



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

Fakultät Life Sciences

# **Analyse der inhibierenden und stimulierenden Effekte von Ingwer auf das Wachstum von Säugetierzellen**

## **Bachelorarbeit**

im Studiengang Biotechnologie

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Oliver Ullrich  
Prof. Dr. rer. nat. F. Birger Anspach

vorgelegt von: Katharina Rützel

Abgabetermin: 03.07.2012

Diese Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für Molekularbiologie und Zellkulturtechnik an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

---

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, die mich während des Bachelorstudiums und während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich für die Möglichkeit der Erstellung dieser Bachelorarbeit, sowie für die freundliche und hilfreiche Betreuung und Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Anspach möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit und auch für die Hilfe und Betreuung bei der Durchführung der Größenausschlusschromatographie danken.

Außerdem geht ein herzliches Dankeschön an Frau Elisabeth Schäfer für ihre große Hilfsbereitschaft bei allen technischen und allgemeinen Fragen im Laboralltag.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Eltern, die mir das Studium ermöglichen und mich immer herzlich und bedingungslos mit allen Kräften unterstützen.

Auch meinen Brüdern Thomas und Christian möchte ich danken, die mir immer eine große Stütze sind und auf deren Hilfe ich mich in allen Belangen verlassen kann.

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	4
1.1 Zellkulturen.....	4
1.2 Zellzyklus.....	6
1.2.1 Die Zellzyklusphasen und deren Regulation .....	6
1.2.2 Zellzyklusinhibitoren .....	11
1.3 Krebs.....	12
1.3.1 Die Entstehung von Krebs.....	12
1.3.2 Krebstherapie .....	14
1.4 In Produktion und Forschung verwendete Zelllinien .....	15
1.4.1 CHO-Zelllinie .....	15
1.4.2 HeLa-Zelllinie.....	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	16
2. Methoden.....	18
2.1 Kultivierung von CHO- und HeLa-Zellen .....	18
2.2 Auftauen von Zellen.....	18
2.3 Passagieren .....	19
2.4 Herstellung der Extrakte .....	20
2.5 Aussaat und Inkubation mit Extrakten .....	21
2.6 Zellzählung.....	21
2.7 Größenausschlusschromatographie .....	22
2.8 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse.....	25
3. Ergebnisse .....	28
3.1 Proliferationsanalysen .....	28
3.1.1 Einfluss des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa- und CHO-Zellen .....	28
3.1.2 Einfluss des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von HeLa- und CHO-Zellen.....	31
3.2 Größenausschlusschromatographie .....	33
3.2.1 Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer.....	33
3.2.2 Größenausschlusschromatographie des Extraktes von frischem Ingwer.....	37
3.2.3 Einfluss vereinigter Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer .....	40
3.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse.....	42

---

3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse des Mikrotubuligerüsts in CHO- und HeLa-Zellen nach Inkubation mit Extrakten des frischen Ingwers.....	42
3.3.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse des Aktingerüsts in CHO- und HeLa-Zellen in Gegenwart von Extrakten des frischen Ingwers .....	51
4. Diskussion .....	55
4.1 Proliferationsanalysen .....	55
4.2 Größenausschlusschromatographie .....	57
4.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse.....	58
4.4 Ausblick .....	61
5. Zusammenfassung.....	62
6. Literaturverzeichnis.....	64
7. Anhang.....	67
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	67
7.2 Tabellenverzeichnis .....	69
7.3 Material .....	70
7.3.1 Geräte.....	70
7.3.2 Verbrauchsmaterialien .....	71
7.3.3 Chemikalien und Biochemikalien .....	71
7.3.4 Antikörper.....	72
7.3.5 Software .....	72
7.4 Abkürzungsverzeichnis .....	73

## 1. Einleitung

Durch die Entdeckung von Antibiotika und die Entwicklung geeigneter Kulturmedien können Zellen vor Kontaminationen geschützt und über lange Zeiträume kultiviert werden. Mit Hilfe von Zellkulturen können viele zelluläre Prozesse *in vitro* erforscht werden. Sie finden sowohl in vielen Bereichen der Produktion als auch in der Forschung Anwendung und werden unter anderem in der Tumorforschung eingesetzt [Boxberger, 2007].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die stimulierenden und inhibierenden Effekte von Ingwerextrakten auf das Wachstum von Säugetierzellen mit Hilfe von Zellkulturen getestet. Dazu wurden die Nicht-Tumorzelllinie CHO sowie die Tumorzelllinie HeLa verwendet und das Wachstum dieser Zellen unter Einsatz von Ingwerextrakten analysiert. Außerdem wurde der Einfluss der Extrakte auf den Zellzyklus dieser Zellen untersucht, was über die eventuelle Wirkungsweise der Ingwerextrakte Aufschluss geben soll.

In diesem Kapitel werden daher zunächst die Grundlagen der durchgeführten Experimente erläutert, bevor in den weiteren Kapiteln die Versuchsdurchführungen sowie die Ergebnisse dargestellt, beschrieben und diskutiert werden.

### 1.1 Zellkulturen

Unter Zellkulturen versteht man den Erhalt und die Vervielfältigung einer spezifischen Zellart außerhalb eines lebenden Organismus im Labor. Die Zellkulturen sind aus heutigen Laboren nicht mehr wegzudenken, da sie im Gegensatz zur Verwendung lebender Organismen viele Vorteile bieten. In lebenden Organismen befinden sich unterschiedliche Zelltypen, die sich in ihren Eigenschaften und Einflüssen stark unterscheiden können. Da die Einflüsse anderer Zelltypen und nicht konstanter Versuchsbedingungen nicht ausgeblendet werden können, kann beispielsweise die Wirkung eines Präparates auf einen speziellen Zelltyp nicht getestet werden.

Zellkulturen sind diesen Einflüssen anderer Zelltypen nicht ausgesetzt. Außerdem können bei Zellen, die in Kultur gehalten werden, Transfektionen durchgeführt

werden, welche die Erforschung von einzelnen Genen und deren Einflüssen ermöglichen.

Weiterhin stellen Zellkulturen innerhalb eines gewissen Rahmens durchaus eine Alternative zu Tierversuchen dar [Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften], da viele zelluläre Prozesse an Zellkulturen erforscht werden können. Tierversuche sind jedoch nicht vollständig zu ersetzen. Sollen gerade die komplexen Zusammenhänge in einem Organismus untersucht werden, stoßen die Zellkulturen an ihre Grenzen. Hierzu müssen weiterhin Tierversuche herangezogen werden [Lodish *et al.*, 2001]. Auch Untersuchungen zur Verstoffwechslung von Medikamenten und immunologische Fragestellungen können aufgrund der Komplexität der Reaktionen nicht in Zellkulturen simuliert werden. Jedoch werden auch für die Zellkultur benötigte Seren und Gewebeproben Tieren entnommen. In den Statistiken werden die damit verbundenen Tötungen jedoch nur unzureichend erfasst, da die Organentnahme nicht als Tierversuch gewertet wird [Schmitz, 2011].

Um Zellen erfolgreich zu kultivieren, müssen einige Rahmenparameter eingehalten werden. Insbesondere die Bereitstellung ausreichender Nährstoffe, die Einstellung geeigneter Wachstumsbedingungen, eine zur Adhäsion geeignete Oberfläche sowie die Einhaltung einer geeigneten Zelldichte müssen gewährleistet werden [Schrödel, 2007].

Zellkulturen benötigen verschiedenste Nährstoffe, die ihnen in Form eines Mediums zugeführt werden. Dieses Medium muss sowohl essentielle Aminosäuren, die von den Zellen nicht eigenständig synthetisiert werden können, enthalten als auch Antibiotika, Puffer, Vitamine, Salze, Glucose und Serum [Schmitz, 2011]. Das aufgrund seiner hohen Konzentration an wachstumsstimulierenden Faktoren am häufigsten verwendete Serum ist das fetale Kälberserum (FKS). Die Bestandteile des Serums sind zahlreich, jedoch nicht genau bekannt [Gstraunthaler, 2003]. Für die Gewinnung von FKS wird Rinderföten durch eine Herzpunktion Blut entnommen, zentrifugiert und sterilfiltriert [Lindl *et al.*, 2008]. Neben ethischen Gründen kann die Qualität hier von Charge zu Charge sehr unterschiedlich sein [Schmitz, 2011]. Außerdem können Kontaminationen durch Viren, Mikroorganismen, Pilze und Toxine

auftreten [Merten, 2002]. Daher wird derzeit nach Alternativen gesucht, die einen ebenso guten Effekt auf das Zellwachstum haben.

Die Kultivierung von Zellen findet in Inkubatoren statt, in welchen die geeigneten Wachstumsbedingungen, wie z.B. die Temperatur und der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft eingehalten werden.

Um in Zellkulturen wachsen zu können benötigen Zellen eine Oberfläche, an welche sie adhären können, um die notwendigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte gewährleisten zu können. Für ihre spezifischen Funktionen in Geweben und Organen stehen Zellen in Wechselwirkung untereinander und bilden Zellverbände aus. Die Leerräume zwischen den Zellen werden als extrazelluläre Räume bezeichnet. Hier befindet sich die extrazelluläre Matrix, welche sich aus Proteinen und Kohlenhydraten zusammensetzt, die von den Zellen sezerniert werden. Um auch Zellen in Kultur die Bildung von Verbänden zu ermöglichen, sind meist adhäsive Oberflächen erforderlich. Oftmals sind diese Oberflächen aus Glas oder Kunststoff und mit negativ geladenen Gruppen ausgestattet.

Für das Wachstum und die Ausdifferenzierung der Zellen müssen die Zell-Zell-Kontakte gewährleistet werden. Es ist wichtig, dass sich die Zelldichte immer in einem gewissen Rahmen bewegt, in welchem die Zellen zueinander Kontakt aufnehmen können, sie jedoch nicht so dicht wachsen, dass es zu einer Kontakthemmung des Zellzyklus kommt [Schmitz, 2011].

## **1.2 Zellzyklus**

### **1.2.1 Die Zellzyklusphasen und deren Regulation**

Die Vermehrung von Zellen in Zellkulturen erfolgt durch Zellteilung, der sogenannten Mitose. Zwischen den einzelnen Zellteilungen durchlaufen die Zellen einen regelmäßigen Zyklus, welcher aus vier Phasen besteht (siehe Abbildung 1.1).

Die erste Phase des Zellzyklus nach einer Zellteilung ist die G<sub>1</sub>-Phase (*gap* engl. = Lücke). In dieser Phase werden Kompartimente der Zelle ergänzt, die nach der Zellteilung neu aufgebaut werden müssen. Beispiele hierfür sind das Cytoplasma

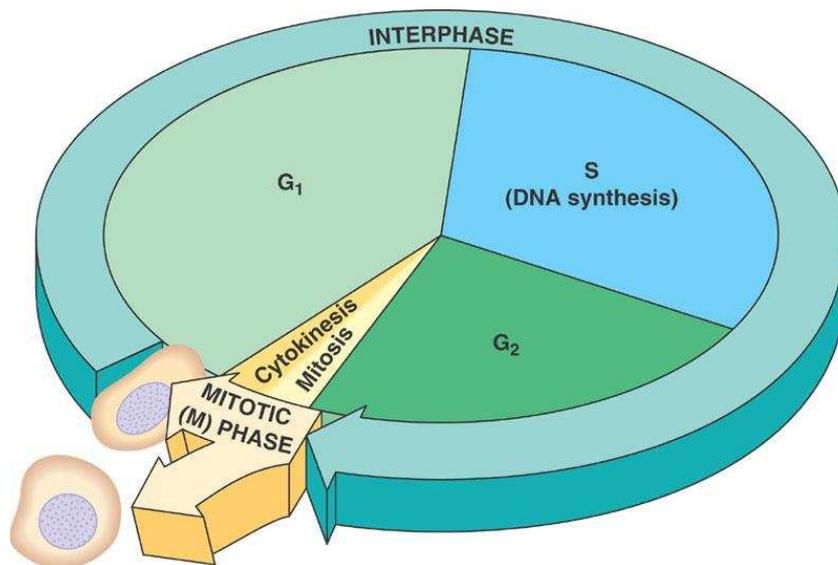
und Zellorganellen. Zusätzlich wächst die Zelle in dieser Phase bis zu ihrer maximalen Größe an.

An die  $G_1$ -Phase schließt sich die S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus an. In dieser Phase findet die DNA-Synthese statt. Die DNA der Mutterzelle muss vor der Teilung repliziert werden, sodass jede Tochterzelle nach der Teilung die vollständige Erbsubstanz erhält.

Auf die S-Phase folgt die  $G_2$ -Phase, in welcher Modifikationen von Proteinen und Enzymen, die für die darauf folgende Mitosephase (M-Phase) notwendig sind, geschehen.

Die  $G_1$ -Phase, die S-Phase und die  $G_2$ -Phase werden gemeinsam als Interphase bezeichnet. Die Zelle befindet sich bis zu 90 % ihrer Lebensdauer in dieser Interphase [Campell & Reece, 2009].

Die letzte Phase des Zellzyklus ist die M-Phase. In dieser Phase entstehen aus der Mutterzelle zwei neue Tochterzellen, welche beide das vollständige, in der S-Phase replizierte Erbgut der Mutterzelle, enthalten. Während der Mitose wird ein Spindelapparat aufgebaut, der für die Trennung der Chromatiden notwendig ist. Dieser Spindelapparat besteht aus Mikrotubuli, die von Polen, den Centrosomen, ausgehen. Der Spindelapparat gewährleistet, dass die Chromatiden in die neuen Tochterzellen geleitet und dass Fehlverteilungen vermieden werden [Wink, 2004].



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Zellzyklus**

Zwischen und während der Zellteilungen laufen verschiedene Phasen in einer bestimmten zeitlichen Folge ab. Die Zelle durchläuft 3 Phasen, die als sogenannte Interphase bezeichnet wird. Hierzu zählen die G<sub>1</sub>-Phase, die S-Phase und die G<sub>2</sub>-Phase. In der G<sub>1</sub>-Phase ergänzt die Zelle Kompartimente, die nach der letzten Teilung neu aufgebaut werden müssen. Darauf folgend wird die DNA in der S-Phase repliziert. In der G<sub>2</sub>-Phase erfolgen letzte Modifikationen von Proteinen und Enzymen. Die eigentliche Teilung der Zelle findet in der M-Phase (Mitosephase) statt. Ist sie abgeschlossen, beginnt der Zyklus erneut mit der G<sub>1</sub>-Phase [Campbell & Reece, 2009].

Die M-Phase selbst ist in fünf verschiedene Stadien unterteilt (siehe Abbildung 1.2). Das erste Stadium ist die sogenannte Prophase, in welcher sich die Chromatinfasern zu einzelnen Chromosomen verdichten und ein Spindelapparat aufgebaut wird. Dieser Spindelapparat wird zwischen zwei sogenannten Centrosomen gebildet. Die „Spindeln“, die sich von den Centrosomen ausgehend ausbreiten, bestehen aus Mikrotubuli.

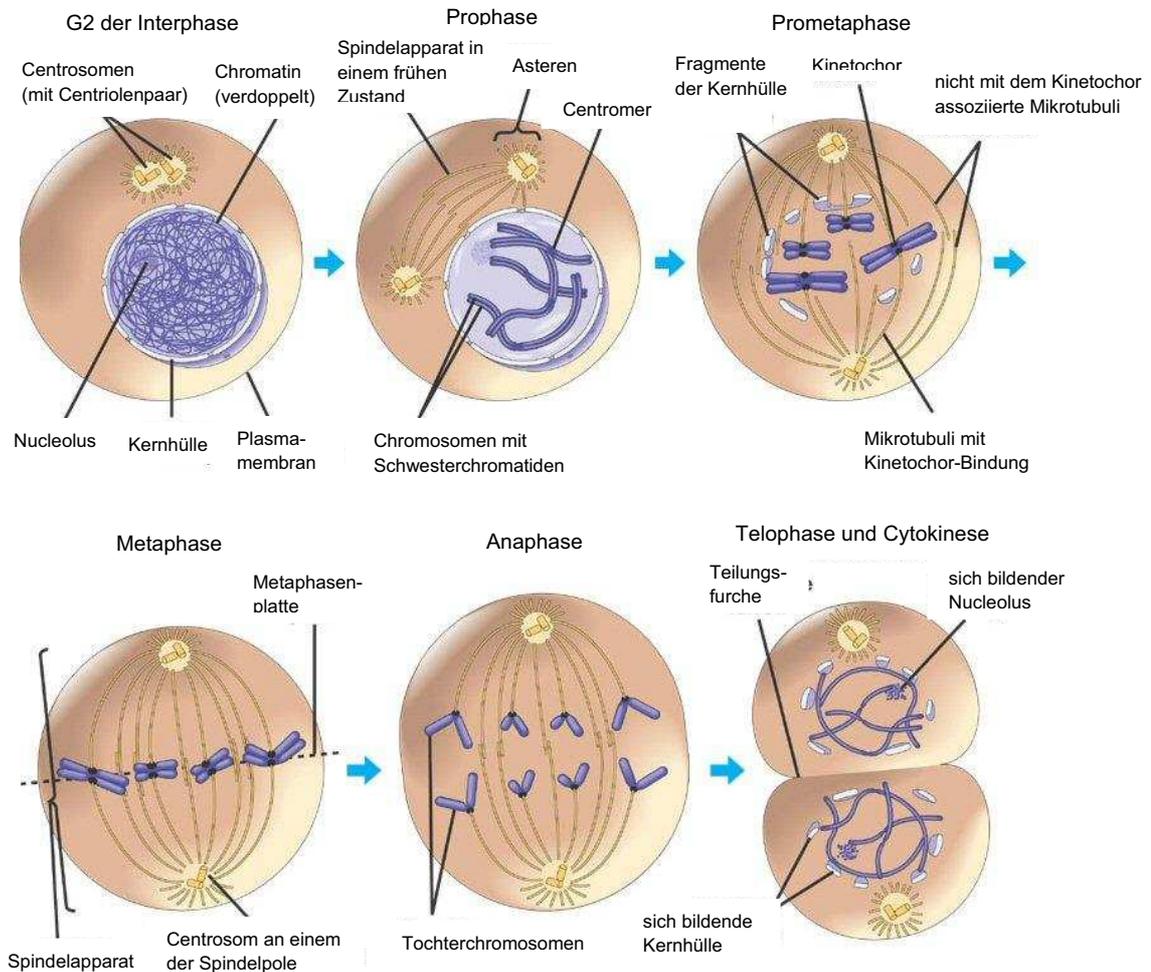
Auf die Prophase folgt die Prometaphase. In diesem Stadium zerfällt die Hülle des Zellkerns und der Spindelapparat wird bis in den Kernbereich hinein ausgebaut. Einige Mikrotubuli haften an sogenannte Kinetochore an, welche sich an den Chromosomen befinden, und können diese so bewegen.

In der darauf folgenden Metaphase sammeln sich die Chromosomen an einer Ebene, die von beiden Centrosomen gleich weit entfernt ist. Jedes Schwesterchromatid wird von Mikrotubuli gebunden, die jeweils von dem entgegengesetzten Centrosom ausgehen.

Nach Beendigung der Metaphase geht die Zelle in das als Anaphase bezeichnete Stadium ein. Hier werden die Schwesterchromatiden voneinander getrennt. Sie wandern zu jeweils entgegengesetzten Centrosomen, sodass sich am Ende jeweils eine Kopie des vollständigen Erbgutes an jedem Centrosom befindet.

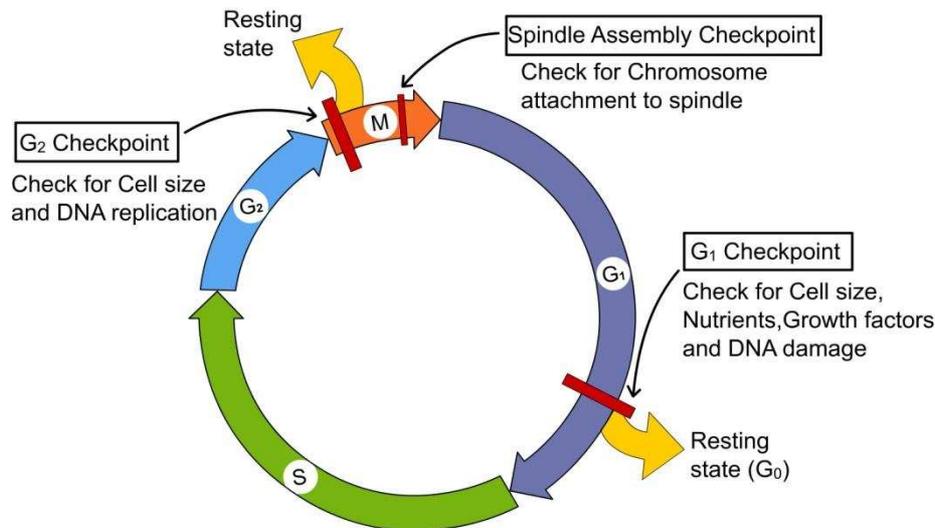
Das letzte Stadium der M-Phase ist die Telophase, in welcher zwei neue Zellkerne ausgebildet und von einer neuen Kernhülle umgeben werden. Zeitgleich wird die Cytokinese durchgeführt: das Cytoplasma wird geteilt und eine Teilungsfurche zur Abschnürung der Tochterzellen voneinander wird ausgebildet [Campbell & Reece, 2009].

Der Zellzyklus hat diverse Kontrollpunkte, an denen bestimmte Parameter auf ihre Richtigkeit überprüft werden, bevor der Zyklus in die nächste Phase übergehen darf (siehe Abbildung 1.3). Diese Kontrollpunkte sind von immenser Bedeutung, da sie ein Vermehren von schadhafte Zellen verhindern können. Immer, wenn der Zyklus an einen Kontrollpunkt gelangt, wird überprüft, ob bis zu diesem Zeitpunkt alle Schritte der Teilung ordnungsgemäß abgelaufen sind. Das Erreichen dieses Kontrollpunktes wird durch sogenannte Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk engl. *cyclin dependent kinases*) gesteuert. Zu bestimmten Zeitpunkten im Zellzyklus werden die Cycline verstärkt exprimiert. Wenn sie ein gewisses Maximum erreicht haben, kontrolliert die Zelle, ob während des Zellzyklus Fehler aufgetreten sind. Ist dies nicht der Fall, geht die Zelle in die nächste Phase über. Die Cycline werden dann wieder abgebaut und die Zelle kann ihren Zyklus fortsetzen [Alberts *et al.*, 1994].



**Abbildung 1.2: Darstellung der verschiedenen Stadien der M-Phase**

Im Zuge der M-Phase durchläuft die Zelle mehrere Stadien. Diese werden als Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase bezeichnet. In der Prophase kondensiert die DNA im Zellkern zu Chromosomen und bildet einen Spindelapparat, der aus Mikrotubuli besteht, zwischen den Centrosomen aus. In der Prometaphase wird der Spindelapparat durch das Wandern der Centrosomen in entgegengesetzte Richtungen weiter ausgebaut und die Hülle des Zellkerns zerfällt. Einige Mikrotubuli heften sich an sogenannte Kinetochore der Chromosomen. In der Metaphase sammeln sich alle Chromosomen an einer Ebene, die sich mittig zwischen den Centrosomen befindet. Die Schwesterchromatiden werden von den Mikrotubuli in der Anaphase zu jeweils entgegengesetzten Centrosomen bewegt, sodass jede Tochterzelle das vollständige Erbgut erhält. In der Telophase werden zwei neue Zellkerne gebildet und die Verdichtung der Chromosomen nimmt ab. Zeitgleich beginnt die Cytokinese, in welcher eine Teilungsfurche gebildet wird und die Tochterzellen abgeschnürt werden [Campbell & Reece, 2009].



**Abbildung 1.3: Der Zellzyklus mit seinen Kontrollpunkten**

Während des Ablaufes des Zellzyklus gibt es verschiedene Kontrollpunkte, die in dieser Darstellung vermerkt sind. Der erste Kontrollpunkt befindet sich am Ende der G<sub>1</sub>-Phase. Hier überprüft die Zelle, ob sie die richtige Größe und genügend Nährstoffe hat. Außerdem werden hier die Wachstumsfaktoren überprüft und ob ein DNA-Schaden vorliegt. Am G<sub>2</sub>-Kontrollpunkt wird noch einmal die Zellgröße überprüft und ob die DNA in der S-Phase korrekt repliziert wurde. Fällt die Kontrolle an diesen Kontrollpunkten nicht positiv aus, tritt die Zelle in den Zellzyklusarrest ein und versucht den Schaden zu beheben. In der M-Phase befindet sich ein weiterer Kontrollpunkt, an dem die ordnungsgemäße Anheftung der Mikrotubuli an die Kinetochore der Chromosomen überprüft wird. [Sichuan University].

Werden jedoch Unregelmäßigkeiten festgestellt, arretiert die Zelle im Zellzyklus und versucht, sich selbst zu reparieren und die Unregelmäßigkeit zu korrigieren. Sofern dies gelingt, kann die Zelle den Kontrollpunkt des Zyklus doch noch passieren. Ist der Schaden jedoch irreparabel, bricht die Zelle die Teilung ab und leitet den Zelltod, die sogenannte Apoptose, ein. Die Apoptose ist, im Gegensatz zur Nekrose, ein programmierter, genetisch kontrollierter Zelltod. Um das absterbende Zellmaterial zu entsorgen, werden die betroffenen Zellen in Membranvesikel eingeschnürt, welche dann phagozytiert werden [Campbell & Reece, 2009].

### 1.2.2 Zellzyklusinhibitoren

Bevor die Zelle einen Kontrollpunkt passiert, hat sie durch Inhibitoren die Möglichkeit den Zellzyklus anzuhalten. Das Anhalten des Zellzyklus wird mit Hilfe von Proteinen gesteuert, die oftmals keine weitere Funktion an anderen Vorgängen des Zellzyklus haben, sondern nur dann aktiv werden, wenn es zu Anomalien kommt.

Inhibitoren können durch verschiedene Auslöser aktiviert werden. Beispiele hierfür sind schadhafte DNA, der Mangel an Nährstoffen und die Kontakthemmung, bei welcher der Zellzyklus durch zu viele Zellen in der direkten Nachbarschaft inhibiert wird.

Es gibt verschiedene Wege, auf denen die Zelle ihren Zellzyklus arretieren kann. Beispielsweise kann die Dephosphorylierung der Cdk, die den Eintritt in die Mitose steuert, durch die Phosphatase Cdc25 verhindert werden. Die Zelle verbleibt somit in der G<sub>2</sub>-Phase. Außerdem gibt es auch Proteine wie z.B. das p21, welche die Kinaseaktivität des Cyclin-Cdk-Komplexes hemmen. Die Zelle kann in diesem Fall nicht mehr in die S-Phase des Zellzyklus übergehen und verharrt in der G<sub>1</sub>-Phase [Karp, 2005].

## **1.3 Krebs**

### **1.3.1 Die Entstehung von Krebs**

Krebs ist ein Oberbegriff für maligne Tumore, die durch das unkontrollierte Wachstum von krankhaft entarteten Zellen zustande kommen [Gronau, 2010]. Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland, führt jedoch nicht zwangsweise zum Tod. Die Heilungschancen variieren stark nach Krebsart und Zeitpunkt der Diagnose [Husmann et al., 2010].

In einem gesunden Organismus besteht zwischen der Zellteilung und dem Zelltod ein Gleichgewicht. In einem mit Krebs erkrankten Organismus ist dieses Gleichgewicht zu Gunsten der Zellteilung gestört. Ursache für diese unkontrollierte Teilung sind Mutationen in Genen, welche die einzelnen Phasen des Zellzyklus, dessen Kontrollmechanismen sowie die Apoptose präzise steuern [Campbell & Reece, 2009]. Die mutierten Gene können ihre Kontrollfunktion nicht mehr korrekt ausführen. Dadurch kommt es zum Überleben schadhafter Zellen [Hanahan & Weinberg, 2000]. Diese Fehler sind in den seltensten Fällen angeboren. Sie werden meist durch Einflüsse aus der Umwelt, wie beispielsweise Strahlung oder chemische Substanzen, hervorgerufen.

Damit das Genom fehlerfrei von Zelle zu Zelle weitergegeben werden kann, wird eine große Zahl der insgesamt 25000 Gene des Menschen benötigt. Die Regulation des Zellzyklus wird unter anderem durch Protoonkogene und durch Tumorsuppressorgene gesteuert.

Protoonkogene sind Gene, die in jeder gesunden Zelle vorkommen, jedoch durch schädliche Umwelteinflüsse wie z.B. Strahlung zu Onkogenen, also Krebsgenen, mutieren. Protoonkogene kodieren Proteine, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich bei der Steuerung des Wachstums, der Zellteilung und -differenzierung beteiligt sind. Beim Zellzyklus einer gesunden Zelle wird die Konzentration dieser Faktoren exakt geregelt. Liegt jedoch eine Mutation im Gen vor, funktioniert diese feine Regelung nicht mehr und es kommt zu einer Über- oder Unterexpression. Als Folge wird ein unkontrolliertes Wachstum induziert [Campbell & Reece, 2009].

Die Produkte von Tumorsuppressorgenen verhindern eine unkontrollierte Zellteilung. Das wohl bekannteste Tumorsuppressorgen ist das p53-Gen. Es ist in etwa der Hälfte aller Tumorzellen mutiert vorzufinden. Das p53-Gen überwacht im Zellzyklus die G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Kontrollpunkte (siehe Abbildung 1.3). Erleidet die Zelle durch Faktoren wie Hitze oder Strahlung einen DNA-Schaden, hat dies eine Akkumulation von p53 zur Folge. Dies ist das Signal für die Zelle den Zellzyklusarrest zu induzieren, um der Zelle Zeit für Reparaturmaßnahmen zu geben. Kann der Schaden nicht behoben werden, wird p53 immer weiter angehäuft und aktiviert weitere Mechanismen, welche die Apoptose einleiten. Ist das p53-Gen einer Zelle mutiert, fällt diese Schutzfunktion weg und die Zelle kann trotz Schäden den Zellzyklus fortsetzen [Karp, 2005].

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Krebsentstehung sind die Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen, die in gesunden Zellen den Zellzyklus, beispielsweise aufgrund von Kontakthemmung, beeinträchtigen. Sind sie beschädigt, kann dies zur Inaktivierung des Inhibitors führen. Der Zellzyklus wird folglich nicht mehr inhibiert und die Zelle tritt ungehemmt immer wieder in die S-Phase des Zellzyklus über.

Im Falle von Krebs greift das Immunsystem, welches normalerweise entartete körpereigene Zellen entsorgt, die fehlerhaften Zellen zwar an, jedoch ist der Abwehrmechanismus oftmals nicht stark genug, um das unkontrollierte Wachstum zu stoppen. Dies liegt daran, dass die Krebszellen den gesunden Zellen in vielerlei Hinsicht noch stark ähneln [Gronau, 2010].

### **1.3.2 Krebstherapie**

Die am häufigsten eingesetzten Krebstherapien sind die Chemo- und die Strahlentherapie. Tumore, die örtlich begrenzt auftreten, können durch Strahlentherapie behandelt werden. Die Strahlung schädigt die DNA und verhindert weitere Zellteilungen.

Bei metastasierenden, also nicht örtlich begrenzten Tumoren wird meist Chemotherapie angewandt. Hierbei werden Wirkstoffe in den Körper geleitet, welche sich teilende Zellen abtöten. Die Wirkstoffe werden bei der Chemotherapie über den Blutkreislauf in den gesamten Körper geleitet und unterscheiden nicht zwischen sich teilenden Nicht-Tumorzellen und sich teilenden Tumorzellen. Infolgedessen entstehen auch signifikante Schäden an gesunden Geweben und Organen. Es treten starke Nebenwirkungen, die von Übelkeit und Haarausfall bis zu Organschäden reichen.

Es gibt verschiedene Chemotherapeutika, die an unterschiedlichen Stellen im Zellzyklus eingreifen. Taxol beispielsweise, welches aus der Eibe gewonnen wird, stoppt den Zellzyklus in der Metaphase der Mitosephase. Es verhindert die Depolymerisation von Mikrotubuli [Campbell & Reece, 2009]. Andere Chemotherapeutika wie Colchicin, Vinblastin und Nocodazol stören den Zellzyklus bereits vor der Metaphase. Sie verhindern den Aufbau der Mikrotubuli.

In der Krebstherapie werden aber auch viele pflanzliche Wirkstoffe als Antiemetika eingesetzt. Sie dämpfen erwiesenermaßen durch Chemotherapie und Radiotherapie hervorgerufene Übelkeit und auftretende Brechreize erfolgreich ein [Haniadka et al., 2012].

In vielen Stoffen pflanzlichen Ursprungs wurden sogenannte Phytochemikalien, wie z.B. Polyphenole nachgewiesen, welche das Krebsrisiko vermindern. Daher wird bereits die präventive Wirkung gegen Krebs von Produkten wie Ingwer, Knoblauch und Brokkoli erforscht [Karna *et al.*, 2011].

## **1.4 In Produktion und Forschung verwendete Zelllinien**

Beispielhaft sollen hier die zwei am häufigsten in Produktion und Forschung verwendeten Zelllinien beschrieben werden. Diese beiden Zelllinien wurden auch für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

### **1.4.1 CHO-Zelllinie**

CHO-Zellen (engl. chinese hamster ovary) stammen aus einer Gewebeprobe einer Ovarie eines chinesischen Hamsters. Diese Probe wurde 1957 von Theodore T. Puck isoliert [Tjio & Puck, 1958].

Die CHO-Zelllinie ist überaus beliebt. Ungefähr 70 % aller rekombinanten Proteine zur Verwendung in der Pharmazie werden in CHO-Zellen exprimiert [Jayapal *et al.*, 2007]. Dies hat verschiedene Gründe. Da die CHO-Zelllinie bereits seit langer Zeit als zuverlässiger und sicherer Wirt verwendet wird, ist es vergleichsweise einfach Zulassungen für pharmazeutisch-therapeutische Proteine zu erlangen. Außerdem gibt es bereits etablierte Methoden zur Genamplifikation in CHO-Zellen, um die spezifische Produktivität zu fördern. CHO-Zellen sind weiterhin gut geeignet für human-identische oder human-ähnliche post-translationale Modifikationen und sind dazu noch in der Lage in serumfreien Medien zu wachsen [Kim *et al.*, 2011].

### **1.4.2 HeLa-Zelllinie**

Die HeLa-Zelllinie war die erste immortale Zelllinie und wurde im Jahre 1951 von George Otto Gey isoliert. Das Gewebe stammt von einer Biopsie eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs). Die erkrankte Patientin, nach welcher die Zelllinie benannt wurde, war **Henrietta Lacks** [Lucey *et al.*, 2009].

Wie andere Tumorzellen sind auch HeLa-Zellen in der Lage übereinander zu wachsen. Es findet keine Kontakthemmung mehr statt. Ihr Wachstum ist somit nicht

auf eine Ebene begrenzt, sondern sie wuchern unkontrolliert. Zusätzlich teilen sich Tumorzellen in deutlich kürzeren Zeitabständen als Nicht-Tumorzellen. Aufgrund des Verlustes regulatorischer Proteine oder deren Funktionalität weisen HeLa-Zellen außerdem eine verringerte Apoptoserate auf. Diese Merkmale bedingen sich zum Teil gegenseitig [Schmitz, 2011].

### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Vielen pflanzlichen Produkten werden heilende Wirkungen zugeschrieben, die häufig auch bereits nachgewiesen wurden. In den letzten Jahren wurde beispielsweise festgestellt, dass ein hoher Konsum von Früchten und Gemüse mit einem reduzierten Krebsrisiko einhergeht [Kaur et al., 2009; Cooke et al., 2005; Yang et al., 2001].

Im Rahmen dieser Arbeit sollten diverse pflanzliche Extrakte auf ihre stimulierende und inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Säugetierzellen untersucht werden. Es handelte sich hierbei um Ingwer, Spitzwegerich, Johanniskraut, grünen Tee und Thymian. Da der Ingwer in den Vorversuchen die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte, sollte dieser detaillierter analysiert werden.

Die heilende Wirkung von Ingwer ist allgemein bekannt. Ingwer wird bereits seit geraumer Zeit in der traditionellen Medizin verwendet. Er wird bei Übelkeit, Arthritis, Husten, Erkältungen und anderen Krankheiten eingesetzt [White, 2007].

In der heutigen Zeit wird Ingwer in der Forschung als potentieller Wirkstoff für den Einsatz in der Krebstherapie gehandelt. Dass Ingwer eine anti-mitotische Wirkung aufweist, wurde kürzlich gezeigt [Choudhury et al., 2011]. Bisher wurden jedoch lediglich Tumorzellen analysiert und keine Vergleiche zu Nicht-Tumorzelllinien hergestellt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die stimulierenden und inhibierenden Effekte von Ingwerextrakten auf das Wachstum von Säugetierzellen in vitro zu untersuchen. Es werden vergleichend die Nicht-Tumorzelllinie CHO und die Tumorzelllinie HeLa eingesetzt. Die Herstellung des Ingwerextraktes soll mit getrocknetem und frischem Ausgangsmaterial durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede zu ermitteln.

Zur Untersuchung der stimulierenden und inhibierenden Effekte der Ingwerextrakte sollen Proliferationsanalysen durchgeführt werden. Darauf folgend sollen die Extrakte mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt werden, um die molekularen Komponenten der Effekte zu finden. Außerdem soll mit Hilfe mikroskopischer Methoden die zelluläre Wirkung der wachstumsbeeinflussenden Effekte genauer untersucht und eine mögliche zellspezifische Inhibition des Wachstums der HeLa-Zellen festgestellt werden.

## **2. Methoden**

### **2.1 Kultivierung von CHO- und HeLa-Zellen**

Für die Kultivierung von Zellen ist eine sterile Arbeitsweise unabdingbar, um Kontaminationen zu vermeiden. Daher wurden alle Arbeitsschritte zur Kultivierung der Zellen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Diese verfügt über einen laminaren Luftstrom an der Öffnung, um Partikel am Eindringen in die sterile Arbeitsumgebung zu hindern. Der Innenraum der Sterilwerkbank wird regelmäßig durch UV-Bestrahlung und Oberflächenbehandlung mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Des Weiteren müssen alle Gegenstände, die in den sterilen Werkraum gelangen, ebenfalls desinfiziert werden.

Die verwendeten Zelllinien wurden in T-75 Zellkulturflaschen kultiviert. Diese Plastikflaschen weisen eine spezielle Beschichtung auf, welche die Adhäsion der Zellen ermöglicht. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre unter Zugabe eines Nährmediums kultiviert. Als Medium wurde für die HeLa-Zellen DMEM Medium verwendet, für die CHO-Zellen Ham's F-12 (siehe Tabelle 2.1).

### **2.2 Auftauen von Zellen**

Die Zelllinien waren bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingelagert. Sie wurden möglichst schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort in Kulturflaschen mit Medium gegeben. Daraufhin wurden sie bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre inkubiert. Da die Zellen in DMSO-haltigem Medium eingefroren waren, welches eine cytotoxische Wirkung hat und somit ein Zellgift ist, wurde nach 4 h ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen hatten sich zu diesem Zeitpunkt bereits an den Boden der Zellkulturflasche angeheftet.

**Tabelle 2.1: Für die Kultivierung von CHO- und HeLa-Zellen verwendeten Puffer und Medien**

Puffer und Medien	Zusammensetzung
Kultivierungsmedium für HeLa-Zellen	370 ml ddH <sub>2</sub> O 50 ml Dulbecco´s MEM 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren 15 ml 7,5 % NaHCO <sub>3</sub> 5 ml 200 mM L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml Na-Pyruvate 50 ml FKS
Kultivierungsmedium für CHO-Zellen	500 ml Ham´s F-12 5 ml 200 mM L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin 50 ml FKS
PBS	0,8 g l-1 NaCl 0,2 g l-1 KCl 1,1 g l-1 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 g l-1 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Trypsin/EDTA	0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS

### 2.3 Passagieren

Um die Kultivierung von Zellen aufrecht zu erhalten ist es wichtig, dass die Zellen genügend Platz für weitere Zellteilungen haben. Gleichzeitig ist aber auch der Kontakt zu anderen Zellen überlebenswichtig. So muss regelmäßig dafür gesorgt werden, dass sich eine angemessene Zelldichte in den Flaschen befindet. Da die Zellen wachsen und der Platz in der Flasche folglich immer weniger wird, wurden die verwendeten Zellen alle drei bis vier Tage durch Subkultivierung ausgedünnt. Die Konfluenz in der Zellkulturflasche sollte beim Passagieren etwa 80 % erreicht haben.

Zu Passagieren wurden die Zellen zuerst zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Darauf folgend wurden 5 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben und 4 ml wieder abgenommen. Der verbleibende Milliliter wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration in der

Atmosphäre für etwa fünf bis zehn Minuten inkubiert. In dieser Zeit löste das Trypsin die Adhäsion der Zellen von der beschichteten Oberfläche der Flasche. Eine zu lange Inkubation mit Trypsin/EDTA schadet den Zellen, weshalb nach der Inkubationszeit 9 ml Medium zu Absättigung der Proteasen hinzugegeben wurden. Die Wirkung des Trypsin/EDTAs wurde durch das Serum, welches im Medium enthalten ist, neutralisiert. Die Zellen befanden sich nun abgelöst in Lösung. Ein Teil dieser Zellsuspension (bei CHO-Zellen 1 ml und bei HeLa-Zellen 0,1 ml) wurde sodann in eine neue Flasche gegeben, mit Medium auf 20 ml aufgefüllt und wieder in den Inkubator gestellt.

## 2.4 Herstellung der Extrakte

Die verwendeten Heilkräuter lagen anfangs in Form von getrocknetem Blatt- bzw. Wurzelgranulat vor. Um eine Anwendung auf die Zellen zu ermöglichen, wurden die potentiellen Wirkstoffe als Extrakte in Lösung gebracht. Es wurden folgende Einwaagen mit 1,5 ml Ham's F-12 Medium (mit FKS) in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben:

- Spitzwegerich : 0,18 g
- Grüner Tee : 0,26 g
- Johanniskraut : 0,16 g
- Thymian : 0,14 g
- Ingwer : 0,39 g

Diese Gemische wurden über Nacht bei Raumtemperatur mittels eines Laborrades geschüttelt, anschließend unter der Sterilwerkbank ausgepresst und danach durch einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße: 0,22 µm) sterilfiltriert.

Im weiteren Versuchsverlauf wurde auch frischer Ingwer verwendet. Dieser wurde mit einem Skalpell zerkleinert und 1 g davon in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Durch einen Spritzenkolben wurden die Wurzelstücke gemörsert, damit die Struktur der Wurzel möglichst gut aufgebrochen wurde. Anschließend wurde 1 ml Ham's F-12 Medium hinzugegeben, das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur mittels eines

Laborades geschüttelt, anschließend unter der Sterilwerkbank ausgepresst und durch einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße: 0,22 µm) sterilfiltriert.

## **2.5 Aussaat und Inkubation mit Extrakten**

Zur Untersuchung des Zellwachstums und der Morphologie unter verschiedenen Einflüssen müssen die zu vergleichenden Zellen in gleicher Zellzahl vorliegen, bevor sie unterschiedlichen Extrakten ausgesetzt werden. Nur so sind Unterschiede im Wachstum nachvollziehbar.

Während die Zellen passagiert wurden, befanden sie sich in Lösung. Die Zellzahl dieser Suspension wurde mit Hilfe des Zellzählgerätes Countess® Cell Counter bestimmt. An Tag 1 wurden  $1 \times 10^5$  CHO-Zellen und  $8 \times 10^4$  HeLa-Zellen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration inkubiert, um eine ausreichende Zeit zur Adhäsion sicherzustellen. Nach 24 h wurden unterschiedliche Konzentrationen der jeweils zu testenden, sterilfiltrierten Probe in Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben.

## **2.6 Zellzählung**

Die behandelten Zellen, die auf der Oberfläche der 24-Well-Platte adhärirt waren, wurden wie beim Passagieren abgelöst, nachdem die Zellen 48 h mit der jeweiligen Probe inkubiert wurden. Die Zählung der Zellen erfolgte mittels des Zellzählgerätes. Nach dem Waschen der Zellen mit 1 ml PBS wurden 100 µl Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben, welche anschließend ca. 10 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Atmosphäre inkubiert wurden. Nach dem Ablösen der Zellen wurden 900 µl des Zellmediums (mit FKS) hinzugegeben.

50 µl der Zellsuspension wurden anschließend mit 50 µl 0,4 % Trypanblau versetzt, welches die Zellen anfärbt. Ungefähr 10 µl dieses Gemisches wurden auf eine Countess® chamber slide pipettiert. Dieses wurde in einen Schlitz im Zellzählgerät geschoben und auf dem Display erschien ein Bild der zu zählenden Probe. Die Zellen konnten nun zum besseren Fokussieren vergrößert dargestellt werden. Nach dem Fokussieren bestimmt das Gerät eigenständig die Zellzahl der Probe. Zur

Kontrolle zeigt das Gerät mittels blauen und roten Kreisen in der Bilddarstellung an, welche Zellen als „lebendig“ und welche als „tot“ gezählt wurden.

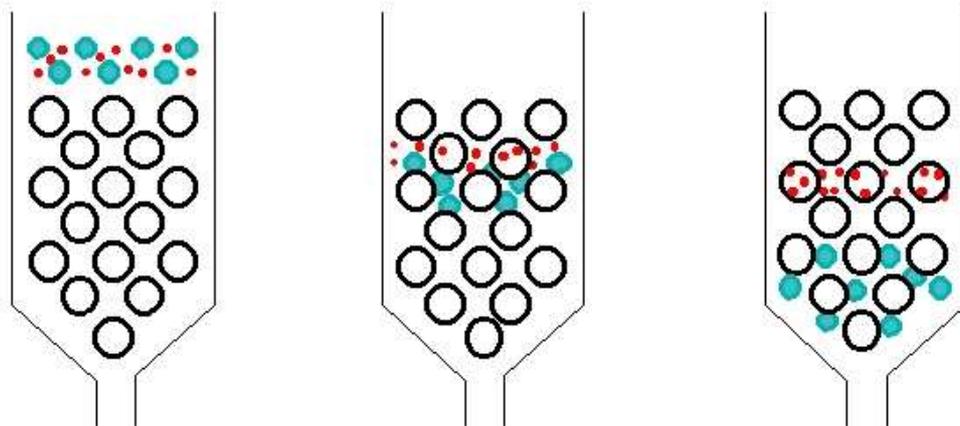
Während des gesamten Zählvorgangs wurden ausschließlich abgeschnittene 200 µl-Pipettenspitzen verwendet, da durch das Pipettieren mit einer normalen Pipettenspitze zu hohe Scherkräfte entstehen können, welche den Zellen schaden.

## **2.7 Größenausschlusschromatographie**

Bei der Größenausschlusschromatographie handelt es sich um eine Art der Flüssigchromatographie, bei welcher die Moleküle der Größe nach aufgetrennt werden (siehe Abbildung 2.1).

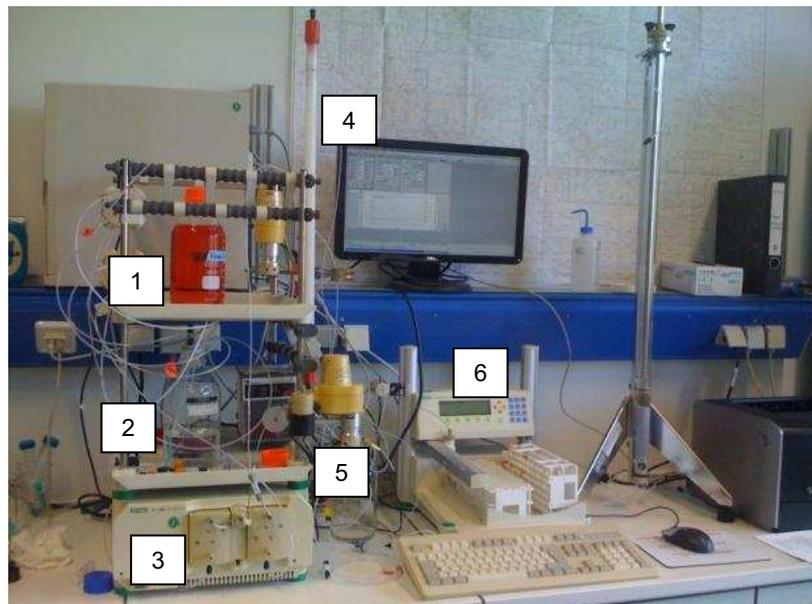
Die Trennung wird in einer Säule durchgeführt, die mit porösem Gel, einem inerten, polymeren Material mit definierter Porengröße, gefüllt ist. Häufig wird dafür Agarose oder Sephadex verwendet. Als mobile Phase dient ein wässriges Laufmittel. Moleküle, die klein genug sind, dringen in die Poren des mit Lösemittel gequollenen Gels ein. Innerhalb der Poren können sich die Partikel nur durch Diffusion bewegen. Ihre Elution wird daher verzögert. Große Moleküle können nicht in die Poren eindringen und wandern deshalb schnell durch die Hohlräume zwischen den Gelpartikeln. Sie werden also am schnellsten eluiert. Zur Detektion der Substanzen wird üblicherweise ein Photometer eingesetzt. Die aufgenommenen Peakflächen sind proportional zur Konzentration des Eluenten [Lottspeich & Engels, 2012].

In dieser Arbeit wurde eine Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 HR-Säule mit einem Säulenvolumen von 120 ml verwendet. Zuerst wurden die Säule und die Anlage mit dem Laufpuffer Ham's F-12 (ohne FKS) mit einer Flussrate von 0,3 ml/min (ca. 2-3 Säulenvolumina) über Nacht äquilibriert, um mögliche Bestandteile aus vorherigen Versuchen, die einen störenden Einfluss haben könnten, zu entfernen.



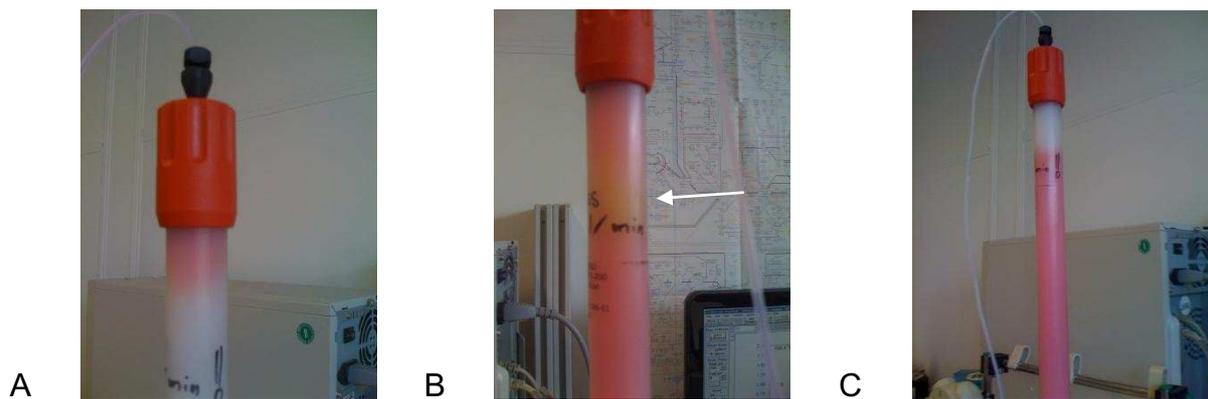
**Abbildung 2.1: Prinzip der Größenausschlusschromatographie**

Größere Moleküle wandern schneller durch die Säule, da sie nicht wie die kleinen Moleküle in die Poren der stationären Phase eindringen können. [Max-Planck-Institut für Polymerforschung, 2010].



**Abbildung 2.2: Bild der Größenausschlusschromatographieanlage**

Dieses Bild zeigt die zur Größenausschlusschromatographie verwendete FPLC-Anlage (BioLogic DuoFlow von BioRad). Der Laufpuffer (1) bzw. der Waschpuffer (2) wird über die Pumpe (3) zur Säule (4) befördert. Über das Probenventil (5) wird der Extrakt auf die Säule aufgegeben und die während der Elution gesammelten Fraktionen werden mit dem Fraktionssammler (6) aufgefangen [Bild im Rahmen dieser Arbeit selbst erstellt].



**Abbildung 2.3: Äquilibration, Probenaufgabe und Waschen der Säule**

Um eventuelle Bestandteile aus vorherigen Versuchen aus der Säule zu entfernen, wurde die Säule zuerst mit dem Laufpuffer äquilibriert. Durch den farbigen pH-Indikator des Laufpuffers ging die Äquilibration mit einer Rosafärbung der Säule einher (A). Die Farbe der aufgetragenen Probe war braun und somit nach der Aufgabe auf die Säule gut sichtbar (siehe Pfeil) (B). Nach Beendigung des Experimentes wurde die Säule mit 20 % Ethanol in Wasser gewaschen, wodurch sich die Säule wieder entfärbte (C).

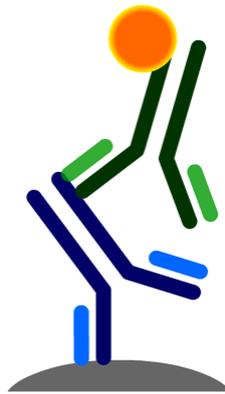
**Tabelle 2.2: Programm zur Probenaufgabe und Elution der Größenausschlusschromatographie**

Schritt	Volumen[ml]	Anweisung
1	0,00	Collection Fractions within 1 time window ending at 185.00 ml
2	0,00	Lamp (UV Detector) ON
3	0,00	Isocratic flow A: Ham's F-12 B: B-Buffer 2 100 % 0 % Volume: 4.00 ml Flow: 0.80 ml/min
4	4,00	Zero Baseline UV Detector
5	4,00	Load/Inject Sample Static Loop Auto inject valve Volume: 1.50 ml Flow: 0.8 ml/min 0 % B (A) Ham's F-12 (B) B-Buffer 2
6	5,50	Isocratic flow A: Ham's F-12 B: B-Buffer 2 100 % 0 % Volume: 180 ml Flow: 0.8 ml/min
7	185,50	End of protocol

Aufgrund des pH-Indikators, welcher in dem Ham's F-12 Medium enthalten ist, hatte der Laufpuffer bereits eine Eigenabsorption bei der Detektion mit dem Photometer. Aus diesem Grund wurde, zur besseren Veranschaulichung, die Nulllinie des Detektors auf den Wert dieser Eigenabsorption kalibriert. Alle verwendeten Puffer mussten vor der Verwendung mittels einer Vakuumfiltration entgast werden, um den Eintrag von Luftbläschen in die Anlage zu verhindern. Des Weiteren wurde die Probenschleife mit dem Ingwerextrakt beladen. Danach wurde gemäß dem in Tabelle 2.2 beschriebenen Programm die Probe aufgegeben und das Eluat in 2 ml-Fractionen gesammelt. Hierbei wurde eine Flussrate von 0,8 ml/min eingestellt. Durch das poröse Material wurden die größten Moleküle zuerst eluiert. Daraufhin folgten weitere Moleküle der Größe nach. Nach der Elution mit 1,5 Säulenvolumina wurde die Säule mit 20 % Ethanol in Wasser gewaschen. Das Waschen der Säule erfolgte ebenso wie die Äquilibration über Nacht bei einer Flussrate von 0,3 ml/min (ca. 2-3 Säulenvolumina).

## **2.8 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse**

Bei der indirekten Immunfluoreszenzanalyse (IFA) werden bestimmte Moleküle von Zellen mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Um die Moleküle in ihrer Lokalisation zu immobilisieren, müssen die Zellen zuerst fixiert werden. Darauf folgend werden die Zellen permeabilisiert und der jeweils für das gewünschte Molekül spezifische Primärantikörper wird hinzugegeben, sodass ausschließlich dieses Molekül gebunden wird. Dieser Primärantikörper ist unmarkiert und somit allein noch nicht sichtbar. Er wird wiederum mit einem Sekundärantikörper detektiert, welcher sich gegen den Primärantikörper richtet. Der Sekundärantikörper ist fluoreszenzmarkiert, also mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem sogenannten Fluorchrom, versehen [Lottspeich & Engels, 2012].



#### Abbildung 2.4: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzanalyse

Das zu detektierende Molekül (grau) wird zuerst mit dem unmarkierten Primärantikörper (blau) inkubiert. Anschließend wird ein Sekundärantikörper (grün), der sich gegen den Primärantikörper richtet, hinzugegeben. Dieser verfügt über einen Fluoreszenzfarbstoff (orange), wodurch das gewünschte Molekül spezifisch sichtbar gemacht wird [Robinson, 2009].

Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Methanolfixierung. Diese ist besonders gut für die Darstellung des Cytoskeletts geeignet, da nicht-polymerisierte Cytoskelettproteine extrahiert werden und somit weniger diffuse Signale bei der Anfärbung des Aktin- bzw. Tubulingerüsts auftreten. Für die Fixierung durch Methanol wurde das Medium abgenommen und die Zellen, welche auf einem Deckgläschen ausgesät wurden, zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Für die Extraktion und die Permeabilisierung der Zellen wurden diese in dem Extraktionsmedium „PIPES“ für 1 min inkubiert und anschließend mit  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Methanol für vier Minuten behandelt, um die Zellen zu fixieren. Es folgten drei Waschschrte mit 1 ml PBS für je 5 min.

---

**Tabelle 2.3: Verwendete Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PIPES Extraktionspuffer	80 mM k-Pipes (7,55 g/250 ml ddH <sub>2</sub> O) 5 mM EGTA (0,47 g/250 ml ddH <sub>2</sub> O) 1 mM MgCl 0,5 % Triton X-100 pH 6,8 mit KOH
Mowiol	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 6 ml ddH <sub>2</sub> O 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Deckgläschen bei Raumtemperatur in dunkler, feuchter Atmosphäre mit 50 µl der in 10 % FKS/PBS verdünnten Primärantikörper (Maus α-Tubulin 1:100 oder Maus α-Aktin 1:200) für 30 min inkubiert. Die Inkubation erfolgte außerhalb der 24-Well-Platte auf einem Stück Parafilm. Daraufhin wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit je 1 ml PBS für 5 min gewaschen. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Sekundärantikörper wurden nun ebenfalls in 10 % FKS/PBS verdünnt (Cy3 α-Maus 1:500) und bei Raumtemperatur in dunkler, feuchter Atmosphäre mit den Deckgläschen auf Parafilm inkubiert. Für jedes Deckgläschen wurden 50 µl des verdünnten Sekundärantikörpers eingesetzt. Zum Anfärben der Zellkerne wurde der DNA-Farbstoff DAPI verwendet. Nachdem der Farbstoff in PBS auf eine Konzentration von 0,2 µg/ml verdünnt worden war, wurden die Zellen 2 min mit dem Farbstoff inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde von den Deckgläschen mit einem Zellstofftuch entfernt, worauf die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen von 5 µl Mowiol gelegt wurden, welcher sich auf einem Objektträger befand. Das Mowiol musste 30 min bei 37 °C trocknen, bevor mikroskopiert werden konnte [Celis, 2006].

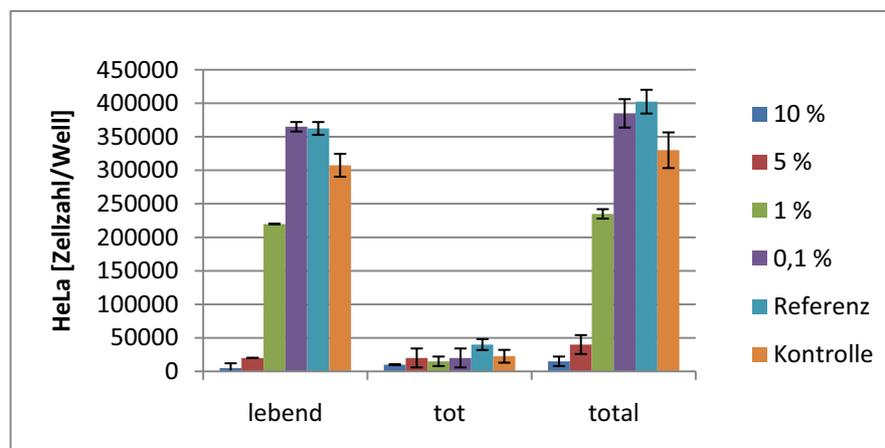
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Proliferationsanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Vorversuchen (hier nicht gezeigt) Johanniskraut, Spitzwegerich, grüner Tee, Thymian und Ingwer auf ihren Einfluss auf die Proliferation von Säugetierzellen (CHO-/HeLa-Zelllinie) untersucht. Da die Ergebnisse des Ingwerextraktes am vielversprechendsten waren, wurde der Fokus nach den ersten Vorversuchen auf die Wirkung der Ingwerextrakte gelegt.

Die Ingwerextrakte wurden durch die Inkubation von 0,39 g des getrockneten Ingwers mit 1,5 ml Ham's F-12 bzw. 1 g des frischen Ingwers mit 1 ml Ham's F-12 Medium über Nacht hergestellt (siehe Kapitel 2.4).

#### 3.1.1 Einfluss des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa- und CHO-Zellen



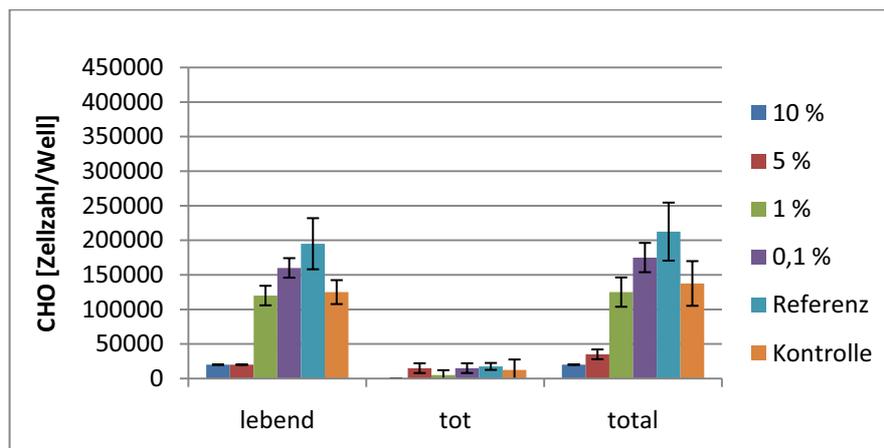
**Abbildung 3.1: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen des Extraktes von getrocknetem Ingwer und Zellen in FKS-haltigem bzw. FKS-freiem Medium. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen des Ingwerextraktes, sowie in FKS-haltiges (Referenz) und FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellzahlen der lebenden und toten Zellen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

Die hergestellten Extrakte wurden sterilfiltriert und in verschiedenen Konzentrationen in 24-Well-Platten mit  $8 \times 10^4$  (bei HeLa-Zellen) bzw.  $1 \times 10^5$  (bei CHO-Zellen) Zellen pro Well gegeben. Die Zellen wurden 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter Einfluss der Extrakte inkubiert und darauf folgend ihre Zellzahl pro Well bestimmt (siehe Kapitel 2.5). Da die Unterscheidung nach den Zellzahlen von toten und lebenden Zellen keine deutlichen Unterschiede zwischen den getesteten Extraktkonzentrationen aufzeigten, bezieht sich die Beschreibung der Ergebnisse auf die totalen Zellzahlen.

In Abbildung 3.1 ist die Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von getrocknetem Ingwer dargestellt. Um eine Aussage über mögliche Veränderungen der Proliferation von HeLa-Zellen treffen zu können, ist zusätzlich ein Referenz- und ein Kontrollwert angegeben. Die Referenz stellt die Proliferation der HeLa-Zellen unter Einfluss von FKS-haltigem Medium dar, während die Kontrolle unter Einfluss von FKS-freiem Grundmedium (DMEM) steht, in welchem auch die verschiedenen Ingwerkonzentrationen hergestellt wurden.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proliferation von HeLa-Zellen bei einer Konzentration von 0,1 % des Extraktes von getrocknetem Ingwer gegenüber der Kontrolle stimulierend wirkt. Jedoch ist bereits bei einer Konzentration von 1 % eine inhibierende Wirkung zu erkennen, die bei höheren Konzentrationen stark zunimmt. Die Zellzahl liegt bei 1 % Extraktkonzentration 30 % unter dem Wert der Kontrolle. Der Einsatz einer Konzentration von 5 % bzw. 10 % des Extraktes von getrocknetem Ingwer reduziert die Proliferation, verglichen mit dem Kontrollwert, um 88 % bzw. 95 % der HeLa-Zellen.



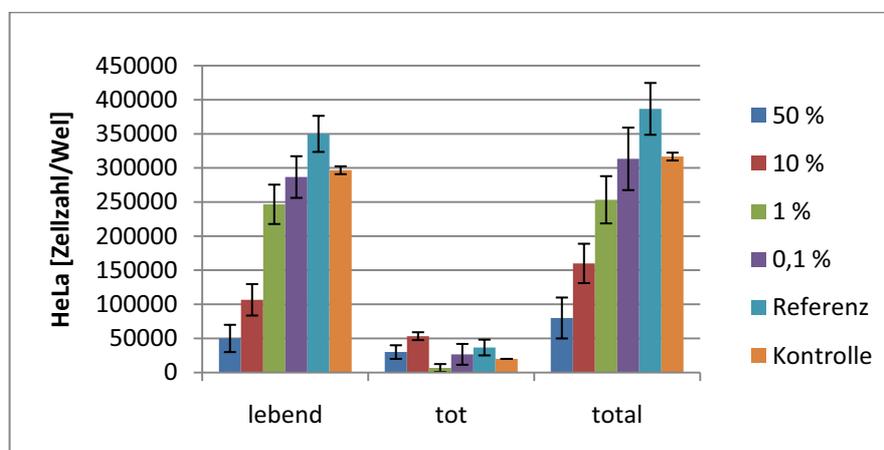
**Abbildung 3.2: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von CHO-Zellen unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen des Extraktes von getrocknetem Ingwer und Zellen in FKS-haltigem bzw. FKS-freiem Medium. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $1 \times 10^5$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen des Ingwerextraktes, sowie in FKS-haltiges (Referenz) und FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellzahlen der lebenden und toten Zellen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

Abbildung 3.2. zeigt die Proliferation von CHO-Zellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von getrocknetem Ingwer. Hier ist bei einer Konzentration von 0,1 % des Extraktes von getrocknetem Ingwer eine leicht stimulierende Wirkung im Vergleich zur Kontrolle, jedoch nicht zur Referenz zu verzeichnen. Beim Einsatz einer Konzentration von 1 % des Extraktes von getrocknetem Ingwer liegt der Wert nur knapp unterhalb der Kontrollzellzahl. Bei höheren Konzentrationen von 5 % bzw. 10 % liegt im Vergleich mit der Kontrolle eine stark inhibierende Wirkung von 75 % bzw. 86 % auf die Proliferation der CHO-Zellen vor.

Der Vergleich von Abbildung 3.1 mit Abbildung 3.2 zeigt, dass das Extrakt von getrocknetem Ingwer unterschiedlich auf die Proliferation der verschiedenen Zelllinien wirkt. Beide Zelllinien zeigen unter dem Einfluss von 0,1 % der Extraktkonzentration eine leicht stimulierende Wirkung. Der inhibierende Effekt von 1 %, 5 % und 10 % Ingwerextraktkonzentration ist bei den HeLa-Zellen mit 20 %, 88 % bzw. 96 % im Vergleich zum Kontrollwert sehr viel stärker als bei den CHO-Zellen (10 %, 75 % bzw. 86 %).

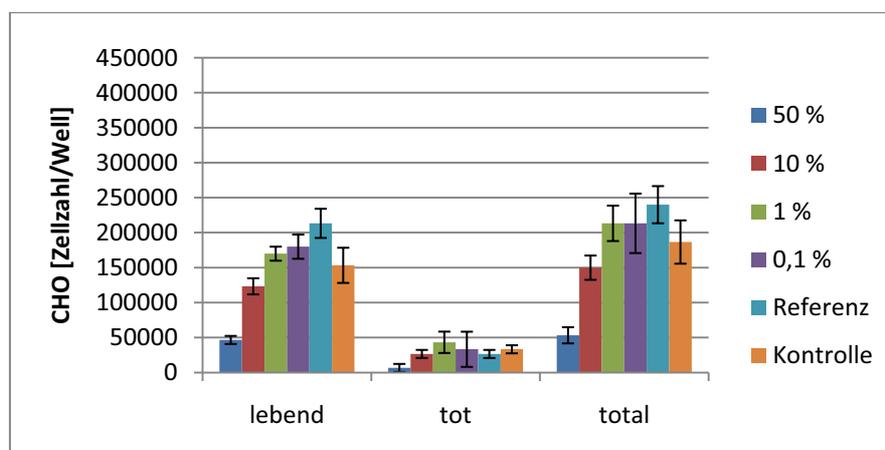
### 3.1.2 Einfluss des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von HeLa- und CHO-Zellen



**Abbildung 3.3: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen vom Extrakt des frischen Ingwers und Zellen in FKS-haltigem bzw. FKS-freiem Medium. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen des Ingwerextraktes, sowie in FKS-haltiges (Referenz) und FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellzahlen der lebenden und toten Zellen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

Nach den Untersuchungen mit dem Extrakt des getrockneten Ingwers (siehe Abbildung 3.1) wurde der Einfluss frischen Ingwers auf die Proliferation von HeLa-Zellen analysiert. Es sollte untersucht werden, ob sich getrockneter und frischer Ingwer in der Aktivität unterscheiden, da der Trocknungsprozess bekanntlich häufig zu Verlusten führt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Messergebnisse zeigen, dass die Beeinträchtigung der Proliferation der HeLa-Zellen umso stärker wird, je mehr Extrakt eingesetzt wird. Beim Einsatz einer Konzentration von 0,1 % des Extraktes liegt die Zellzahl in etwa auf der Höhe der Kontrolle und weist somit keinen Effekt auf die Proliferation der HeLa-Zellen auf. Stehen die Zellen unter dem Einfluss einer Konzentration von 1 % des frischen Ingwerextraktes, weisen sie eine Inhibition von 20 %, gemessen am Kontrollwert, auf. Eine Inhibition um etwa 50 % der Kontrollzellzahl wurde bei einer Ingwerextraktkonzentration von 10 % festgestellt und bei einer Konzentration von 50% des Ingwerextraktes wird die Proliferation um 75 % reduziert.



**Abbildung 3.4: Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von CHO-Zellen unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen vom Extrakt des frischen Ingwers und Zellen in FKS-haltigem bzw. FKS-freiem Medium. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $1 \times 10^5$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen des Ingwerextraktes, sowie in FKS-haltiges (Referenz) und FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellzahlen der lebenden und toten Zellen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

Der Einfluss des frischen Ingwerextraktes auf die Proliferation von CHO-Zellen ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Wie in Abbildung 3.4 zu erkennen, liegt die CHO-Zellzahl beim Einsatz einer Konzentration von 0,1 % und 1 % des frischen Ingwerextraktes oberhalb des Kontrollwertes. Die Proliferation der Zellen wird hier im Gegensatz zu HeLa-Zellen also leicht stimuliert. Selbst bei einer Konzentration von 10 % des Extraktes liegt die Zellzahl nur etwa 20 % unter der des Kontrollwertes. Werden jedoch 50 % des frischen Ingwerextraktes eingesetzt, ist eine Inhibition der Proliferation der CHO-Zellen zu verzeichnen. Gemessen am Kontrollwert wird sie um 72 % reduziert.

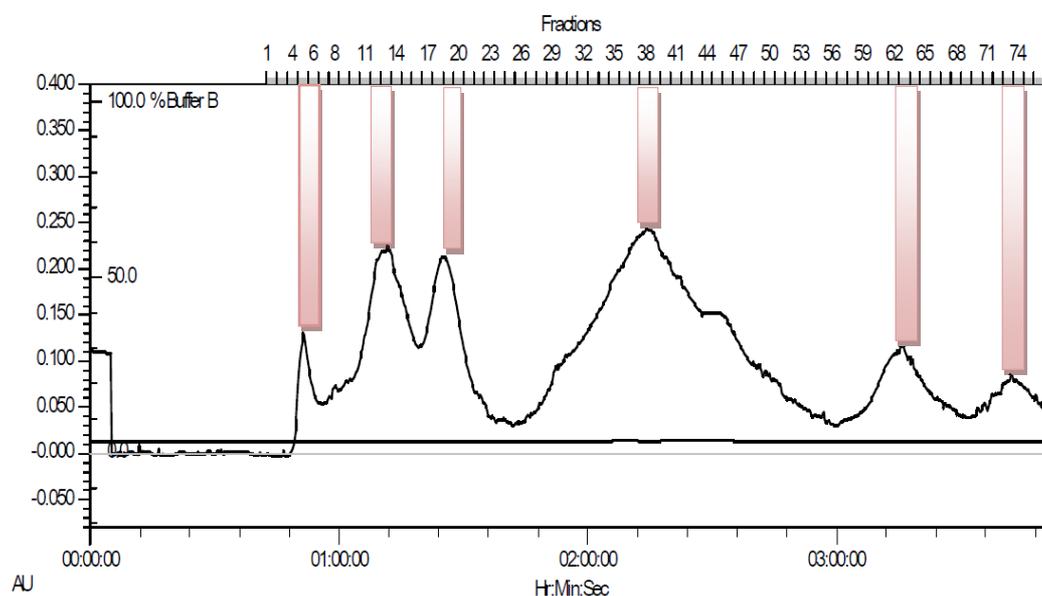
Eine Konzentration von 0,1 % des frischen Ingwerextraktes wies bei den CHO-Zellen eine stimulierende Wirkung auf, während die HeLa-Zellen von der Kontrolle abweichende Reaktion zeigten. Beim Einsatz einer Konzentration von 1 % wiesen die HeLa-Zellen bereits eine Inhibition auf, während die Proliferation der CHO-Zellen bei dieser Konzentration stimuliert wird. 10 % Extraktkonzentration zeigten bei den HeLa-Zellen einen deutlich stärkeren inhibierenden Effekt als bei den CHO-Zellen.

Allerdings ist unter Einfluss von einer Konzentration von 50 % kein zellspezifischer Unterschied in der stimulierenden bzw. inhibierenden Wirkung des frischen Ingwerextraktes festzustellen.

## 3.2 Größenausschlusschromatographie

### 3.2.1 Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer

Die Abbildungen 3.1 – 3.4 zeigen bei niedrigen Konzentrationen (0,1 %) keinen inhibierenden, meist sogar einen leicht stimulierenden Effekt und bei höheren Konzentrationen (>1 %) einen inhibierenden Effekt der Extrakte von getrocknetem und frischem Ingwer auf die Proliferation der Zellen. Um die sich möglicherweise überlagernden stimulierenden- und inhibierenden Faktoren der Ingwerextrakte zu separieren, wurde das Extrakt mittels einer Größenausschlusschromatographie aufgetrennt.

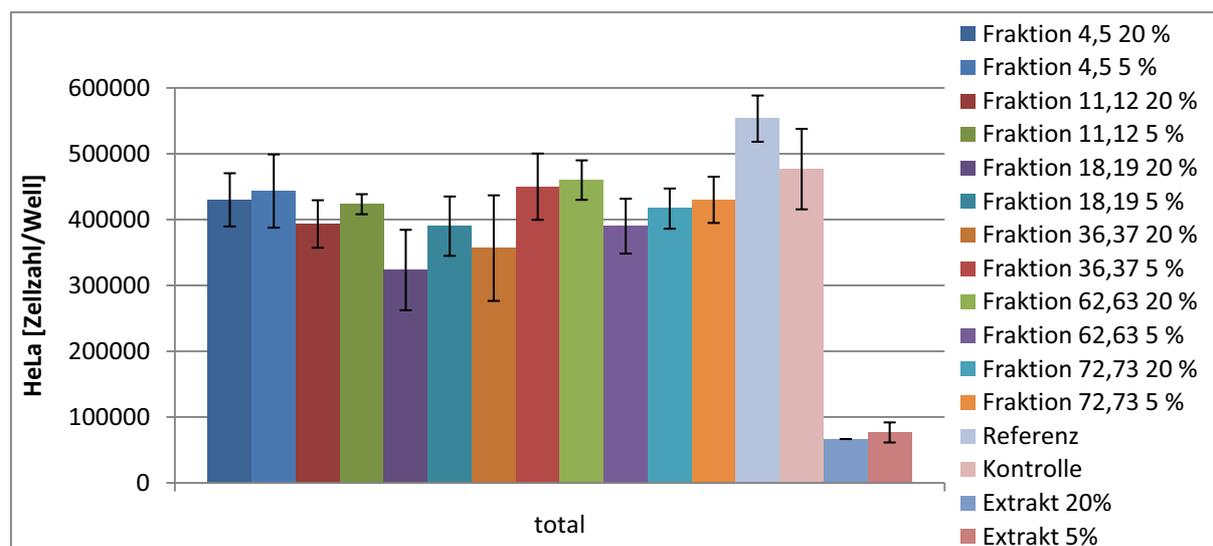


**Abbildung 3.5: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer**

Dargestellt ist der Verlauf der Absorption während der Auftrennung des Extraktes von getrocknetem Ingwer durch eine Größenausschlusschromatographie. Die x-Achse zeigt die Absorption bei 280 nm an und die y-Achse stellt die Zeit dar. Die 2 ml-Fractionen, die während der Elution der Probe genommen worden sind, werden über dem Chromatogramm gekennzeichnet. Die roten Rechtecke zeigen die getesteten Fractionen in den Abbildung 3.6, 3.7, 3.10 und 3.11 an. Als Laufpuffer wurde Ham's F-12 Medium ohne den Zusatz von FKS bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min verwendet. Die verwendete Säule war eine Hi-Prep Sephacryl S-200 mit einem Säulenvolumen von 120 ml und das Probenvolumen betrug 1 ml.

Der Extrakt wurde durch die Inkubation von 0,39 g des frischen Ingwers mit 1,5 ml Ham's F-12 Medium über Nacht hergestellt und sterilfiltriert (siehe Kapitel 2.4). Es wurde 1 ml dieses Extraktes auf die Säule aufgetragen. Der Laufpuffer (Ham's F-12) durchlief die Säule während der Elution mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/min, das Eluat wurde in 2 ml-Fractionen gesammelt.

Während der Größenausschlusschromatographie wurde die vom Detektor gemessene Absorption bei 280 nm in einem Chromatogramm dargestellt (siehe Abbildung 3.5). Entsteht ein Peak, so sind vom Detektor Proteine entdeckt worden, die bei 280 nm absorbieren. Die Höhe des Peaks ist proportional zur Konzentration der Proteine. In Abbildung 3.5 sind die in dem Chromatogramm gesammelten Fraktionen gekennzeichnet. Die in Abbildungen 3.6 und 3.7 untersuchten Fraktionen sind in dem Chromatogramm (siehe Abbildung 3.5) durch rote Rechtecke am Maximum eines jeden Peaks gekennzeichnet.

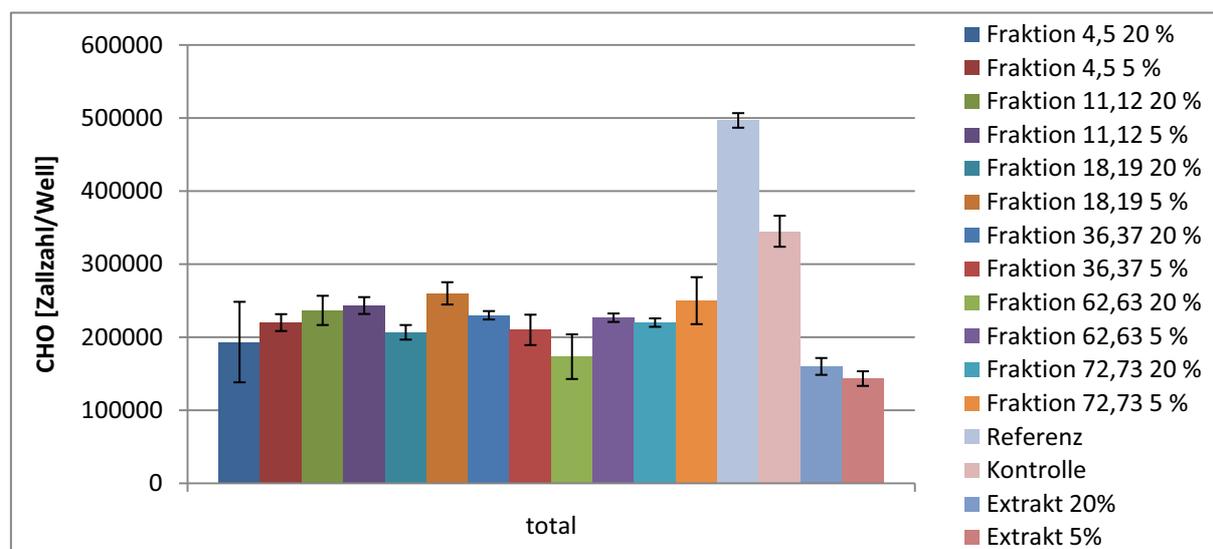


**Abbildung 3.6: Einfluss ausgewählter Peak-Fractionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss von 5 % bzw. 20 % verschiedener Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen der Fraktionen, sowie in FKS-haltiges (Referenz) bzw. FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Außerdem wurden 5 % und 20 % des Ingwerextraktes, welcher auf die Säule gegeben wurde, parallel getestet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die totalen Zellzahlen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

In Abbildung 3.6 ist der Einfluss ausgewählter Fraktionen des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen dargestellt. Ausgewählt wurde die Fraktionen, die den Peaks im Chromatogramm (siehe Abbildung 3.5) entsprechen. Die untersuchten Konzentrationen betragen diesmal 5 % und 20 %, da durch die Größenausschlusschromatographie ein Verdünnungseffekt hervorgerufen wird. Zusätzlich wurde der Extrakt, welcher auf die Säule gegeben wurde, ebenfalls mit den gleichen Konzentrationen getestet wie die Fraktionen.

Der auf die Säule aufgetragene Extrakt des getrockneten Ingwers weist in beiden Konzentrationen eine stark inhibierende Wirkung auf die Proliferation der HeLa-Zellen auf. Beim Einsatz der Konzentrationen von 5 % und 20 % des Extraktes wird die Poliferation der Zellen, verglichen mit dem Kontrollwert, in beiden Fällen um etwa 85 % reduziert. Alle Fraktionen weisen ebenfalls einen leichten bis starken inhibierenden Effekt auf, kommen jedoch maximal auf 32 % (Fraktionen 62 und 63 bei 5 % Konzentration) und damit nicht ansatzweise auf vergleichbar niedrige Werte wie das unaufgetrennte Ausgangsextrakt (85 %). Um für die Analyse ausreichend Material zu erhalten, wurden jeweils zwei benachbarte Fraktionen vor der Verdünnung vereinigt, da diese sich aufgrund der Tatsache, dass sie im Chromatogramm direkt aufeinander folgen, in ihren Bestandteilen kaum unterscheiden sollten.



**Abbildung 3.7: Einfluss ausgewählter Peak-Fractionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von CHO-Zellen unter Einfluss von 5 % bzw. 20 % verschiedener Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie des getrockneten Ingwerextraktes. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $1 \times 10^5$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen der Fraktionen, sowie in FKS-haltiges (Referenz) bzw. FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Außerdem wurden 5 % und 20 % des Ingwerextraktes, welcher auf die Säule gegeben wurde, parallel getestet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die totalen Zellzahlen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

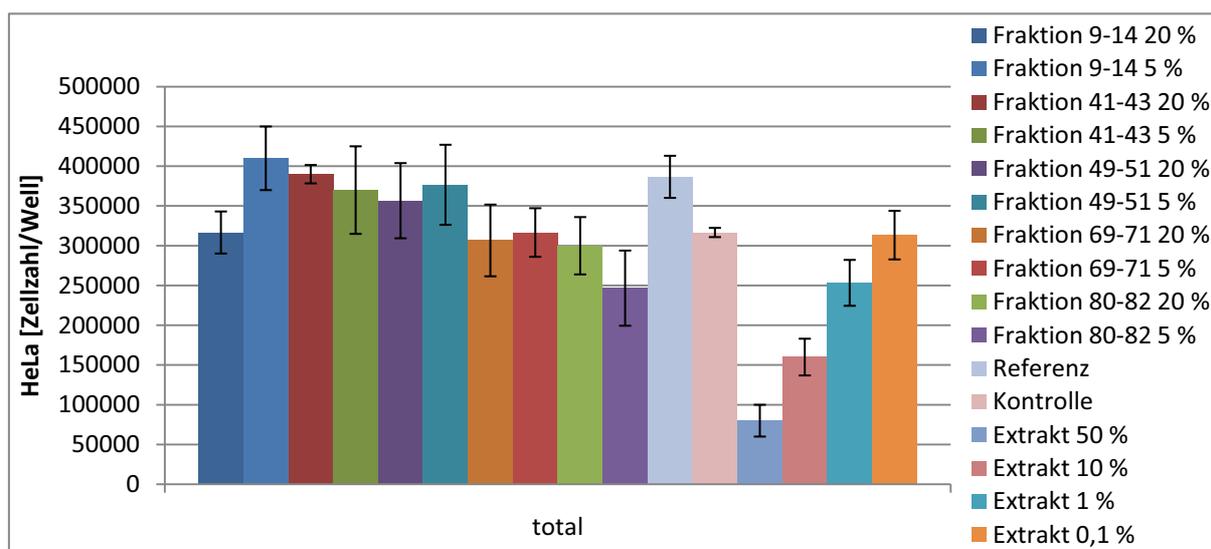
Dieselben Fraktionen wurden ebenfalls auf ihren Effekt auf die Proliferation von CHO-Zellen getestet. In Abbildung 3.7 zeigen alle Fraktionen einen inhibierenden Effekt. Die Fraktionen mit dem stärksten Effekt sind die Fraktionen 62 und 63 in einer Konzentration von 20 %. Verglichen mit dem Kontrollwert wurde die Zellzahl dieser Fraktionen etwa um 50 % reduziert. Während der inhibierende Effekt der Fraktionen zwischen 50 % und 25 % liegt, beträgt dieser ca. 60 % für das gesamte Extrakt.

Die CHO-Zellen reagieren deutlich stärker auf den inhibierenden Einfluss der Fraktionen des Extraktes von getrocknetem Ingwer als die HeLa-Zellen. Sie werden jedoch mit 60 % nicht so stark von dem Gesamtextrakt beeinträchtigt wie die HeLa-Zellen, welche mit einer Reduzierung der Proliferation um 85 % des Kontrollwertes eine sehr starke Reaktion auf den Effekt des Extraktes von getrocknetem Ingwer zeigen.

### 3.2.2 Größenausschlusschromatographie des Extraktes von frischem Ingwer

Zwischen den Effekten der beider Ingwerextrakte wurden bereits bei den vorherigen Analysen zur Proliferation der Zellen Unterschiede festgestellt. Aus diesem Grund wurde der Extrakt aus frischem Ingwer ebenfalls mittels der Größenausschlussanalyse aufgetrennt. Die Chromatographie wurde analog zu der des getrockneten Ingwers durchgeführt (Chromatogramm nicht separat abgebildet), auch hier wurden ausgewählte Peak-Fractionen des Eluates analysiert.

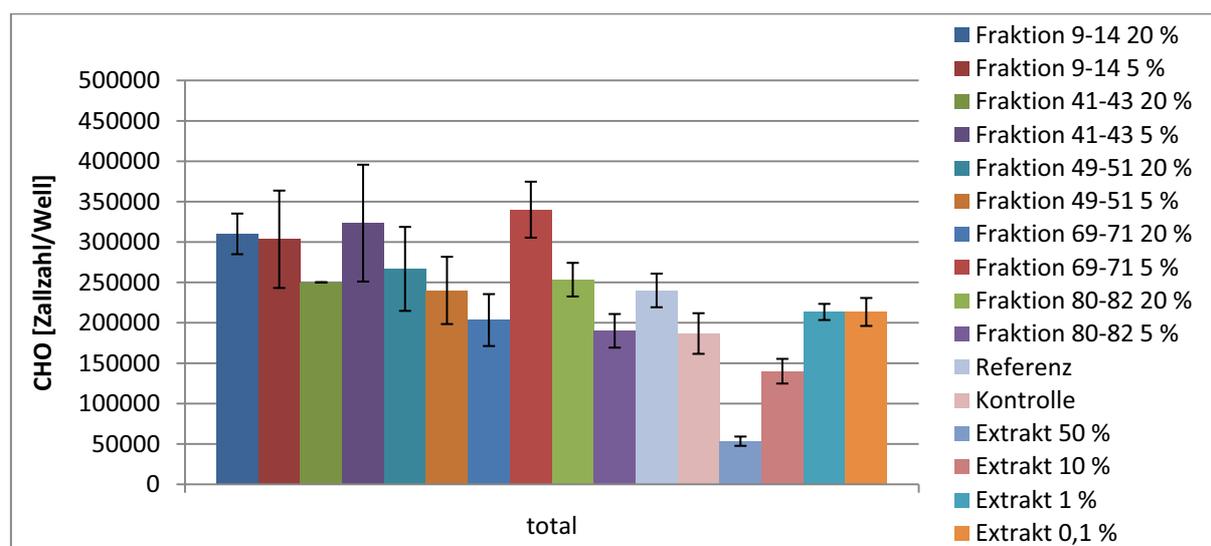
Der Extrakt wurde durch die Inkubation von 1 g des frischen Ingwers mit 1 ml Ham's F-12 Medium über Nacht hergestellt und sterilfiltriert (siehe Kapitel 2.4). Es wurden 1,5 ml dieses Extraktes auf die Säule aufgetragen. Der Laufpuffer (Ham's F12) durchlief die Säule während der Elution mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,8 ml/ min und das Eluat wurde in 2 ml-Fractionen gesammelt.



**Abbildung 3.8: Einfluss ausgewählter Peak-Fractionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss von 5 % bzw. 20 % verschiedener Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von frischem Ingwer. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen der Fraktionen, sowie in FKS-haltiges (Referenz) bzw. FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Außerdem wurden verschiedene Konzentrationen des Ingwerextraktes, welcher auf die Säule gegeben wurde, parallel getestet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die totalen Zellzahlen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

Der Effekt der chromatographischen Fraktionen des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation der HeLa-Zellen wird in Abbildung 3.8 dargestellt. Wie bereits bei den Fraktionen des Extraktes von getrocknetem Ingwer hat auch hier keine der Fraktionen einen auffällig starken Einfluss auf die Proliferation der HeLa-Zellen - unabhängig davon, ob eine Konzentration von 5 % oder 20 % eingesetzt wurde. Einige Fraktionen weisen leicht stimulierende, andere leicht inhibierende Effekte auf. Den mit 29 % stärksten stimulierenden Effekt im Vergleich mit dem Kontrollwert weisen die Fraktionen 9-14 bei einer Konzentration von 5 % auf. Den mit 22 % stärksten inhibierenden Effekt, verglichen mit dem Kontrollwert, zeigen die Fraktionen 80-82 bei einer Konzentration von 5 %. Dieser Effekt ist jedoch nicht mit dem Extrakt des frischen Ingwers vor der Aufreinigung vergleichbar, welcher mit zunehmender Konzentration eine immer stärker werdende inhibierende Wirkung aufweist und bei 10 % Extraktkonzentration bereits eine Reduktion der Proliferation um 50%, verglichen mit dem Kontrollwert, zeigt. Bei einer Konzentration von 50 % des Extraktes von frischem Ingwer wird die Proliferation der Zellen, verglichen mit dem Kontrollwert, um 75 % reduziert. Wird jedoch eine Konzentration von 0,1 % eingesetzt, ist der Wert dem Kontrollwert sehr ähnlich.



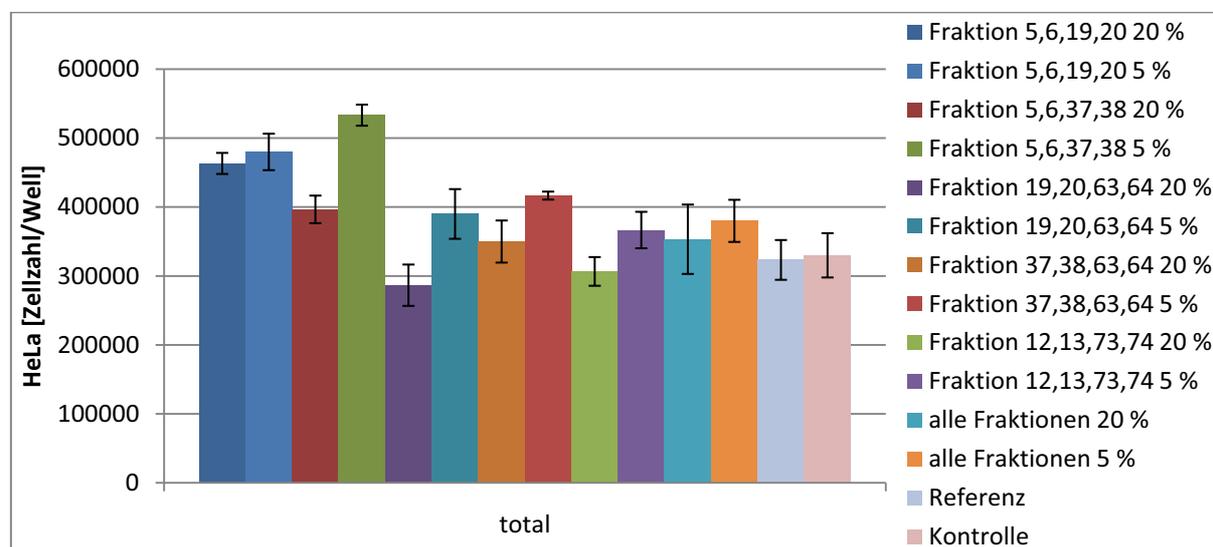
**Abbildung 3.9: Einfluss ausgewählter Peak-Fractionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von CHO-Zellen unter Einfluss von 5 % bzw. 20 % verschiedener Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von frischem Ingwer. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $1 \times 10^5$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen der Fraktionen, sowie in FKS-haltiges (Referenz) bzw. FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Außerdem wurden verschiedene Konzentrationen des Ingwerextraktes, welcher auf die Säule gegeben wurde, parallel getestet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die totalen Zellzahlen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

Die Fraktionen des Extraktes von frischem Ingwer weisen keine nennenswerte inhibierende Wirkung auf die CHO-Zellen auf, wie Abbildung 3.9. zeigt. Stattdessen sind vor allem bei den Fraktionen 69-71 bei einer Konzentration von 5 % starke stimulierende Effekte zu erkennen. Die Zellzahl der Referenz ist um etwa 30 % geringer als die Zellzahl der Fraktionen 69-71. Der Einfluss vom Extrakt des frischen Ingwers ist mit steigender Konzentration zunehmend inhibierend. Während beim Einsatz einer Konzentration von 0,1 % bzw. 1 % des Extraktes von frischem Ingwer ein leicht stimulierender Effekt zu erkennen ist, zeigt sich bei einer Konzentration von 10 % bereits ein inhibierender Effekt (25 %), der beim Einsatz einer Konzentration von 50 % deutlich verstärkt auftritt (71 %).

Wie bereits bei der Proliferationsanalyse des Extraktes von frischem Ingwer (siehe Abbildung 3.3 und 3.4) beobachtet, werden auch in diesem Versuch die HeLa-Zellen deutlich stärker inhibiert als die CHO-Zellen.

### 3.2.3 Einfluss vereinigter Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer



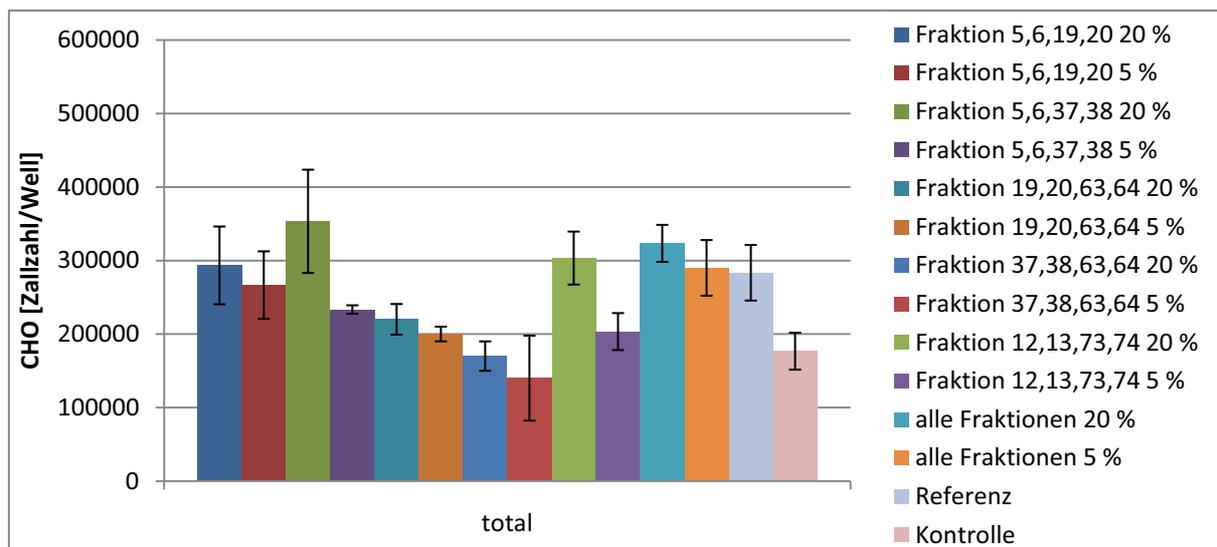
**Abbildung 3.10: Einfluss vereinigter Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss von 5 % bzw. 20 % verschiedener vereinigter Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen der Fraktionen, sowie in FKS-haltiges (Referenz) bzw. FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die totalen Zellzahlen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

In den oben beschriebenen Größenausschlusschromatographien konnte der inhibierende Faktor des Ingwerextraktes nicht separiert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der inhibierende Effekt nur von Komponenten mehrerer Faktoren gemeinsam hervorgerufen werden kann. Daher wurden die Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer in verschiedenen Kombinationen vereinigt, um sich eventuell verstärkende Effekte zu identifizieren.

Die getesteten kombinierten Fraktionen zeigen keinen signifikant stärker inhibierenden Effekt auf die Proliferation der HeLa-Zellen (siehe Abbildung 3.10) als die einzelnen Fraktionen. Fast alle vereinigten Fraktionen stimulieren sogar die Proliferation der HeLa-Zellen. Die Fraktionen 5, 6, 37 und 38 weisen bei einer

Konzentration von 5 % sogar einen mit 62 % sehr starken stimulierenden Effekt auf im Vergleich zum Kontrollwert auf. Die Fraktionen 5, 6, 19 und 20 zeigen ebenfalls bei beiden Konzentrationen einen mit 40 % bzw. 45 % starken stimulierenden Effekt, verglichen mit der Kontrolle.



**Abbildung 3.11: Einfluss vereinigter Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen**

Dargestellt ist der Vergleich der Proliferation von CHO-Zellen unter Einfluss von 5 % bzw. 20 % verschiedener vereinigter Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie des getrockneten Ingwerextraktes. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte:  $1 \times 10^5$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen der Fraktionen, sowie in FKS-haltiges (Referenz) bzw. FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Doppelwerte dar. Nach 48 h Inkubation wurden die totalen Zellzahlen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

Abbildung 3.11 stellt den Einfluss der vereinigten Fraktionen des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen dar. Die Fraktionen 5,6,37 und 38 zeigen bei einer Konzentration von 20 % eine stimulierende Wirkung. Die Proliferation dieser Fraktionen, im Vergleich zu Kontrolle, ist um 99 % stimuliert worden. Bei den Fraktionen 5, 6, 19 und 20 sind beide Konzentrationen wachstumsfördernd. Dieses Ergebnis ähnelt dem der HeLa-Zellen (siehe Abbildung 3.10). Lediglich mit den Fraktionen 37, 38, 63 und 64 wurde ein inhibierender Effekt auf die Proliferation von CHO-Zellen ausgelöst. Dieser ist jedoch relativ gering.

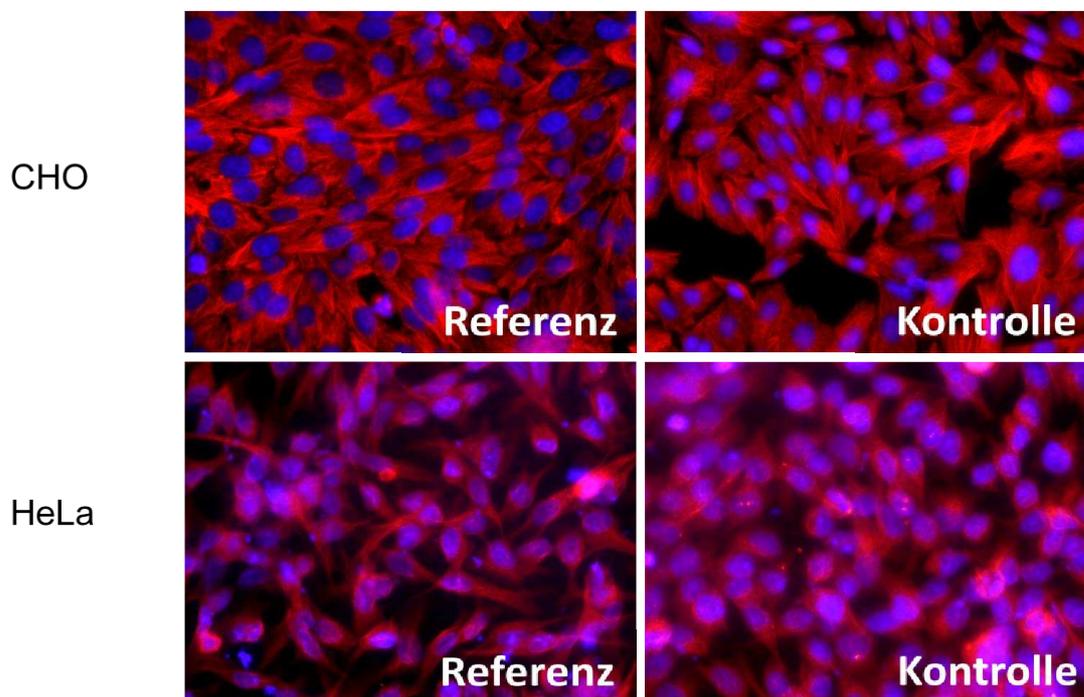
Es konnte also bei beiden Zelllinien kein verstärkter inhibierender Effekt durch das Vereinigen der Fraktionen gefunden werden. Vielmehr wurden offenbar die stimulatorischen Effekte durch die Kombination verstärkt. Möglicherweise wurde die Kombination, die diesen inhibierenden Effekt verursacht, nicht getestet.

### **3.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse**

Nachdem die inhibierende Wirkung des Ingwerextraktes, wie in Kapitel 3.1 und 3.2 beschrieben, nachgewiesen wurde, sollten die zellulären Ursachen, insbesondere in Bezug auf das Cytoskelett, näher untersucht werden. Dazu wurde eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt, um den Einfluss der Ingwerextrakte auf das Tubulin- und das Aktengerüst, den Zellzyklus und die Morphologie der Zellen zu analysieren.

#### **3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse des Mikrotubuligerüsts in CHO- und HeLa-Zellen nach Inkubation mit Extrakten des frischen Ingwers**

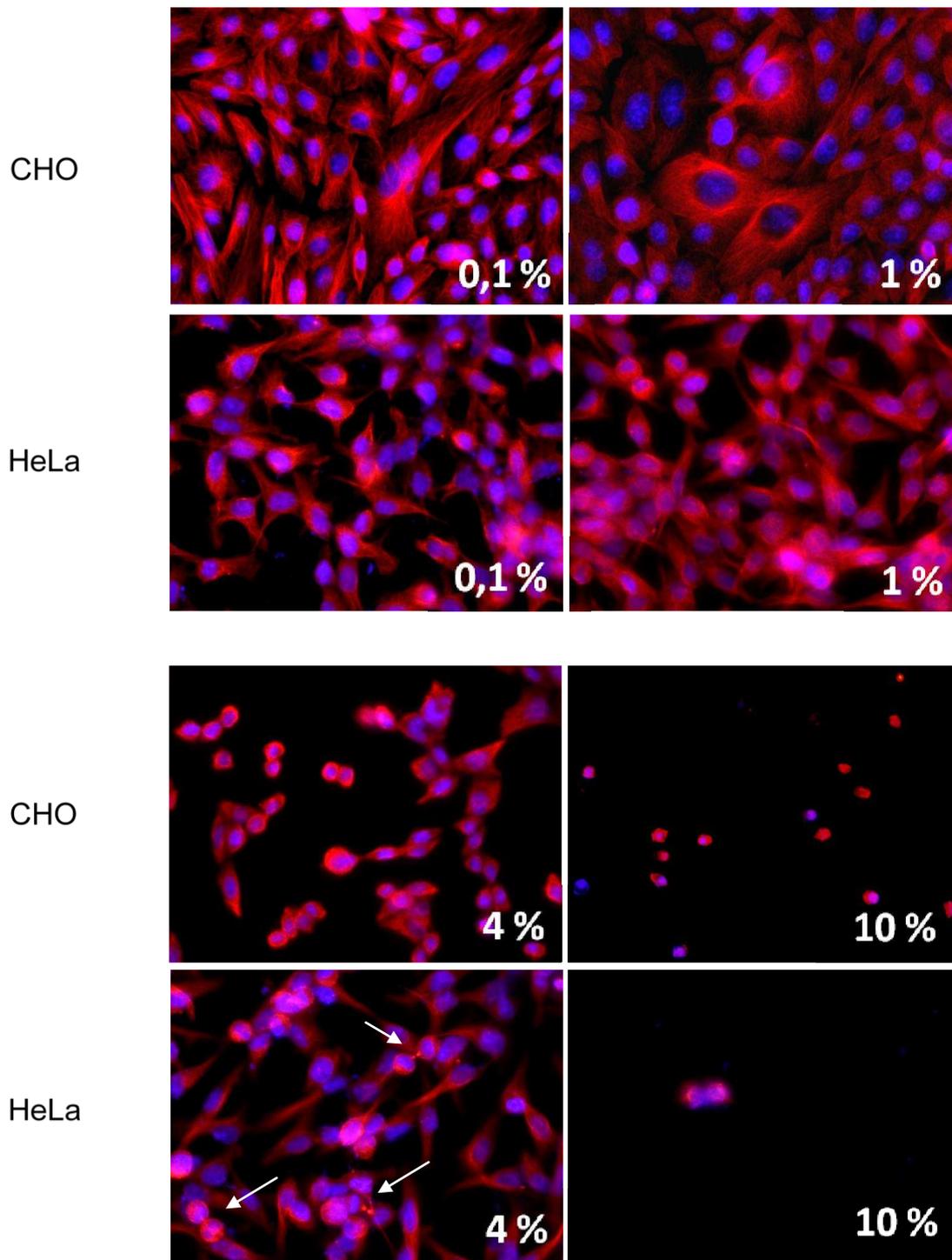
Im Rahmen der indirekten Immunfluoreszenzanalyse wurde die Zellkerne blau und die Tubuline rot angefärbt. Dazu wurden Zellen auf Deckgläschen in 24-Well-Platten angezogen und mit dem Extrakt von frischem Ingwer für 48 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und mittels Antikörpern angefärbt (siehe Kapitel 2.8).



**Abbildung 3.12: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen in FKS-haltigem bzw. FKS-freiem Medium**

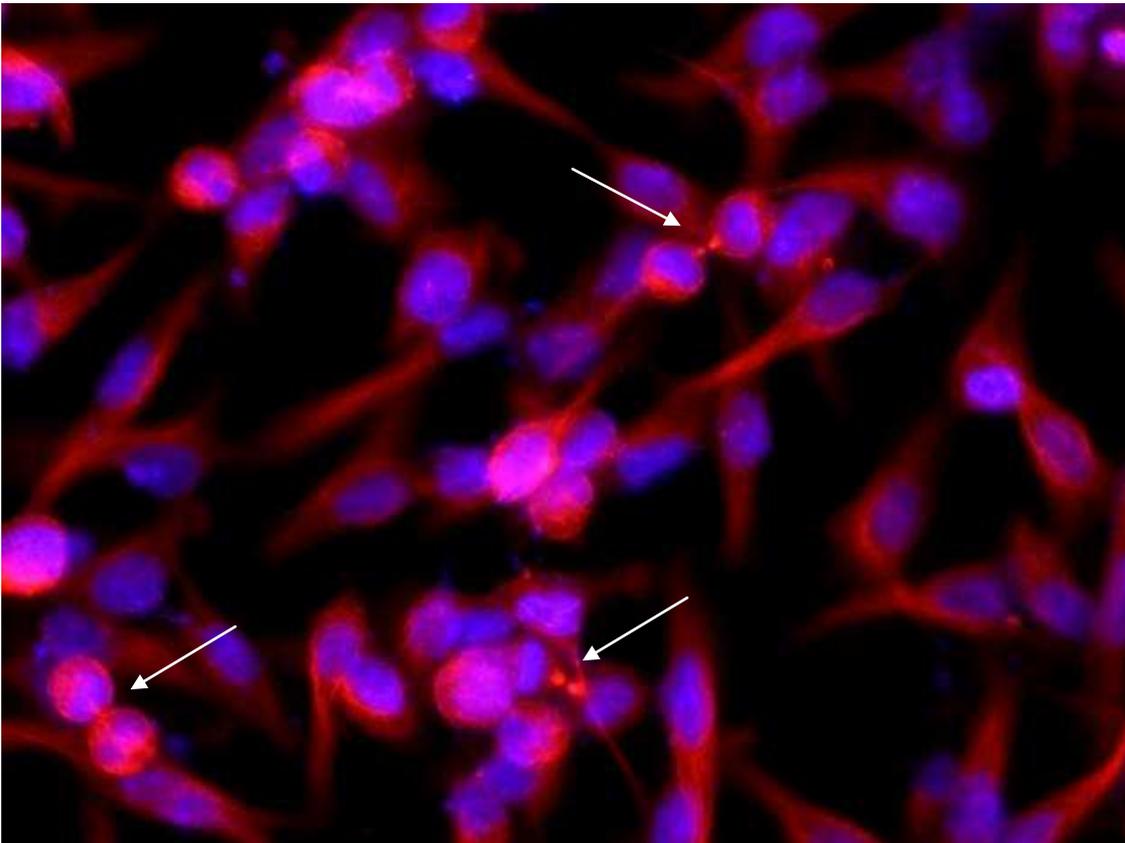
Dargestellt ist der Einfluss von Kulturmedien mit FKS (Referenz) und ohne FKS (Kontrolle) auf CHO- und HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte CHO:  $1 \times 10^5$ , Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in entsprechendes Medium überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Tubulin (1:100) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die hier abgebildeten Zellen sind 400x vergrößert.

Um Aussagen über den Zustand der Zellen treffen zu können, die dem Einfluss des Ingwers nicht ausgesetzt sind, wurden eine Kontroll- (ohne FKS) und eine Referenzkultur (mit FKS) angelegt. Diese stellen die Standardsituation für die Kultur von Zellen in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von wachstumsförderndem Serum dar. Die Immunfluoreszenzanalyse zeigt für beide Zelllinien dicht gewachsene Zellen, die fest an dem Untergrund haften. Die CHO-Zellen liegen, wie für diese Zellen typisch, flach ausgebreitet und besitzen ein wohl geordnetes Mikrotubuligerüst. Die HeLa-Zellen sind hingegen etwas abgerundeter, ihr Mikrotubuligerüst ist, wie für diese Zelllinie charakteristisch, chaotischer strukturiert. Sich gerade in Mitose befindliche Zellen sind bei beiden Zelllinien sehr selten und in diesen Ausschnitten gar nicht zu sehen.



**Abbildung 3.13: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer**

Dargestellt ist der Einfluss von 0,1 % bis 10 % des Extraktes von frischem Ingwer auf CHO- und HeLa Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte CHO:  $1 \times 10^5$ , Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen des Ingwerextraktes überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Tubulin (1:100) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die hier abgebildeten Zellen sind 400x vergrößert.



**Abbildung 3.14: Vergrößerte Darstellung aus Abb. 3.13 der indirekten Immunfluoreszenzanalyse von HeLa-Zellen unter Einfluss von 4 % frischem Ingwerextrakt**

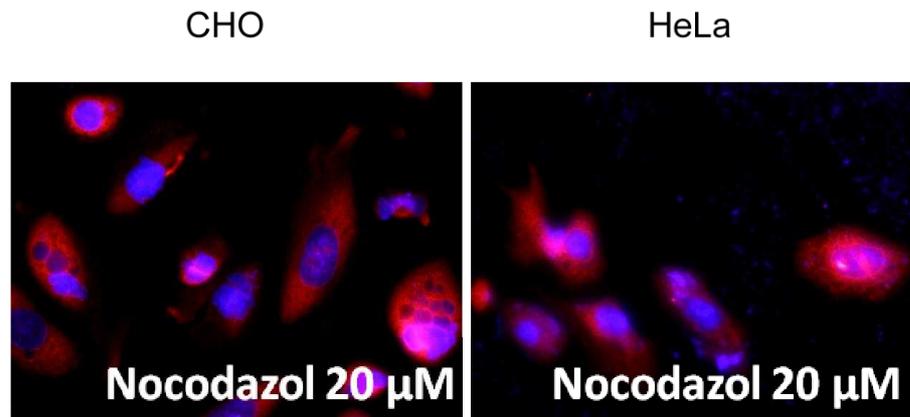
Diese Abbildung zeigt eine vergrößerte Darstellung des Einflusses von 4 % des Extraktes vom frischen Ingwer auf HeLa Zellen (aus Abb.3.13). Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen des Ingwerextraktes überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Tubulin (1:100) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt.

Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzanalyse für HeLa- und CHO-Zellen, die mit einer Extraktkonzentration von 0,1 % bis 10 % behandelt wurden. Die Zellen wurden in vierhundertfacher Vergrößerung aufgenommen.

Sowohl beim Einsatz einer Konzentration von 0,1 % als auch beim Einsatz einer Konzentration von 1 % des Ingwerextraktes zeigen die CHO-Zellen keine Auffälligkeiten. Die Zellen haben sich ausgebreitet und die Mikrotubuli erstrecken sich in geordneten Strukturen von den Mikrotubuliorganisationszentren, welche als verdichteter Punkt neben den Zellkernen zu erkennen sind, in die Zellperipherie.

Auch die HeLa-Zellen zeigen sich bei 0,1 % des Extraktes von frischem Ingwer weitestgehend unbeeinflusst. Die Zellkerne weisen keine morphologischen Veränderungen auf und die Mikrotubuli haben einen geordneten Aufbau. Es scheint aber, als ob die Mikrotubuli unter dem Einfluss von einer Konzentration von 1 % des Ingwerextraktes bereits etwas diffuser angeordnet und sich nicht mehr so weit in die Zellperipherie ausbreiten bzw. die Zellen sich nicht mehr abrunden. Dies erschwert die Fokussierung der Zellen, da die HeLa-Zellen nicht planar, also auf einer Ebene, wachsen.

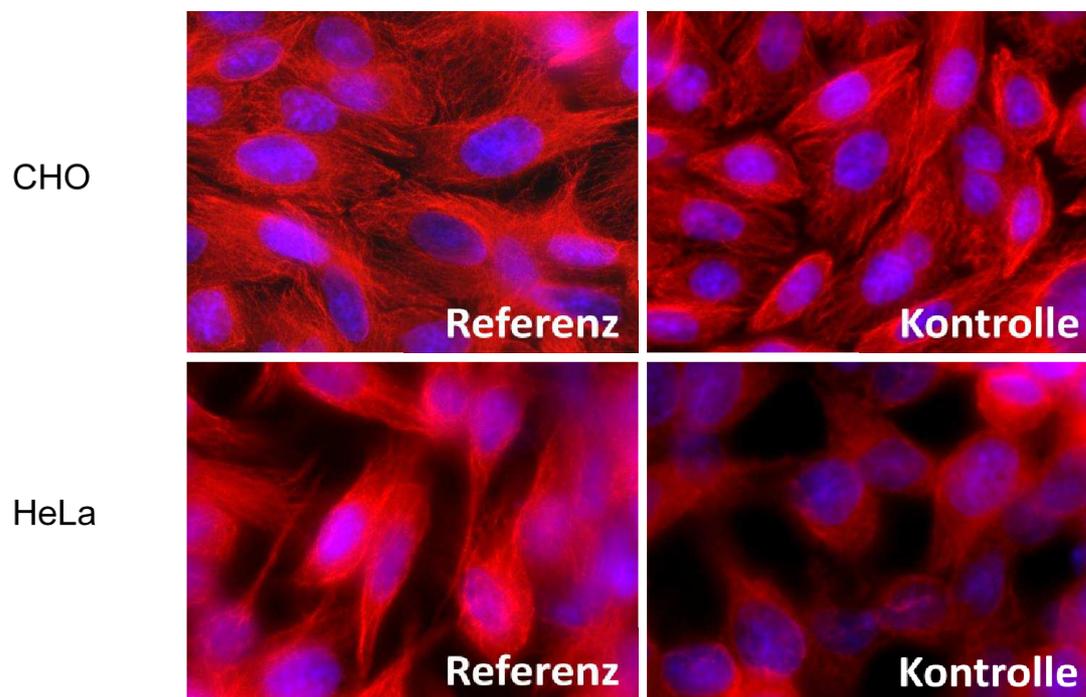
Bei höheren Konzentrationen hingegen zeigen beide Zelllinien eine deutliche Beeinflussung durch den Ingwer. Unter dem Einsatz von 4 % des Ingwerextraktes ist ein sehr heterogenes Bild der Zellen zu sehen. Bei beiden Zelllinien gibt es einerseits Zellen, die bereits stark abgerundet sind, jedoch auch noch Zellen, deren Mikrotubuligerüst noch relativ intakt aussieht, auch wenn ihre Struktur nicht mehr so geordnet ist wie in Kontrollzellen. Auffällig ist, dass sich bei 4 % Extraktkonzentration die Zellen oftmals paarweise gegenüberliegen. Insbesondere bei den HeLa-Zellen sind allein in diesem Bildausschnitt drei Zellpaare zu erkennen, die sich anscheinend an einem ähnlichen Punkt in der Zellteilung befinden (siehe Abbildung 3.14). Dies deutet darauf hin, dass die Zellen nicht in der Lage sind, den Zellzyklus vollständig zu durchlaufen und zu beenden. Die Zellkerne haben sich zwar bereits gebildet, jedoch können die Zellen sich offensichtlich nicht vollständig voneinander abschnüren. Die weiterhin bestehenden Tubulin-haltigen Verbindungen zwischen den Zellen sind deutlich zu sehen. Sie zeigen sich als dichte, dreieckförmige Strukturen, die zwischen den Zellen symmetrisch angeordnet sind. Da sich alle diese Zellpaare gerade im Stadium der Zellteilung befinden, ist es wahrscheinlich, dass die Zellen in dieser Phase des Zellzyklus stoppen. Unter dem Einfluss von 10 % der Extraktkonzentration zeigt sich sowohl bei HeLa- als auch bei CHO-Zellen eine starke Wachstumsinhibition. Während bei den HeLa-Zellen nur noch vereinzelt Zellen zu finden sind, sind bei den CHO-Zellen noch deutlich mehr Zellen vorhanden. Jedoch sind bei beiden Zelllinien die Zellen stark geschrumpft und abgerundet, das Mikrotubuligerüst zeigt sich sehr diffus.



**Abbildung 3.15: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen nach Inkubation mit 20 µM Nocodazol**

Dargestellt ist der Einfluss von 20 µM Nocodazol auf CHO- (links) und HeLa-Zellen (rechts). Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte CHO:  $1 \times 10^5$ , Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit 20 µM Nocodazol überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Tubulin (1:100) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die hier abgebildeten Zellen sind 400x vergrößert.

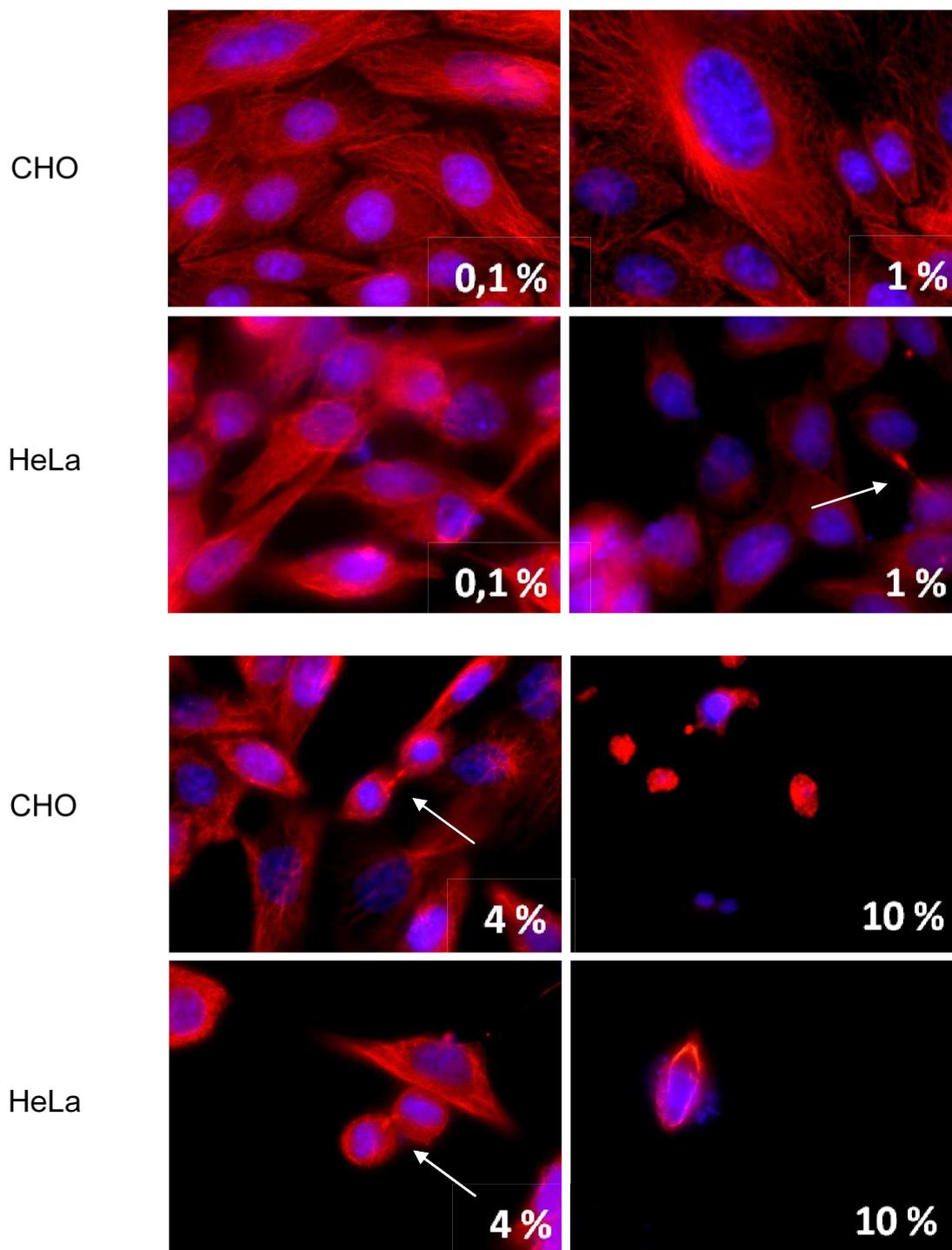
Um den Effekt des Ingwerextraktes mit dem einer anderen pflanzlichen Droge zu vergleichen, die auf Mikrotubuli einwirkt und in der Krebstherapie eingesetzt wird, wurden wie in Abbildung 3.15 dargestellt Zellen mit Nocodazol behandelt. Nocodazol zerstört die Struktur der Mikrotubuli in Zellen [DeBrabander *et al.*, 1978]. Sowohl die CHO-Zellen (links), als auch die HeLa-Zellen (rechts) befinden sich nach 48 h Inkubation alle in der Apoptose. Die geordnete Mikrotubulstruktur ist komplett zerstört und der Zellkern wird in kleine Vesikel fragmentiert. Es gibt keine Zellen mit einem ausgebildeten Spindelapparat, weshalb auch keine Zellteilung zu beobachten ist.



**Abbildung 3.16: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen nach Inkubation mit FKS-haltigem bzw. FKS-freiem Medium**

Dargestellt ist der Einfluss von Kulturmedium mit FKS (Referenz) und ohne FKS (Kontrolle) auf CHO- und HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte CHO:  $1 \times 10^5$ , Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in entsprechendes Medium überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Tubulin (1:100) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die hier abgebildeten Zellen sind 1000x vergrößert.

Die Analyse der Referenzen und Kontrollen beider Zelllinien weisen in Abbildung 3.16, analog zu Abbildung 3.12, eine geordnete und weit ausgebreitete Tubulinfilamentstruktur auf.



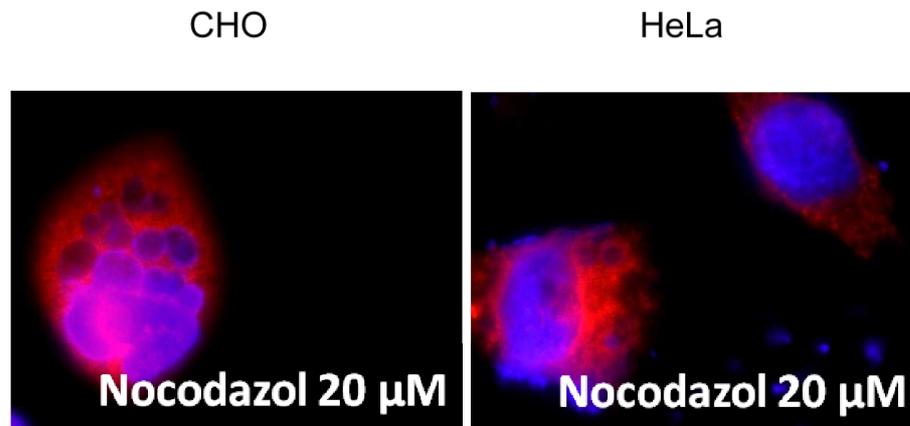
**Abbildung 3.17: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer**

Dargestellt ist der Einfluss von 1 % bis 10 % des Extraktes von frischem Ingwer auf CHO- und HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte CHO:  $1 \times 10^5$ , Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit entsprechenden Konzentrationen des Ingwerextraktes überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Tubulin (1:100) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die hier abgebildeten Zellen sind 1000x vergrößert.

In Abbildung 3.17 ist der Einfluss von 0,1 % bis 10 % Extraktkonzentration auf die Zellstrukturen bei eintausendfacher Vergrößerung zu sehen. Wie bereits bei der vierhundertfachen Vergrößerung scheint eine Konzentration von 0,1 % bzw. 1 % des Ingwerextraktes bei den CHO-Zellen keine sichtbare Wirkung zu entfalten; die Mikrotubuli sind optimal ausgedehnt und wohl geordnet. Bei den HeLa-Zellen sind die Mikrotubuli und Zellkerne bei 0,1 % Ingwerextrakt ebenfalls nicht beeinträchtigt, während bei einer Konzentration von 1 % die Tubulinfilamentstruktur bereits diffuser ist und auch schon Zellen zu finden sind, die in demselben Stadium des Zellzyklus arretieren, wie bei vierhundertfacher Vergrößerung (siehe Abbildung 3.13) unter dem Einfluss von 4 % des Ingwerextraktes.

Wird eine Konzentration von 4 % des Ingwerextraktes auf die Zellen gegeben, sind bei beiden Zelllinien sowohl normale Zellen zu beobachten als auch viele Zellen, die den Zellzyklus nicht mehr vollständig durchlaufen können.

Analog zur vierhundertfachen Vergrößerung ist auch hier deutlich zu sehen, dass die Zellen beider Zelllinien unter dem Einfluss von 10 % des Ingwerextraktes sehr stark beeinträchtigt werden.



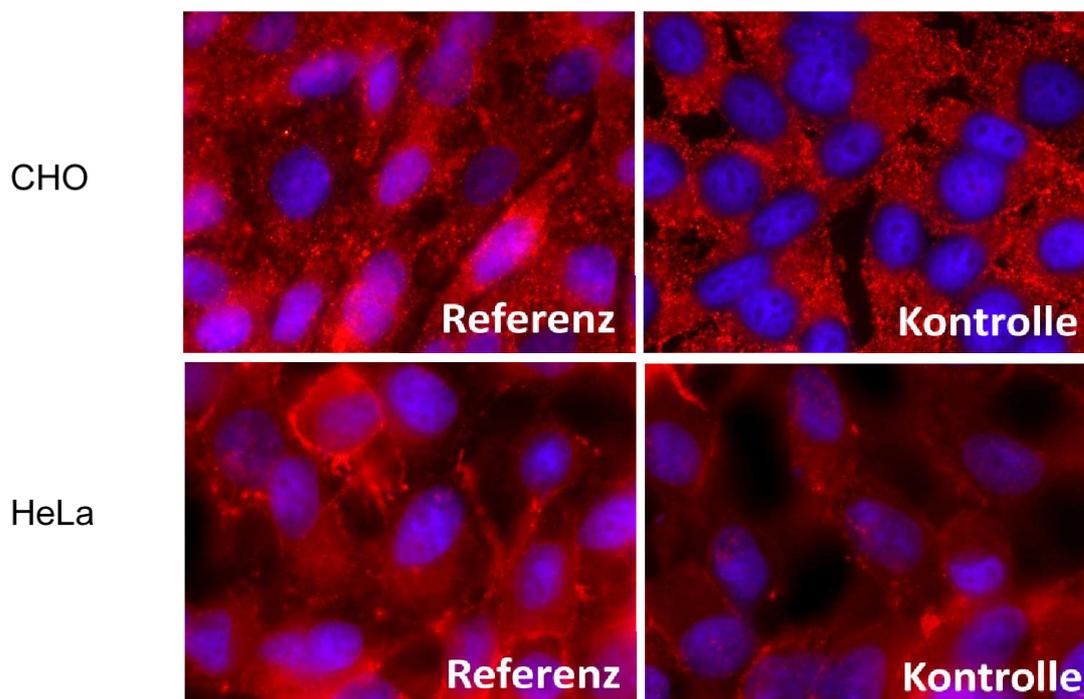
**Abbildung 3.18: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen in Gegenwart von 20 µM Nocodazol**

Dargestellt ist der Einfluss von 20 µM Nocodazol auf CHO- (links) und HeLa-Zellen (rechts). Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte CHO:  $1 \times 10^5$ , Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in FKS-freies Medium mit der entsprechenden Konzentration des Nocodazols überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Tubulin (1:100) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die hier abgebildeten Zellen sind 1000x vergrößert.

Abbildung 3.18 zeigt die mit Nocodazol behandelten Zellen in eintausendfacher Vergrößerung. Sowohl die CHO-Zellen (links) als auch die HeLa-Zellen (rechts) befinden sich in einem sehr schlechten Zustand. Sie sind abgerundet, das Mikrotubuligerüst ist depolymerisiert und apoptotische Versikel mit und ohne Kernmaterial sind deutlich sichtbar.

### **3.3.2 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse des Aktingerüsts in CHO- und HeLa-Zellen in Gegenwart von Extrakten des frischen Ingwers**

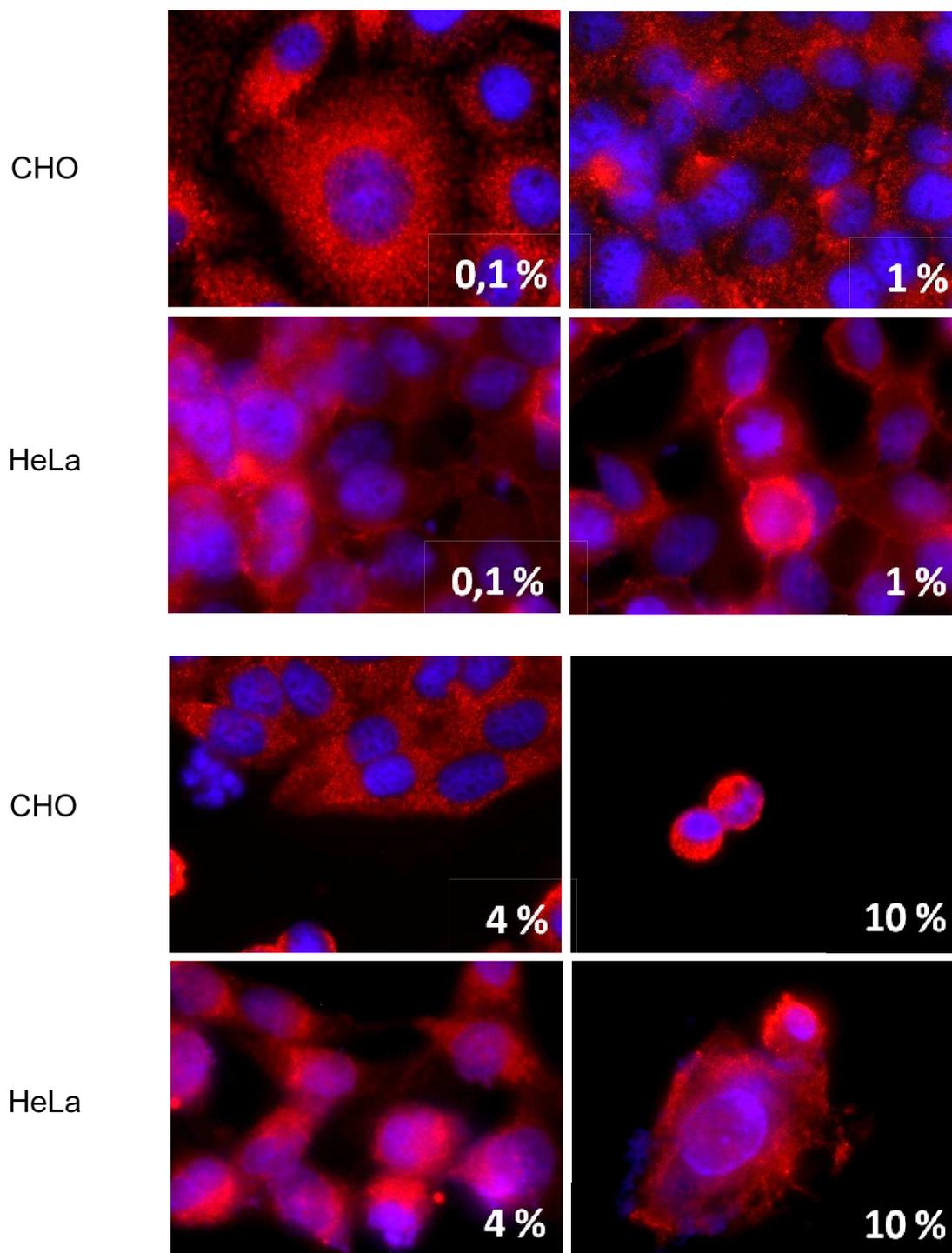
Um eventuelle weitere Effekte auf den Zellzyklus und die Morphologie zu entdecken, wurde zusätzlich eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt, in welcher das Aktinskelett angefärbt wurde. Während der Cytokinese bildet die Zelle eine Teilungsfurche. Diese besitzt auf der cytoplasmatischen Seite einen kontraktilen Ring aus Aktinfilamenten und Myosinmolekülen, welche auch beispielsweise für die Muskelkontraktion verantwortlich sind [Campbell & Reece, 2009]. In der indirekten Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellkerne blau gefärbt und Aktin rot.



**Abbildung 3.19: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen in Gegenwart von FKS-haltigem und FKS-freiem Medium**

Dargestellt ist der Einfluss von Kulturmedium mit FKS (Referenz) und ohne FKS (Kontrolle) auf CHO- und HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte CHO:  $1 \times 10^5$ , Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in entsprechendes Medium überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Aktin (1:200) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die hier abgebildeten Zellen sind 1000x vergrößert.

Sowohl Referenz als auch Kontrolle der CHO-Zellen zeigen die typische punktförmige, selten filamentöse Färbung von Aktin. Bei HeLa-Zellen ist dies auch zu erkennen, jedoch wie zuvor bei der Tubulinfärbung weniger deutlich und insgesamt diffuser.



**Abbildung 3.20: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer**

Dargestellt ist der Einfluss von 0,1 % bis 10 % des Extraktes von frischem Ingwer auf CHO- und HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte CHO:  $1 \times 10^5$ , Aussaatdichte HeLa:  $8 \times 10^4$ ) in Medium mit entsprechenden Konzentrationen des Ingwerextraktes überführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Methanolfixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus  $\alpha$ -Aktin (1:200) und als Sekundärantikörper  $\alpha$ -Maus Cy3 (1:500) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff DAPI gefärbt. Die hier abgebildeten Zellen sind 1000x vergrößert.

Abbildung 3.20 zeigt die Aktinfilamente und die Zellkerne unter dem Einfluss von 0,1 % bis 10 % der Extraktkonzentration. Beide Zelllinien weisen hier bis zu einer Konzentration von 1 % im Vergleich zur Referenz und Kontrolle keine Besonderheiten auf. Die Zellen sind von normaler Größe und Form.

Wird jedoch eine Konzentration von 4 % des Ingwerextraktes eingesetzt, runden sich die HeLa-Zellen ab und die Aktinfilamente erscheinen unstrukturierter und auf engem Raum konzentriert. Bei einem Einsatz von einer Konzentration von 10 % des Ingwerextraktes zeigen beide Zelllinien diese Effekte in verstärkter Form. Insbesondere die HeLa-Zellen zeigen sehr diffuse Aktinfilamente und lokale Konzentrierungen des Signals. Die Zelldichte ist bei beiden Zelllinien stark reduziert.

## 4. Diskussion

Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird die Proliferation von Säugetierzellen durch Ingwer inhibiert. Hierbei sind Unterschiede bei der Empfindlichkeit der untersuchten Zelllinien zu verzeichnen. Die Tumorzelllinie HeLa wird deutlich stärker in ihrem Wachstum gehemmt als die Nicht-Tumorzelllinie CHO. Der inhibierende Faktor konnte durch die chromatographische Auftrennung des Extraktes nicht identifiziert werden. Jedoch wurde mittels der Methode der indirekten Immunfluoreszenzanalyse ein durch Ingwer induzierter Zellzyklusarrest beobachtet.

### 4.1 Proliferationsanalysen

Bei den Proliferationsanalysen (siehe Abbildungen 3.1 bis 3.4) wird deutlich, dass sowohl bei der Proliferation der HeLa-Zellen als auch der CHO-Zellen ein mit der Konzentration des Ingwerextraktes steigender inhibierender Effekt eintritt. Eine wachstumshemmende Wirkung auf Tumorzellen wurde bereits bei diversen Extrakten aus Früchten und Gemüsen nachgewiesen [Liu, 2003]. Die Stärke des inhibierenden Effektes und die Abhängigkeit von der Konzentration sind für die Extrakte von getrocknetem und frischem Ingwer unterschiedlich.

Der inhibierende Einfluss des Extraktes von getrocknetem und von frischem Ingwer ist bei den HeLa-Zellen bereits bei einer Konzentration von 1 % erkennbar und steigt mit zunehmender Konzentration (siehe Abbildung 3.1 und Abbildung 3.3). Je mehr Extrakt eingesetzt wird, desto stärker wird die Proliferation der Zellen inhibiert. Die Stärke der Inhibition ist bei gleicher Konzentration des Extraktes beim getrockneten Ingwer jedoch deutlich größer. Obwohl bei der Herstellung der Extrakte die Trocken- und Feuchtgewichte berücksichtigt wurden, sind unterschiedlich eingesetzte Gewebemengen nicht ganz auszuschließen. Darüber hinaus wären eine Aktivierung des Faktors durch den Trocknungsprozess und Unterschiede in den Qualitäten der Ingwerproben denkbar. Auch könnte dies bedeuten, dass der für die Inhibition verantwortliche Faktor bei der Extraktion aus frischem Ingwer in geringeren Mengen extrahiert wird als bei der Extraktion aus getrocknetem Ingwer.

Es sind jedoch auch stimulierende Effekte der Ingwerextrakte auf die Proliferation beider Zelllinien zu verzeichnen. Werden nur sehr geringe Konzentrationen von etwa 0,1 % eingesetzt, liegt die Zellzahl deutlich über der Kontrolle, erreicht aber nicht die mit dem stark wachstumsfördernden FKS versetzte Referenz (siehe Abbildungen 3.1 bis 3.4). Der zusätzlich vorhandene inhibierende Faktor kann bei diesen geringen Konzentrationen offensichtlich seine Wirkung nicht entfalten. Die stimulierenden Effekte, die hier bereits Wirkung zeigen, werden bei höheren Konzentrationen wahrscheinlich vom inhibierenden Effekt überlagert, sodass ihre Wirkung dort nicht mehr zu beobachten ist.

Für Ingwerextrakte wurden bereits zuvor wachstumshemmende und Apoptose-induzierende Effekte bei HeLa-Zellen und A549-Zellen (Lungenkrebszellen) beschrieben [Choudhury et al., 2010]. Jedoch wurde dabei eine deutlich aufwendigere Aufreinigungs- und Anreicherungsprozedur angewandt und kein Vergleich zu einer Nicht-Tumorzelllinie durchgeführt. Die HeLa-Zellen reagieren in den Proliferationsanalysen in dieser Arbeit sehr viel sensitiver auf die Zugabe von Ingwerextrakten als die CHO-Zellen (vgl. Abbildungen 3.1 mit 3.2 und 3.3 mit 3.4). Diese Tatsache lässt sich durch das schnellere Wachstum und die häufigeren Zellteilungen der HeLa-Zellen verglichen mit CHO-Zellen erklären. Wird der Zellzyklus an einer Stelle behindert, so ist die Zelllinie, die den Zellzyklus öfter durchläuft, auch stärker beeinträchtigt.

Es stellt sich die Frage, was die inhibierenden Faktoren im Ingwer sein könnten. Ingwer enthält viele Polyphenole, welche wiederum zu 80 % aus Flavonoiden bestehen [Khan et al., 2007]. Polyphenolische Verbindungen sind für ihre antimitotische Wirkung bekannt [Lee et al., 2007]. Es ist daher wahrscheinlich, dass in den Extrakten aus getrocknetem und frischem Ingwer Polyphenole enthalten sind, die für die Inhibition der Proliferation in den hier durchgeführten Analysen verantwortlich sind.

Es wurden ebenfalls bereits in vivo-Versuche mit Ingwerextrakten durchgeführt, wobei der Ingwer auch in diesem Fall einer deutlich aufwendigeren Aufreinigung unterzogen wurde. An Prostatakrebs erkrankten Nacktmäusen wurde oral Ingwerextrakt verabreicht. Die Tumore der behandelten Mäuse wiesen einen

reduzierten Proliferationsindex auf, während keine toxische Wirkung auf gesundes Gewebe festgestellt wurde [Karna et al., 2011]. Diese tumorzellspezifische Wirkung kann in dieser Arbeit anhand der durchgeführten in vitro-Versuche für die Proliferation von HeLa-Zellen in einem bestimmten Konzentrationsbereich bestätigt werden. Während die HeLa-Zellen empfindlich auf die Behandlung mit Ingwerextrakten reagieren, weisen die Nicht-Tumorzellen eine weitaus schwächere Inhibition auf.

## 4.2 Größenausschlusschromatographie

Die Proliferationsanalysen zeigen, dass sowohl inhibierende als auch stimulierende Faktoren in den Ingwerextrakten vorhanden sind. Um diese zu separieren, wurden die Extrakte mittels der Größenausschlusschromatographie aufgetrennt.

Die Größenausschlusschromatographie wurde sowohl mit dem Extrakt des getrockneten Ingwers (siehe Abbildungen 3.5, 3.6 und 3.7) als auch mit dem Extrakt des frischen Ingwers (siehe Abbildungen 3.8 und 3.9) durchgeführt. In beiden Fällen konnte keine Fraktion gefunden werden, die einen ähnlich starken inhibierenden Effekt aufwies wie der ursprüngliche Extrakt. Da für die Größenausschlusschromatographie und für die Behandlung der Zellen der identische Extrakt verwendet wurde, steht jedoch fest, dass der inhibierende Faktor im Extrakt vorhanden sein muss.

Polyphenole, die möglicherweise die Ursache der Inhibition sind, sind sehr kleine Moleküle [Lee et al., 2007]. Die Elution der Polyphenole erfolgt daher erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Größenausschlusschromatographie. Infolgedessen waren diese Polyphenole vermutlich nicht in den gesammelten und hier analysierten Fraktionen enthalten. Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie stützen daher die These, dass sehr kleine Moleküle wie Polyphenole für den inhibierenden Effekt der Ingwerextrakte verantwortlich sind.

Es ist jedoch auch möglich, dass die Wirkung im Gesamtextrakt einfach stärker ist als in den aufgetrennten Fraktionen, da in anderen Studien bereits festgestellt wurde, dass die Extrakte von Pflanzen teilweise eine stärkere Wirkung ausüben als die

aufgereinigten Komponenten [Seeram *et al.*, 2004, 2005]. Ursache hierfür könnten Aktivitätsverluste während der Aufreinigung sein.

Möglicherweise kann die inhibierende Wirkung aber auch erst durch die richtige Kombination von Fraktionen hervorgerufen werden. Für die Hemmung könnten mehrere Faktoren verantwortlich sein, die in der Chromatographie auf verschiedene Fraktionen verteilt werden. Deswegen wurden mehrere Fraktionen in verschiedenen Zusammenstellungen vereinigt und auf ihre Effekte getestet (siehe Abbildungen 3.10 und 3.11). Der erhoffte inhibierende Effekt konnte, zumindest in einer mit dem ursprünglichen Extrakt vergleichbaren Weise, in den untersuchten, vereinigten Fraktionen nicht nachgewiesen werden. Dies kann ein Indiz dafür sein, dass, wie zuvor diskutiert, die in späteren und hier nicht getesteten Fraktionen laufenden Polyphenole den inhibierenden Effekt des Ingwerextraktes verursachen.

Die CHO-Zellen wurden von den Fraktionen des getrockneten Ingwers deutlich stärker in ihrer Proliferation beeinträchtigt als die HeLa-Zellen. Dies erscheint zunächst widersprüchlich zu den Ergebnissen der Proliferationsanalysen mit den Gesamtextrakten. Jedoch war der inhibierende Faktor, dessen Effekt im ursprünglichen Extrakt beobachtet werden kann, vermutlich nicht in den Fraktionen enthalten. In den Extrakten sind anscheinend auch andere inhibierende Faktoren enthalten, die jedoch nicht in den Zellzyklus eingreifen. Da Tumorzellen, sofern sie nicht bei der Zellteilung behindert werden, sehr robust sind und auf viele Faktoren gar nicht oder nur geringfügig reagieren, ist die sensitivere Wirkung der CHO-Zellen folgerichtig. Tumorzellen sind darüber hinaus von stimulierenden Faktoren weniger abhängig, die durch die Aufreinigung getrennt wurden und nun eher den CHO-Zellen beim Wachstum fehlen. Dafür spricht auch die höhere FKS-Abhängigkeit der CHO-Zellen im Vergleich von Referenz zu Kontrolle.

### **4.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse**

Die mögliche Wirkungsweise des/r inhibierenden Faktors/Faktoren wurde durch die indirekte Immunfluoreszenzanalyse von Cytoskelettkomponenten untersucht. Das Cytoskelett einer Zelle besteht aus Mikrotubuli, Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten [Campbell & Reece, 2009]. Ausgangspunkt für diese Analyse

war, die Färbung von Tubulin, Aktin und der DNA, wodurch sich die generelle Morphologie der Zellen und ganz besonders ihr Zellzyklus gut beobachten lassen.

Durch die Tubulinfärbung lässt sich zum Einen der inhibierende Effekt des Ingwerextraktes optisch bestätigen, da die Zellzahl beider Zelllinien mit steigender Konzentration des Ingwerextraktes merklich abnimmt. Zum Anderen gibt die Tubulinfärbung Aufschluss über die Wirkungsweise des inhibierenden Faktors. Die Zellteilung kann unter Einfluss des Ingwerextraktes nicht beendet werden. In Abbildung 3.14 sind in einem Bildausschnitt gleich drei Zellpaare zu sehen, welche die Zellteilung nicht beenden können. Dieser Effekt ist auch in Abbildung 3.13 und Abbildung 3.17 zu beobachten. Der Zellzyklus ist zum Zeitpunkt seiner hier beobachteten Arretierung, bereits bis weit in die Mitosephase vorangeschritten. Durch die Färbung der DNA mit dem Kernfarbstoff DAPI ist deutlich zu sehen, dass sich bereits zwei neue Zellkerne gebildet haben und die Chromosomenstruktur sich aufgelockert hat (siehe z.B. Abbildung 3.17). Das heißt, dass die Zelle sich bereits in der Telophase der Mitose befindet (siehe Abbildung 1.2), wenn sie vom inhibierenden Faktor des Ingwerextraktes beim Voranschreiten im Zellzyklus gehindert wird. Ob die komplette Abschnürung der Tochterzellen ausbleibt, ist hier nicht erkennbar. Eindeutig ist jedoch, dass die mitotischen Zellen an dem gleichen spezifischen Abschnitt arretieren. Bekannte pflanzliche Chemotherapeutika wie das Taxol verhindern die Zellteilung bereits in der Metaphase der Mitosephase [Campbell & Reece, 2009]. Chloroformextrakte von Ingwer verursachen bei A549-Zellen (Lungenkrebs) den Zellzyklusarrest in einer anderen Zyklusphase, der G1-Phase [Choudhury et al., 2010]. Dies ist vielleicht damit zu erklären, dass es sich hier um ein Chloroformextrakt und bei A549-Zellen um einen anderen Zelltyp handelt. Der Chloroformextrakt des Ingwers und das Taxol greifen folglich an einem früheren Punkt in den Zellzyklus ein als der in dieser Arbeit beobachtete inhibierende Faktor des Ingwerextraktes auf HeLa-Zellen.

Bei der indirekten Immunfluoreszenzanalyse ist die erhöhte Sensitivität der HeLa-Zellen im Vergleich zu den CHO-Zellen zu beobachten. Während die ersten Zellteilungsschwierigkeiten der HeLa-Zellen schon bei einer Konzentration von 1 % des Ingwerextraktes zu beobachten sind, sind diese bei den CHO-Zellen erst ab einer Konzentration von 4 % zu erkennen (siehe Abbildung 3.17). Dies kann, wie

bereits in Kapitel 4.1. erläutert, durch die höhere Zellteilungsrate der Tumorzelllinie erklärt werden.

Die generelle Morphologie und das Cytoskelett der Zellen verändern sich ebenfalls mit steigender Konzentration des Ingwerextraktes. Die Zellen schrumpfen und runden sich zunehmend ab, bis bei einer Konzentration von 10 % des Ingwerextraktes das Cytoskelett und der Zellkern sehr diffus werden und auch der Zellkern optisch kleiner wirkt (siehe Abbildung 3.13 und 3.17). Diese Zellen sind nicht mehr in der Lage sich zu teilen. Es wurde bereits beschrieben, dass Ingwer die Struktur und die Funktion der Mikrotubuli zerstört [Choudhury et al., 2010]. Die Struktur ist bei den hier beschriebenen Versuchen zwar ebenfalls beeinflusst, jedoch offenbar nicht zerstört und auch die Funktion der Mikrotubuli scheint ebenfalls nicht komplett gestört zu sein, da die Zellen in der Lage sind den Zellzyklus bis zur Telophase zu durchlaufen, was intakte Mikrotubuli voraussetzt. Außerdem sind in den arretierten Zellen eindeutig mit  $\alpha$ -Tubulin gefärbte Strukturen zu erkennen, die an einen Spindelapparat erinnern. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist jedoch nicht möglich, da die Herstellung des Extraktes sehr unterschiedlich durchgeführt wurde.

Um eventuelle Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der Wirkungsweise auf der zellulären Ebene zu erkennen, wurden die gleichen Zelllinien, die mit dem Ingwerextrakt behandelt wurden, auch mit dem Chemotherapeutikum Nocodazol behandelt. Nocodazol zerstört die Struktur der Mikrotubuli in Zellen [DeBrabander et al., 1978]. Das Cytoskelett der Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, ist völlig zerstört (siehe Abbildung 3.15 und 3.18), wohingegen das Cytoskelett auch beim Einsatz einer Konzentration von 4 % des Ingwerextraktes noch weitgehend intakt wirkt (siehe Abbildung 3.17). Die Mikrotubuli sind zwar nicht mehr so strukturiert und wohl angeordnet, jedoch erscheint ihr Aufbau noch intakt. Zellen, die mit Nocodazol behandelt werden, treten typischerweise in die Apoptose ein. Dies ist auch bei den hier mit Nocodazol behandelten Zellen zu beobachten. Der Zellkern wird fragmentiert und bildet bereits bläschenartige Strukturen, die letztendlich von anderen Zellen phagozytiert werden. Im Gegensatz dazu zeigen die mit Ingwerextrakt behandelten Zellen keine apoptotische Reaktion. Nocodazol hat eine anti-mitotische Wirkung, die normalerweise auch Nicht-Tumorzellen angreift. Es wurde jedoch beschrieben, dass

Nocodazol protektive Mechanismen anregt, welche die Nicht-Tumorzellen überleben und die Mitose beenden lassen [Nishiyama et al., 2012]. Dieser Effekt kann in der vorliegenden Arbeit, zumindest für die hier verwendeten Konzentrationen, nicht bestätigt werden, da die CHO-Zellen ebenso wie die Tumorzellen in die Apoptose eintreten. Für Ingwer ist bekannt, dass dieser *in vitro* die Apoptose einleiten kann [Choudhury et al., 2010]. Dies wurde jedoch in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse in dieser Arbeit nicht beobachtet. Hierfür können zum Beispiel die unterschiedliche Extrakt Herstellung und auch der Einsatz von anderen Zellen Ursache sein.

Zusätzlich zur Tubulinfärbung wurde auch eine Aktinfärbung vorgenommen. Im Gegensatz zur Tubulinfärbung konnte der Zellzyklusarrest mit der Aktinfärbung nicht sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 3.20). Mit Extrakten behandelte und unbehandelte Zellen sahen in Bezug auf das Aktinskelett sehr ähnlich aus, ein Einfluss über das Aktingerüst erscheint daher eher unwahrscheinlich.

#### **4.4 Ausblick**

Die Anwendung von Ingwerextrakten als Therapeutikum gegen schnell wachsende Zellen wäre wünschenswert und ist grundsätzlich denkbar. In weiteren Versuchen müsste hierfür zunächst der inhibierende Faktor isoliert und charakterisiert werden. Es müsste zudem der molekulare Mechanismus auf die Zellteilung noch genauer untersucht werden. Beispielsweise wäre zu klären, auf welchen Abschnitt der Telophase die Inhibierung wirkt, welches die Interaktionspartner sind, welche die eventuell betroffene Signalkette ist, wie die Tumorzellspezifität zustande kommt und wie sie sich weiter verbessern lässt. Anschließend könnten die Aufnahmewege in den Organismus und der Effekt auf bestehende Tumore mit *in vivo*-Versuchen untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die stimulierenden und inhibierenden Effekte von pflanzlichen Extrakten auf das Wachstum der Nicht-Tumorzelllinie CHO und der Tumorzelllinie HeLa untersucht. Ziel war es, pflanzliche Komponenten zu finden, die das Wachstum von Zellkulturen fördern bzw. das von Tumorzellen möglichst spezifisch inhibieren. Da in Vorversuchen Ingwer die vielversprechendsten Ergebnisse hervorbrachte, wurden Extrakte von getrocknetem und frischem Ingwer in Bezug auf ihre Wirkung und den zugrunde liegenden zellulären Mechanismus analysiert.

Die stimulierenden und inhibierenden Effekte auf das Wachstum der Zelllinien wurden mittels Proliferationsanalysen untersucht. Bei sehr niedriger Extraktkonzentration zeigte sich ein leicht stimulierender Einfluss auf das Wachstum. Darüber hinaus konnte ein konzentrationsabhängiger, wachstumsinhibierender Effekt beider Ingwerextrakte nachgewiesen werden, wobei dieser bei dem Extrakt aus getrocknetem Ingwer ausgeprägter war. Zusätzlich zeigten die Tumorzellen HeLa eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber den wachstumsinhibierenden Extrakten als die CHO-Zellen.

Zur Trennung der förderlichen und hemmenden Faktoren im Ingwerextrakt wurden Größenausschlusschromatographien durchgeführt und ausgewählte Fraktionen einzeln und in Kombination auf ihren Einfluss auf die Proliferation beider Zelllinien untersucht. Überraschenderweise waren die Effekte der Fraktionen jedoch geringer als die des Ausgangsextraktes. Möglicherweise entgingen die inhibierenden Fraktionen der Analyse oder die Effekte waren instabil oder auf unterschiedliche Fraktionen verteilt.

Um Aufschluss über die zelluläre Wirkungsweise zu erlangen, folgte eine Immunfluoreszenzanalyse von Cytoskelettbestandteilen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der inhibierende Effekt wahrscheinlich durch einen Zellzyklusarrest in der Telophase der Mitose herbeigeführt wird. Dies könnte den stärker inhibierenden Effekt auf HeLa-Tumorzellen erklären, da diese mit ihrer erheblich größeren Zellteilungsrate anfälliger für anti-mitotische Wirkungen sind als CHO-Zellen.

Das Ergebnis dieser Arbeit deutet darauf hin, dass Ingwer anti-mitotische Aktivitäten enthält, auf die Tumorzellen wie HeLa empfindlicher reagieren als die Nicht-Tumorzelllinie CHO. Zukünftige Arbeiten sollten darauf abzielen, die Faktoren zu isolieren und den genauen Wirkmechanismus aufzuklären.

## 6. Literaturverzeichnis

**Alberts, Bruce, Bray, Dennis, Lewis, Julian, Raff, Martin, Roerts, Keith und Watson, James D. 1994.** *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Inc.

**Boxberger, Hans Jürgen. 2007.** *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken*. Weinheim: Wiley-VCH

**Campbell, Neil A., Reece, Jane B. 2009.** *Biologie (8. Auflage.)*. München: Pearson Studium

**Celis, Julio E. 2006.** *Cell Biology- A Laboratory Handbook Volume 1(3. Auflage)*. Elsevier Academic Press

**Choudhury, Diptiman, Das, Amlan, Bhattacharya, Abhijit und Chakrabarti, Gopal. 2010.** *Aqueous extract of ginger shows antiproliferative activity through disruption of microtubule network of cancer cells*. Elsevier Ltd

**Cooke, D., Steward, WP, Gescher, AJ und Marcylo, T. 2005.** *Anthocyanins from fruits and vegetables - does bright colour signal cancer chemopreventive activity?* Eur J Cancer

**DeBrabander, M.J., Van de Viere, R.M.L., Aerts, F.E.M., Borgers, M. und Janssen, P.A. 1978.** *The effects of nocodazole, a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro*. Cancer Res

**Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften [www.drze.de](http://www.drze.de)**  
eingesehen am 18.06.2012

**Gronau, Thomas. 2010.** *Krebsdefinition*. online veröffentlicht

**Gstraunthaler, Gerhard. 2003.** *Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Serum-free Cell Culture*. Altex 20, 4/03

**Hanahan, Douglas und Weinberg, Robert A. 2000.** *The Hallmarks of Cancer*. Cell Press

**Haniadka, Raghavendra, Popouri, Sandhya, Palatty, Princy Louis, Arora, Rajesh und Baliga, Manjeshwar Shrinath. 2012.** *Medical Plants as Antiemetics in the Treatment of Cancer: A Review*. SAGE

**Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic, A., Bertz, J., Haberland, J.G., Kraywinkel, K. und Wolf, U. 2010.** *Krebs in Deutschland 2005/2006 – Häufigkeiten und Trends*. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.

- Jayapal, KP, Wlaschin, KF, Hu, WS und Yap MG. 2007.** *Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting.* Chem Eng Prog
- Karna, Prasanthi, Chagani, Sharmeen, Gundula, Sushma R., Rida, Padmashree C. G., Asif, Ghazia, Sharma, Vibhuti, Gupta, Meenakshi V. und Aneja, Ritu. 2011.** *Benefits of whole ginger extract in prostate cancer.* British Journal of nutrition
- Karp, Gerald. 2005.** *Molekulare Zellbiologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
- Kaur, M, Agarwal, C und Agarwal R. 2009.** *Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products.* JNutr.
- Khan, N., Afaq, F., Mukhtar, H. 2007.** *Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth.* Carcinogenesis
- Kim, Jee Yon, Kim, Yeon-Gu und Lee, Gyun Min. 2011.** *CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential.* Springer-Verlag
- Lee, S.M., Cekanova, M., Back, S.J. 2007.** *Multiple mechanisms are involved in 6-Gingerol induced cell growth arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells.* Mol. Carcinogen
- Lindl, T. & Gstraunthaler, G. 2008.** *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank (6 Auflage).* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Liu, RH. 2003.** *Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals.* Am J Clin Nutr.
- Lodish, Harvey, Berk, Arnold, Zipursky, S. Lawrence, Matsudaira, Paul, Baltimore, David und Darnell, James E. 2001.** *Molekulare Zellbiologie.* Berlin, Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag
- Lottspeich, F und Engels, J.W. 2012.** *Bioanalytik (3. Auflage).* Berlin, Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag
- Lucey, Brendan P, Nelson-Rees, Walter, Hutchins und Grover M. 2009.** *Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination.* Arch Pethol Lab Med
- Merten, O.-W. 2002.** *Virus contamination of cell cultures - a biotechnological view.* Cytotechnology
- Nishiyama, Akira, Dey, Anup, Tamura, Tomohiko, Ko, Minuro und Ozato, Keiko. 2012.** *Activation of JNK Triggers Release of Brd4 from Mitotic Chromosomes and Mediates Protection from Drug-Induced Mitotic Stress.* PLoS One

- Schmitz, Sabine. 2011.** *Der Experimentator: Zellkultur (3.Auflage)*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Schrödel, Andrea. 2007.** *Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Hardy, M.L., Heber, D. 2004.** *Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines*. J. Agric. Food Chem.
- Seeram, N.P., Adams, L.S., Henning, S.M., Nilu, Y.T., Zhang, Y.J., Naair, M.G., Heber, D. 2005.** *In vitro antiproliferative apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice*. J.Nutr. Biochem
- Tjio, J.H. und Puck, Theodore T. 1958.** *Genetic of Somatic Mammalian Cells*. The Rockefeller University Press
- White, B. 2007.** *Ginger: an overview*. Am. Fam. Physician
- Wink, M. 2004.** *Molekulare Biotechnologie*. Weinheim: Wiley-VCH
- Yang, CS, Laundau, JM, Huang, MT und Newmark, HL. 2001.** *Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds*. Annu Rev Nutr.

## 7. Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	8
Abbildung 1.2:	Darstellung der verschiedenen Stadien der M-Phase.....	10
Abbildung 1.3:	Der Zellzyklus mit seinen Kontrollpunkten.....	11
Abbildung 2.1:	Prinzip der Größenausschlusschromatographie.....	23
Abbildung 2.2:	Bild der Größenausschlusschromatographieanlage.....	23
Abbildung 2.3:	Äquilibration, Probenaufgabe und Waschen der Säule.....	24
Abbildung 2.4:	Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzanalyse.....	26
Abbildung 3.1:	Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen.....	28
Abbildung 3.2:	Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen.....	30
Abbildung 3.3:	Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen.....	31
Abbildung 3.4:	Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen.....	32
Abbildung 3.5:	Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer.....	33
Abbildung 3.6:	Einfluss einiger Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen.....	34
Abbildung 3.7:	Einfluss einiger Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen.....	36
Abbildung 3.8:	Einfluss einiger Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen.....	37
Abbildung 3.9:	Einfluss einiger Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von frischem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen.....	39

---

Abbildung 3.10:	Einfluss vereinigter Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von HeLa-Zellen.....	40
Abbildung 3.11:	Einfluss vereinigter Fraktionen der Größenausschlusschromatographie des Extraktes von getrocknetem Ingwer auf die Proliferation von CHO-Zellen.....	41
Abbildung 3.12:	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss von FKS-haltigem und FKS-freiem Medium.....	43
Abbildung 3.13:	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer.....	44
Abbildung 3.14:	Vergrößerte Darstellung der indirekten Immunfluoreszenzanalyse von HeLa-Zellen unter Einfluss von 4% des Extraktes von frischem Ingwer.....	45
Abbildung 3.15:	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss von 20µM Nocodazol.....	47
Abbildung 3.16:	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss von FKS-haltigem und FKS-freiem Medium.....	48
Abbildung 3.17:	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer.....	49
Abbildung 3.18:	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss von 20µM Nocodazol.....	51
Abbildung 3.19:	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss von FKS-haltigem und FKS-freiem Medium.....	52
Abbildung 3.20:	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von CHO- und HeLa-Zellen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen des Extraktes von frischem Ingwer.....	53

---

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Für die Kultivierung von CHO- und HeLa-Zellen verwendeten Puffer und Medien.....	19
Tabelle 2.2: Programm zur Probenaufnahme und Elution der Größenausschlusschromatographie.....	24
Tabelle 2.3: Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse verwendete Lösungen.....	27

---

## 7.3 Material

### 7.3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec GmbH
Chromatographieanlage	Bio-Rad
Digitalkamera	Canon
Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Fraktionssammler	Bio-Rad
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Inkubator	Binder
Inverses Mikroskop	Zeiss
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Laborrad	Fröbel Labortechnik GmbH
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe	Brand
Reinstwasseranlage	Millipore
Schwenktisch	European Molecular Biology Laboratory
Spülmaschine	Miele
Sterilwerkbank Klasse 2	Thermo Electron Corporation
UV Detector	Bio Rad
Vortexer	Heidolph
Waage	Sartorius
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Zellzählgerät	Invitrogen
Zentrifuge	Kendro Laborator Products

---

### 7.3.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-Well-Platte	Biochrom AG
Cell countin chmaber slides	Invitrogen
Kunststoffpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Biochrom AG
Kanülen	Becton Dickinson
Mikroreaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG
Objektträger	Roth
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf AG
Spritzen	Braun
Spritzenvorsatzfilter	Roth
T-75 Zellkulturflaschen	Biochrom AG
Zentrifugenröhrchen (15ml, 25ml)	Roth

### 7.3.3 Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalien und Biochemikalien	Hersteller
Ethanol	Carl Roth
Fetales Kälberserum	BIOCHROM AG
L-Glutamin	BIOCHROM AG
Mowiol	CALBIOCHEM
NaHCO <sub>3</sub>	BIOCHROM AG
Na-Pyruvate	BIOCHROM AG
Nicht-essentielle Aminosäuren	BIOCHROM AG
Nocodazol	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin 10.000 Units · ml <sup>-1</sup> ; 10.000 µg · ml <sup>-1</sup>	BIOCHROM AG
Trypan Blue Stain 0,4%	GIBCO
Trypsin/EDTA 0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS	BIOCHROM AG

---

---

### 7.3.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Maus $\alpha$ - Tubulin	Sigma
Cy3 $\alpha$ -Maus	Sigma
Maus $\alpha$ -Actin	Dianova

### 7.3.5 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 5.0	Adobe
Countess Software	Invitrogen
Microsoft Excel 2007	Microsoft
Microsoft Word 2007	Microsoft
BioLogic DuoFlow	BioRad
Cell <sup>^</sup> F	Olympus

---

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cdk	Cyclin dependent kinase
CHO	Chinese Hamster Ovary
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
ddH <sub>2</sub> O	engl. = double distilled water
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. = <i>Desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	engl. = ethylen glycol tetraacetic acid
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
HeLa	Henrietta Lacks
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
NaCl	Natriumchlorid

---

nm	Nanometer
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
Na-Pyruvate	Natrium-Pyruvate
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
s	Sekunde(n)
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
vgl.	vergleiche
w/v	engl. = <i>weight per volume</i> ; Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

---

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Hamburg, 03. Juli 2012

---

Katharina Rützel