



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss von Bilirubin auf den Fettstoffwechsel von
HepG2-Zellen“

verfasst von / submitted by

Antonia Klimpke BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2019 / Vienna 2019

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner danken, für die Betreuung meiner Masterarbeit und das Schaffen eines so entspannten Arbeitsklimas.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Mag. Claudia Lang, MSc, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mich mit vielen wertvollen Ratschlägen durch die Arbeit begleitet hat.

Weiters möchte ich mich bei Yvonne, Paulina und Julia bedanken, für die angenehme Zusammenarbeit im Labor und die schönen gemeinsamen Kaffeepausen.

Ein großes Danke auch an meine Freunde, insbesondere meine ehemalige Mitbewohnerin Marleen, die in allen Höhen und Tiefen des Studiums für mich da waren.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und Geschwistern danken, auf deren Unterstützung ich stets zählen konnte und die immer an meiner Seite standen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Formulierungen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Wien, 2019

Antonia Klimpke

Inhaltsverzeichnis

I Abbildungsverzeichnis	III
II Tabellenverzeichnis	V
III Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	1
2. Theoretischer Hintergrund	3
2.1 Bilirubin.....	3
2.1.1 Chemische Eigenschaften	3
2.1.2 Metabolismus	3
2.2 Hyperbilirubinämie	6
2.2.1 Schwere Hyperbilirubinämie	6
2.2.2 Leichte Hyperbilirubinämie	7
2.3 Bilirubin und der hepatische Fettstoffwechsel	10
2.3.1 Bilirubin und die Leber	10
2.3.2 Effekte auf die NAFLD	10
2.3.3 Potenzieller Wirkmechanismus	11
3. Material und Methoden	13
3.1 Reagenzien, Materialien und Geräte	13
3.1.1 Reagenzien	13
3.1.2 Materialien.....	14
3.1.3 Geräte	16
3.2 Zellkultur.....	17
3.2.1 Zelllinie	17
3.2.2 Passagieren und Aussäen der Zellen	17
3.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	18

3.3 Stocks und Treatments	19
3.3.1 Zusammensetzung und Eigenschaften	19
3.3.2 Herstellung	20
3.4 Experimente	22
3.4.1 MTT-Assay	22
3.4.2 NR-Assay	25
3.4.3 Bradford-Assay	27
3.5 Statistische Analyse	29
4. Ergebnisse	30
4.1 MTT-Assay	30
4.1.1 MTT-Assay mit Glucose	30
4.1.2 MTT-Assay ohne Glucose	32
4.2 NR-Assay	34
4.2.1 NR-Assay mit Glucose	34
4.2.2 NR-Assay ohne Glucose	37
5. Diskussion	41
5.1 Einfluss der Behandlungen auf die Zellviabilität	41
5.2 Einfluss der Behandlungen auf den Fettgehalt	42
5.3 Limitationen und Probleme	45
5.4 Schlussfolgerung und Ausblick	46
6. Zusammenfassung	47
7. Summary	48
IV Literaturverzeichnis	VIII
V Anhang	XIII

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von unkonjugiertem Bilirubin.....	3
Abbildung 2: Abbau von Häm über Biliverdin zu Bilirubin.....	4
Abbildung 3: Metabolismus von Bilirubin.....	5
Abbildung 4: HepG2-Zellen bei geringer (links) und hoher (rechts) Konfluenz.....	17
Abbildung 5: Chemische Struktur von MTT und seinem reduziertem Formazanprodukt	22
Abbildung 6: Schema eines 96-Wellplates für den MTT-Assay	24
Abbildung 7: NR-Fluoreszenz von kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta (Affe) und Peritoneal-Makrophagen (Maus) gemessen bei unterschiedlichen Wellenlängen	25
Abbildung 8: Schema eines 96-Wellplates für den NR-Assay	26
Abbildung 9: 96-Wellplate nach Durchführung des MTT-Assays	30
Abbildung 10: Ergebnisse des MTT-Assays mit Glucose. Zellviabilität der UKB- und FFS- Treatments im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 24h.....	31
Abbildung 11: Ergebnisse des MTT-Assays ohne Glucose. Zellviabilität der UKB- und FFS- Treatments im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 5h.....	33
Abbildung 12: Ergebnisse des NR-Assays mit Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h	35
Abbildung 13: Ergebnisse des NR-Assays mit Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments mit 17,1µM UKB, 30µM UKB und 55µM UKB im Vergleich zu den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO, 0,5mM FFS und 1mM FFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h	36
Abbildung 14: Ergebnisse des NR-Assays ohne Glucose. Veränderung der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h	38

Abbildung 15: Ergebnisse des NR-Assays ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments mit 17,1µM UKB, 30µM UKB und 55µM UKB im Vergleich zu den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO, 0,5mM FFS und 1mM FFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h 39

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentrationen der Stock-Lösungen	19
Tabelle 2: Ergebnisse des MTT-Assays mit Glucose. Veränderungen der Zellviabilität der UKB- und FFS-Treatments im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 24h	32
Tabelle 3: Ergebnisse des MTT-Assays ohne Glucose. Veränderungen der Zellviabilität der UKB- und FFS-Treatments im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 5h	34
Tabelle 4: Ergebnisse des NR-Assays mit Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h	35
Tabelle 5: Ergebnisse des NR-Assays mit Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments mit 17,1µM UKB, 30µM UKB und 55µM UKB im Vergleich zu den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO, 0,5mM FFS und 1mM FFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h	37
Tabelle 6: Ergebnisse des NR-Assays ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h	38
Tabelle 7: Ergebnisse des NR-Assays ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments mit 17,1µM UKB, 30µM UKB und 55µM UKB im Vergleich zu den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO, 0,5mM FFS und 1mM FFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h	40
Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der NR-Assays mit und ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz bei dem Vergleich der Treatments 0,5mMFFS und 1mMFFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h (mit Glucose) bzw. 0,5h und 5h (ohne Glucose)	43
Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der NR-Assays mit und ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz bei dem Vergleich der Treatments BSA/DMSO, 0,5mMFFS und 1mMFFS mit und ohne 17,1µM, 30µM und 55µM UKB nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h (mit Glucose) bzw. 0,5h und 5h (ohne Glucose)	44

III Abkürzungsverzeichnis

AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
BVR	Biliverdin-Reduktase
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CPT1	Carnitine Palmitoyltransferase 1
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	Formaldehyd
FAS	Fettsäure-Synthase
FBS	Fetales Bovines Serum
Fe	Eisen
FFS	Freie Fettsäuren
FGF21	Fibroblast Growth Factor
Gln	Glutamin
GS	Gilbert Syndrom
HCC	Hepatocellular carcinoma (hepatozelluläres Karzinom)

HCl	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HO	Hämoxygenase
LDL	Low Density Lipoprotein
MRP2	Multidrug Resistance Protein 2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease (nicht-alkoholische Fettlebererkrankung)
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis (nicht-alkoholische Steatohepatitis)
NR	Nile Red (Nilrot)
OATP	Organische anionentransportierende Polypeptide
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PGC	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren γ Coaktivator
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
RCF	Relative Centrifugal Force (relative Zentrifugalkraft)
RT	Raumtemperatur
T2DM	Typ 2 Diabetes Mellitus
UGT1A1	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase 1A1
UKB	Unkonjugiertes Bilirubin
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1. Einleitung

Bilirubin zählt zu den Tetrapyrrolen und galt lange Zeit als schädliches Abbauprodukt des Häm katabolismus. Grund hierfür war, dass es in höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte hat, wovon insbesondere das zentrale Nervensystem betroffen ist (Fujiwara et al., 2018). Mittlerweile mehren sich jedoch die Hinweise auf protektive Effekte, sofern der Bilirubinspiegel nur leicht erhöht ist. Dies ist beispielsweise beim sogenannten Gilbert Syndrom (GS) der Fall, bei dem es sich um eine häufige und milde Form der unkonjugierten Hyperbilirubinämie handelt (Wagner et al., 2018). Studien konnten zeigen, dass betroffene Personen eine höhere antioxidative Kapazität, einen gesteigerten Energieumsatz, ein geringeres Körpergewicht, ein günstigeres Lipidprofil, verbesserte Blutglucosewerte und einen niedrigeren Blutdruck aufweisen. Außerdem liegt ein reduziertes Risiko für Adipositas, kardiovaskuläre Erkrankungen, Atherosklerose, das metabolische Syndrom, Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) und verschiedene Krebsarten vor (Bulmer et al., 2013; Gazzin et al., 2016, Mölzer et al., 2016). Dass Bilirubin gesundheitliche Vorteile bringt, wird vor allem auf seine Wirkung als Antioxidans zurückgeführt. Zusätzlich werden ihm aber auch antiinflammatorische, vasodilatorische, immunmodulierende, antiproliferative und antimutagene Eigenschaften zugesprochen (Gupta et al., 2016; Zelenka et al., 2016). Die genauen molekularen Mechanismen dahinter sind noch weitgehend unerforscht. Ziel dieser Masterarbeit war es, sich mit dem grundlegenden Einfluss von Bilirubin auf den Fettstoffwechsel auseinanderzusetzen, der bei diesem Sachverhalt von großer Relevanz erscheint. Außerdem wurde der Fokus auf die Leber gelegt, da diese sowohl bei der Metabolisierung von Bilirubin als auch von Fett eine zentrale Rolle einnimmt. Für die Experimente wurden HepG2-Zellen herangezogen, die sich als alternatives in-vitro-Modell für primäre Hepatozyten etabliert haben. Sie wurden mit Treatments unterschiedlicher Konzentrationen an unkonjugiertem Bilirubin (UKB) und freien Fettsäuren (FFS) inkubiert. Zusätzlich wurden verschiedene Expositionszeiten und der Zusatz von Glucose untersucht. Zu Beginn wurde ein MTT-Assay durchgeführt, womit die Treatments auf eine potenzielle Zytotoxizität getestet wurden.

Anschließend erfolgte ein Nilrot (NR)-Assay zur Bestimmung des intrazellulären Fettgehaltes. Die Ergebnisse sollten Aufschluss darüber geben, ob und inwiefern UKB einen Einfluss auf die Fettsakkumulation bei den getesteten Zellen hat.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Bilirubin

2.1.1 Chemische Eigenschaften

Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur des orange-gelben Bilirubins. Es besteht aus vier Pyrrolringen, die durch Kohlenstoffbrücken verbunden sind. Da die Doppelbindungen der Vinyl- und Methylengruppe leicht oxidierbar sind, ist es von relativ geringer Stabilität. Bilirubin ist deshalb sehr empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen wie Licht, Sauerstoff und hohen bzw. niedrigen pH-Werten. Zusätzlich ist es schlecht in Wasser löslich (Ostrow et al., 2009).

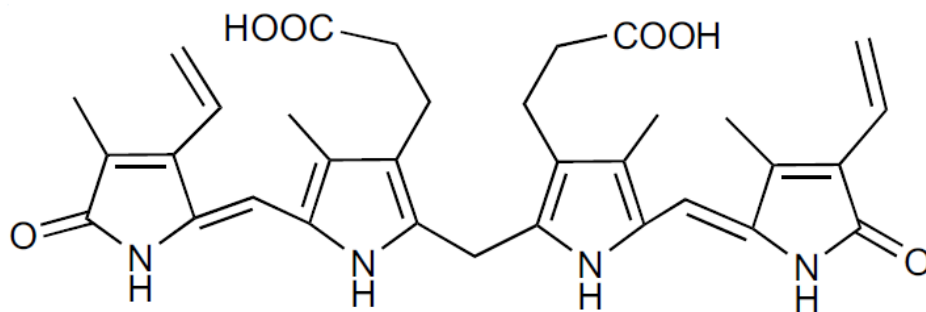


Abbildung 1: Struktur von unkonjugiertem Bilirubin (Ostrow et al., 2009)

2.1.2 Metabolismus

Bilirubin ist das Endprodukt des Häm katabolismus und stammt hauptsächlich aus dem Abbau von Erythrozyten-Hämoglobin im retikuloendothelialen System. Ein kleiner, aber wesentlicher Anteil resultiert aus dem Abbau anderer Hämproteine und einer ineffektiven Erythropoese im Knochenmark (Memon et al., 2016). Abbildung 2 zeigt den Abbau von Häm zu Bilirubin. Nachdem Häm aus hämhaltigen Verbindungen freigesetzt wurde, wird es zunächst durch die Hämoxxygenase (HO) zu Biliverdin, freiem Eisen (Fe^{3+}) und Kohlenmonoxid (CO) oxidiert. Biliverdin wird dann von Makrophagen aufgenommen und durch die Biliverdin-Reduktase (BVR) weiter zu Bilirubin reduziert.

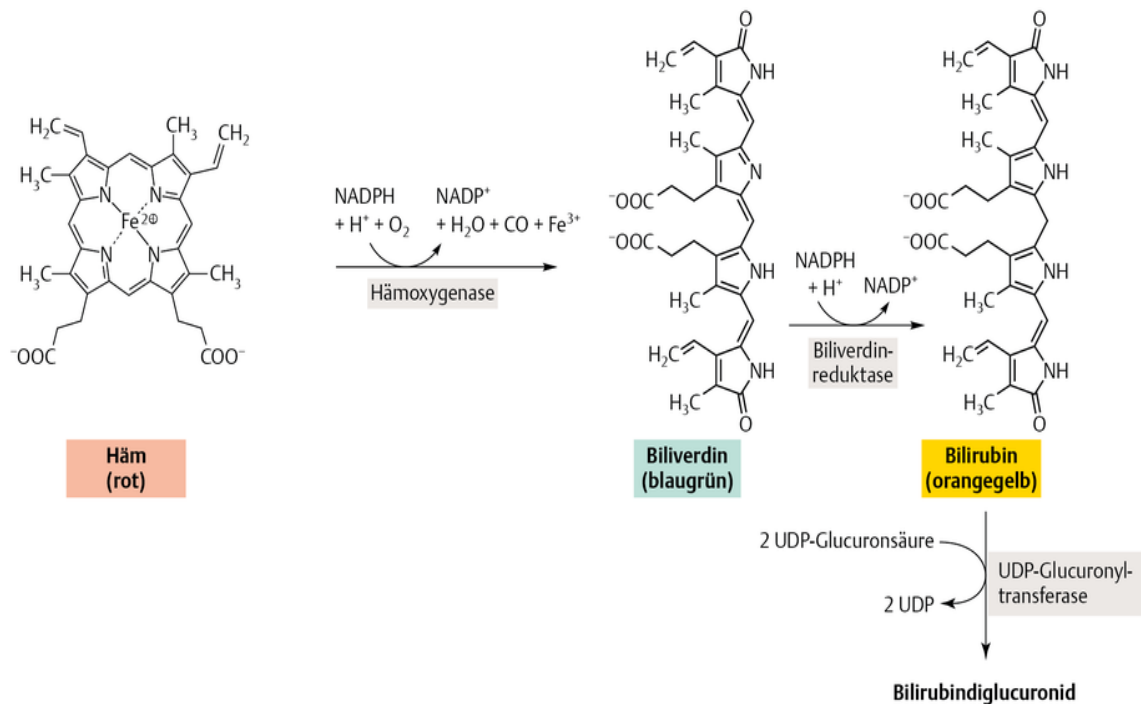


Abbildung 2: Abbau von Häm über Biliverdin zu Bilirubin (www.viamedici.thieme.de)

Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft ist Bilirubin im Blut meist an Albumin gebunden, wobei kleine Mengen an ungebundenem Bilirubin im Gleichgewicht mit gebundenem Bilirubin stehen. Gelangt das Bilirubin zur Leber, wird es in seiner freien Form sowohl passiv als auch aktiv von den Hepatozyten aufgenommen. Die genauen Mechanismen der selektiven Aufnahme sind noch nicht vollständig geklärt. Allerdings wird angenommen, dass sie durch die organischen anionentransportierenden Polypeptide (OATP) 1B1 und 1B3 vermittelt wird. In den Hepatozyten wird das Bilirubin an Ligandin gebunden und zum glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Hier wird es über die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) zu wasserlöslichen Mono- und Diglucuroniden konjugiert, die dann über das Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) in den Gallenkanal sezerniert werden (Gupta et al., 2016; Memon et al., 2016). Das konjugierte Bilirubin gelangt über die Galle in die Gallenblase und wird dort gespeichert oder mit anderen Gallenbestandteilen in den Darm abgegeben. Dort wird es über bakterielle β -Glucosidasen wieder dekonjugiert und anschließend im Rahmen verschiedener reduzierender und oxidativer Prozesse umgesetzt. Zu den Hauptmetaboliten zählen Urobilinogen und Sercobilin, die zum Teil rückresorbiert werden und über

den enterohepatischen Kreislauf erneut zur Leber gelangen. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich mit der Fäzes, aber auch in geringerem Umfang mit dem Urin (Wagner et al., 2018). Beim Erwachsenen werden täglich insgesamt ca. 250-350 mg Bilirubin gebildet und ausgeschieden (Hirschfield & Alexander, 2006). Während der Serum-Bilirubinspiegel anderer Säugetiere im Allgemeinen extrem niedrig ist, liegt er beim Menschen physiologisch bei 0,2-1,2mg/dl (Fujiwara et al., 2018).

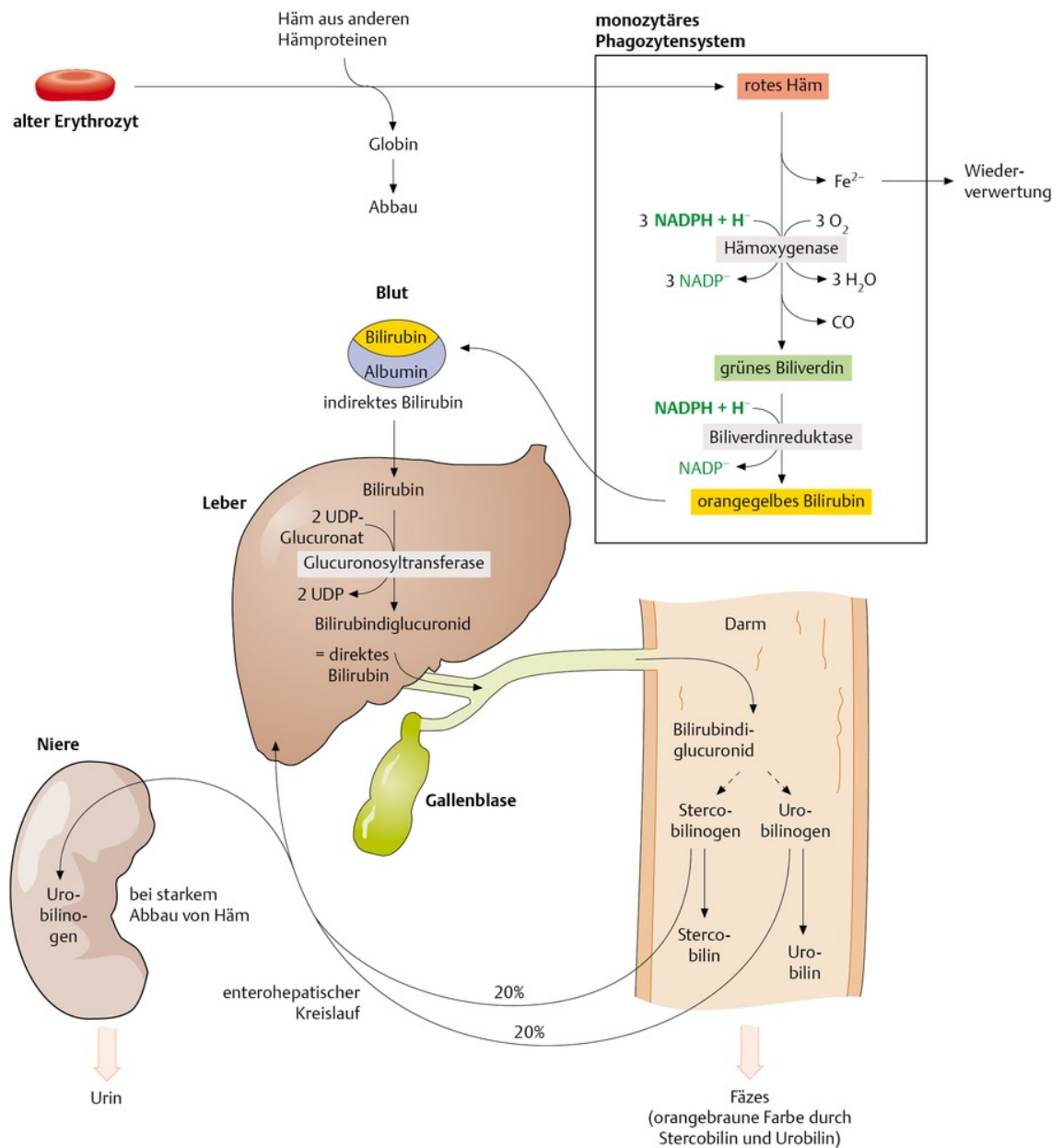


Abbildung 3: Metabolismus von Bilirubin (www.viamedici.thieme.de)

2.2 Hyperbilirubinämie

Zu einer Hyperbilirubinämie kommt es, sobald ein Ungleichgewicht zwischen der Bilirubin-Produktion sowie der Bilirubin-Clearance vorliegt. Dies ist zum Beispiel dann der Fall, wenn der Bilirubin-Spiegel infolge einer Hämolyse stark ansteigt und die Kapazitäten des metabolisierenden Systems übersteigt. Andererseits können aber auch Polymorphismen vorliegen, durch die die Metabolisierungsrate auch bei normal anfallenden Bilirubinmengen nicht ausreicht. Je nachdem welcher Stoffwechselschritt betroffen ist, kommt es entweder zu einer konjugierten oder unkonjugierten Hyperbilirubinämie. Der Ausprägungsgrad hängt davon ab, wie stark die Aktivität der entsprechenden Enzyme oder Transporter eingeschränkt ist (Memon et al., 2016). Während eine schwere Hyperbilirubinämie mit negativen Effekten assoziiert ist, scheint bei einer leichten Hyperbilirubinämie das Gegenteil der Fall zu sein.

2.2.1 Schwere Hyperbilirubinämie

Bilirubin hat in höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte, was sowohl die Morbidität als auch die Mortalität erhöht. Zu den klinischen Symptomen zählen unter anderem Gelbsucht, Cholestase und neurologische Störungen. Diese resultieren daraus, dass Bilirubin ab Konzentrationen von $>30\text{mg/dl}$ die Blut-Hirn-Schranke passiert und neurotoxisch wirken kann. Die Folge ist im schlimmsten Fall ein sogenannter Kernikterus, der mit irreversiblen Schädigungen einhergeht (Fujiwara et al., 2018; Wagner et al., 2018). Eine Risikogruppe hierfür stellen insbesondere Neugeborene dar, da sie mit einem Serum-Bilirubinspiegel von $5\text{-}15\text{mg/dl}$ physiologisch eine Hyperbilirubinämie entwickeln. Dies kann auf zwei Hauptfaktoren zurückgeführt werden: Zum einen erfolgt die Sauerstoffversorgung nach der Geburt nicht mehr über die Plazenta, sondern die Lunge. Da dieser Weg wesentlich effektiver ist, führen die anfallenden großen Sauerstoffmengen zu oxidativem Stress, was wiederum in einer beschleunigten Hämolyse resultiert. Es wird somit mehr Bilirubin produziert. Zum anderen ist die Bilirubin-Clearance eingeschränkt. Das UGT1A1-Enzym wird in der sich noch entwickelnden Leber wesentlich schwächer exprimiert, als es beim Erwachsenen der Fall ist. Seine Leistung reicht nicht aus, um die

massive Bilirubin-Produktion innerhalb der ersten Tage nach der Geburt verstoffwechseln zu können. 8-11% der Neugeborenen entwickeln eine relativ schwere Hyperbilirubinämie, wobei die Inzidenz für einen Kernikterus bei 1:50.000-100.000 liegt (Fujiwara et al., 2018). Während hier mehrere Faktoren kombiniert auftreten, kann ein stark erhöhter Bilirubinspiegel auch Folge angeborener Polymorphismen sein, die einen vollständigen oder nahezu vollständigen Verlust der Aktivität wichtiger metabolisierender Enzyme bewirken. Ist davon beispielsweise das UGT1A1 betroffen, kommt es zur seltenen und schwerwiegenden Form der unkonjugierten Hyperbilirubinämie, dem Crigler-Najjar-Syndrom (CNS). Sind die Mutationen hingegen nur mit einer geringen Reduktion der UGT1A1-Aktivität assoziiert, äußert sich das in einem nur leicht erhöhtem Bilirubinspiegel, dem „gutartigen“ Gilbert Syndrom (GS) (Fujiwara et al., 2018; Memon et al., 2016).

2.2.2 Leichte Hyperbilirubinämie

Gilbert Syndrom

Das GS wurde erstmals 1901 von Gilbert und Lereboulet beschrieben. Es tritt bei 3-13% der Bevölkerung auf, womit es sich um die häufigste Form der angeborenen Hyperbilirubinämie handelt. Es wird autosomal rezessiv vererbt, wobei mehr als 100 Mutationen involviert sind, deren Häufigkeit sich zwischen den verschiedenen ethnischen Gruppen unterscheidet. Die beiden wichtigsten Allele, die bei GS-Patienten beobachtet werden, sind UGT1A1*6 und UGT1A1*28. UGT1A1*6 ist ein Polymorphismus, der mit 10-20% eine relativ hohe Prävalenz in der asiatischen Bevölkerung aufweist (Fujiwara et al., 2018). UGT1A1*28 hingegen ist der häufigste Genotyp bei Kaukasiern. Es handelt sich um einen homozygoten Polymorphismus zweier zusätzlicher Basen (TA) in der TATAA-Box-Sequenz der Promotorregion des UGT1A1-Gens, was zu einer Sequenz von A (TA) 7TAA anstelle des normalen A (TA) 6TAA führt. Die zusätzliche TA-Wiederholung verringert die Affinität des TATAA-Bindungsproteins gegenüber der TATAA-Box, was in einer reduzierten Genexpression resultiert (Memon et al., 2016; Matsui et al., 2010). Diese

wiederum führt zu einem Abfall der enzymatischen Aktivität auf ca. 20-30% des Normalwertes (Hirschfield & Alexander, 2006). Obwohl es sich bei GS um eine erbliche Erkrankung handelt, zeigt es sich in der Regel erst im jungen Erwachsenenalter in Form einer milden, intermittierenden Hyperbilirubinämie in Abwesenheit von Symptomen. Es kann sich allerdings auch bereits bei Neugeborenen manifestieren, insbesondere wenn gleichzeitig hämolytische Erkrankungen wie ABO-Inkompatibilität oder ein Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel vorliegen (Memon et al., 2016).

Gesundheitliche Vorteile

Bilirubin kann einerseits zytotoxische Effekte haben, wirkt andererseits aber auch als Antioxidans, indem es wieder zu Biliverdin oxidiert wird. Die antioxidativen Eigenschaften sind unabhängig davon, ob es in konjugierter oder unkonjugierter Form, frei oder an Albumin gebunden vorliegt (Gupta et al., 2016). Seine Wirksamkeit soll vergleichbar zu derjenigen von Vitamin E und Glutathion sein. Klinische Studien deuten darauf hin, dass eine leichte Hyperbilirubinämie die allgemeine antioxidative Kapazität im Blut erhöht, wodurch oxidativer Stress und das Auftreten damit assoziierter Erkrankungen vermindert werden können (Fujiwara et al., 2018). So konnten Kwon et al. kürzlich in einer prospektiven Kohortenstudie zeigen, dass das T2DM-Risiko mit zunehmendem Gesamtbilirubinspiegel abnimmt. Es hatte außerdem den Anschein, dass Bilirubin dem Ausbruch entgegenwirkt, wenn bereits eine gestörte Glucosetoleranz und Nüchtern-glucose vorliegen (Kwon et al., 2017). Eine solche negative Assoziation konnte schon in vorherigen Studien beobachtet werden, auch hinsichtlich der Prävalenz einer diabetischen Nephropathie (Cheriyath et al., 2010; Han et al., 2010). Im Hinblick auf den Lipidstatus gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass eine milde unkonjugierte Hyperbilirubinämie mit Reduktionen des Gesamtcholesterins, Low Density Lipoprotein (LDL)-Cholesterins, Very Low Density Lipoprotein (VLDL)-Cholesterins und der Triglyceride assoziiert ist, während das High Density Lipoprotein (HDL)-Cholesterin tendenziell ansteigt (Bulmer et al., 2013, Seyed Khoei et al., 2018). Abgesehen von diesen günstigen Effekten auf das Lipidprofil, scheinen GS-Personen einen gesteigerten Energieumsatz, einen geringeren Body-Mass-

Index (BMI) und Hüftumfang sowie ein niedrigeres Adipositas-Risiko aufzuweisen (Mölzer et al., 2016; Seyed Khoei et al., 2018; DiNicolantonio et al., 2018). Ferner ist bekannt, dass Bilirubin antiatherogene Eigenschaften hat, die zum Teil ebenfalls durch die Reduktion von oxidativem Stress vermittelt werden. UKB soll nicht nur günstige Effekte auf atherosklerotischen Plaques haben, sondern auch negativ mit der Schwere von Atherosklerose assoziiert sein (Lapenna et al., 2018). Abgesehen davon konnte in mehreren Studien beobachtet werden, dass die Verwendung von Atazanavir - einem HIV-Medikament, das zu erhöhten Gesamtbilirubinwerten führt - die Endothelfunktion verbessern und den Lipidspiegel sowie den Blutdruck bei HIV-infizierten diabetischen Patienten senken kann. Zusätzlich kam es zu einer Reduktion der Entzündungsmarker und einer Verlangsamung der Progression der Intima-Media-Dicke (Marconi et al., 2018). Der Zusammenhang zwischen Gesamtbilirubin und kardiovaskulären Erkrankungen wurde auch im Rahmen der Veterans Aging Cohort Study (VACS) untersucht. Hierbei handelt es sich um eine prospektive Längsschnittstudie, die insgesamt 96.381 Personen miteinschloss, von denen 96% Männer waren. Es zeigte sich, dass eine leicht erhöhte Bilirubinkonzentration mit einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Herzinsuffizienz, akutem Myokardinfarkt und ischämischen Schlaganfallereignissen assoziiert war. Dies war auch dann der Fall, nachdem die Ergebnisse um bekannte Risikofaktoren korrigiert worden waren, sowie nach Ausschluss von Personen mit Lebererkrankungen (Marconi et al., 2018). Laut einer Metaanalyse ist ein Anstieg des Gesamtbilirubinspiegels um $1\mu\text{mol/l}$ mit einer Reduktion des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen um 6,5% verbunden (Vítek et al., 2012) und mit einem Abfall des systolischen Blutdrucks um 0,13mmHg (McCallum et al., 2015). Des Weiteren liegt ein positiver Einfluss auf respiratorische Erkrankungen wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) vor (Horsfall et al., 2011). In einer Studie von Apperley et al. wurden 4.680 Rauchern im Alter von 35-60 Jahren mit leichter bis mittlerer Atemnot untersucht. Es zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen dem Gesamtbilirubinwert und der Schwere sowie dem Verlauf der COPD (Apperley et al., 2015). Außerdem besteht ein inverser Zusammenhang zwischen dem Bilirubinspiegel und verschiedenen Krebsarten (Ohnaka et al., 2010) sowie der Gesamtmortalität (Horsfall et al., 2011; Horsfall et al., 2013).

2.3 Bilirubin und der hepatische Fettstoffwechsel

2.3.1 Bilirubin und die Leber

Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Hinblick auf die Bilirubin-Metabolisierung. So wird UKB von den Hepatozyten aufgenommen, intrazellulär gespeichert, zu wasserlöslichen Metaboliten konjugiert, in die Galle abgegeben und teilweise über den enterohepatischen Kreislauf wiederaufgenommen. Es besteht somit ein ständiger und enger Kontakt mit Bilirubin (Memon et al., 2016). Abgesehen davon handelt es sich bei der Leber um ein Organ, das sowohl direkt als auch indirekt von einer Vielzahl metabolischer Erkrankungen betroffen ist, die mit Störungen des Fett- und Glucosestoffwechsels einhergehen. Bilirubin, dem hierauf positive Effekte zugesprochen werden, könnte demnach wichtig für die hepatische Gesundheit sein (Kwak et al., 2012).

2.3.2 Effekte auf die NAFLD

Störungen im Fett- und Glucosestoffwechsel sind meist mit Fetteinlagerungen assoziiert. Diese resultieren aus einem Ungleichgewicht zwischen der Fettverfügbarkeit (Fettaufnahme oder de-novo-Lipogenese) und der Fettverstoffwechselung (Fettabbau bzw. β -Oxidation) und haben eine erhöhte intrazelluläre Lipidperoxidation und oxidativen Stress zur Folge. Die Bildung großer Mengen freier Radikale und Entzündungsfaktoren kann dann die Leber schädigen (Yao et al., 2011). Dies spielt unter anderem eine Rolle bei der Pathogenese der nichtalkoholischen Fettleberkrankheit (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), die mit einer Prävalenz von 20-30% die häufigste chronische Lebererkrankung darstellt. Sie umfasst ein breites Spektrum von Leberfunktionsstörungen, die von einer einfachen Steatose bis hin zu einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH), einer Zirrhose und einem hepatozellulären Karzinom (hepatocellular carcinoma, HCC) reichen. Die NAFLD gilt als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms, da sie mit Adipositas, Dyslipidämie, Insulinresistenz, T2DM und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist. Es ist bekannt, dass das Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Faktoren ausschlaggebend dafür sein kann, ob und in welchem Ausmaß die Erkrankungen fortschreiten (Kwak et al., 2012). Im

Rahmen einer Querschnittstudie, in der die Daten von 17.348 Personen untersucht wurden, konnte beobachtet werden, dass die NAFLD-Prävalenz sowohl bei Männern als auch bei Frauen signifikant mit steigendem Bilirubin-Wert abnahm. Die Assoziation blieb nach Korrektur um andere metabolische Risikofaktoren bestehen, schien also davon unabhängig zu sein (Kwak et al., 2012). Auch in einer prospektiven Kohortenstudie von Tian et al. konnte ein solcher inverser Zusammenhang gezeigt werden, wobei dieser nur für konjugiertes Bilirubin, nicht aber für UKB bzw. das Gesamtbilirubin galt. Hier gingen die Ausgangs-Bilirubinwerte von 8.189 Teilnehmern sowie die NAFLD-Inzidenz nach einem Follow-up von 5 Jahren in die Analysen mit ein (Tian et al., 2016). Ebenso in Hinblick auf NASH konnte eine präventive Wirkung des Bilirubins gezeigt werden, sowohl bei Erwachsenen (Hjelkrem et al., 2012; Salomone et al., 2013) als auch bei Kindern (Puri et al., 2013).

2.3.3 Potenzieller Wirkmechanismus

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren α (PPAR α) sind nukleare Rezeptoren, die über unterschiedliche Liganden aktiviert werden können und als Transkriptionsfaktoren die Expression einer Vielzahl von Genen steuern. Bei den Zielgenen handelt es sich vor allem um solche, die bei der Regulation des Fett- und Glucosestoffwechsels eine Rolle spielen. Stec et al. konnten 2016 zeigen, dass Bilirubin strukturelle Ähnlichkeiten zu bekannten PPAR α -Liganden aufweist und in der Lage ist, PPAR α direkt zu binden und in folgedessen zu aktivieren. Hierbei könnte es sich um einen neuen molekularen Mechanismus handeln, der eine Erklärung für die fettsenkenden und glucoseregulierenden Effekte eines moderaten Anstieges des Bilirubinspiegels wäre. Bereits 2014 konnte im Rahmen einer Studie von Hinds et al. beobachtet werden, dass Mäuse mit einem erhöhten Bilirubinspiegel gleichzeitig auch eine gesteigerte PPAR α -Expression aufwiesen. Spätere in vitro-Versuche legten dar, dass diese mit einer vermehrten Aktivität zahlreicher Gene assoziiert ist. Versuche mit einem Adipositas-Zellmodell konnten zeigen, dass 10 μ M bzw. 55 μ M Bilirubin die Fettakkumulation während der Adipogenese um 49% bzw. 91% reduzierte. Außerdem kam es zu einer verminderten Expression der Fettsäure-

Synthase (FAS), während die Expression der Carnitine Palmitoyltransferase 1 (CPT1) gesteigert wurde. Zusätzlich wurde ein Tierversuch durchgeführt. Wildtyp-Mäuse, die im Rahmen einer fettreichen Ernährung mit Bilirubin behandelt wurden, wiesen ein geringeres Körpergewicht, einen geringeren Fettanteil, eine erhöhte fettfreier Masse sowie einen reduzierten Blutglucosespiegel auf. Letzteres wurde auf die gesteigerte Expression von Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) in der Leber und im Serum zurückgeführt. All diese Effekte blieben bei PPAR α -Knockout-Mäusen aus, wodurch die vermittelnde Rolle von PPAR α bestätigt werden konnte (Stec et al., 2016). Mölzer et al. konnte den Sachverhalt auch beim Menschen darlegen. Die Fall-Kontroll-Studie schloss 120 fastende, gesunde, alters- und geschlechtsangepasste Probanden mit und ohne GS mit ein. Es bestand eine Assoziation zwischen GS und den Konzentrationen an Phospho-Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase (Phospho-AMPK) $\alpha 1/\alpha 2$, PPAR α/γ und PPAR γ -Coactivator (PGC) 1 α , was auf eine verstärkte Fastenreaktion bzw. Veränderungen im Energie- und Fettmetabolismus hinwies (Mölzer et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob solche Effekte auf den Fettmetabolismus, die sich unter anderem in einer verringerten Fettakkumulation äußern, auch bei HepG2-Zellen beobachtet werden können, wenn diese für unterschiedliche Expositionszeiten mit verschiedenen FFS- und UKB-Konzentrationen inkubiert wurden.

3. Material und Methoden

3.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

3.1.1 Reagenzien

Accutase	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: A6964)
Bilirubin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: B412)
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: A2153)
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: B6916)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: D4540)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: D8537)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium flüssig	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: D1145)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium Pulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: D5030)
Fetales Bovines Serum	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: F7524)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: F1635)
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: D8270)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: G7513)

Linolsäurenatriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: L8134)
MTT	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktnummer: M2128)
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: 06203-M)
Natriumoleat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: O7501)
Natriumpalmetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: P9767)
Nile Red	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: 72485)
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland (Produktcode: P0781)
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (Produktcode: T10282)

3.1.2 Materialien

96-Mikroplatte schwarz	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich (Produktcode: 655090)
96-Mikroplatte transparent	VWR International, Darmstadt, Deutschland (Produktcode: 734-0481)
Objektträger	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland (Produktcode: 872011)
Pasteur-Pipetten 2ml	VWR International, Darmstadt, Deutschland (Produktcode: 612-1702)
Pipettenspitzen 200µl	Starlab International, Hamburg, Deutschland (Produktcode: S1111-0006)

Pipettenspitzen 1000µl	Starlab International, Hamburg, Deutschland (Produktcode: S1111-6001)
Pipettenspitzen 5000µl	Starlab International, Hamburg, Deutschland (Produktcode: E1009-7001)
Reagenzreservoirs	Lactan, Graz, Österreich (Produktcode: EKT7.1)
Spritzen	VWR International, Darmstadt, Deutschland (Produktcode: 613-5398)
Spritzenvorsatzfilter	VWR International, Darmstadt, Deutschland (Produktcode: 514-1113)
Sterilindikatorband Dampf	Lactan, Graz, Österreich (Produktcode: XC20.1)
Sterilindikatorband Heißluft	Lactan, Graz, Österreich (Produktcode: XC21.1)
Tubes 0,5ml transparent	VWR International, Darmstadt, Deutschland (Produktcode: RATI8610007)
Tubes 2,0 ml transparent	Starlab International, Hamburg, Deutschland (Produktcode: E1420-2000)
Tubes 15ml braun	VWR International, Darmstadt, Deutschland (Produktcode: 525-0599)
Tubes 15ml transparent	VWR International, Darmstadt, Deutschland (Produktcode: 525-0400)
Tubes 50ml transparent	VWR International, Darmstadt, Deutschland (Produktcode: 525-0402)
Zellkulturflaschen 75cm ²	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich (Produktcode: 658175)
Zellkulturflaschen 175cm ²	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich (Produktcode: 660175)

3.1.3 Geräte

Laminar Safemate 1.8	Biofair, Siziano, Italien
Inkubator Function Line	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microplate Reader FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge® 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellzähler LUNA-FL™	Logos Biosystems, Anyang, Südkorea
Waage XSE205 Dual Range	Mettler-Toledo, Columbus, USA
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Schüttelwasserbad 1086	GFL, Burgwedel, Deutschland
Schüttler KS 125 Basic	IKA-Werke, Breisgau, Deutschland
pH-Meter 827 pH lab	Metrohm Iluna, Herisau, Schweiz
Multikanalpipette Proline® 5-100µl	Biohit, Helsinki, Finnland
Multikanalpipette Proline® 50-300µl	Biohit, Helsinki, Finnland
Multikanalpipette Proline® 100-300µl	Biohit, Helsinki, Finnland
Pipette Proline® 0,5-10µl	Biohit, Helsinki, Finnland
Pipette Proline® 20-200µl	Biohit, Helsinki, Finnland
Pipette Proline® 0,1-1ml	Biohit, Helsinki, Finnland
Pipette Proline® 1-5ml	Biohit, Helsinki, Finnland
Pipette Research® plus 1-5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumpumpe	Bartelt, Graz, Österreich
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zelllinie

Bei der verwendeten Zelllinie handelte es sich um HepG2-Zellen, die vom Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität zur Verfügung gestellt wurden. Sie stammen ursprünglich von einem hepatozellulärem Karzinom eines 15-jährigen kaukasischen Mannes ab. Abbildung 4 zeigt sie bei geringer bzw. hoher Konfluenz. Sie sind adhärent, haben eine epithelartige Morphologie und enthalten einen Kern mit einer Chromosomenzahl im Bereich von 48 bis 54 Chromosomen pro Zelle (Wilkening et al., 2003). HepG2-Zellen sind hochdifferenziert und zeigen viele der genotypischen Merkmale normaler Leberzellen (Gerets et al., 2012). Während der Kultivierung sezernieren HepG2-Zellen zahlreiche leberspezifische Plasmaproteine wie Albumin, Transferrin und α -Fetoprotein (Luckert et al., 2017). Sie sind in der Lage, sowohl FFS (Yao et al., 2011) als auch UKB (Zucker & Goessling, 2000) aufzunehmen.

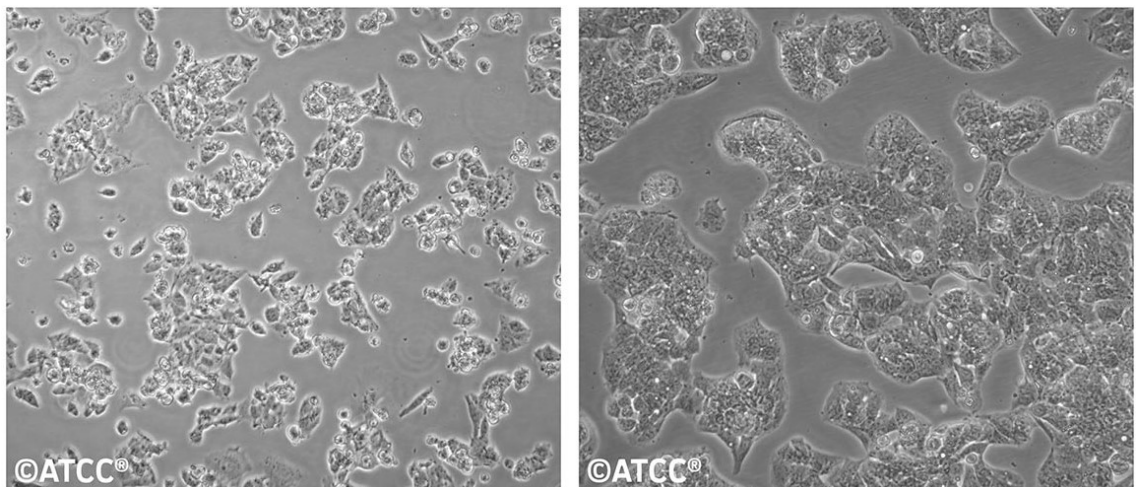


Abbildung 4: HepG2-Zellen bei geringer (links) und hoher (rechts) Konfluenz (www.lgcstandards-atcc.org)

3.2.2 Passagieren und Aussäen der Zellen

Es wurden zwei unabhängige Passagen geführt. Die Zellen wurden in 75cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und zweimal wöchentlich bei einer Konfluenz von ca. 80% passagiert.

Bei dem verwendeten Nährmedium handelte es sich um glucosereiches und Natriumhydrogencarbonat (NaCO_3)-haltiges Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10% fetalem Rinderserum (FBS), 2% Glutamin (Gln) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) supplementiert wurde. Zum Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurde mit 3ml PBS (37°C) gewaschen, 3ml Accutase aufgetragen und für 6min inkubiert (5% CO_2 , 37°C). Dann wurde die Accutase durch Zugabe von 6ml $\text{DMEM}_{\text{suppl.}}$ (37°C) inaktiviert und die Zelllösung in einem 15ml Tube für 5min zentrifugiert (1000RCF, 20°C). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 2ml PBS gelöst (37°C), 30µl der Zelllösung entnommen und zweimal je 10µl Zelllösung mit 10µl Tryptophan-Blau (RT) gemischt. Das Zellzählen erfolgte mittels *LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter*. Nachdem die Zellzahl bestimmt worden war, wurde die Zelllösung nochmals für 5min zentrifugiert (1000 RCF, 20°C), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2ml $\text{DMEM}_{\text{suppl.}}$ (37°C) gelöst.

Für die Passagieroutine wurde in neue 75cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Die Inkubation betrug entweder 3 Tage ($2,3 \cdot 10^6$ Zellen/Zellkulturflasche) oder 4 Tage ($2,0 \cdot 10^6$ Zellen/Zellkulturflasche) (5% CO_2 , 37°C). Für die Experimente wurde in transparente (MTT-Assay) bzw. schwarze (NR-Assay) 96-Wellplates ausgesät, wonach die Zellen für 2 Tage ($0,6 \cdot 10^5$ Zellen/Well) oder 2,5 Tage ($0,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well) inkubiert wurden (5% CO_2 , 37°C). Anschließend waren sie vollständig konfluent und konnten behandelt werden.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden wie in 3.2.2 verfahren. Allerdings wurde das zum Schluss erhaltene Zellpellett nicht in $\text{DMEM}_{\text{suppl.}}$, sondern in einem Freezing-Medium gelöst. Dieses wurde direkt zuvor aus 90% FBS und 10% DMSO hergestellt, wobei beide Bestandteile eine Temperatur von knapp über 0°C aufwiesen. Die Zelllösung wurde dann in vorgekühlte Cytrotubes pipettiert und zunächst für 24h in den Tiefkühler (-80°C) gestellt. Danach wurden diese in Flüssigstickstoff (-196°C) überführt und dort bis zur weiteren Verwendung gelagert. Pro Cytrotube waren $2,4 \cdot 10^6$ Zellen in 1,2 ml enthalten.

Zum Auftauen der Zellen wurde jedes Cryotube kurz in der Hand erwärmt. Die angetaute Zelllösung wurde dann in ein 15ml-Tube mit 8ml DMEM_{suppl.} (37°C) gegeben und für 5min zentrifugiert (1000 RCF, 20°C). Nachfolgend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10ml DMEM_{suppl.} (37°C) gelöst und die Zelllösung in eine 75cm²-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen konnten nach 2 Tagen Inkubation (5% CO₂, 37°C) das erste Mal passagiert werden, wonach bereits der Übergang zur Passagieroutine möglich war.

3.3 Stocks und Treatments

3.3.1 Zusammensetzung und Eigenschaften

Die Treatments wurden aus vier verschiedenen Stock-Lösungen hergestellt. Hierbei handelte es sich um einen BSA-Stock, FFS-Stock, UKB-Stock und DMSO-Stock. Basis aller Stocks bildete der BSA-Stock, der mit Gln, DMEM, NaHCO₃ und ggf. Glucose supplementiert wurde. Die Konzentrationen der Stock-Lösungen gehen aus Tabelle 1 hervor.

BSA	Gln	DMEM	NaHCO ₃	Glucose
3,023g/100ml	0,06g/100ml	0,83g/100ml	0,37g/100ml	0,45g/100ml
3%	2%	10%	4%	1%

Tabelle 1: Konzentrationen der Stock-Lösungen

Insgesamt wurde bei allen Stocks und Treatments darauf geachtet, dass diese bestmöglich an die physiologischen Bedingungen des menschlichen Blutes angepasst wurden. Die BSA-Konzentration aller Stocks und Treatments betrug 0,4545mM. Grund hierfür war, dass gleiche Voraussetzungen geschaffen werden sollten und Verdünnungen zum Ausfällen von UKB führen könnten. Sowohl UKB als auch FFS mussten an BSA konjugiert werden, um die Löslichkeit in einer polaren Umgebung sowie die Verfügbarkeit in der Zelle zu ermöglichen. UKB musste außerdem vor der Konjugation an BSA in DMSO gelöst werden. Der 0,275%ige DMSO-Stock diente dazu, in allen Treatments gleiche DMSO-

Konzentrationen zu gewährleisten. Der FFS-Stock wurde analog zur Fettsäure-Zusammensetzung des Blutplasmas hergestellt. Die Konzentrationen von gesättigten Fettsäuren (SFA), einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) und mehrfach ungesättigten Fettsäure (PUFA) liegen hier bei 42,4 μM , 17,1 μM bzw. 40,6 μM , was einem Verhältnis von etwa 2:1:2 entspricht. Da es sich bei Palmitinsäure (PA), Ölsäure (OA) und Linolsäure (LA) um die häufigsten vorkommenden FSS handelt, wurden diese herangezogen (Hodson et al., 2008; De Almeida et al., 2002). Der FFS-Stock wies eine Konzentration von 1,5mM (molares FFS:BSA-Verhältnis: 3,3:1) auf, die FFS-Treatments 0,5mM bzw. 1mM. Hierbei handelte es sich um Konzentrationen, die zu einem Anstieg des intrazellulären FFS-Gehaltes führen (Yao et al., 2011). Die Konzentration des UKB-Stocks betrug 0,055mM (molares UKB:BSA-Verhältnis: 0,121:1), diejenigen der UKB-Treatments 17,1 μM , 30 μM und 55 μM . 17,1 μM wurde deshalb gewählt, da es sich um den Schwellenwert handelt, ab dem GS diagnostiziert wird (Bosma et al., 1995). Der Wert wurde mit 30 μM bzw. 55 μM zusätzlich verdoppelt bzw. verdreifacht, da physiologisch auch höhere Konzentrationen vorliegen können (Hirschfield & Alexander, 2006). Schließlich wurde auch der pH-Wert aller Stocks und Treatments an menschliches Blut angepasst. Er betrug 7,36-7,44.

3.3.2 Herstellung

Die Stocks wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt. Um eine Zersetzung von FFS und UKB durch direkte Lichteinwirkung zu verhindern, wurde stets im Dunkeln gearbeitet. Es wurde auf Trübungen und UKB-Kristallbildung geachtet, die Hinweis für Ausfällungen gewesen wären und nicht auftreten durften. Außerdem wurden Temperaturen und pH-Werte angewandt, die eine optimale Löslichkeit gewährleisteten, ohne aber nachteilige Effekte auf die Struktur oder die Haltbarkeit der einzelnen Bestandteile zu haben. Zum Lösen der Reagenzien wurde ein Magnetrührer verwendet.

BSA-Stock

Zur Herstellung des BSA-Stocks wurde BSA-Pulver für 20min in ddH₂O gelöst (37°C) und nachfolgend wie in Tabelle 1 ersichtlich supplementiert.

FFS-Stock

Zur Herstellung des FFS-Stocks wurden die FFS jeweils für 30min in ddH₂O gelöst (70°C), schrittweise zum BSA-Stock hinzugegeben und dann wie in Tabelle 1 supplementiert.

DMSO-Stock

Zur Herstellung des DMSO-Stocks wurde der BSA-Stock_{suppl.} zunächst mittels NaOH (40g/l) auf einen pH-Wert von >7,7 eingestellt und auf dunkle Tubes aufgeteilt. Nachdem das DMSO hinzugegeben worden war, wurden die Tubes sofort kräftig geschüttelt und für 5min in ein Schüttelbad gestellt (37°C). Danach erfolgte eine Überprüfung auf DMSO-Kristalle.

UKB-Stock

Zur Herstellung des UKB-Stocks wurde zunächst ein 20mM UKB-Stock hergestellt. Hierfür wurden UKB und DMSO in ein dunkles Eppendorf-Tube gegeben. Dieses wurde 10sec gevortext, 5min ins Wasserbad gestellt (70°C), 10sec gevortext, 1min ins Ultraschallbad gestellt, 10sec gevortext und 30sec zentrifugiert (14.000RCF, 4°C). Dann wurde der BSA-Stock_{suppl.} mittels NaOH (40g/l) auf einen pH-Wert von >7,7 eingestellt und auf dunkle Tubes aufgeteilt. Nachdem das UKB hinzugegeben worden war, wurden die Tubes sofort kräftig geschüttelt und für 5min in ein Schüttelbad gestellt (37°C). Danach erfolgte eine Überprüfung auf UKB-Kristalle.

Zuletzt wurde jeder Stock mittels HCl (1:3 25%HCl:ddH₂O) auf einen pH-Wert von 7,36-7,44 adjustiert, mit ddH₂O auf das finale Volumen aufgefüllt, sterilfiltriert und für max. drei Monate tiefgefroren (-20°C). Zur Herstellung der Treatments wurden die Stocks im Wasserbad (37°C) erwärmt, die benötigten Mengen entnommen, in dunkle Tubes überführt und gut durchmischt.

3.4 Experimente

3.4.1 MTT-Assay

Hintergrund

Der MTT-Assay ist ein sensibler und zuverlässiger Test, der der quantitativen Bestimmung der Zellviabilität dient. Er sollte im Vorfeld zeigen, dass die Treatments nicht toxisch wirken, d.h. zu keinen oder akzeptablen Änderungen der metabolischen Aktivität führen und somit im nachfolgenden NR-Assay untersucht werden können. Der MTT-Assay basiert auf der Fähigkeit lebender Zellen, das gelbe, wasserlösliche Substrat 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazanprodukt zu reduzieren. Die Reduktion erfolgt unter Tetrazolium-Ringspaltung und wird hauptsächlich durch die mitochondriale Dehydrogenase vermittelt. Abbildung 5 zeigt die Reaktion.

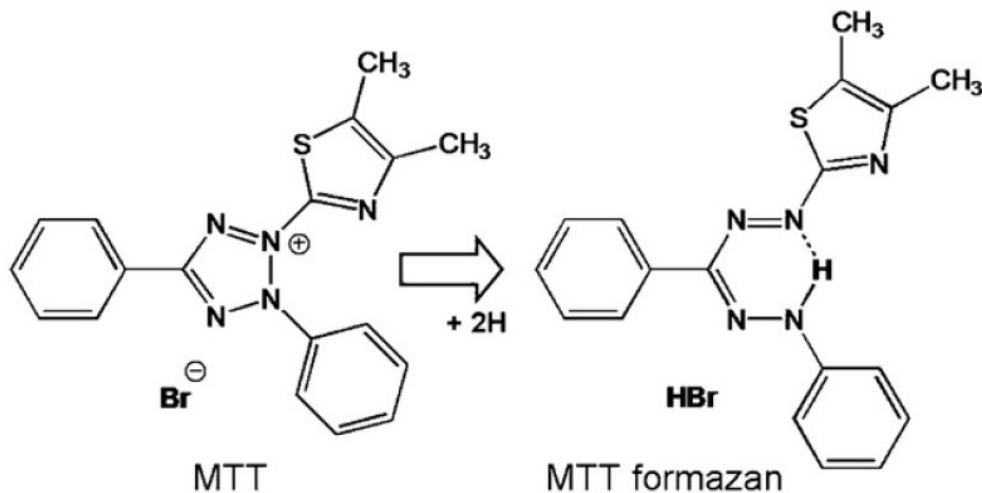


Abbildung 5: Chemische Struktur von MTT und seinem reduziertem Formazanprodukt (Stockert et al., 2012)

Die während der MTT-Inkubation ausfallenden Formazankristalle müssen zur photometrischen Messung gelöst werden, wofür organische Lösungsmittel wie DMSO Verwendung finden. Die ermittelten Absorbance-Werte sind proportional zur Anzahl lebensfähiger Zellen und umgekehrt proportional zum Grad der Zytotoxizität (Stockert et al.,

2012; Senthilraja & Kathiresan, 2015). DMSO wurde im Rahmen des MTT-Assays nicht nur als Lösungsmittel, sondern auch als Positivkontrolle eingesetzt. Grundlage hierfür war, dass es Einfluss auf die Membranpermeabilität hat und mit dem zellulären Stoffwechsel interagieren kann. In höheren Konzentrationen können diese Wechselwirkungen zytotoxische Effekte und Zellschäden zur Folge haben. Wie stark diese ausgeprägt sind, hängt von der Zelllinie, der Konzentration und der Expositionsdauer ab. Auf Basis früherer Studienergebnisse konnte angenommen werden, dass eine Konzentration von 20% DMSO nach 5h (ohne Glucose) bzw. 24h (mit Glucose) einen deutlichen Abfall der Zellviabilität bedingen sollte (Violante et al., 2002).

Planung

Der MTT-Assay wurde in transparenten 96-Wellplates durchgeführt. Abbildung 6 zeigt das Durchführungsschema. Jedes Treatment wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten wiederholt (N=3), wobei je sechs Messwerte ermittelt wurden (n=6). Sie äußeren Wells enthielten keine Zellen und stellten den Blank dar. Mit ihnen wurde genauso verfahren, wie auch mit den restlichen Wells, allerdings wurde das Treatment durch DMEM ersetzt. Untersucht wurden die Negativkontrolle BSA/DMSO, die Positivkontrolle 20% DMSO und 11 Treatments unterschiedlicher UKB- und FFS-Konzentration: 17,1µM UKB, 30µM UKB, 55µM UKB, 0,5mM FFS, 0,5mM FFS+17,1µM UKB, 0,5mM FFS+30µM UKB, 0,5mM FFS+55µM UKB, 1mM FFS, 1mM FFS+17µM UKB, 1mM FFS+30µM UKB, 1mM FFS+55µM UKB. Die Inkubationszeit entsprach dem jeweiligen Maximum im nachfolgenden NR-Assay, das 24h (mit Glucose) bzw. 5h (ohne Glucose) betrug. Die Expositionsdauer wurde bei den Experimenten ohne Glucose deshalb kürzer gewählt, da die Treatments nicht ausreichend Glucose für lange Inkubationszeiten lieferten. Die Behandlung erfolgte bei vollständiger Konfluenz der Zellen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL
B	BL	NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	PK	BL
C	BL	NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	PK	BL
D	BL	NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	PK	BL
E	BL	NK	T1	T2	T3	T4	T5	T 6	T7	T8	PK	BL
F	BL	NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	PK	BL
G	BL	NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	PK	BL
H	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL	BL

Abbildung 6: Schema eines 96-Wellplates für den MTT-Assay. Abkürzungen: BL=Blank, NK=Negativkontrolle, PK=Positivkontrolle, T=Treatment.

Durchführung

Zunächst wurde das DMEM_{suppl.} abgesaugt, mit 0,2ml/Well PBS (37°C) gewaschen, 0,2ml/Well Treatment (37°C) aufgetragen und für 24h (mit Glucose) bzw. 5h (ohne Glucose) inkubiert (5% CO₂, 37°C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Treatment abgesaugt, mit 0,2ml/Well PBS (37°C) gewaschen, 0,1ml/Well MTT-Lösung (1mg/ml DMEM, 37°C) auftragen und für 4h inkubiert (5% CO₂, 37°C). Danach wurde die MTT-Lösung abgesaugt, 0,2ml/Well DMSO (RT) aufgetragen und für 1h inkubiert (5% CO₂, 37°C). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der Absorption mittels *FLUOstar OPTIMA Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 485nm.

Berechnungen

Pro Treatment wurden sechs Absorbance-Werte gemessen, die um den Blank korrigiert wurden. Die erhaltenen Einzelwerte wurden anschließend auf den Mittelwert der Negativkontrolle BSA/DMSO bezogen, wonach die Berechnung der jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte.

3.4.2 NR-Assay

Hintergrund

Bei NR handelt es sich um einen lipophilen, roten Phenoxazin-Farbstoff, der an intrazelluläre, neutrale Lipide binden kann (siehe Abbildung 7). Er ist fluoreszierend, wobei eine lineare Korrelation zwischen dem abgegebenen Fluoreszenzsignal und dem Fettgehalt der Zellen besteht. NR kann deshalb für dessen quantitative Bestimmung eingesetzt werden. Da er einfach und kostengünstig in seinem Gebrauch ist, hat er sich in einer Vielzahl von Zelltypen etabliert (Alemán-Nava et al., 2016).

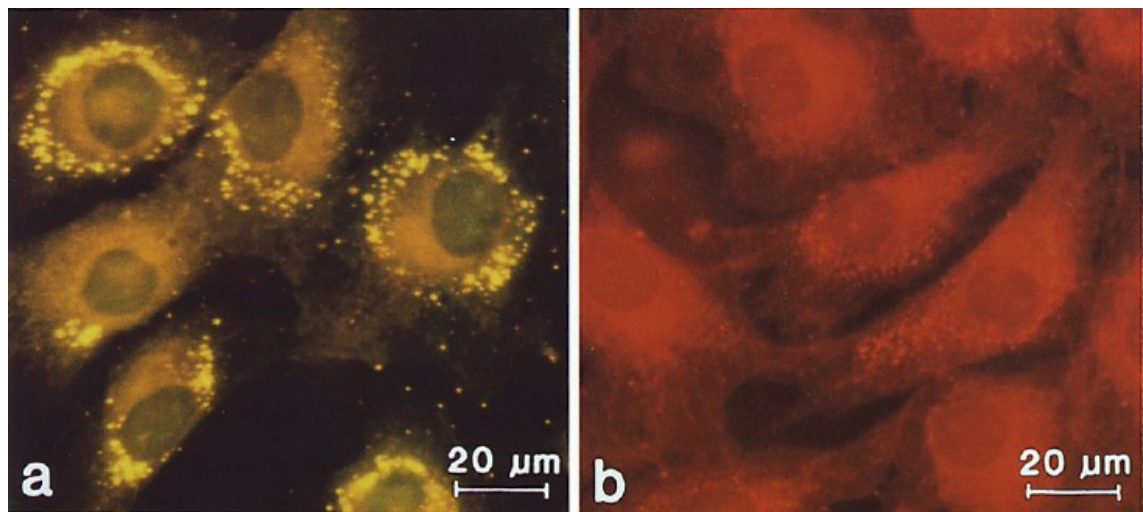


Abbildung 7: NR-Fluoreszenz von kultivierten glatten Muskelzellen der Aorta (Affe) und Peritoneal-Makrophagen (Maus) gemessen bei unterschiedlichen Wellenlängen (Greenspan et al., 1985)

Bevor die Zellen mit NR gefärbt werden, kann eine Fixierung durch Formaldehyd (FA) erfolgen. FA wirkt als Vernetzungsmittel, das mit Proteinen und Nukleinsäuren in der Zelle reagiert. Es findet weitverbreitete Anwendung, da es zu einer geringen Schrumpfung und einer guten Erhaltung der Zellstruktur für ein breites Spektrum an Zellen und Geweben führt. Es scheint außerdem keine signifikanten strukturellen Veränderungen an Proteinen zu bewirken (Hobro & Smith, 2017). Die FA-Fixierung diente dazu, die Behandlungen zu den entsprechenden Inkubationszeiten zu stoppen und weitere Veränderungen zu unterbinden.

Planung

Der NR-Assay wurde in schwarzen 96-Wellplates durchgeführt. Abbildung 8 zeigt das Durchführungsschema. Jedes Treatment wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten wiederholt (N=3), wobei je vier Messwerte ermittelt wurden (n=4). Die äußeren Wells wurden freigelassen, da hier größere Schwankungen aufgrund der höheren Verdampfung im Inkubator zu erwarten wären. Untersucht wurden die Negativkontrolle BSA/DMSO und 11 Treatments unterschiedlicher UKB- und FFS-Konzentration: 17,1µM UKB, 30µM UKB, 55µM UKB, 0,5mM FFS, 0,5mM FFS+17,1µM UKB, 0,5mM FFS+30µM UKB, 0,5mM FFS+55µM UKB, 1mM FFS, 1mM FFS+17µM UKB, 1mM FFS+30µM UKB, 1mM FFS+55µM UKB. Als Inkubationszeit wurden 0,5h und 5h (ohne Glucose) bzw. 0,5h, 5h und 24h (mit Glucose) gewählt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
B		NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
C		NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
D		NK	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
E		T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
F		T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
G		T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	
H		T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	

Abbildung 8: Schema eines 96-Wellplates für den NR-Assay (Abkürzungen: NK=Negativkontrolle, T=Treatment)

Durchführung

Zunächst wurde das DMEM_{suppl.} abgesaugt, mit 0,2ml PBS (37°C) gewaschen, 0,2ml Treatment (37°C) aufgetragen und für jeweils 0,5h, 5h oder 24 inkubiert (5% CO₂, 37°C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Treatment abgesaugt, mit 0,2ml/Well PBS (37°C) gewaschen, 0,1ml/Well 3%ige FA-Lösung (RT) auftragen und für 20min inkubiert (RT, dunkel). Nachdem die Zellen fixiert worden waren, wurde die FA-Lösung abgesaugt, dreimal mit 0,1ml/Well PBS (RT) gewaschen und die Zellen beim letzten Waschen in PBS belassen. Nach Messung der Background-Fluoreszenz mittels *FLUOstar OPTIMA*

Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 590nm, wurde PBS abgesaugt, 0,1 ml/Well NR-Lösung (3,3µg/ml PBS, RT) aufgetragen und für 2h inkubiert (RT, dunkel). Die NR-Lösung wurde abgesaugt, Reste der Färbelösung mit 0,1ml/Well PBS (RT) gewaschen und 0,1ml/Well PBS (RT) aufgetragen. Nach einer Inkubation von 22-24h (RT, dunkel) erfolgte die Fluoreszenz-Messung mittels *FLUOstar OPTIMA Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 590nm.

Berechnungen

Pro Treatment wurden vier Fluoreszenz-Werte gemessen. Zunächst wurde die Background-Fluoreszenz von der NR-Fluoreszenz subtrahiert. Die erhaltenen Einzelwerte wurden anschließend durch den Proteinwert des jeweiligen Treatments dividiert, was die Fluoreszenz/mg Protein ergab. Anschließend wurden die Werte auf den Mittelwert der Negativkontrolle bezogen, wonach die Berechnung der jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen erfolgte.

3.4.3 Bradford-Assay

Hintergrund

Der Bradford-Assay (BR) dient der quantitativen Proteinbestimmung und basiert auf der Beobachtung, dass Coomassie Brilliant Blue G-250 in zwei verschiedenen Farbformen existiert. Die ursprünglich rote Form des Farbstoffes wird nach Bindung an das Protein in die blaue Form umgewandelt, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm auf 595nm bedingt. Es handelt sich um eine sehr schnelle und einfache Methode, da sich der Farbstoff-Protein-Komplex innerhalb von 2min bildet und für ca. 1h stabil bleibt. Außerdem gewährleistet der hohe Extinktionskoeffizient eine hohe Sensitivität (Bradford, 1975). Der Assay wurde angewandt, um die Fluoreszenz-Werte der einzelnen Wells in Bezug zum jeweiligen Proteingehalt zu setzen. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die Menge an Zellen einen Einfluss auf die Intensität der NR-Fluoreszenz hat.

Planung

Der Bradford-Assay erfolgte immer unmittelbar nach dem NR-Assay. Jedes Treatment wurde somit ebenfalls in mindestens drei unabhängigen Experimenten wiederholt (N=3), wobei je vier Messwerte ermittelt wurden (n=4). Zusätzlich wurde zu Beginn der Experimentreihe eine Standardgerade erstellt. Hierfür wurde der Bradford-Assay mit 0,05M NaOH als Blank, ddH₂O als Negativkontrolle und BSA-Lösungen in sechs unterschiedlichen Konzentrationen (0,1mg/ml, 0,25mg/ml, 0,5mg/ml, 0,75mg/ml, 1mg/ml) im Triplikat (n=3) durchgeführt.

Durchführung

Zunächst wurde das PBS abgesaugt, 30µl/Well 0,05M NaOH-Lösung (RT) aufgetragen, die Wellplates für 2min auf den Schüttler gestellt (500rpm) und für 5min inkubiert (RT, dunkel). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lyse der Zellen unter dem Mikroskop geprüft. War diese erfolgt, wurden 250µl/Well Bradford-Reagenz (RT) aufgetragen, die Wellplates erneut für 1min auf den Schüttler gestellt (500rpm) und für 20min inkubiert (RT, dunkel). Direkt im Anschluss erfolgte die Messung der Absorption mittels *FLUOstar OPTIMA Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 620nm.

Berechnungen

Es wurden je vier Absorbance-Werte gemessen, die um den Blank korrigiert wurden. Die erhaltenen Einzelwerte wurden anschließend in die Gleichung der Standardgerade ($y = 0,7345x - 0,0387$, $R^2 = 0,9712$) eingesetzt, wodurch die Proteinkonzentrationen in mg/ml berechnet werden konnten. Anschließend erfolgte die Ermittlung der jeweiligen Mittelwerte, die für die Endberechnungen herangezogen wurden.

3.5 Statistische Analyse

Jedes Treatment und Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Statistiksoftware *IBM SPSS Statistics*. Zunächst wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft, ob die Daten einer Normalverteilung folgten. Anschließend wurde eine einfaktorielle ANOVA nach Bonferroni (bei normalverteilten Daten) oder der Kruskal-Wallis-Test bzw. Mann Whitney-U-Test (bei nicht normalverteilten Daten) durchgeführt, um die Mittelwerte der verschiedenen Treatments zu vergleichen. Trends wurden bei $p < 0,1$ akzeptiert, statistisch signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$ und statistisch hochsignifikante Unterschiede bei $p < 0,01$.

4. Ergebnisse

4.1 MTT-Assay

Abbildung 9 zeigt ein 96-Wellplate nach Durchführung des MTT-Assays. Es kam zu unterschiedlich stark ausgeprägten Farbumschlägen, die schon mit bloßem Auge erkennbar waren. Vor allem die Positivkontrolle 20% DMSO hob sich hierbei durch die geringe Färbung von den anderen Treatments ab.

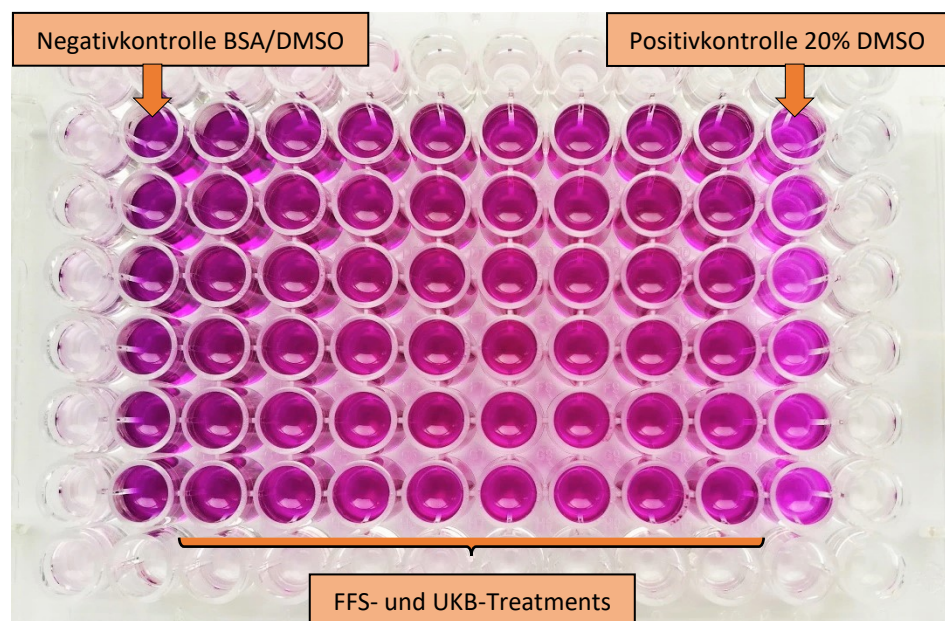


Abbildung 9: 96-Wellplate nach Durchführung des MTT-Assays

4.1.1 MTT-Assay mit Glucose

Abbildung 10 zeigt die prozentuellen Zellviabilitäten nach der Behandlung mit glucose-reichen Treatments unterschiedlicher FFS- und UKB-Konzentration nach einer Inkubationszeit von 24h im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO. Die rote Linie kennzeichnet die zuvor festgelegte Grenze von 80%, über derer die Treatments als nicht zytotoxisch eingestuft wurden. Sie wurde im Rahmen der Schwankungen von allen untersuchten Treatments übertroffen, wobei das Treatment 1mM FFS+55µM UKB im Mittel knapp darunter lag.

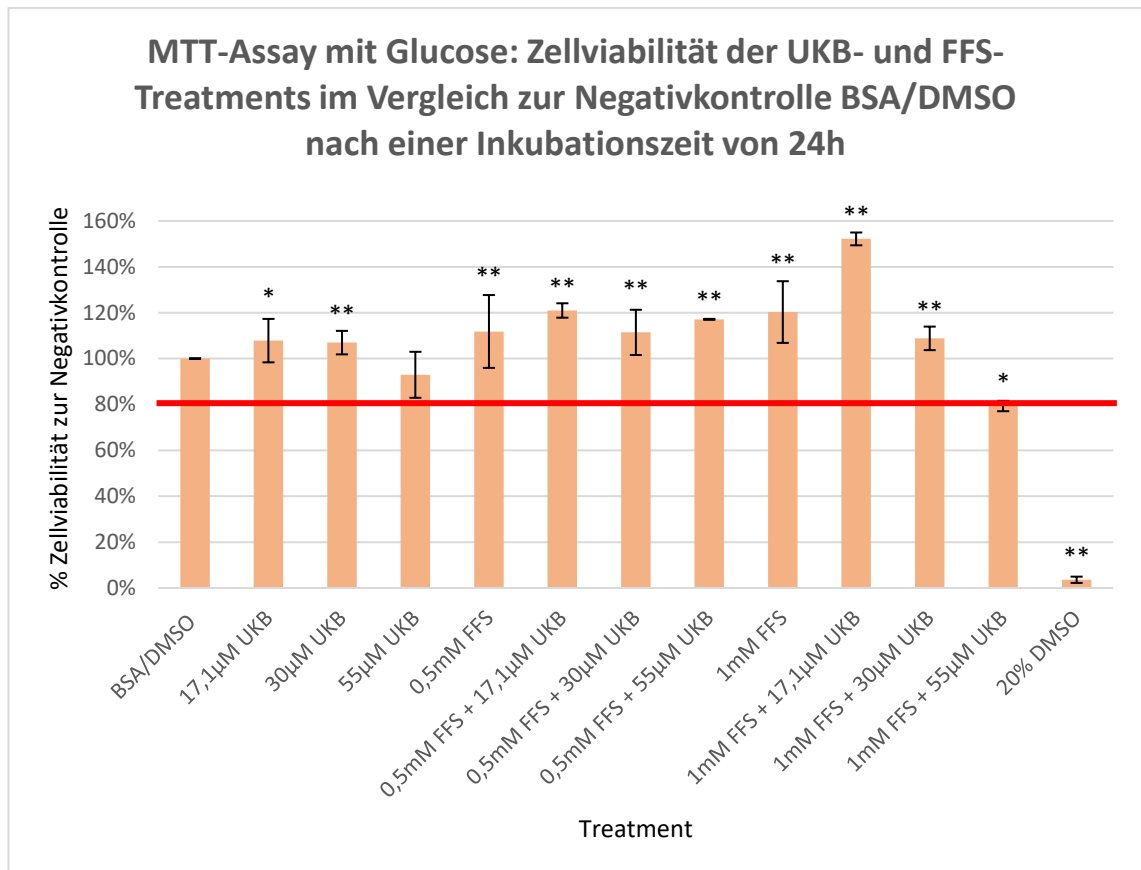


Abbildung 10: Ergebnisse des MTT-Assays mit Glucose. Zellviabilität der UKB- und FFS-Treatments im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 24h. Die rote Linie kennzeichnet die festgelegte Zytotoxizitäts-Grenze von 80%. Angabe der Daten als $MW \pm SD$. Angabe der Signifikanzen: * = signifikant bei $p < 0,05$ und ** = hochsignifikant bei $p < 0,01$ gegenüber der Negativkontrolle BSA/DMSO.

Aus Tabelle 2 geht nochmals genauer hervor, in welchem Ausmaß die Zellviabilitäten nach der Behandlung mit den einzelnen Treatments mit Glucose von der Negativkontrolle BSA/DMSO abweichen. Während bei den Treatments 55µM UKB (-7,1%) und 1mM FFS+55µM UKB (-20,7%) eine Abnahme der Zellviabilität zu verzeichnen war, konnte bei allen anderen Treatments eine Zunahme der Zellviabilität von +7,0% (30µM UKB) bis +52,2% (1mM FFS+17,1µM UKB) beobachtet werden. Bei der Positivkontrolle 20% DMSO reduzierte sich die Zellviabilität um 96,4%. Insgesamt waren die Abweichungen entweder signifikant oder hochsignifikant, mit Ausnahme jener des Treatments 55µM UKB.

Veränderungen der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO			
Treatment	Δ (%)	KI (%)	p-Wert
17,1 μ M UKB	+7,8	-1,6; +17,3	0,013
30 μ M UKB	+7,0	+1,8; +12,1	0,003
55 μ M UKB	-7,1	-17,1; +3,0	0,331
0,5mM FFS	+11,8	-4,0; +27,7	0,000
0,5mM FFS+17,1 μ M UKB	+21,0	+17,8; +24,1	0,000
0,5mM FFS+30 μ M UKB	+11,4	+1,6; +21,3	0,000
0,5mM FFS+55 μ M UKB	+17,1	+16,9; +17,3	0,000
1mM FFS	+20,3	+6,8; +33,7	0,000
1mM FFS+17,1 μ M UKB	+52,2	+49,4; +55,0	0,000
1mM FFS+30 μ M UKB	+8,8	+3,7; +13,9	0,001
1mM FFS+55 μ M UKB	-20,7	-22,9; -18,4	0,019
20% DMSO	-96,4	-97,8; -95,1	0,000

Tabelle 2: Ergebnisse des MTT-Assays mit Glucose. Veränderungen der Zellviabilität der UKB- und FFS-Treatments im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 24h. Angabe von Δ in Prozent und auf Basis der MW. Zusätzlich Angabe des KI (MW $\pm$ SD) und des p-Wertes.

4.1.2 MTT-Assay ohne Glucose

Abbildung 11 zeigt die prozentuellen Zellviabilitäten nach der Behandlung mit den glucosearmen Treatments unterschiedlicher FFS- und UKB-Konzentration nach einer Inkubationszeit von 5h im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO. Die rot gekennzeichnete 80%-Grenze wurde von allen untersuchten Treatments übertroffen.

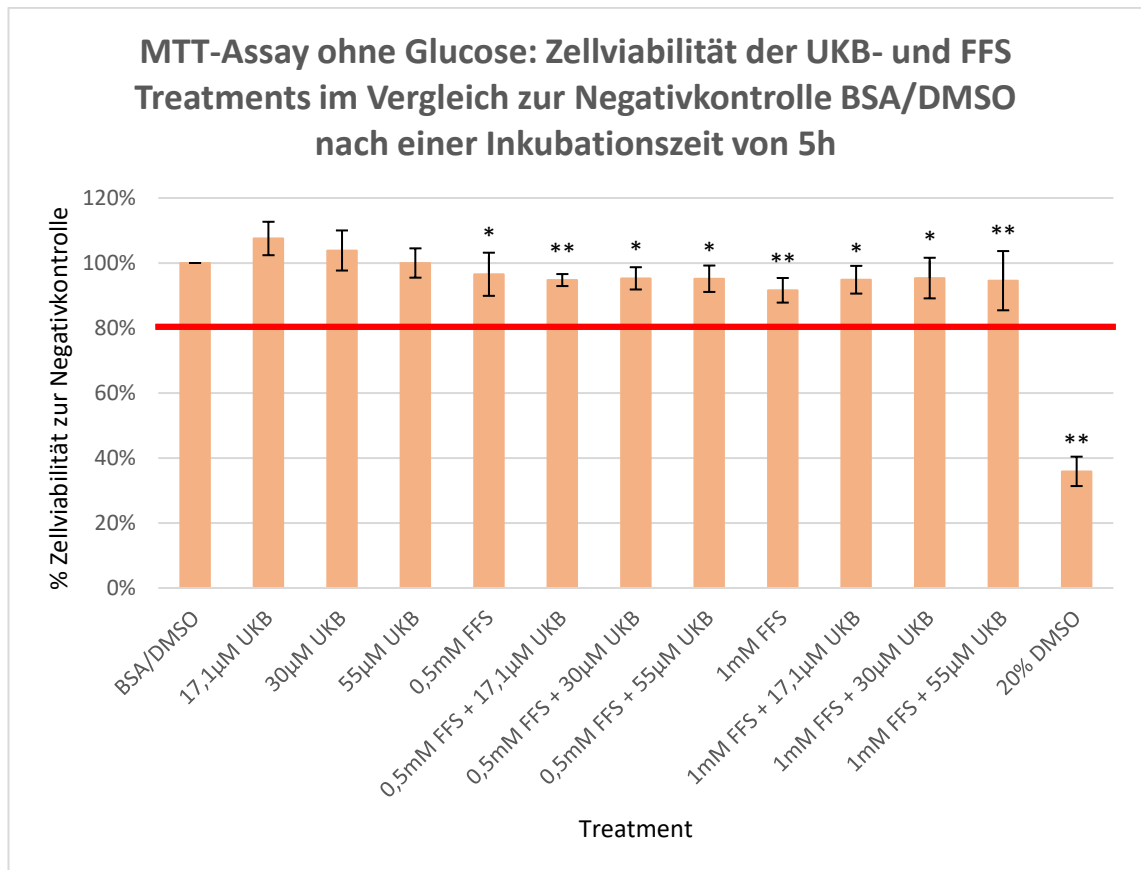


Abbildung 11: Ergebnisse des MTT-Assays ohne Glucose. Zellviabilität der UKB- und FFS-Treatments im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 5h. Die rote Linie kennzeichnet die festgelegte Zytotoxizitäts-Grenze von 80%. Angabe der Daten als $MW \pm SD$. Angabe der Signifikanzen: *=signifikant bei $p < 0,05$ und **hochsignifikant bei $p < 0,01$ gegenüber der Negativkontrolle BSA/DMSO.

Tabelle 3 beinhaltet die Veränderungen der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO für die Treatments ohne Glucose. Während bei den Treatments 17,1µM UKB (+7,5%), 30µM UKB (+3,9%) und 55µM UKB (0%) eine Zunahme bzw. ein Gleichbleiben der Zellviabilität zu verzeichnen war, konnte bei allen anderen Treatments eine Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden. Die Werte schwankten zwischen -3,5% (0,5mM FFS) und -8,4% (1mM FFS). Bei der Positivkontrolle 20% DMSO reduzierte sich die Zellviabilität um 64,1%. Insgesamt waren die Abweichungen entweder signifikant oder hochsignifikant, mit Ausnahme jener der Treatments 17,1µM UKB, 30µM UKB und 55µM UKB.

Veränderungen der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO			
Treatment	Δ (%)	KI (%)	p-Wert
17,1 μ M UKB	+7,5	+2,4; +12,7	0,101
30 μ M UKB	+3,9	-2,3; +10,0	0,412
55 μ M UKB	0,0	-4,5; +4,5	0,545
0,5mM FFS	-3,5	-10,1; +3,2	0,021
0,5mM FFS+17,1 μ M UKB	-5,2	-7,1; -3,4	0,010
0,5mM FFS+30 μ M UKB	-4,7	-8,1; -1,3	0,026
0,5mM FFS+55 μ M UKB	-4,8	-8,9; -0,8	0,020
1mM FFS	-8,4	-12,2; -4,6	0,000
1mM FFS+17,1 μ M UKB	-5,1	-9,4; -0,9	0,015
1mM FFS+30 μ M UKB	-4,6	-10,9; +1,6	0,016
1mM FFS+55 μ M UKB	-5,4	-14,5; +3,7	0,005
20% DMSO	-64,1	-68,6; -59,6	0,000

Tabelle 3: Ergebnisse des MTT-Assays ohne Glucose. Veränderungen der Zellviabilität der UKB- und FFS-Treatments im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 5h. Angabe von Δ in Prozent und auf Basis der MW. Zusätzlich Angabe des KI (MW $\pm$ SD) und des p-Wertes.

4.2 NR-Assay

4.2.1 NR-Assay mit Glucose

Abbildung 12 zeigt die Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der beiden Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h. Aus Tabelle 4 geht hervor, wie groß die jeweiligen prozentuellen Differenzen waren. 0,5h Inkubation führten weder bei 0,5mM FFS noch bei 1mM FFS zu signifikanten Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein. Eine Inkubation von 5h hatte sowohl bei 0,5mM FFS als auch bei 1mM FFS eine hochsignifikante Zunahme der Fluoreszenz/mg Protein um 18,6% bzw. 26,3% zur Folge. Auch nach 24h Inkubation konnte sowohl bei 0,5mM FFS als auch bei 1mM FFS ein hochsignifikanter Anstieg der Fluoreszenz/mg Protein um 30,2% bzw. 55,6% beobachtet werden.

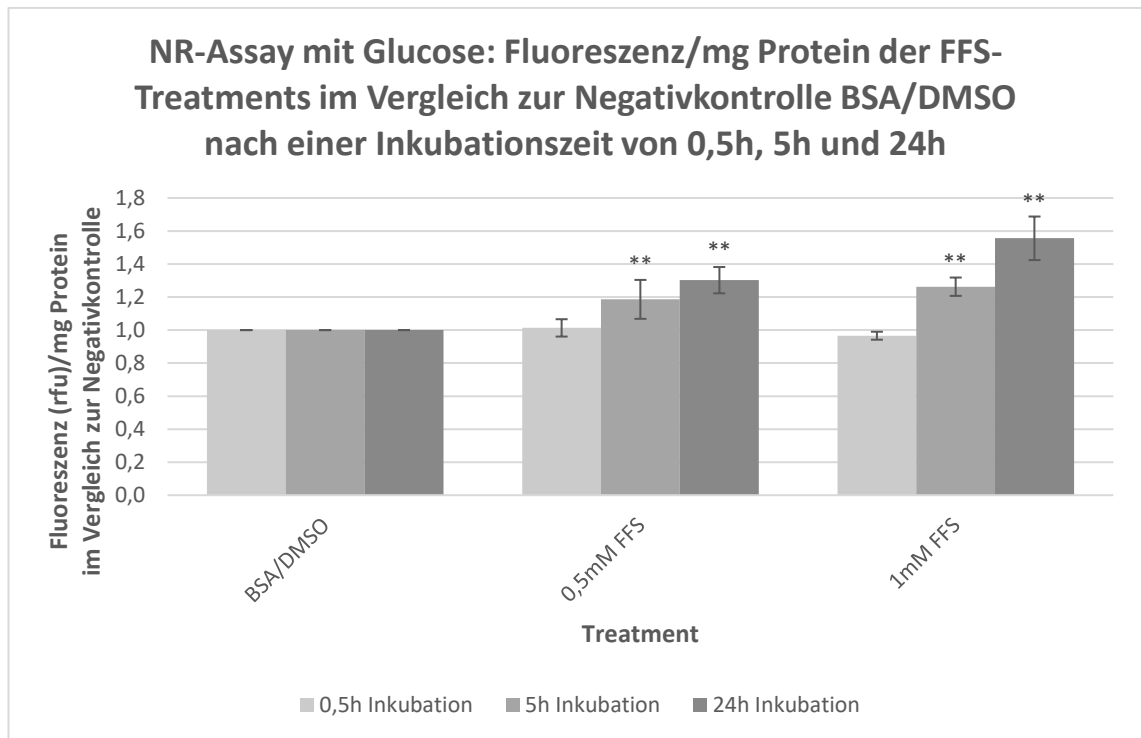


Abbildung 12: Ergebnisse des NR-Assays mit Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h. Darstellung der Daten als MW $\pm$ SD. Angabe der Signifikanzen: *=signifikant bei $p < 0,05$, **=hochsignifikant bei $p < 0,01$.

Treatments ohne FFS vs. mit FFS		0,5h		5h		24h	
		Δ (%)	p-Wert	Δ (%)	p-Wert	Δ (%)	p-Wert
BSA/DMSO	0,5mM FFS	+1,3	0,578	+18,6	0,000	+30,2	0,000
	1mM FFS	-3,4	0,248	+26,3	0,000	+55,6	0,000

Tabelle 4: Ergebnisse des NR-Assays mit Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h. Angabe von Δ in Prozent und auf Basis der MW. Zusätzliche Angabe des p-Wertes.

In Abbildung 13 werden die Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der UKB-haltigen Treatments mit den UKB-freien Treatments BSA/DMSO, 0,5mM FFS und 1mM FFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h verglichen. Tabelle 5 gibt Aufschluss über die jeweiligen prozentuellen Differenzen. Bei einer Inkubationszeit von 0,5h kam es zu einer signifikanten Reduktion der Fluoreszenz/mg Protein bei den Treatments

30µM UKB (-6,1%) und 0,5mM FFS+55µM UKB (-7,2%) sowie einer hochsignifikant verminderten Fluoreszenz/mg Protein bei 0,5mM FFS+30µM UKB (-11,6%). Eine Inkubationszeit von 5h hatte einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz/mg Protein bei 30µM UKB (+11,6%) zur Folge, während die Fluoreszenz/mg Protein bei 0,5mM FFS+55µM UKB (+9,2%) im Trend anstieg und bei 1mM FFS+55µM UKB (-9,8%) im Trend abfiel. Nach 24h Inkubation erreichte nur die Zunahme der Fluoreszenz/mg Protein des Treatments 1mMFFS+55µM UKB (+14,4%) das Signifikanzniveau. Außerdem nahm die Streuung der Ergebnisse mit steigender Inkubationszeit zu.

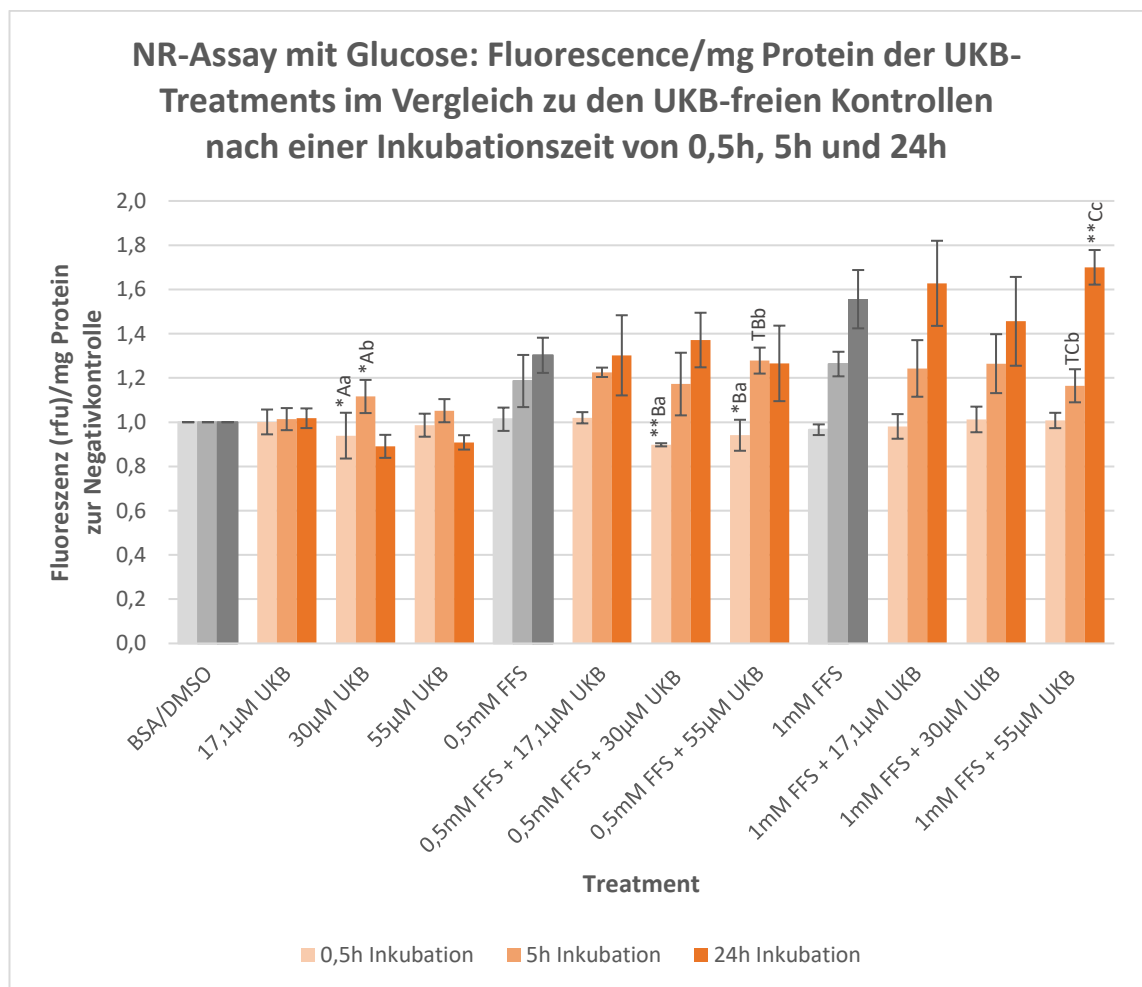


Abbildung 13: Ergebnisse des NR-Assays mit Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments mit 17,1µM UKB, 30µM UKB und 55µM UKB im Vergleich zu den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO (A), 0,5mM FFS (B) und 1mM FFS (C) nach einer Inkubationszeit von 0,5h (a), 5h (b) und 24h (c). Darstellung der Daten als MW±SD. Angabe der Signifikanzen: T=Trend bei $p < 0,1$, *=signifikant bei $p < 0,05$, **=hochsignifikant bei $p < 0,01$.

Treatments ohne UKB vs. mit UKB		0,5h		5h		24h	
		Δ (%)	p-Wert	Δ (%)	p-Wert	Δ (%)	p-Wert
BSA/DMSO	+17,1 μ M	+0,1	0,838	+1,4	0,884	+1,8	1,000
	+30 μ M	-6,1	0,030	+11,6	0,026	-10,9	0,864
	+55 μ M	-1,4	0,661	+5,2	0,339	-9,1	0,941
0,5mM FFS	+17,1 μ M	+0,7	0,801	+3,9	0,317	+0,0	1,000
	+30 μ M	-11,6	0,000	-1,4	0,892	+6,9	0,980
	+55 μ M	-7,2	0,023	+9,2	0,056	-4,0	1,000
1mM FFS	+17,1 μ M	+1,5	0,923	-2,0	0,603	+7,2	0,741
	+30 μ M	+4,7	0,163	+0,2	0,880	-10,0	1,000
	+55 μ M	+4,2	0,121	-9,8	0,078	+14,4	0,003

Tabelle 5: Ergebnisse des NR-Assays mit Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments mit 17,1 μ M UKB, 30 μ M UKB und 55 μ M UKB im Vergleich zu den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO, 0,5mM FFS und 1mM FFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h. Angabe von Δ in Prozent und auf Basis der MW. Zusätzlich Angabe des p-Wertes.

4.2.2 NR-Assay ohne Glucose

Abbildung 14 zeigt die Fluoreszenz/mg Protein der beiden Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h. Tabelle 6 legt dar, wie groß die jeweiligen Differenzen waren. Eine Inkubation von 0,5h hatte sowohl bei 0,5mM FFS als auch bei 1mM FFS eine nicht-signifikante Abnahme der Fluoreszenz/mg Protein um 5,2% bzw. 1,9% zur Folge. Nach 5h Inkubation konnte sowohl bei 0,5mM FFS als auch bei 1mM FFS ein nicht-signifikanter Anstieg der Fluoreszenz/mg Protein um 4,3% bzw. 0,9% beobachtet werden.

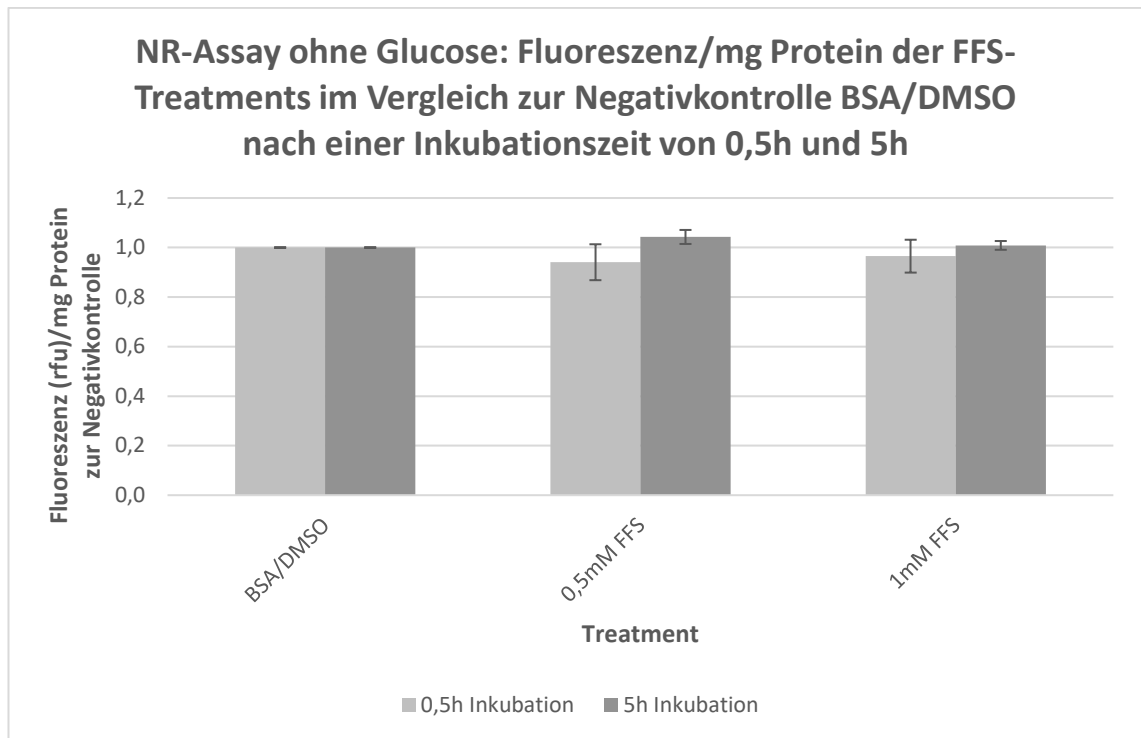


Abbildung 14: Ergebnisse des NR-Assays ohne Glucose. Veränderung der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h. Darstellung der Daten als $MW \pm SD$. Angabe der Signifikanzen: T=Trend bei $p < 0,1$, *=signifikant bei $p < 0,05$, **=hochsignifikant bei $p < 0,01$.

Treatments ohne FFS vs. mit FFS		0,5h		5h	
		Δ (%)	p-Wert	Δ (%)	p-Wert
BSA/DMSO	0,5mM FFS	-5,2	0,266	+4,3	0,184
	1mM FFS	-1,9	0,751	+0,9	0,655

Tabelle 6: Ergebnisse des NR-Assays ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h. Angabe von Δ in Prozent und auf Basis der MW. Zusätzliche Angabe des p-Wertes.

Aus Abbildung 15 gehen die Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der UKB-haltigen Treatments im Vergleich zu den UKB-freien Treatments BSA/DMSO, 0,5mM FFS und 1mM FFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h hervor. Tabelle 7 beinhaltet die prozentuellen Differenzen. Sowohl bei 0,5h als auch bei 5h konnte in fast allen Fällen signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede beobachtet werden. Nur bei den Treatments 17,1 μ M UKB (0,5h und 5h), 0,5mM FFS+30 μ M UKB (0,5h) und 1mM FFS+30 μ M

UKB (5h) war dies nicht der Fall. Es kam ausnahmslos zu Reduktionen in der Fluoreszenz/mg Protein. Diese reichten bei 0,5h Inkubation von -9,9% bis -30,6% und bei 5h Inkubation von -4,1% bis -15,3%.

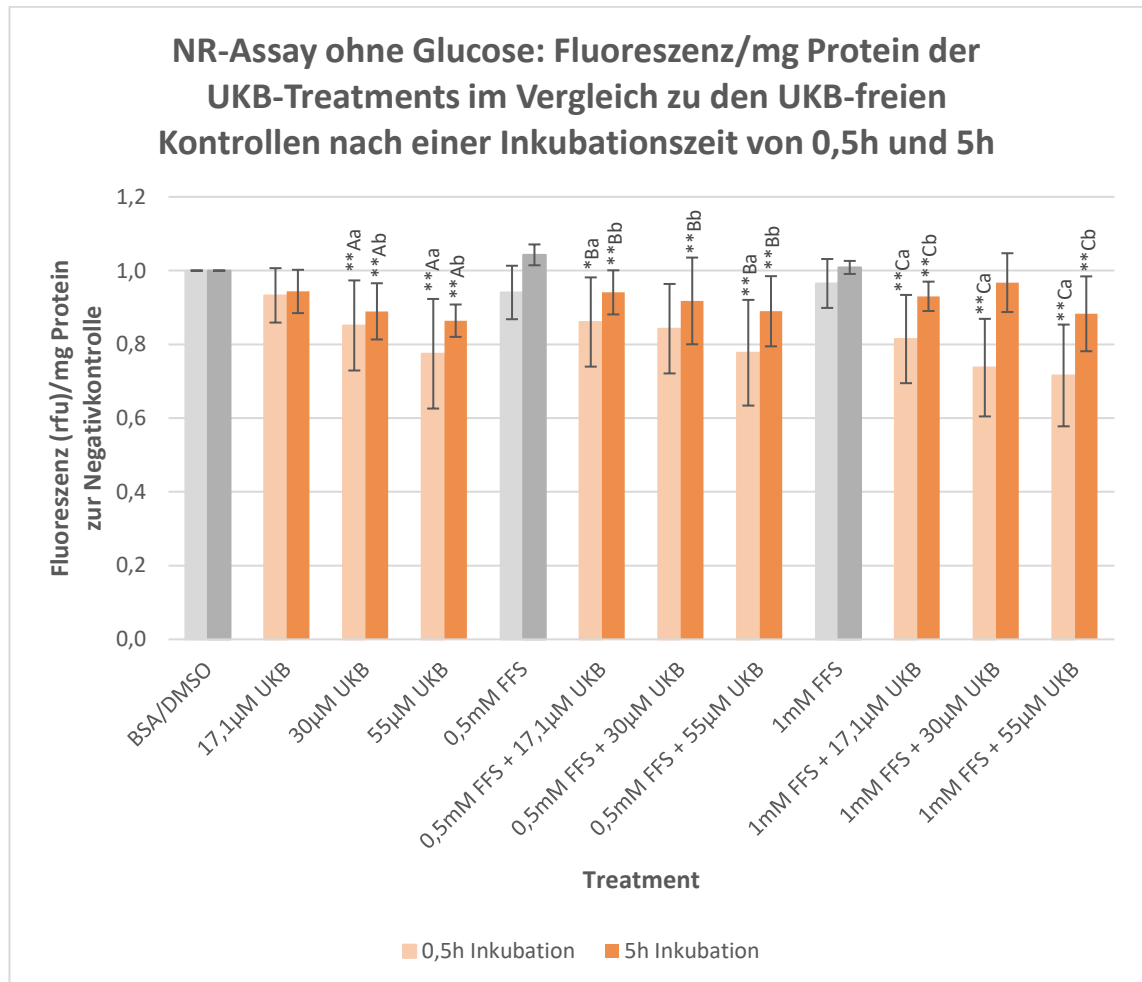


Abbildung 15: Ergebnisse des NR-Assays ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments mit 17,1µM UKB, 30µM UKB und 55µM UKB im Vergleich zu den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO (A), 0,5mM FFS (B) und 1mM FFS (C) nach einer Inkubationszeit von 0,5h (a) und 5h (b). Darstellung der Daten als MW±SD. Angabe der Signifikanzen: T=Trend bei $p < 0,1$, * = signifikant bei $p < 0,05$, ** = hochsignifikant bei $p < 0,01$.

Treatments ohne UKB vs. mit UKB		0,5h		5h	
		Δ (%)	p-Wert	Δ (%)	p-Wert
BSA/DMSO	+17,1 μ M	-5,4	0,196	-5,7	0,150
	+30 μ M	-15,2	0,004	-11,0	0,004
	+55 μ M	-24,0	0,000	-13,6	0,000
0,5mM FFS	+17,1 μ M	-10,3	0,040	-10,3	0,003
	+30 μ M	-9,9	0,088	-12,5	0,001
	+55 μ M	-19,9	0,001	-15,3	0,000
1mM FFS	+17,1 μ M	-19,5	0,000	-7,8	0,010
	+30 μ M	-25,8	0,000	-4,1	0,147
	+55 μ M	-30,6	0,000	-12,6	0,001

Tabelle 7: Ergebnisse des NR-Assays ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz/mg Protein der Treatments mit 17,1 μ M UKB, 30 μ M UKB und 55 μ M UKB im Vergleich zu den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO, 0,5mM FFS und 1mM FFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h und 5h. Angabe von Δ in Prozent und auf Basis der MW. Zusätzlich Angabe des p-Wertes.

5. Diskussion

5.1 Einfluss der Behandlungen auf die Zellviabilität

Die Mittelwerte der Zellviabilitäten der HepG2-Zellen lag bei allen Treatments über der zuvor festgelegten Zytotoxizitäts-Grenze von 80%. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass sie nicht toxisch waren und für die Durchführung der nachfolgenden NR-Assays verwendet werden konnten. Bei den MTT-Assays ohne Glucose waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Treatments schwächer ausgeprägt, als es bei denjenigen mit Glucose der Fall war. Die Zellviabilitäts-Werte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle BSA/DMSO reichten von 91,6% bis 107,5% bzw. 79,3% bis 152,2%. Die geringe metabolische Aktivität bei der Positivkontrolle bestätigte, dass die Methode funktioniert hatte und das Vorhandensein von falsch-negativen Ergebnissen ausgeschlossen werden konnte. Sie betrug bei den MTT-Assays ohne Glucose 35,9%, während sie bei denjenigen mit Glucose sogar auf 3,6% absank. Die deutlich stärkeren Effekten wurde durch die höhere Expositionszeit von 24h im Vergleich zu 5h begründet. Zusätzlich konnte bei den Behandlungen mit Glucose eine höhere metabolische Aktivität mit zunehmenden FFS-Konzentrationen beobachtet werden, was auf einen positiven Einfluss der FFS in Verbindung mit Glucose und UKB hinwies. Dass FFS-Konzentrationen von 0,5mM bzw. 1mM keine negativen Auswirkungen haben, konnten auch Yao et al. 2011 im Rahmen ihrer MTT-Assays zeigen. Sie behandelten HepG2-Zellen mit 0,25mM, 0,5mM, 1mM, 2mM bzw. 3mM FFS und inkubierten sie für 12h, 24h bzw. 36h. Während FFS-Konzentrationen von 0,25mM bis 1mM nach keiner der Inkubationszeiten zytotoxisch waren, war die Zellviabilität bei 2mM und 3mM unabhängig von der Expositionsdauer um 20-30% bzw. 30-40% reduziert. Außerdem ließen die morphologische Begutachtung den Schluss zu, dass FFS-Konzentrationen von bis zu 1mM keine nekrotischen bzw. apoptotischen Veränderungen bei HepG2-Zellen zur Folge haben. Ab Konzentrationen von 2mM hingegen traten leichten Anzeichen von Nekrose und Apoptose auf, die dann bei 3mM stärker ausgeprägt waren (Yao et al., 2011). Was die UKB-Toxizität betrifft, konnten Seppen et al. an Wistar-Ratten-Hepatozyten zeigen, dass UKB-Konzentrationen von bis zu 80µM nach einer 24-stündigen Exposition nicht toxisch wirken (Seppen et al., 1996). Bei Gong et al.

waren bei 5 μ M und 10 μ M UKB keine signifikanten Reduktionen der Zellviabilität von HepG2-Zellen festzustellen (Gong et al., 2004).

5.2 Einfluss der Behandlungen auf den Fettgehalt

Tabelle 8 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der NR-Assays mit und ohne Glucose. Es wurde der Fettgehalt bei den Treatments 0,5mM FFS und 1mM FFS mit demjenigen der Negativkontrolle BSA/DMSO verglichen. Bei den NR-Assays mit Glucose zeigte sich, dass eine Inkubation von 0,5h bei keiner der beiden FFS-Konzentrationen einen Anstieg der Fluoreszenz/mg Protein zur Folge hatte. Eine solche Expositionsdauer schien für die HepG2-Zellen zu kurz gewesen zu sein, um intrazellulär Fett einlagern zu können. Sowohl 5h Inkubation als auch 24h Inkubation reichten hierfür allerdings aus. So kam es bei beiden Inkubationszeiten zu einem hochsignifikanten Anstieg der Fluoreszenz/mg Protein, wobei dieser positiv mit der Expositionsdauer und der FFS-Konzentration korrelierte. Er betrug nach 5h bzw. 24h bei 0,5mM FFS +18,6% bzw. +30,2% und bei 1mM FFS +26,3% bzw. +55,6%. Yao et al. konnten in ihren in vitro-Versuchen mit HepG2-Zellen ebenfalls eine Dosisabhängigkeit bei der intrazellulären Fetteinlagerung beobachten. Hier kam es neben einer Erhöhung der FFS-Konzentration zu einer Größenzunahme der Fetttröpfchen. Sie hatten die Zellen für 24h mit 1mM, 2mM und 3mM FFS inkubiert. Sowohl die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den behandelten Gruppen als auch diejenigen zwischen den behandelten Gruppen waren statistisch signifikant (Yao et al., 2011). Auch bei dem NR-Assay ohne Glucose führte eine Inkubation von 0,5h weder bei einer 0,5mM FFS noch 1mM FFS zu einem Anstieg der Fluoreszenz/mg Protein. Nach der längeren Expositionszeit von 5h nahm die Fluoreszenz/mg Protein zwar sowohl bei 0,5mM FFS als auch 1mM FFS um +4,3% bzw. +0,9% zu, die Werte erreichten allerdings nicht das Signifikanzniveau. Der fehlende Fluoreszenz-Anstieg könnte einen Hinweis darauf geben, dass HepG2-Zellen die FFS nicht einlagern, sondern direkt zur Energiebereitstellung heranziehen, wenn keine Glucose zur Verfügung steht. Sind hingegen sowohl FFS als auch Glucose verfügbar, könnte es zu Fettakkumulationen kommen, sobald der zelluläre Energiebedarf übertroffen wird.

Treatments ohne FFS vs. mit FFS		Mit Glucose			Ohne Glucose	
		0,5h	5h	24h	0,5h	5h
BSA/DMSO	0,5mM FFS	-	↑↑	↑	↓ ^T	-
	1mM FFS	-	↑↑	↑↑	-	-

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der NR-Assays mit und ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz bei dem Vergleich der Treatments 0,5mMFFS und 1mMFFS nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h (mit Glucose) bzw. 0,5h und 5h (ohne Glucose) (↑^T/↓^T = Trend-Anstieg/Abfall, ↑/↓ = signifikanter Anstieg/Abfall, ↑↑/↓↓ = hochsignifikanter Anstieg/Abfall)

Des Weiteren wurden die UKB-haltigen Treatments mit den jeweiligen UKB-freien Kontrollen BSA/DMSO, 0,5mM FFS bzw. 1mM FFS verglichen (siehe Tabelle 9). Bei den Experimenten mit Glucose gab es insgesamt kaum signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen. Außerdem waren die Ergebnisse sehr uneinheitlich. So kam es sowohl zu Reduktionen als auch zu Anstiegen der Fluoreszenz/mg Protein und damit des Fettgehaltes, weshalb die Hypothese hier nicht bestätigt werden konnte. Bei den Experimenten ohne Glucose lag hingegen eine eindeutige Tendenz vor. So nahm die Fluoreszenz/mg Protein bei beiden Inkubationszeiten sowie allen neun UKB-haltigen Treatments ab. Die Abnahmen waren bis auf wenige Ausnahmen hochsignifikant. Sie betrugen nach einer Inkubationszeit von 0,5h bzw. 5h durchschnittlich -17,9% bzw. -10,3%, wobei Werte von -5,4% bis -30,6% bzw. -4,1% bis -15,3% erreicht wurden. Die Expositionsdauer schien keinen Einfluss zu haben. Allerdings gab es Hinweise auf eine Dosisabhängigkeit, da die Fluoreszenz/mg Protein in den meisten Fällen mit steigender UKB-Konzentration abnahm. Dies bestätigt die bereits erwähnten Ergebnisse von Stec et al., in deren Adipositas-Zellmodell UKB-Konzentrationen von 10µM bzw. 55µM die Fettakkumulation reduziert hatten. Hier wurden sogar noch weitaus höhere Werte von 49% bzw. 91% erreicht (Stec et al., 2016).

Treatments ohne UKB vs. mit UKB		Mit Glucose			Ohne Glucose	
		0,5h	5h	24h	0,5h	5h
BSA/DMSO	17,1µM UKB	-	-	-	-	-
	30µM UKB	↓	↑	-	↓↓	↓↓
	55µM UKB	-	-	-	↓↓	↓↓
0,5mM FFS	0,5mM FFS +17,1µM UKB	-	-	-	↓	↓↓
	0,5mM FFS + 30µM UKB	↓↓	-	-	-	↓↓
	0,5mM FFS +55µM UKB	↓	↑ ^T	-	↓↓	↓↓
1mM FFS	1mM FFS + 17,1µM UKB	-	-	-	↓↓	↓↓
	1mM FFS + 30µM UKB	-	-	-	↓↓	-
	1mM FFS +55µM UKB	-	↓ ^T	↑↑	↓↓	↓↓

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der NR-Assays mit und ohne Glucose. Veränderungen der Fluoreszenz bei dem Vergleich der Treatments BSA/DMSO, 0,5mMFFS und 1mMFFS mit und ohne 17,1µM, 30µM und 55µM UKB nach einer Inkubationszeit von 0,5h, 5h und 24h (mit Glucose) bzw. 0,5h und 5h (ohne Glucose) (↑^T/↓^T = Trend-Anstieg/Abfall, ↑/↓ = signifikanter Anstieg/Abfall, ↑↑/↓↓ = hochsignifikanter Anstieg/Abfall)

5.3 Limitationen und Probleme

Die Experimente wurden an der immortalisierten Zelllinie HepG2 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein alternatives in-vitro-Modell für Leberzellen, das sich in den letzten Jahrzehnten besonders etabliert hat. Die HepG2-Zellen wurden deshalb gewählt, weil sie einige Vorteile gegenüber den primären Hepatozyten aufweisen. So können sie über eine lange Zeitspanne kultiviert werden, sind theoretisch unsterblich, einfach zu handhaben und unbegrenzt verfügbar. Durch ihren stabilen Phänotyp sowie die fehlende interindividueller Variabilität kann außerdem eine hohe Reproduzierbarkeit der experimentellen Ergebnisse gewährleistet werden (Luckert et al., 2017). Nachteilig ist, dass HepG2-Zellen die in-vivo-Situation schlechter widerspiegeln als primäre Hepatozyten. Sie weisen eine vergleichsweise geringere metabolische Kapazität auf, was beispielsweise durch einen niedrigeren Gehalt an Cytochromen bedingt wird (Gerets et al., 2012). Während Phase-II-Enzyme in ähnlichem Ausmaß exprimiert werden, ist dies bei Phase-I-Enzymen nicht der Fall. Die verminderte Aktivität entsprechender Enzyme äußert sich beispielsweise in einer reduzierten genotoxischen Sensitivität bei der Behandlung mit Promutagenen. Die Übertragbarkeit auf den menschlichen Leber-Stoffwechsel kann somit eingeschränkt sein, was bei der Interpretation der Ergebnisse mitberücksichtigt werden sollte (Wilkening et al., 2003).

Während der Experimente mussten einige Treatments nochmals wiederholt werden, da ein unerwartetes Problem aufgetreten ist. So wurden zu Beginn die unterschiedlichen Inkubationszeiten zum Teil auf einer Platte analysiert. Es konnte beobachtet werden, dass sich an den sich angrenzenden Wells zweier Inkubationszeiten Zellen ablösten, wobei immer diejenigen Wells der jeweils längeren Inkubationszeit betroffen waren. Da die Ablösungen direkt nach der Fixierung auftraten, wurde daraus gefolgert, dass das FA der zuvor fixierten Wells im Inkubator teilweise verdampft war und die umliegenden Wells erreicht hatte. Da die Zellen dort noch nicht fixiert worden waren, reagierten sie empfindlich auf die toxischen Dämpfe, woraufhin sie begannen sich von den Wells abzulösen. Beim nachfolgenden Schritt wurden sie dann mit dem PBS abgesaugt. Das Problem wurde fortan damit umgangen, dass die verschiedenen Inkubationszeiten auf separaten Wellplates untersucht wurden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Nachdem die Experimente bereits an Muskelzellen durchgeführt worden waren, konnten die Effekte von UKB auf die intrazelluläre FFS-Konzentration nun auch an Leberkarzinomzellen gezeigt werden. Interessant wäre es, zusätzlich primäre Hepatozyten heranzuziehen, die die in vivo-Situation noch besser widerspiegeln würden. Außerdem könnten Versuche mit anderen Zelllinien folgen, die bei dieser Thematik von Relevanz erscheinen, wie etwa Adipozyten des braunen oder weißen Fettgewebes.

Die vorliegenden Ergebnisse konnten zwar darlegen, dass UKB in Abwesenheit von Glucose fetttsenkend zu wirken scheint, die genauen molekularen Mechanismen dahinter sind allerdings noch unklar. So lässt sich keine Aussage treffen, ob das UKB hemmende Effekte auf die Fettaufnahme in die Zelle hat oder aber den intrazellulären Fettstoffwechsel erhöht. Hier könnten genetische oder metabolische Assays Antworten liefern, im Rahmen derer untersucht wird, ob relevante Gene bzw. Proteine durch die Zugabe von UKB verändert exprimiert werden. Wären hiervon beispielsweise Fetttransporter betroffen, würde das einen Hinweis darauf geben, dass die Fettaufnahme beeinflusst ist. Andererseits spräche eine veränderte Expression von Enzymen der β -Oxidation dafür, dass der Fettstoffwechsel eine kausale Rolle einnimmt.

Des Weiteren könnten in vivo-Versuche bei Tier oder Mensch folgen, die zum Teil bereits durchgeführt wurden. So wurden beispielsweise Gewebeproben im Rahmen einer Leberbiopsie entnommen und auf eine vermeintliche Assoziation zwischen dem Fettgehalt und dem Bilirubinspiegel untersucht. Aus den Ergebnissen konnte gefolgert werden, ob Bilirubin auch in vivo Auswirkungen auf den Fettgehalt der Hepatozyten hat. Weiterführend wäre es, den Bilirubinspiegel künstlich innerhalb einer Interventionsstudie zu erhöhen und zu beobachten, ob und inwiefern sich die Veränderungen auf die Gesundheitsparameter des Einzelnen auswirkt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss UKB auf den Fettstoffwechsel von HepG2-Zellen hat. Hierfür wurden die Zellen mit zwei FFS-Konzentrationen (0,5mM, 1mM) sowie drei UKB-Konzentrationen (17,1µM, 30µM, 55µM) behandelt. Außerdem wurden alle Behandlungen sowohl mit Glucose (0,45g/100ml) als auch ohne Glucose durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Expositionszeiten gewählt, die entweder 0,5h, 5h und 24h (mit Glucose) oder 0,5h und 5h (ohne Glucose) betrugen. Zunächst erfolgte ein MTT-Assay, durch den gezeigt werden konnte, dass die Treatments nicht zytotoxisch waren und keine wesentlichen Einschränkungen der metabolischen Aktivität der Zellen zur Folge hatten. Der anschließende NR-Assay konnte Aufschluss darüber geben, dass der intrazelluläre Fettgehalt durch UKB reduziert werden kann, wobei dies nur auf die Behandlungen ohne Glucose zutraf. Die fettsenkenden Effekte nahmen hierbei mit steigender UKB-Konzentration zu, wobei kein Zusammenhang mit der Inkubationszeit bestand. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass UKB einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel von HepG2-Zellen haben kann und in der Lage ist, den intrazellulären Fettgehalt zu senken. Sie unterstützen somit die Annahme, dass eine leichte Hyperbilirubinämie protektiv wirken, insbesondere wenn es um Erkrankungen des hepatischen Fettstoffwechsels geht. Zukünftige Studien sollten folgen, um den genauen molekularen Mechanismus dahinter zu klären, die Effekte auch in vivo zu untersuchen und der Frage nachzugehen, ob es sinnvoll wäre, den Fokus auf eine Erhöhung des Bilirubinspiegels beim Menschen zu legen.

7. Summary

The aim of this study was to investigate the influence of UKB on the lipid metabolism of HepG2 cells. The cells were treated with two FFS concentrations (0.5mM, 1mM) and three UKB concentrations (17.1µM, 30µM, 55µM). In addition, all treatments were performed with glucose (0.45g/100ml) and without glucose. Different exposure times were chosen, either 0.5h, 5h and 24h (with glucose) or 0.5h and 5h (without glucose). First, the MTT assay showed that the treatments were not cytotoxic and did not result in significant reductions of the metabolic activity of the cells. The subsequent NR assay was able to show that the intracellular fat content could be reduced by UKB, although this only applied to the treatments without glucose. The fat-lowering effects rose with increasing UKB concentration and were not related to the incubation time. The results confirm the hypothesis that UKB may have an influence on the fat metabolism of HepG2 cells and is able to reduce the intracellular fat content. Thus, they support the assumption that mild hyperbilirubinemia has a protective effect, especially in diseases which affect hepatic fat metabolism. Future studies should follow in order to clarify the exact molecular mechanism, to investigate the effects also in vivo and to examine the question whether it would be useful to focus on an increase of bilirubin levels in humans.

IV Literaturverzeichnis

Alemán-Nava, Gibrán S.; Cuellar-Bermudez, Sara P.; Cuaresma, María; Bosma, Rouke; Muylaert, Koenraad; Ritmann, Bruce E.; Parra, Roberto (2016): How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. In: *Journal of Microbiological Methods* 128, S. 74–79.

Apperley, Scott; Park, Hye Yun; Holmes, Daniel T.; Man, S. F. Paul; Tashkin, Donald; Wise, Robert A.; Connett, John El.; Sin, Don D. (2015): Serum Bilirubin and Disease Progression in Mild COPD. In: *Chest* 148, S. 169–175.

Bradford, Marion M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In: *Analytical Biochemistry* 72, S. 248–254.

Bosma, Piter J.; Chowdhury, Jayanta Roy; Bakker, Conny; Gantla, Shailaja; de Boer, Anita; Oostra, Ben A.; Lindhout, Dick; Tytgat, Guido N.J.; Jansen, Peter L.M.; Oude Elferink, Ronald P.J.; Roy Chowdhury, Namita (1995): The Genetic Basis of the Reduced Expression of Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome. In: *The New England Journal of Medicine* 333, S. 1171–1175.

Bulmer, A. C.; Verkade, H. J.; Wagner, K-H (2013): Bilirubin and beyond: a review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. In: *Progress in Lipid Research* 52, S. 193–205.

Canu, Giulia; Minucci, Angelo; Zuppi, Cecilia; Capoluongo, Ettore (2013): Gilbert and Crigler Najjar syndromes: an update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. In: *Blood Cells, Molecules & Diseases* 50, S. 273–280.

Da Violante, Georges; Zerrouk, Naima; Richard, Isabelle; Provot, Gérard (2002): Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, S. 1600–1603.

De Almeida, I. Tavares; Cortez-Pinto; H.; Fidalgo, G.; Rodrigues, D.; Camilo, M. E. (2002): Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. In: *Clinical Nutrition* 21, S. 219–223.

DiNicolantonio, James J.; McCarty, Mark F.; O'Keefe, James H. (2018): Antioxidant bilirubin works in multiple ways to reduce risk for obesity and its health complications. In: *Open Heart* 5.

Fujiwara, Ryoichi; Haag, Mathias; Schaeffeler, Elke; Nies, Anne T.; Zanger, Ulrich M.; Schwab, Matthias (2018): Systemic regulation of bilirubin homeostasis: Potential benefits of hyperbilirubinemia. In: *Hepatology* 67, S. 1609–1619.

Gerets, H. H. J.; Tilmant, K.; Gerin, B.; Chanteux, H.; Depelchin, B. O.; Dhalluin, S.; A-tienzar, F. A. (2012): Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. In: *Cell Biology and Toxicology* 28, S. 69–87.

Gong, Pengfei; Cederbaum, Arthur I.; Nieto, Natalia (2004): Heme oxygenase-1 protects HepG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity. In: *Free Radical Biology & Medicine* 36, S. 307–318.

Gupta, Nancy; Singh, Tavankit; Chaudhary, Rahul; Garg, Sushil K.; Sandhu, Gurprataap Singh; Mittal, Varun et al. (2016): Bilirubin in coronary artery disease: Cytotoxic or protective? In: *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics* 7, S. 469–476.

Han, Seung Seok; Na, Ki Young; Chae, Dong-Wan; Kim, Yon Su; Kim, Suhnggwon; Chin, Ho Jun (2010): High Serum Bilirubin Is Associated with the Reduced Risk of Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy. In: *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221, S. 133–140.

Hinds, Terry D.; Hosick, Peter A.; Chen, Shujuan; Tukey, Robert H.; Hankins, Michael W.; Nestor-Kalinoski, Andrea; Stec, David E. (2017): Mice with hyperbilirubinemia due to Gilbert's syndrome polymorphism are resistant to hepatic steatosis by decreased serine 73 phosphorylation of PPAR α . In: *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 312, S. 244-252.

Hirschfield G. M.; Alexander G. J. (2006): Gilbert's syndrome: an overview for clinical biochemists. In: *The Association for Clinical Biochemistry* 43, S. 340–343.

Hobro, Alison J.; Smith, Nicholas I. (2017): An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. In: *Vibrational Spectroscopy* 91, S. 31–45.

Hodson, Leanne; Skeaff, C. Murray; Fielding, Barbara A. (2008): Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. In: *Progress in Lipid Research* 47, S. 348–380.

Horsfall, Laura J.; Nazareth, Irwin; Pereira, Stephen P.; Petersen, Irene (2013): Gilbert's syndrome and the risk of death: a population-based cohort study. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28, S. 1643–1647.

Horsfall, Laura J.; Rait, Greta; Walters, Kate; Swallow, Dallas M.; Pereira, Stephen P.; Nazareth, Irwin; Petersen, Irene (2011): Serum Bilirubin and Risk of Respiratory Disease and Death. In: *American Medical Association* 305, S. 691–697.

Kwak, Min-Sun; Kim, Donghee; Chung, Goh Eun; Kang, Seung Joo; Park, Min Jung; Kim, Yoon Jun; Yoon, Jung-Hwan; Lee, Hyo-Suk (2012): Serum bilirubin levels are inversely associated with nonalcoholic fatty liver disease. In: *Clinical and Molecular Hepatology* 18, S. 383–390.

Kwon, Y-J; Lee, Y-J; Park, B-J; Hong, K-W; Jung, D-H (2018): Total serum bilirubin and 8-year incident type 2 diabetes mellitus: The Korean Genome and Epidemiology Study. In: *Diabetes & Metabolism* 44, S. 346–353.

Lapenna, Domenico; Ciofani, Giuliano; Pierdomenico, Sante Donato; Giamberardino, Maria Adele; Uchino, Sante; Davi, Giovanni (2018): Association of serum bilirubin with oxidant damage of human atherosclerotic plaques and the severity of atherosclerosis. In: *Clinical and experimental medicine* 18, S. 119–124.

Luckert, Claudia; Schulz, Christina; Lehmann, Nadja; Thomas, Maria; Hofmann, Ute; Hammad, Seddik et al. (2017): Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. In: *Archives of toxicology* 91, S. 393–406.

Marconi, Vincent C.; Duncan, Meredith S.; So-Armah, Kaku; Lo Re, Vincent; Lim, Joseph K.; Butt, Adeel A.; Goetz, Matthew Bidwell; Rodriguez-Barradas, Maria C.; Alcorn, Charles W.; Lennox, Jeffrey; Beckman, Joshua A.; Justice, Amy; Freiberg, Matthew (2018): Bilirubin Is Inversely Associated With Cardiovascular Disease Among HIV-Positive and HIV-Negative Individuals in VACS (Veterans Aging Cohort Study). In: *Journal of the American Heart Association* 7.

Matsui, Katsuyuki; Maruo, Yoshihiro; Sato, Hiroshi; Takeuchi, Yoshihiro (2010): Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of UGT1A1 as a cause of Gilbert syndrome. In: *BMC Gastroenterology* 10.

Memon, Naureen; Weinberger, Barry I.; Hegyi, Thomas; Aleksunes, Lauren M. (2016): Inherited disorders of bilirubin clearance. In: *Pediatric Research* 79, S. 378–386.

Mölzer, Christine; Wallner, Marlies; Kern, Carina; Tosevska, Anela; Schwarz, Ursula; Zadnikar, Rene; Doberer, Daniel; Marculescu, Rodrig; Wagner, Karl-Heinz (2016): Features of an altered AMPK metabolic pathway in Gilbert's Syndrome, and its role in metabolic health. In: Scientific reports 6.

Ohnaka, Keizo; Kono, Suminori (2010): Bilirubin, cardiovascular diseases and cancer: epidemiological perspectives. In: Expert Review of Endocrinology & Metabolism 5, S. 891–904.

Papageorgiou, Ioannis; Court, Michael H. (2017): Identification and validation of microRNAs directly regulating the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily enzymes by a functional genomics approach. In: Biochemical Pharmacology 137, S. 93–106.

Puri, Kanika; Nobili, Valerio; Melville, Katherine; Corte, Claudia D.; Sartorelli, Maria R.; Lopez, Rocio et al. (2013): Serum bilirubin level is inversely associated with nonalcoholic steatohepatitis in children. In: Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 57, S. 114–118.

Salomone, Federico; Li Volti, Giovanni; Rosso, Chiara; Grosso, Giuseppe; Bugianesi, Elisabetta (2013): Unconjugated bilirubin, a potent endogenous antioxidant, is decreased in patients with non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis. In: Journal of Gastroenterology and Hepatology 28, S. 1202–1208.

Senthilraja, P.; Kathiresan, K. (2015): In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero, HepG2 and MCF -7 cell lines study of Marine Yeast. In: Journal of Applied Pharmaceutical Science, S. 80–84.

Seppen, Jurgen; Tada, Kouji; Hellwig, Sandra; Bakker, Conny T. M.; Pradas, Vinayaka R.; Roy Chowdhury, Namita (1996): Bilirubin glucuronidation by intact Gunn rat fibroblasts expressing bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. In: Biochemical Journal 314, S. 477–483.

Stec, David E.; John, Kezia; Trabbic, Christopher J.; Luniwal, Amarjit; Hankins, Michael W.; Baum, Justin; Hinds, Terry D. (2016): Bilirubin Binding to PPAR α Inhibits Lipid Accumulation. In: PLOS ONE 11.

Stockert, Juan C.; Blázquez-Castro, Alfonso; Cañete, Magdalena; Horobin, Richard W.; Villanueva, Angeles (2012): MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. In: Acta Histochemica 114, S. 785–796.

Seyed Khoei, Nazlisadat; Grindel, Annemarie; Wallner, Marlies; Mölzer, Christine; Dobe-
rer, Daniel; Marculescu, Rodrig; Bulmer, Andrew; Wagner, Karl-Heinz (2018): Mild hy-
perbilirubinaemia as an endogenous mitigator of overweight and obesity: Implications
for improved metabolic health. In: *Atherosclerosis* 269, S. 306–311.

Tian, Jianbo; Zhong, Rong; Liu, Cheng; Tang, Yuhang; Gong, Jing; Chang, Jiang; Lou, Jiao;
Ke, Juntao; Li, Jiaoyuan; Zhang, Yi; Yang, Yang; Zhu, Ying; Gong, Yajie; Xu, Yanyan; Liu,
Peiyi; Yu, Xiao; Xiao, Lin; Du, Min; Yang, Ling; Yuan, Jing; Wang, Youjie; Chen, Weihong;
Wei, Sheng; Liang, Yuan; Zhang, Xiaomin; He, Meian; Wu, Tangchun; Yao, Ping; Miao,
Xiaoping (2016): Association between bilirubin and risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Dise-
ase based on a prospective cohort study. In: *Scientific Report* 6.

Vítek, Libor (2012): The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovas-
cular diseases. In: *Frontiers in Pharmacology* 3.

Vítek, Libor; Ostrow, Donald J. (2009): Bilirubin Chemistry and Metabolism; Harmful and
Protective Aspects. In: *Current Pharmaceutical Design* 15, S. 2869–2883.

Wagner, Karl-Heinz; Shiels, Ryan G.; Lang, Claudia Anna; Seyed Khoei, Nazlisadat; Bul-
mer, Andrew C. (2018): Diagnostic criteria and contributors to Gilbert's syndrome. In:
Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 55, S. 129–139.

Wilkening, Stefan; Stahl, Frank; Bader, Augustinus (2003): Comparison of primary hu-
man hepatocytes and hepatoma cell line hepg2 with regard to their biotransformation
properties. In: *Drug Metabolism and Disposition* 31, S. 1035–1042.

Yao, Hong-Rui; Liu, Jun; Plumeri, Daniel; Cao, Yong-Bing; He, Ting; Lin, Ling; Li, Yu; Jiang,
Yuan-Ying; Li, Ji; Shang, Jing (2011): Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty
acids. In: *American Journal of Translational Research* 3, S. 284–291.

Zucker, Stephen D.; Goessling, Wolfram (2000): Mechanism of hepatocellular uptake of
albumin-bound bilirubin. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1463, S. 197–208.

<http://www.lgcstandards-atcc.org/en/Products/All/HB-8065.aspx> (letzter Zugriff am:
10.03.2019)

[https://viamedici.thieme.de/lernmodule/biochemie/h%C3%A4moglobin+syn-
these+und+abbau](https://viamedici.thieme.de/lernmodule/biochemie/h%C3%A4moglobin+synthese+und+abbau) (Zugriff am: 10.03.2019)

V Anhang

Zellviabilität (MTT-Assay) im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO	Mit Glucose (24h)		Ohne Glucose (5h)	
	MW	SD	MW	SD
BSA/DMSO	1,000	0,000	1,000	0,000
17,1µM UKB	1,078	0,095	1,075	0,051
30µM UKB	1,070	0,051	1,039	0,062
55µM UKB	0,929	0,100	1,000	0,045
0,5mM FFS	1,118	0,159	0,965	0,066
0,5mM FFS + 17,1µM UKB	1,210	0,031	0,948	0,018
0,5mM FFS + 30µM UKB	1,114	0,099	0,953	0,034
0,5mM FFS + 55µM UKB	1,171	0,002	0,952	0,041
1mM FFS	1,203	0,134	0,916	0,038
1mM FFS + 17,1µM UKB	1,522	0,028	0,949	0,043
1mM FFS + 30µM UKB	1,088	0,051	0,954	0,062
1mM FFS + 55µM UKB	0,793	0,023	0,946	0,091
20% DMSO	0,036	0,014	0,359	0,045

Protein in mg (Bradford-Assay)	Mit Glucose						Ohne Glucose					
	0,5h		5h		24h		0,5h		5h		5h	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
BSA/DMSO	0,397	0,084	0,356	0,147	0,538	0,109	0,455	0,059	0,444	0,040	0,444	0,040
17,1µM UKB	0,417	0,123	0,370	0,166	0,540	0,122	0,450	0,026	0,460	0,094	0,460	0,094
30µM UKB	0,444	0,113	0,349	0,104	0,579	0,049	0,458	0,031	0,467	0,117	0,467	0,117
55µM UKB	0,393	0,070	0,359	0,164	0,569	0,087	0,467	0,039	0,455	0,095	0,455	0,095
0,5mM FFS	0,409	0,113	0,352	0,142	0,599	0,139	0,466	0,076	0,451	0,108	0,451	0,108
0,5mM FFS + 17,1µM UKB	0,425	0,097	0,365	0,125	0,574	0,041	0,470	0,085	0,450	0,104	0,450	0,104
0,5mM FFS + 30µM UKB	0,435	0,058	0,361	0,137	0,611	0,085	0,433	0,027	0,463	0,096	0,463	0,096
0,5mM FFS + 55µM UKB	0,414	0,056	0,360	0,133	0,577	0,074	0,465	0,053	0,464	0,051	0,464	0,051
1mM FFS	0,420	0,118	0,361	0,137	0,549	0,053	0,451	0,033	0,469	0,081	0,469	0,081
1mM FFS + 17,1µM UKB	0,416	0,064	0,393	0,157	0,593	0,098	0,490	0,108	0,472	0,151	0,472	0,151
1mM FFS + 30µM UKB	0,384	0,097	0,379	0,143	0,584	0,104	0,498	0,066	0,459	0,107	0,459	0,107
1mM FFS + 55µM UKB	0,421	0,084	0,396	0,156	0,553	0,107	0,519	0,071	0,486	0,104	0,486	0,104

Fluoreszenz/mg Protein (NR-Assay) im Vergleich zur Negativkontrolle BSA/DMSO	Mit Glucose						Ohne Glucose					
	0,5h		5h		24h		0,5h		5h			
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD		
BSA/DMSO	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
17,1µM UKB	1,001	0,056	1,014	0,050	1,018	0,045	0,946	0,092	0,944	0,059		
30µM UKB	0,939	0,103	1,116	0,075	0,891	0,052	0,848	0,145	0,890	0,076		
55µM UKB	0,986	0,052	1,052	0,052	0,909	0,032	0,760	0,177	0,864	0,044		
0,5mM FFS	1,013	0,053	1,186	0,118	1,302	0,080	0,948	0,088	1,043	0,028		
0,5mM FFS + 17,1µM UKB	1,020	0,025	1,225	0,021	1,302	0,181	0,845	0,141	0,941	0,060		
0,5mM FFS + 30µM UKB	0,898	0,007	1,172	0,142	1,371	0,123	0,849	0,140	0,918	0,118		
0,5mM FFS + 55µM UKB	0,941	0,070	1,278	0,059	1,266	0,171	0,749	0,156	0,890	0,095		
1mM FFS	0,966	0,024	1,263	0,055	1,556	0,132	0,981	0,082	1,009	0,018		
1mM FFS + 17,1µM UKB	0,981	0,056	1,243	0,128	1,628	0,192	0,786	0,130	0,930	0,040		
1mM FFS + 30µM UKB	1,012	0,058	1,265	0,133	1,456	0,201	0,723	0,154	0,967	0,080		
1mM FFS + 55µM UKB	1,008	0,035	1,165	0,075	1,700	0,078	0,676	0,157	0,883	0,102		