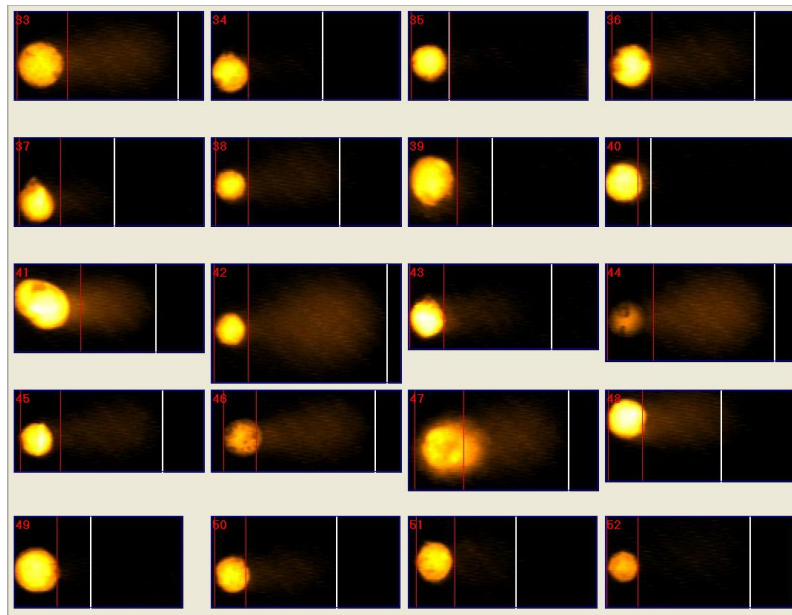


Abbildung 15: Caco-2 Zellen im Auswertungsprogramm Comet 5.5

3.3.1. Gefahrenpotential Ethidiumbromid

Laut der EU Verordnung für Gefahrenstoffkennzeichnung erhält Ethidiumbromid die Symbole GSH06 (giftig oder sehr giftig) und GSH08 (Gesundheitsgefährdend). Laut den H und P sowie R und S Sätzen wirkt Ethidiumbromid toxisch beim Einatmen und steht im Verdacht, genetische Defekte (Keimzellmutationen) zu verursachen. Es kann zu irreversiblen Schäden kommen. Man soll das Einatmen der Substanz vermeiden und bei der Arbeit Schutzkleidung sowie Handschuhe tragen. Ethidiumbromid darf nicht ins Abwasser gelangen [SIGMA-ALDRICH, 2012].

3.4. Statistische Auswertung

Aus den Daten, die sich durch die Auswertung der Gele mittels dem Programm Comet 5.5 ergeben haben, wurden die Mittelwerte der prozentuellen Anteile an DNA im Kometenschweif (%tail DNA) berechnet und in Microsoft Excel 2007 übertragen. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden anschließend die Mittelwerte und die Standardabweichungen pro Konzentration berechnet. Mit diesen Werten als Grundlage wurden anschließend Grafiken erstellt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit SPSS 17.0. Verwendet wurden die explorative Datenanalyse zur Ausreißerbereinigung, die einfaktorielle

Varianzanalyse (one-way ANOVA) nach Überprüfung der Normalverteilung mittels K-S Test bzw. Histogramm, Mittelwertvergleiche mit dem post-Hoc Test Dunnett3 und die bivariate Korrelationsanalyse.

3.5. Arbeitsablauf

3.5.1. Testaufbau

Wie bereits erklärt, wurde aus statistischen Gründen für jedes Gallenpigment zwei Mal ein Test (Comet Assay) durchgeführt. Tabelle 4 stellt den Ablauf des Auftragens des Zellgemisches auf die Objektträger dar. Alle Objektträger wurden mit der Lyselösung behandelt, zusätzlich wurde ein Teil der Objektträger davor noch (wie in Tabelle 4 erwähnt) einer *t*-BOOH Behandlung ausgesetzt.

Konzentration 1 (0,5µM)	2 Objektträger 2 Objektträger mit <i>t</i> -BOOH
Konzentration 2 (5µM)	2 Objektträger 2 Objektträger mit <i>t</i> -BOOH
Konzentration 3 (17µM)	2 Objektträger 2 Objektträger mit <i>t</i> -BOOH
Kontrolle (nur Zellen)	2 Objektträger Negativkontrolle 2 Objektträger Positivkontrolle mit <i>t</i> -BOOH
16 Objektträger = 32 Gele pro Test	

Tabelle 4: Testaufbau

3.5.2. Wochenrhythmus

In der Testphase wurden pro Woche bei idealen Bedingungen 2 Tests durchgeführt. Die Behandlung der Zellen in den ZK Fläschchen wurde immer gleich gehandhabt, egal ob Tests stattfanden oder nicht. Der Arbeitsablauf erfolgte wie in Abbildung 16 gezeigt.

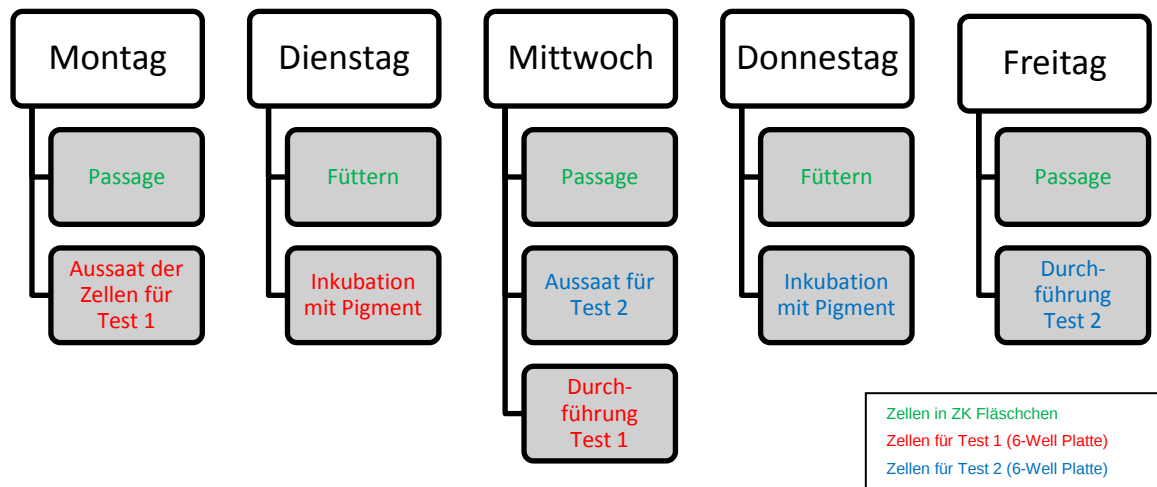


Abbildung 16: Arbeitsschema Wochenrhythmus

4. Ergebnisse und Diskussion

Im experimentellen Teil dieser Masterarbeit wurden die Auswirkungen der Tetrapyrrole Urobilin, Stercobilin, Biliverdin und Biliverdindimethylester auf die humane Colonicarcinomzelllinie Caco-2 getestet.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Tetrapyrrols behandelt und 24 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Teil der Zellen zusätzlich dem Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid ausgesetzt. Zum Vergleichen der Tetrapyrrol Effekte auf die Zellen gab es je Tetrapyrrol auch eine Negativkontrolle (nur Zellen) und eine Positivkontrolle (Zellen mit *t*-BOOH).

Der Effekt der Tetrapyrrole auf die Caco-2 Zellen wurde mittels Comet Assay getestet. Pro Tetrapyrrol wurden zwei voneinander unabhängige Versuche unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

Mit Hilfe des Computerprogramms Comet 5.5 wurden der prozentuale Anteil an DNA im Kometenschweif (%tail DNA) der Zellen nach den verschiedenen Versuchen ermittelt und mit den Programmen EXCEL und SPSS graphisch und statistisch ausgewertet.

4.1. Effekte der Tetrapyrrole auf Caco-2 Zellen

Im Folgenden finden sich die grafisch und statistisch ausgewerteten Versuchsergebnisse.

4.1.1. Urobilin

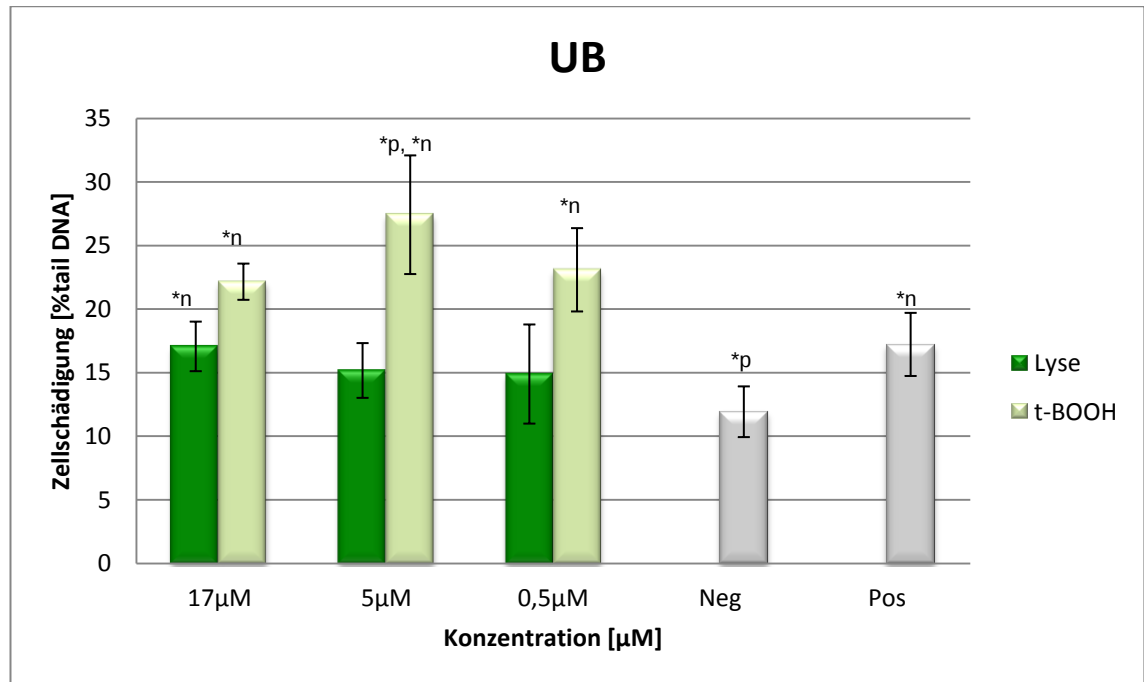


Abbildung 17: Effekte von Urobilin im Comet Assay; das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der %tail DNA Gehalte der Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Urobilin von zwei unabhängigen Versuchen (Lyse und t-BOOH Behandlung) im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle. Mit *p und/oder *n gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).

Lyse

UB Lyse	17µM	5µM	0,5µM	Neg	Pos
Neg	0,019	0,256	0,674		0,049
Pos	1	0,805	0,898	0,049	

Tabelle 5: UB Lyse - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Urobilin.

Bei den Versuchen mit Urobilin unterschieden sich Positiv- und Negativkontrolle signifikant ($p = 0,049$). Die Konzentration von 17µM hat gegenüber der Negativkontrolle eine signifikant höhere DNA Schädigung bewirkt ($p = 0,019$). Die Konzentration 17µM unterschied sich im %tail DNA Gehalt nicht von der

Positivkontrolle. Die Konzentrationen 0,5µM und 5µM wiesen ähnliche %tail DNA Gehalte auf. Diese waren höher als die Gehalte der Negativkontrolle und niedriger als die der Positivkontrolle, unterschieden sich aber nicht signifikant. Beim grafischen Vergleich der Werte der Konzentrationen 0,5µM und 5µM mit dem der Konzentration 17µM ist eine leichte aber nicht signifikante Steigerung des %tail DNA Gehalts zu beobachten.

t-BOOH

UB t-BOOH	17µM	5µM	0,5µM	Neg	Pos
Neg	0	0,001	0,001		0,049
Pos	0,052	0,015	0,065	0,049	

Tabelle 6: UB t-BOOH - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Urobilin und t-BOOH Behandlung.

Bedingt durch die Behandlung mit t-BOOH wiesen die Konzentrationen 0,5µM, 5µM und 17µM einen signifikant höheren %tail DNA Wert auf als die Negativkontrolle ($p=0,001$, $0,001$ und $0,000$). Die Konzentration 5µM zeigte einen signifikant höheren %tail DNA Wert als die Positivkontrolle ($p=0,015$). Die Konzentrationen 0,5µM und 17µM wiesen ähnliche Werte auf und zeigten ebenfalls höhere %tail DNA Werte als die Positivkontrolle, der Unterschied war jedoch nicht signifikant, allerdings war ein Trend vorhanden.

4.1.2. Stercobilin

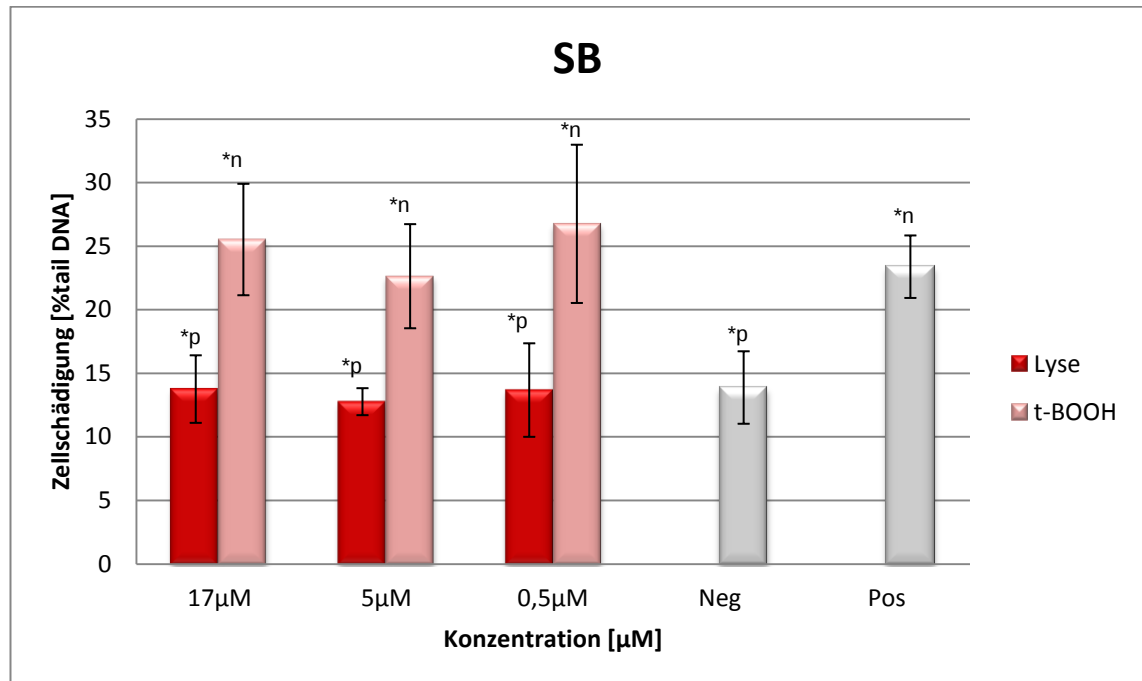


Abbildung 18: Effekte von Stercobilin im Comet Assay; das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der %tail DNA Gehalte der Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Stercobilin von zwei unabhängigen Versuchen (Lyse und t-BOOH Behandlung) im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle. Mit *p und/oder *n gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).

Lyse

SB Lyse	17µM	5µM	0,5µM	Neg	Pos
Neg	1	0,976	1		0,006
Pos	0,005	0,009	0,003	0,006	

Tabelle 7: SB Lyse - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Stercobilin.

Bei der Behandlung der Zellen mit Stercobilin unterschieden sich Positiv- und Negativkontrolle signifikant ($p = 0,006$). Die Konzentrationen 0,5µM, 5µM und 17µM zeigten alle ähnlich hohe %tail DNA Werte wie die Negativkontrolle. Diese Werte waren signifikant niedriger als die %tail DNA Werte der Positivkontrolle ($p = 0,003$, 0,009, 0,005), es konnten keinerlei Unterschiede zwischen den drei verschiedenen verwendeten Konzentrationen festgestellt werden.

t-BOOH

SB <i>t</i> -BOOH	17µM	5µM	0,5µM	Neg	Pos
Neg	0,004	0,017	0,003		0,006
Pos	0,963	1	0,839	0,006	

Tabelle 8: SB t-BOOH - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche;; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Stercobilin und t-BOOH Behandlung.

Bei den Zellen die mit *t*-BOOH behandelt wurden, zeigten alle drei Konzentrationen signifikant höhere %tail DNA Werte als die Negativkontrolle ($p=0,003$, $0,017$, $0,004$) und waren in etwa gleich hoch wie die DNA Schädigung der Positivkontrolle.

4.1.3. Biliverdin

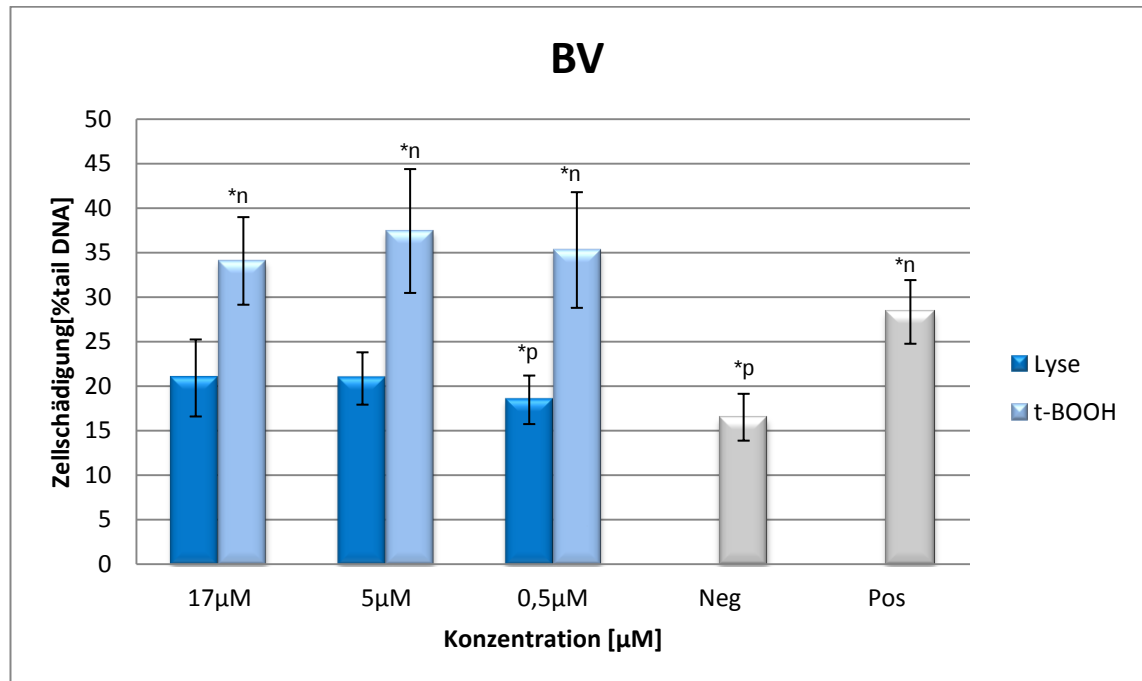


Abbildung 19: Effekte von Biliverdin im Comet Assay; das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der %tail DNA Gehalte der Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Biliverdin von zwei unabhängigen Versuchen (Lyse und t-BOOH Behandlung) im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle. Mit *p und/oder *n gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).

Lyse

BV Lyse	17µM	5µM	0,5µM	Neg	Pos
Neg	0,39	0,167	0,874		0,015
Pos	0,14	0,097	0,032	0,015	

Tabelle 9: BV Lyse – Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Biliverdin.

Der Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle war hier signifikant ($p=0,015$). Zellen, die mit BV behandelt wurden, wiesen bei den Konzentrationen 0,5µM, 5µM und 17µM etwas höhere %tail DNA Werte auf als die Negativkontrolle, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Konzentration 0,5µM unterschied sich signifikant von der Positivkontrolle ($p=0,032$), die Konzentrationen 5µM und 17µM zeigten ebenfalls niedrigere %tail DNA Werte als die Positivkontrolle, allerdings waren diese nicht signifikant niedriger. Die Konzentrationen 5µM und 17µM wiesen zwar keine signifikant

höheren Werte als die Negativkontrolle auf, betrachtet man die Grafik, zeichnet sich jedoch ein leicht erhöhter %tail DNA Gehalt dieser beiden Konzentrationen ab.

t-BOOH

BV <i>t</i> -BOOH	17µM	5µM	0,5µM	Neg	Pos
Neg	0,001	0,003	0,003		0,015
Pos	0,396	0,19	0,375	0,015	

Tabelle 10: BV t-BOOH - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Biliverdin und t-BOOH Behandlung.

Bei zusätzlicher Behandlung mit *t*-BOOH wiesen die Konzentrationen 0,5µM 5µM und 17µM signifikant höhere %tail DNA Werte auf als die Negativkontrolle ($p=0,003$, $0,003$, $0,001$) sowie grafisch betrachtet, leicht, aber nicht signifikant höhere %tail DNA Werte als die Positivkontrolle.

4.1.4. Biliverdindimethylester

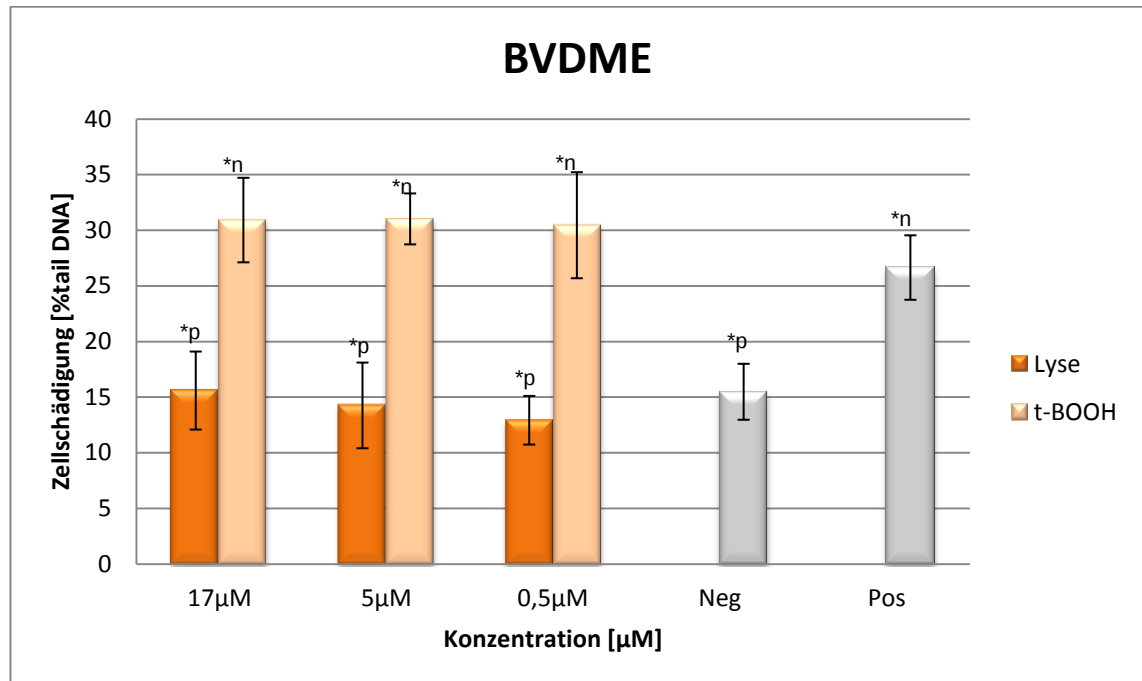


Abbildung 20: Effekte von Biliverdindimethylester im Comet Assay; das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung der %tail DNA Gehalte der Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Biliverdindimethylester von zwei unabhängigen Versuchen (Lyse und t-BOOH Behandlung) im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrolle. Mit *p und/oder *n gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).

Lyse

BVDME	17µM	5µM	0,5µM	Neg	Pos
Lyse					
Neg	1	0,998	0,581		0,002
Pos	0,003	0,002	0	0,002	

Tabelle 11: BVDME Lyse - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche;; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Biliverdindimethylester.

Auch hier war ein signifikanter Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle zu beobachten ($p = 0,002$). Nach der Behandlung mit BVDME zeigten die Zellen der Konzentrationen 0,5µM 5µM und 17µM signifikant niedrigere %tail DNA Werte als die Positivkontrolle ($p = 0,000$, 0,002, 0,003) und in etwa gleich hohe Werte wie die Negativkontrolle.

t-BOOH

BVDME <i>t</i> -BOOH	17µM	5µM	0,5µM	Neg	Pos
Neg	0	0	0,002		0,002
Pos	0,395	0,184	0,672	0,002	

Tabelle 12: BVDME *t*-BOOH - Ergebnisse der Mittelwertvergleiche;; Signifikanzen der Mittelwertvergleiche; Die Tabelle zeigt signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, farbig markiert) der %tail DNA Gehalte (Zellschädigung) der getesteten Konzentrationen und Positiv- sowie Negativkontrolle nach 24h Inkubation mit Biliverdindimethylester und *t*-BOOH Behandlung.

Bei zusätzlicher *t*-BOOH Behandlung zeigten die Zellen der Konzentrationen 0,5µM 5µM und 17µM signifikant höhere %tail DNA Werte als die Negativkontrolle ($p=0,002$, 0,000, 0,000) sowie, graphisch betrachtet, etwas höhere %tail DNA Werte als die Positivkontrolle, allerdings ohne Signifikanz.

4.2. Ergebnisse - Gesamtgrafiken

4.2.1. Lyse

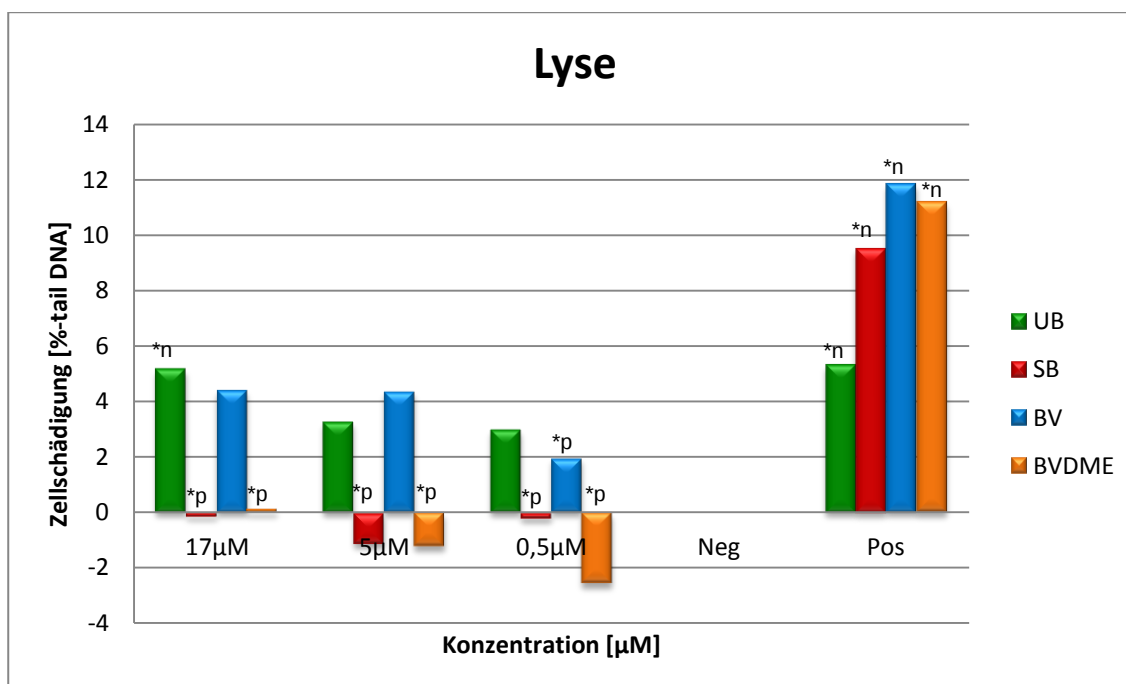


Abbildung 21: Gesamtübersicht der Ergebnisse aller Tetrapyrrole nach dem Comet Assay – Lyse. Im Balkendiagramm sind die Unterschiede der einzelnen Pigmentkonzentrationen sowie der Positivkontrolle zur hier null gesetzten Negativkontrolle dargestellt. Mit *n und/oder *p gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).

Vergleicht man die Ergebnisse aller Tetrapyrrole nach der Lysebehandlung zeigt sich, dass UB und BV in allen Konzentrationen höhere DNA Schädigungen bewirkt haben als die Negativkontrolle und dass SB und BVDME gleich hohe bzw. leicht geringere DNA Schäden als die Negativkontrolle verursacht haben. Für die Ergebnisse der Arbeit relevante statistische Signifikanz im Vergleich mit der Negativkontrolle erreichte allerdings nur die Behandlung der Caco-2 Zellen mit UB bei der Konzentration 17µM.

4.2.2. *t*-BOOH

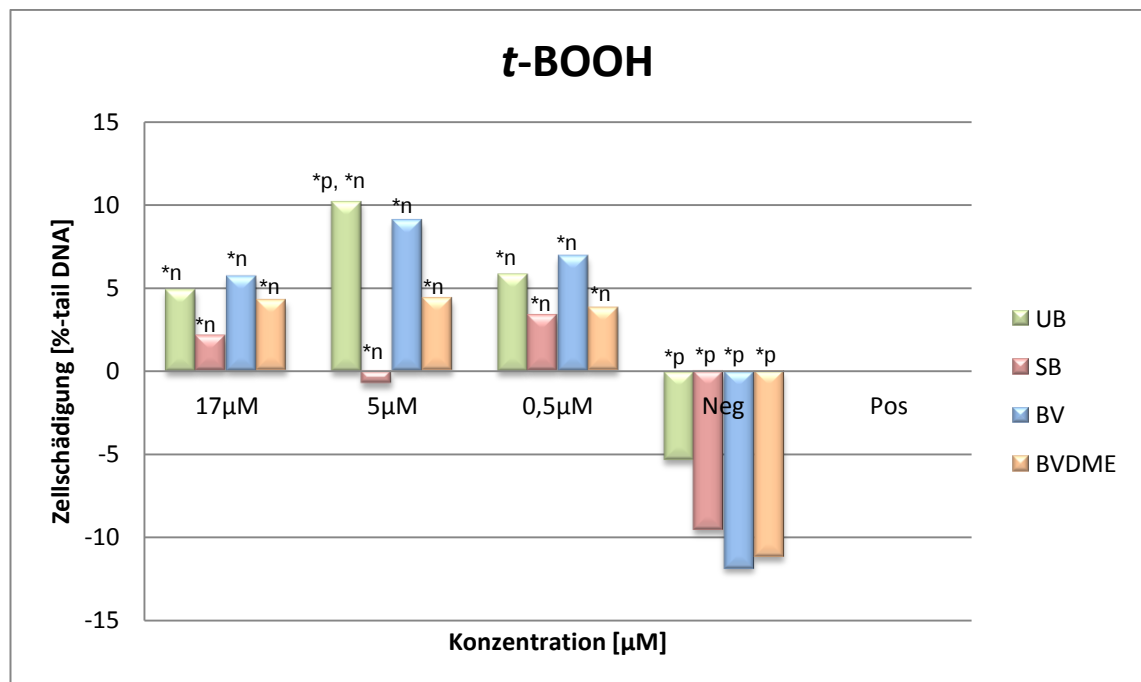


Abbildung 22: Gesamtübersicht der Ergebnisse aller Tetrapyrrole nach dem Comet Assay – *t*-BOOH. Im Balkendiagramm sind die Unterschiede der einzelnen Pigmentkonzentrationen sowie der Negativkontrolle zur hier null gesetzten Positivkontrolle dargestellt. Mit *n und/oder *p gekennzeichnete Balken unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von der Positiv- (*p) oder von der Negativkontrolle (*n).

Beim Vergleich der Tetrapyrrol Effekte nach der Behandlung mit *t*-BOOH, erkennt man, dass alle Tetrapyrrole höhere DNA Schädigungen erreicht haben als die jeweilige Negativ- und Positivkontrolle, mit Ausnahme der Konzentration 5µM von SB, die etwas unter dem Wert der Positivkontrolle liegt. Für die Ergebnisse relevante statistische Signifikanz erreichte allerdings nur die Konzentration 5µM von UB.

4.3. Korrelationen

Im Rahmen des FWF-Projekts Physiological Relevance of Bile Pigments wurden außer dem Comet Assay noch weitere Methoden zur Untersuchung der Effekte von Gallenpigmenten auf Caco-2 Zellen verwendet, auf die in vorliegender Arbeit nicht im Detail eingegangen wird. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden Apoptose und Zellzahl Assays durchgeführt sowie intrazelluläre Superoxide und Hydroperoxide gemessen. Im Folgenden finden sich interessante Korrelationen zwischen den Ergebnissen aus den genannten anderen Projektteilen und den Ergebnissen aus dieser Masterarbeit.

	Interzelluläre Hydroperoxide	Cellcycle Apoptose	Interzelluläre Superoxide	Prozent Apoptose
BV Lyse	r=0,768 p=0,006			
BVDME Lyse		r=0,574 p=0,032		
SB Lyse		r=0,479 p=0,083		
UB <i>t</i> -BOOH		r=-0,453 p=0,090		
BV <i>t</i> -BOOH			r=0,471 p=0,144	r=0,381 p=0,222
SB <i>t</i> -BOOH		r=0,300 p=0,297		

Tabelle 13: Ergebnisse der Korrelationsanalysen der DNA Schädigung in Caco-2 Zellen; r=Korrelationskoeffizient, Signifikante Korrelation wenn $p < 0,05$;

Bei der Korrelationsanalyse zeigte sich eine starke, signifikante positive Korrelation zwischen der DNA Schädigung in Caco-2 Zellen nach Inkubation mit BV (bei Lysebehandlung) und den intrazellulären Hydroperoxiden.

Beim Tetrapyrrol BVDME (Lysebehandlung) und Apoptose Assay war eine mittlere, signifikante Korrelation mit der DNA Schädigung zu erkennen. Ein Trend zu signifikanten Korrelation zeichnete sich bei der DNA Schädigung von SB (Lyse) und Apoptose Assay ab.

Bei Caco-2 Zellen, die mit UB (*t*-BOOH) behandelt wurden und dem Apoptose Assay war eine mittlere, negative Korrelation mit Tendenz zur Signifikanz beobachtbar.

DNA Schäden bei BV (*t*-BOOH Behandlung) zeigten eine mittlere bzw. leichte Korrelation mit intrazellulären Superoxiden bzw. Prozent Apoptose, allerdings war diese Beobachtung nicht signifikant.

Eine ebenfalls nicht signifikante, leicht positive Korrelation zeigten Caco-2 Zellen bei der Behandlung mit SB (*t*-BOOH) zwischen DNA Schäden und dem Apoptose Assay.

4.4. Diskussion

Laut dem World Cancer Report 2008 werden weltweit jährlich 12 Millionen Krebsfälle neu diagnostiziert. Bis zum Jahr 2030 wird diese Zahl auf über 25 Millionen anwachsen. Darmkrebs ist in Industrieländern eine der häufigsten Ursachen bei Todesfällen durch Krebserkrankungen [IARC, 2008]. Ziel der Forschung ist es sowohl Wege zur Prävention als auch neue Behandlungsmittel und -methoden zu finden. Die vorliegende Arbeit soll zusammen mit den anderen Arbeiten im Rahmen dieses FWF Projekts neue Erkenntnisse bringen und Ansporn für weitere Studien zur Aufklärung der anticancerogenen Wirkung von Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen liefern.

In Anbetracht der Forschungsergebnisse zu den vielfältigen Wirkungen von Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen, war das Ziel der vorliegenden *in vitro* Studie, die Effekte der Tetrapyrrole UB, SB, BV und BVDME auf humane Caco-2 Zellen zu untersuchen und eventuell neue Hinweise auf die anticancerogenen Eigenschaften dieser Substanzen zu erhalten.

Da es zum Thema anticancerogene Effekte von UB, SB, BV und BVDME *in vitro* zur Zeit wenig bis keine Literatur gibt, die gut mit den Versuchsbedingungen dieser Masterarbeit vergleichbar ist, gestaltet sich die Diskussion der Ergebnisse nicht ganz einfach. Aus diesem Grund werden in der Diskussion auch Studien herangezogen, die ähnliche Tetrapyrrole oder andere Zelllinien sowie andere Untersuchungsmethoden als den Comet Assay verwendet haben.

Die Diskussion verläuft dahingehend, dass eine erhöhte Schädigung der Caco-2 Zellen durch die Tetrapyrrol Behandlung in den Ergebnissen dieser Arbeit darauf hinweist, dass die Zellen so geschädigt werden, dass sie nicht mehr wachsen können. Das wiederum könnte auf einen anticancerogenen Effekt hindeuten.

Rao *et al.* verwendeten in ihrer Studie zur anticancerogenen Wirkung von BR, SB und UB auf humane TMK-1 Zellen verschiedene Methoden, darunter auch den Comet Assay. Dabei zeigte sich bei Kontrollzellen und bei Zellen, die mit

Urobilin behandelt wurden, intakte DNA. TMK-1 Zellen, die mit Bilirubin behandelt wurden, zeigten den typischen Kometenschweif, der auf DNA Schäden hinweist, bei 50-60% der Zellpopulation. Bei den Untersuchungen zur Zellproliferation nach 48h Inkubation mit dem Pigment wies ebenfalls nur Bilirubin einen Effekt auf (50% geringere Zellpopulation). Außerdem war ein Zellzyklusarrest in der G0/1 Phase bei der Bilirubin Behandlung erkennbar. Die Zellen können dabei nicht in die für die Zellproliferationsphase wichtige S-Phase übergehen. Es zeigte sich, dass BR in den TMK-1 Zellen prooxidativ wirkte, was letztendlich zu den anderen beobachteten BR Effekten führte [RAO *et al.*, 2006]. Öllinger *et al.* konnten denselben Zellzyklusarrest bei BR Behandlung in ihrer Studie an HRT-18 Zellen (humane colorectale Adonocarcinomzellen) feststellen [OLLINGER *et al.*, 2007; RAO *et al.*, 2006]. In der Studie von Rao *et al.* zeigten sowohl Urobilin als auch Stercobilin keine Effekte in den TMK-1 Zellen [RAO *et al.*, 2006].

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die Versuche mit SB keine signifikanten Effekte auf die untersuchten Caco-2. Im Gegensatz zur Beobachtung von Rao *et al.* bei TMK-1 Zellen zeigte sich bei Caco-2 in dieser Arbeit nach Inkubation mit UB und Lysebehandlung bei der Konzentration 17µM eine DNA Schädigung.

Zum Tetrapyrrol Stercobilin ist außer der Studie von Rao *et al.* keine weitere vergleichbare Arbeit in der Literatur zu finden.

Für die *in vitro* Versuche der Studie von Rao *et al.* wurden neben TMK-1 Zellen auch WI38 Zellen (humane Lungenzellen) verwendet, bei denen jedoch keinerlei Effekte der Testsubstanzen, weder ein Einfluss auf den Zellzyklus noch auf die Zellproliferation, festgestellt werden konnten. Das weist darauf hin, dass die Testsubstanzen, besonders BR, *in vitro* in normalen Zellen gar nicht bzw. anders wirken als in Tumorzellen [RAO *et al.*, 2006].

Teil der Studie von Rao *et al.* war auch ein *in vivo* Versuch, bei dem Mäusen TMK-1 Zellen und BR in verschiedenen Konzentrationen (Versuchsgruppe) oder PBS (Kontrollgruppe) injiziert wurden. Dabei konnten in allen Gruppen

positive Wirkungen von BR auf das Tumorwachstum beobachtet werden. [RAO *et al.*, 2006]. Auch Öllinger *et al.* injizierten in einem *in vivo* Versuch Mäusen HRT-18 Zellen, um die Wirkung von Bilirubin auf bereits vorhandene Tumore zu untersuchen. 14 Tage nach der Zellinjektion wurden die Mäuse in Versuchs- (25mg BR pro kg, 2 Mal täglich) und Kontrollgruppe (kein BR) geteilt. Das Wachstum der Tumore in der Versuchsgruppe war im Vergleich mit den Tumoren in der Kontrollgruppe deutlich reduziert [OLLINGER *et al.*, 2007].

Malhotra widmete sich in einer epidemiologischen Studie der Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Darmkrebsinzidenz und dem Urobilinogen Gehalt sowie den pH-Wert im Faeces von zwei indischen Bevölkerungsgruppen gibt. Dabei war das Darmkrebsrisiko in der Hochrisikogruppe doppelt so hoch als in der Kontrollgruppe. Aus beiden Gruppen wurden je 60 Personen untersucht, wobei sich zeigte, dass Personen aus der Hochrisikogruppe einen signifikant alkalischen Faeces pH-Wert aufwiesen und dass diese eine signifikant größere Menge Urobilinogen ausgeschieden haben als die Personen in der Kontrollgruppe. Der Autor bringt hier aber die Ernährung mit dem Urobilinogen Gehalt im Faeces in Zusammenhang. Dabei zeigte sich bei der Hochrisikogruppe eine Darmkrebs fördernde Ernährungsweise [MALHOTRA, 1982].

Im Rahmen dieser Masterarbeit zeigten Caco-2 Zellen nach 24h Inkubation mit Urobilin in der Konzentration 17µM eine signifikant höhere DNA Schädigung als Zellen der Negativkontrolle. Die Zellen aller drei UB Konzentrationen nach *t*-BOOH Behandlung tendierten zu einer höheren Schädigung als Zellen in der Positivkontrolle, die Konzentration 5µM zeigte eine signifikant höhere Schädigung. Diese Ergebnisse weisen auf einen anticancerogenen Effekt von Urobilin *in vitro* hin. Der beobachtete Effekt kann aber ohne weitere Forschungsarbeiten nicht auf *in vivo* Bedingungen umgelegt werden. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine *in vitro* Studie handelt und die Arbeit von Malhotra eine epidemiologische Studie ist, können die Ergebnisse nicht verglichen werden.

Keshavan *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit die Wirkung von BR, BRD und BV auf mehrere Darmkrebszelllinien, u. a. Caco-2 Zellen, mit verschiedenen Methoden. Dabei konnte nur BR die Zellvitalität, besonders bei HCT-15 Zellen, verringern und somit einen Effekt in allen Versuchszelllinien zeigen. Außerdem konnte im Fall der HCT-15 Zellen gezeigt werden, dass Bilirubin Apoptose induzieren kann. Hier verweisen die Autoren auf einen intrinsischen mitochondrialen Pathway, mit Cytochrom C Freisetzung, Mitochondrien Depolarisierung und Aktivierung der Caspase 9. Die Tatsache, dass die in der Studie verwendeten BR Konzentrationen (0,5-17µM) der physiologischen BR Konzentration im Intestinalraum entsprechen, legen die Vermutung nahe, dass BR die Tumorgenese im Darm beeinflussen kann [KESHAVAN *et al.*, 2004].

Wie in der Studie von Keshavan zeigte BV auch im Rahmen dieser Masterarbeit keinerlei signifikante Effekte auf die Zellschädigung in Caco-2 Zellen.

Ziel einer *in vitro* Studie von Ishikawa *et al.* war es, die Effekte von Hämin, das im Stoffwechsel zu Biliverdin abgebaut wird, auf Caco-2 Zellen, u. a. mittels Comet Assay, zu erforschen. Dabei konnte ein zellschädigender Effekt von Hämin auf die Caco-2 Zellen festgestellt werden. Es muss aber beachtet werden, dass die Autoren dieser Studie die Caco-2 Zellen als Modell für das Darmepithel verwendet haben und einen cancerogenen Effekt von Hämin nachweisen wollten, was ihnen auch gelungen ist. Die Studie basiert auf der Annahme, dass ein hoher Konsum an rotem Fleisch und somit auch Hämin eine Ursache für Darmkrebs ist [ISHIKAWA *et al.*, 2010].

Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden die Caco-2 Zellen als Krebszellen angesehen und eine erhöhte Schädigung der Zellen durch die Tetrapyrrole als anticancerogener Effekt betrachtet.

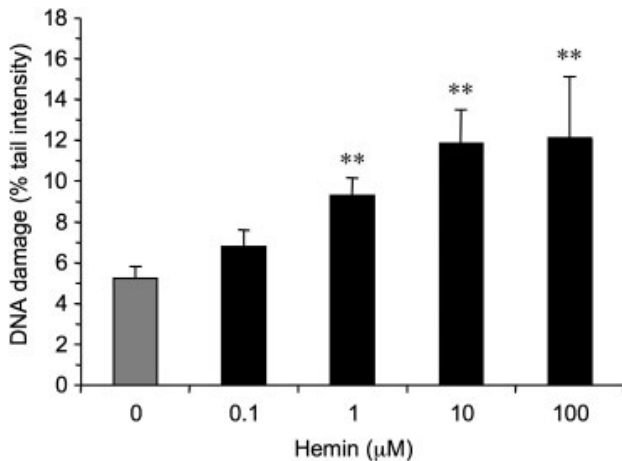


Abbildung 23: Effekt von Hämin in verschiedenen Konzentrationen auf DNA Schäden in Caco-2 Zellen, ermittelt durch den Comet Assay. Die Zellen wurden zuvor 6h mit dem Hämin inkubiert. **= $p < 0,01$ [ISHIKAWA et al., 2010]

Ishikawa *et al.* führen die von ihnen beobachtete cancerogene Wirkung von Hämin auf die Induktion von HO und das dabei entstehende H_2O_2 , das wiederum die Tumor Initiation und Promotion beeinflusst, zurück. HO kann von Hämin Metaboliten wie BV und BR im Darm nicht induziert werden [ISHIKAWA *et al.*, 2010].

Zum Tetrapyrrol Biliverdindimethylester findet sich zum momentanen Zeitpunkt gar keine Literatur die in irgendeiner Weise in Zusammenhang mit dem beschriebenen FWF Projekt steht. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei der Inkubation der Caco-2 Zellen mit Biliverdindimethylester keine signifikanten Effekte, weder bei der Lyse noch bei der *t*-BOOH Behandlung.

Außer den bereits erwähnten Effekten kann bei näherer Betrachtung der Ergebnissen dieser Masterarbeit beobachtet werden, dass Zellen nach *t*-BOOH Behandlung, unabhängig von Tetrapyrrol und Konzentration, immer signifikant höhere %tail DNA Werte als die jeweilige Negativkontrolle aufwiesen sowie, graphisch betrachtet, größtenteils auch höhere, allerdings nicht immer signifikante, %tail DNA Werte zeigten als die jeweilige Positivkontrolle. Das deutet an, dass die Tetrapyrrole die Caco-2 Zellen nicht vor dem Prooxidans schützten.

Natürlich darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die oben erwähnten Studien teilweise mit anderen Zelllinien bzw. mit strukturell mit den in dieser

Masterarbeit verwendeten Tetrapyrrolen verwandten Substanzen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser Studien sind somit nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Masterarbeit vergleichbar. Außerdem muss an dieser Stelle betont werden, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit und eine *in vitro* Studie handelt, die Zellen nehmen also nicht an Stoffwechselprozessen wie im lebenden Organismus teil. Aus diesem Grund können die Ergebnisse dieser Arbeit auf keinen Fall unmittelbar auf *in vivo* Bedingungen umgelegt werden.

Es gibt einige Humanstudien, die einen inversen Zusammenhang zwischen hohen Bilirubin Konzentrationen bzw. moderat erhöhten Bilirubin Konzentrationen und der Inzidenz von Krebs beschreiben.

In einer epidemiologischen Studie gingen Zucker *et al.* der Vermutung nach, dass es einen Zusammenhang zwischen Serum Bilirubin Gehalt und der Krebsinzidenz in der U.S. Bevölkerung gibt. Die mittlere Serum Bilirubin Konzentration war dabei bei Männern und bei Nichtrauchern signifikant höher. Personen, die angaben, zu einem früheren Zeitpunkt an einer Krebserkrankung gelitten zu haben, hatten signifikant niedrigere Serum Bilirubin Konzentrationen als Personen, die nie Krebs hatten. Besonders deutlich war dieser Zusammenhang bei Colorectalkrebs. Bei einer Erhöhung der Bilirubin Konzentration um 17µmol/l (1mg/dl) verringerte sich die Prävalenz von Colorectalkrebs deutlich (OR=0,257) [ZUCKER *et al.*, 2004]. Temme *et al.* untersuchten in ihrer prospektiven Studie einen möglichen Zusammenhang zwischen Serum Bilirubin Gehalt und Mortalität. Dabei zeigte sich, dass bei steigendem Serum Bilirubin Gehalt sowohl die Gesamtmortalität, als auch die Krebsmortalität sinken (RR 0,73 und 0,42; Vergleich von höchster mit geringster Bilirubin Konzentration) [TEMME *et al.*, 2001]. In einer neuen Fall Kontrollstudie (Colorectalkrebs Patienten verglichen mit Gesunden) von Jiraskova *et al.* konnten bei Erkrankten signifikant niedrigere Serum Bilirubin Konzentrationen festgestellt werden als bei Gesunden. Je 1µmol/l geringerer Bilirubin Konzentration stieg das Krebsrisiko um 7%. Zwischen Colorectalkrebsrisiko und der Genmutation für das Gilbert's Syndrom konnte

eine Assoziation gezeigt werden ($OR=0,80$), die allerdings nur bei Männern signifikant war [JIRASKOVA *et al.*, 2011]. Auch wenn der genaue Ablauf des Schutzmechanismus von Bilirubin gegen Colorectalkrebs nicht genau bekannt ist, dürfte die bei erhöhtem Bilirubin Spiegel ebenso erhöhte Bilirubin Konzentration im Darm eine essentielle Rolle spielen [JIRASKOVA *et al.*, 2011; TEMME *et al.*, 2001; ZUCKER *et al.*, 2004]

Ein großer Teil der Studien zu den Effekten von Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen verwendet Bilirubin als Untersuchungsmodell. Das liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit daran, dass Bilirubin im menschlichen Körper von Natur aus sowohl im Verdauungstrakt als auch im Blutkreislauf vorkommt und somit seine Wirkungen entfalten kann. Dadurch, dass die Bilirubin Konzentration von Mensch zu Mensch variieren kann, ist es relativ einfach, epidemiologische Studien im Zusammenhang mit der Bilirubin Konzentration und bestimmten Erkrankungen durchzuführen.

Szatrowski *et al.* konnten nachweisen, dass das Level an ROS in humanen Tumorzellen höher ist als in gesunden Zellen. Außerdem weiß man heute, dass Radikale die Krebsentstehung beeinflussen und begünstigen können [SZATROWSKI und NATHAN, 1991]. An diesem Punkt könnten Gallenpigmente und andere Tetrapyrrole mit ihren antioxidativen Eigenschaften ansetzen und Tumorentstehung sowie Wachstum beeinflussen, was nur einen von vielen möglichen Wirkungswegen von Gallenpigmenten im Körper darstellt.

Abschließend kann man festhalten, dass sich die momentan verfügbare Literatur zu Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen in Grenzen hält und zu einem großen Anteil auf *in vitro* Studien bzw. auf Bilirubin als Testsubstanz beschränkt. Dennoch konnten bereits bedeutende Forschungserfolge geleistet werden, die eine Basis für neue Forschungsprojekte bieten.

5. Schlussbetrachtung

Im menschlichen Stoffwechsel entstehen Gallenpigmente und Tetrapyrrole kontinuierlich auf natürliche Weise. Lange Zeit war die Meinung vorherrschend, dass diese nichts weiter als Stoffwechselendprodukte sind, die bei Akkumulation toxische Wirkungen entfalten. Dank zahlreicher Forschungsarbeiten gibt es vielerlei Hinweise darauf, dass Gallenpigmente und Tetrapyrrole, hier besonders Bilirubin, eine wichtige Rolle im menschlichen Körper spielen. Die dahinterstehenden Wirkungsmechanismen sind zum momentanen Zeitpunkt noch weitgehend unerforscht, trotzdem weisen die Ergebnisse aus *in vitro* und auch aus *in vivo* Studien auf vielfältige Wirkungen der Gallenpigmente hin, darunter antioxidative, antimutagene, anticancerogene und antiinflammatorische Effekte.

Die vorliegende Masterarbeit widmete sich der Untersuchung der Effekte von Urobilin, Stercobilin, Biliverdin und Biliverdindimethylester auf humane Caco-2 Zellen mit dem Ziel, einen möglichen anticancerogenen Effekt mittels DNA Schädigung nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden den Caco-2 Zellen mit dem jeweiligen Tetrapyrrol in drei verschiedenen Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. In weiterer Folge wurden die Zellen für den Assay vorbereitet, wobei ein Teil der Zellen dem Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid ausgesetzt wurde. Nach durchgeführtem Comet Assay wurden die Ergebnisse softwaregestützt grafisch und statistisch ausgewertet.

Eine signifikant erhöhte DNA Schädigung im Vergleich zur Negativkontrolle konnte in dieser Arbeit bei Behandlung der Caco-2 Zellen mit der höchsten Konzentration an Urobilin erzielt werden. Alle anderen Behandlungen, sowohl mit als auch ohne Tertiärbutyl Hydroperoxid Einfluss, brachten keine signifikanten Ergebnisse hervor, allerdings konnten vereinzelte Tendenzen beobachtet werden. Mit diesem Resultat liefert die vorliegende Masterarbeit einen weiteren Hinweis für eine mögliche anticancerogene Wirkung von Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen.

Es ist denkbar, dass Gallenpigmente und Tetrapyrrole bei Behandlung und Prävention unterschiedlicher Erkrankungen, vor allem im Fall von Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen, zum Einsatz kommen könnten. Die jüngsten Forschungsergebnisse, zusammen mit dieser Theorie, lassen das Thema Gallenpigmente und Tetrapyrrole immer weiter ins Interessensfeld der Pharmaindustrie rücken. Die therapeutische Anwendung auf Bevölkerungsbasis liegt aber aus der Sicht des momentanen Forschungsstandes noch in ferner Zukunft.

Die Ergebnisse dieser Masterarbeit liefern zusammen mit den Ergebnissen der anderen Masterarbeiten in diesem Projekt mögliche Ansatzpunkte für weitere Studien zur anticancerogenen Wirkung von Gallenpigmenten und Tetrapyrrolen, um einen tieferen Einblick in die zugrundeliegenden Mechanismen zu gewinnen. Dazu sind allerdings noch weitere Forschungsprojekte in Form von *in vitro* Studien und weiterführend in Tier und Humanstudien erforderlich.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Masterarbeit wurde im Rahmen des internationalen FWF-Projekts Physiological Relevance of Bile Pigments durchgeführt. Mit den *in vitro* Versuchen dieser Arbeit wurden Effekte der Gallenpigmente und Tetrapyrrole Urobilin, Stercobilin, Biliverdin und Biliverdindimethylester auf die humane Colonicarcinomzelllinie Caco-2 untersucht.

Gallenpigmente entstehen im menschlichen Körper zum Großteil beim Katabolismus von Häm, das über mehrere Schritte zu Bilirubin abgebaut und anschließend ausgeschieden wird. Früher glaubte man, dass Gallenpigmente nur Nebenprodukte des Stoffwechsels sind und toxisch wirken können. Heute deuten die Ergebnisse zahlreicher Studien darauf hin, dass diese Stoffe eine bedeutende physiologische Rolle spielen. Es gibt Evidenz für antiinflammatorische, antioxidative, antimutagene und anticancerogene Effekte, die sowohl durch *in vitro* als auch teilweise durch *in vivo* Studien belegt sind.

Ziel dieser Masterarbeit war es, mittels der Methode des Comet Assay eine mögliche anticancerogene Wirkung der Testsubstanzen auf die Caco-2 Zellen festzustellen.

Mit dem Comet Assay können DNA Doppel- und Einzelstrangbrüche sichtbar gemacht werden. In weiterer Folge kann softwaregestützt das Ausmaß der Zellschädigung in Prozent DNA im Kometenschweif (%tail DNA) ermittelt werden. Zur Vorbereitung auf den Comet Assay wurden die Caco-2 Zellen in 6-Wellplatten ausgesät, mit dem jeweiligen Tetrapyrrol in drei Konzentrationen (0,5µM, 5µM und 17µM) 24 Stunden inkubiert, einer Lysebehandlung unterzogen und anschließend der Elektrophorese ausgesetzt. Zum Vergleich der Effekte der Testsubstanzen wurde je Konzentration ein Teil der Zellen zusätzlich mit dem Prooxidans Tertiärbutyl Hydroperoxid behandelt sowie eine Positiv- (Zellen + *t*-BOOH) und Negativkontrolle (nur Zellen) erstellt.

Bei der Behandlung der Zellen mit Urobilin zeigte sich eine signifikante DNA-Schädigung in der Konzentration 17µM bei der Lysebehandlung, was auf einen anticancerogenen Effekt hindeutet. Ein ähnlicher Effekt war bei den restlichen

Urobilin Konzentrationen zu erkennen, dieser erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Bei Zellen, die mit Stercobilin oder Biliverdindimethylester behandelt wurden, konnten keinerlei Effekte auf die Caco-2 Zellen beobachtet werden. Im Fall von Biliverdin zeigen sich zwar ebenfalls keine signifikanten Effekte, allerdings zeigen sich tendenziell leicht erhöhte Werte der DNA Schädigung.

Die Ergebnisse dieser Masterarbeit zeigen einen gewissen DNA schädigenden Effekt und damit potentiell anticancerogene Eigenschaften von gewissen Tetrapyrrolen.

7. Summary

The present master thesis was conducted within the international FWF Project Physiological Relevance of Bile Pigments. In this *in vitro* study, bile pigment and tetrapyrrol effects on human colon carcinoma Caco-2 cells were examined. Investigated substances were Urobilin, Stercobilin, Biliverdin and Biliverdindimethylester.

In humans, bile pigments are formed during heme catabolism, which is degraded to Bilirubin and finally excreted. So far bile pigments were known as byproducts of metabolism with toxic properties. Today, numerous study outcomes indicate an important physiological bile pigment function. There is evidence of anti-inflammatory, antioxidative, antimutagenic and anticancerogenic effects, which are underpinned by both, *in vitro* and partly by *in vivo* studies.

This master thesis aim was to determine a possible anticancerogenic effect of the test substances by the comet assay method, which indicates DNA damage, on Caco-2 cells.

Through the comet assay, DNA double- and single strand breaks can be detected. Subsequently, the cell damage extend is measured expressed as percentage of DNA in the comet tail (%tail DNA). For comet assay preparation, Caco-2 cells were seeded on 6-well plates, incubated with the respective tetrapyrrole in three concentrations (0.5 μ M, 5 μ M und 17 μ M) for 24 hours and treated with lysis solution. Finally, electrophoresis was performed. Part of cells was also treated with the prooxidant tertiarybutyl hydroperoxide. Moreover, a positive (cells + *t*-BOOH) and negative control (cells only) was considered.

After Urobilin treatment, Caco-2 cells showed a significant increase in DNA damage in the 17 μ M concentration after lysis. This finding suggests an anticancerogenic effect. A similar effect was seen in the other Urobilin concentrations, however without being statistical significant. In Caco-2 cells treated with Stercobilin or Biliverdindimethylester, no effects were observed.

Biliverdin showed also no significant effects, however slightly, not significant elevated levels of DNA damage were observed.

Results of this work show a DNA damaging potential of specific tetrapyrroles, which could be discussed as an anticancerogenic matter.

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.
2. ARIMOTO S, KAN-YAMA K, RAI H, HAYATSU H. Inhibitory effect of hemin, chlorophyllin and related pyrrole pigments on the mutagenicity of benzo[a]pyrene and its metabolites. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1995; 345(3-4): 127-35. doi: 10.1016/0165-1218(95)90048-9.
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, ALMARÁ AM, MOTTINO AD. In vivo anti-complement effect of bilirubin-IX α . *Biochemical pharmacology* 2002; 64(4): 741-4. doi: 10.1016/s0006-2952(02)01215-7.
5. ARRIAGA SM, MOTTINO AD, ALMARA AM. Inhibitory effect of bilirubin on complement-mediated hemolysis. *Biochimica et biophysica acta* 1999; 1473(2-3): 329-36.
6. ATCC. Internet: <http://www.atcc.org/Attachments/1985.jpg> (accessed 22th June 2012).
7. BARANANO DE, RAO M, FERRIS CD, SNYDER SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(25): 16093-8. doi: 10.1073/pnas.252626999252626999 [pii].
8. BEDNARZ N, ZAWACKA-PANKAU J, KOWALSKA A. Protoporphyrin IX induces apoptosis in HeLa cells prior to photodynamic treatment. *Pharmacological reports : PR* 2007; 59(4): 474-9.
9. BOIADJIEV SE, LIGHTNER DA. Optical activity and stereochemistry of linear oligopyrroles and bile pigments. *Tetrahedron: Asymmetry* 1999; 10(4): 607-55. doi: 10.1016/s0957-4166(99)00037-3.
10. BOSMA PJ. Inherited disorders of bilirubin metabolism. *Journal of hepatology* 2003; 38(1): 107-17.
11. BULMER AC, COOMBES JS, BLANCHFIELD JT, TOTH I, FASSETT RG, TAYLOR SM. Bile pigment pharmacokinetics and absorption in the rat: therapeutic potential for enteral administration. *British journal of pharmacology* 2011; 164(7): 1857-70. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01413.x.
12. BULMER AC, RIED K, BLANCHFIELD JT, WAGNER KH. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutat Res* 2008; 658(1-2): 28-41. doi: S1383-5742(07)00008-7 [pii]10.1016/j.mrrev.2007.05.001.

13. 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. *Mutat Res* 2007; 629(2): 122-32. doi: S1383-5718(07)00030-7 [pii]10.1016/j.mrgentox.2007.01.008.
14. CHEMSPIDER. Internet: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10628548.html> (accessed 5th June 2012).
15. CHEMSPIDER. Internet: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.22857732.html> (accessed 5th June 2012).
16. CHEMSPIDER. Internet: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16736732.html> (accessed 5th June 2012).
17. CHEMSPIDER. Internet: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4938471.html> (accessed 5th June 2012).
18. 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. *The Journal of organic chemistry* 2006; 71(1): 22-30. doi: 10.1021/jo051359e.
19. CHO YS, HONG ST, CHOI KH, CHANG YH, CHUNG AS. Chemopreventive Activity of Porphyrin Derivatives Against 6-Sulfooxymethylbenzo[a]pyrene Mutagenicity. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2000; 1(4): 311-7.
20. COLLINS AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26(3): 249-61. doi: MB:26:3:249 [pii]10.1385/MB:26:3:249.
21. DORE S, SNYDER SH. Neuroprotective action of bilirubin against oxidative stress in primary hippocampal cultures. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 890: 167-72.
22. 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 Biokhimiia* 2001; 66(9): 1019-27.
23. FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; 339(1): 37-59.
24. FALK H. The chemistry of linear oligopyrroles and bile pigments. Wien [u.a.]: Springer, 1989; 24-47.
25. FERRUZZA S, ROSSI C, SCARINO ML, SAMBUY Y. A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. *Toxicol In Vitro* 2012. doi: S0887-2333(12)00009-4 [pii]10.1016/j.tiv.2012.01.008.

26. FOGH J, FOGH JM, ORFEO T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59(1): 221-6.
27. 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.
28. IARC. Internet: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf (accessed 28th June 2012).
29. ISHIKAWA S, TAMAKI S, OHATA M, ARIHARA K, ITOH M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: a possible mechanism of heme-induced colon cancer. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(8): 1182-91. doi: 10.1002/mnfr.200900348.
30. JIRASKOVA A, NOVOTNY J, NOVOTNY L, *et al.* Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2011; 31(10): 27412.
31. KATOH Y, NEMOTO N, TANAKA M, TAKAYAMA S. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in Chinese hamster V79 cells by hemin and related compounds. *Mutation Research Letters* 1983; 121(2): 153-7. doi: 10.1016/0165-7992(83)90114-8.
32. KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 1972; 26(4): 239-57.
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. KONINGSBERGER JC, RADEMAKERS LH, 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.
36. LAFARGE-FRAYSSINET C, MOREL-CHANY E, TRINCAL G, FRAYSSINET C. Promoting effect of biliverdin for liver cells initiated by aflatoxin B1. *Cancer Letters* 1983; 18(3): 277-82. doi: 10.1016/0304-3835(83)90236-7.
37. LY JD, GRUBB DR, LAWEN A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2003; 8(2): 115-28.

38. MACLEAN PD, CHAPMAN EE, DOBROWOLSKI SL, THOMPSON A, BARCLAY LR. 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.
39. MAGHZAL GJ, LECK MC, COLLINSON E, LI C, STOCKER R. Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular antioxidant protection by biliverdin reductase. *J Biol Chem* 2009; 284(43): 29251-9. doi: M109.037119 [pii]10.1074/jbc.M109.037119.
40. MALHOTRA SL. Faecal urobilinogen levels and pH of stools in population groups with different incidence of cancer of the colon, and their possible role in its aetiology. *J R Soc Med* 1982; 75(9): 709-14.
41. MATYSIK J, HILDEBRANDT P, SMIT K, *et al.* Raman spectroscopic analysis of isomers of biliverdin dimethyl ester. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1997; 15(9-10): 1319-24. doi: 10.1016/s0731-7085(96)01964-4.
42. MCART DG, WASSON GR, MCKERR G, SAETZLER K, REED M, HOWARD CV. Systematic random sampling of the comet assay. *Mutagenesis* 2009; 24(4): 373-8. doi: gep020 [pii]10.1093/mutage/gep020.
43. MCDONAGH AF. The biliverdin-bilirubin antioxidant cycle of cellular protection: Missing a wheel? *Free Radic Biol Med* 2010; 49(5): 814-20. doi: S0891-5849(10)00350-3 [pii]
10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.001.
44. MINETTI M, MALLOZZI C, DI STASI AM, PIETRAFORTE D. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Archives of biochemistry and biophysics* 1998; 352(2): 165-74. doi: 10.1006/abbi.1998.0584.
45. MORI H, OTAKE T, MORIMOTO M, *et al.* In vitro anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of biliverdin, a bile pigment. *Japanese journal of cancer research : Gann* 1991; 82(7): 755-7.
46. NAKAGAMI T, TOYOMURA K, KINOSHITA T, MORISAWA S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochimica et biophysica acta* 1993; 1158(2): 189-93.
47. OLLINGER R, KOGLER P, TROPPEMAIR J, *et al.* Bilirubin inhibits tumor cell growth via activation of ERK. *Cell Cycle* 2007; 6(24): 3078-85.
48. OWENS D, EVANS J. Population studies on Gilbert's syndrome. *Journal of medical genetics* 1975; 12(2): 152-6.

49. PIETTE J, VOLANTI C, VANTIEGHEM A, MATROULE JY, HABRAKEN Y, AGOSTINIS P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochemical pharmacology* 2003; 66(8): 1651-9.
50. QIN XF. Impaired inactivation of digestive proteases by deconjugated bilirubin: the possible mechanism for inflammatory bowel disease. *Medical hypotheses* 2002; 59(2): 159-63.
51. RAO P, SUZUKI R, MIZOBUCHI S, YAMAGUCHI T, SASAGURI S. Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342(4): 1279-83. doi: S0006-291X(06)00324-X [pii]10.1016/j.bbrc.2006.02.074.
52. ROMERT L, JANSSON T, CURVALL M, JENSSEN D. Screening for agents inhibiting the mutagenicity of extracts and constituents of tobacco products. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 1994; 322(2): 97-110. doi: 10.1016/0165-1218(94)00015-8.
53. ROY-CHOWDHURY J, ROY-CHOWDHURY N. Bilirubin Metabolism and it's Disorders. In: Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011; 1079–1109.
54. RYTER SW. Bile pigments in pulmonary and vascular disease. *Frontiers in pharmacology* 2012; 3: 39. doi: 10.3389/fphar.2012.00039.
55. SAMBUY Y, DE ANGELIS I, RANALDI G, SCARINO ML, STAMMATI A, ZUCCO F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 2005; 21(1): 1-26. doi: 10.1007/s10565-005-0085-6.
56. SCHULTZ DR, HARRINGTON WJ, JR. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Seminars in arthritis and rheumatism* 2003; 32(6): 345-69. doi: 10.1053/sarh.2003.50005.
57. SEDLAK TW, SALEH M, HIGGINSON DS, PAUL BD, JULURI KR, SNYDER SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(13): 5171-6. doi: 10.1073/pnas.0813132106.
58. SEDLAK TW, SNYDER SH. Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle. *Pediatrics* 2004; 113(6): 1776-82.
59. SEDLAK TW, SNYDER SH. Cycling the wagons for biliverdin reductase. *J Biol Chem* 2009; 284(46): 1e11; author reply 1e2. doi: 284/46/1e11 [pii]10.1074/jbc.L109.037119.

60. SIGMA-ALDRICH. Internet:
http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=E1510|SIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC (accessed 10th February 2012).
61. STOCKER R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6(5): 841-9. doi: 10.1089/ars.2004.6.841.
62. STRASSBURG CP. Gilbert-Meulengracht's syndrome and pharmacogenetics: is jaundice just the tip of the iceberg? *Drug metabolism reviews* 2010; 42(1): 168-81. doi: 10.3109/03602530903209429.
63. 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.
64. SZATROWSKI TP, NATHAN CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research* 1991; 51(3): 794-8.
65. TANG X, EDENHARDER R. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by vitamins, porphyrins and related compounds, and vegetable and fruit juices and solvent extracts. *Food and Chemical Toxicology* 1997; 35(3-4): 373-8. doi: 10.1016/s0278-6915(97)00126-9.
66. TEMME EH, ZHANG J, SCHOUTEN EG, KESTELOOT H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer causes & control : CCC* 2001; 12(10): 887-94.
67. VÍTEK L, ZELENKA J, ZADINOVÁ M, MALINA J. The impact of intestinal microflora on serum bilirubin levels. *Journal of hepatology* 2005; 42(2): 238-43. doi: 10.1016/j.jhep.2004.10.012.
68. WEGIEL B, OTTERBEIN LE. Go green: the anti-inflammatory effects of biliverdin reductase. *Frontiers in pharmacology* 2012; 3: 47. doi: 10.3389/fphar.2012.00047.
69. 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.20407.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Elisabeth Maria Putz, Bakk.
E-Mail:	elisabethputz@gmx.net
Geburtsdatum:	12. März 1989
Geburtsort:	Vorau
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	ledig



Studium

seit 11/2010	Masterstudium Ernährungswissenschaften an der Universität Wien Spezialisierung: Molekulare Ernährung
10/2007 – 11/2010	Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften an der Universität Wien (Abschluss am 23.11.2010)

Schulbildung

09/2003 – 07/2007	Realgymnasium mit angewandter Informatik und naturwissenschaftlichem Schwerpunkt in Hartberg (Matura am 19.06.2007)
-------------------	---

Berufserfahrung und Praktika

04/2012 – 06/2012	KiloCoach™ Datenbankmanagement, Userbetreuung, BIA- und GU-Messungen, Literaturrecherche;
01/2012 – 02/2012	Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien – Projekt Active Ageing Blutprobenaufbereitung, Betreuung Analysegeräte, Literaturrecherche;
11/2011 – 12/2011	AKE – Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung Mitarbeiterin im nutritionDay Büro auf Honorarnotenbasis; Newsletter Erstellung, E-Mail und Homepage Betreuung, Bearbeitung von Fragebögen, Mitarbeit nutritionDay 2011;
05/2011 – 11/2011	Herba Chemosan Apotheker-AG Lagermitarbeiterin auf geringfügiger Basis

03/2011 – 04/2011	AKH Wien – Adipositasambulanz der Klinik für Innere Medizin III BIA Messungen und Auswertung, 24h Recalls und Auswertung, Literaturrecherche, SPSS Dateneingabe; (Ausmaß: sechs Wochen)
11/2010 – 02/2011	Institut für Ernährungswissenschaften, Universität Wien – Arbeitsgruppe Haslberger Unterstützung bei der Probenakquirierung einer laufenden Studie: Terminvereinbarung mit Probanden, Mundschleimhautabstriche, Fragebogen; (Ausmaß: vier Wochen)
08/2010	Bäckerei Ströck Ferialaushilfe im Verkauf
07/2010	Firma Agrana Fruit Austria GmbH Abteilung Labor, Bereich Qualitätssicherung und Mikrobiologie
09/2009	Firma NÖM AG Abteilung Labor, Bereich Chemie und Bakteriologie

Sprachen

Deutsch – Muttersprache

Englisch – verhandlungssicher

Latein – Maturaniveau

EDV Kompetenzen

MS Office

SPSS 17.0

Komet 5.5

Endnote X5

Photoshop und Adobe Illustrator

NUTS und USDA Datenbank

TYPO3

Interessen

Kochen (mediterrane und österreichische Küche), Reisen (Städte und Kroatien), Sport
(schwimmen, Rad fahren, laufen), Lesen (Krimis und Thriller), Ernährung;