



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Fakultät Life Sciences

Charakterisierung der inhibierenden Wirkung von Ingwer-Fraktionen auf HeLa-Zellen

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

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

vorgelegt von: Mareike Renger

Abgabetermin: 28.02.2013

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.

Ganz besonders 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. Birger Anspach möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit und auch für die Bereitstellung der Größenausschlusschromatographieanlage sowie für die Hilfe 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 Familie, die mir das Studium ermöglicht und mich immer herzlich und bedingungslos mit allen Kräften unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Ingwer.....	4
1.1.1	Botanik, Aussehen und Vorkommen der Ingwerpflanze	4
1.1.2	Verwendung von Ingwer als Nahrungsmittel und Heilmittel	5
1.1.3	Inhaltsstoffe des Ingwers	7
1.2	Krebs	7
1.2.1	Krebsentstehung.....	7
1.2.2	Molekulare Grundlagen der Karzinogenese.....	9
1.3	Mechanismen des Zellzyklus.....	10
1.3.1	Funktion des Midbody	13
1.3.2	Das Zellzyklus-Kontrollsystem	14
1.4	Zielsetzung	15
2	Methoden	17
2.1	Kultivierung von Zellen	17
2.2	Aussaat der HeLa-Zellen	18
2.3	Passagieren	18
2.4	Herstellung des Ingwer-Extrakts.....	19
2.5	Größenausschlusschromatographie.....	20
2.6	Aussaat auf 24-Well-Platten	23
2.7	Inkubation der HeLa-Zellen mit dem Ingwer-Extrakt und dessen Fraktionen	24
2.8	Zellzählung	24
2.9	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	25
3	Ergebnisse	28
3.1	Größenausschlusschromatographie.....	28
3.2	Einfluss von Ingwer-Fractionen auf die Proliferation von HeLa- und CHO-Zellen	29

3.3	Auswirkungen der Ingwer-Fractionen auf die Morphologie von HeLa-Zellen	36
3.3.1	HeLa-Zellen im Lichtmikroskop	36
3.4	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von HeLa-Zellen	42
3.4.1	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts	42
4	Diskussion	59
4.1	Proliferation von HeLa-Zellen und CHO-Zellen unter dem Einfluss von Ingwer-Fractionen	59
4.2	Einfluss der Ingwer-Fractionen auf Zellmorphologie und Zellteilung	61
4.3	Wirkung von Ingwer-Fractionen auf das Mikrotubuli-Zytoskelett und den Zellzyklus	63
4.4	Ausblick	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	68
6.1	Quellenverzeichnis der Abbildungen	72
7	Anhang	73
7.1	Abbildungsverzeichnis	73
7.2	Tabellenverzeichnis	75
7.3	Material	75
7.3.1	Geräte	75
7.3.2	Verbrauchsmaterialien	76
7.3.3	Chemikalien und Biochemikalien	76
7.3.4	Antikörper	77
7.3.5	Software	77
7.4	Abkürzungsverzeichnis	78

1 Einleitung

Bei der Suche nach wirksamen Substanzen, die als Grundlage für ein neues Medikament dienen können, greifen die Forscher auch auf alt bewährte Naturmedizin zurück. Dabei sind für sie vor allem die Pflanzen interessant, die als Heilkräuter bekannt sind und für die eine besondere Wirkung tatsächlich nachgewiesen wurde. Eine dieser aktiven Heilpflanzen ist der Ingwer.

1.1 Ingwer

1.1.1 Botanik, Aussehen und Vorkommen der Ingwerpflanze



Abbildung 1.1: Zingiber officinale ROSCOE

Rechts im Bild ist die Ingwerpflanze mit der begehrten Wurzel im Ganzen zu sehen. Links daneben sind Blüte, Knospe, ein Blütenlängsschnitt, Honiglippe und Stempel detailliert dargestellt [1].

Die Ingwerpflanze stammt aus der Familie der Zingiberaceae (Ingwergewächse). Es gibt mehr als 50 Ingwerarten, die bekannteste ist der *Zingiber officinale* Roscoe. Bei dem hier zu Lande bekannten Ingwer handelt es sich um die Wurzel der Ingwerpflanze, dem sogenannten Rhizom [Kalg, 2009].

Die oberirdische Ingwerpflanze bildet sich aus dem Rhizom. Sie wächst aus dem Boden heraus als immer grüner Stängel, der eine Wuchshöhe von bis zu 1 m erreichen kann. Seine lanzettlichen Blätter verleihen der Pflanze ein schilfartiges Aussehen. Auch die Blütenstängel wachsen direkt aus dem Rhizom. Sie enden in einer zapfenartigen Knolle, auf der Orchideen ähnliche Blüten wachsen [Kötter, 2009]



Abbildung 1.2: Zingiberis Rhizoma

Rechts ist ein Abbild eines noch ungeschälten und auf der linken Seite eines aufgeschnittenen Zingiberis Rhizoma dargestellt. An der Schnittstelle zeigt sich das Rhizom, das aus einem gelb gefärbten, faserigen Geflecht besteht. [2], [3]

Das Zingiberis Rhizoma ist eine Knolle mit kleinen stumpfen Verzweigungen. Die Knolle ist von einer beigen Schale umhüllt, unter der sie eine gelbe Farbe besitzt. An der Schnittstelle erkennt man das faserige Gewebe der Knolle (siehe Abb.1.2). Der Ingwer ist in Ländern mit tropischem Klima beheimatet. Er wird als Kulturpflanze in Süd- und Ostasien, Westafrika und Australien angebaut.

1.1.2 Verwendung von Ingwer als Nahrungsmittel und Heilmittel

Die Ingwerknolle wird nicht nur in der Küche zum Kochen und als Gewürz genutzt, sondern hat ihren Einzug in viele Bereiche der Nahrungsmittelindustrie gefunden. Ingwer gibt es in sämtlichen Arten und Formen, getrocknet, gebeizt, kristallisiert, kandiert, zerkleinert oder gemahlen. Insbesondere hat die Genussmittelindustrie den Ingwer für sich entdeckt. Das wohl bekannteste Produkt aus Ingwer ist das Gingerale. Daneben sind heute Spezialitäten wie zum Beispiel Ingwerschokolade, Ingwerweingummi, Ingwerkonfitüre und Ingwertee bekannt. Diese stellen nur ein kleines Spektrum der Ingwerprodukte dar.

In der chinesischen Medizin wurde Ingwer schon vor 3000 Jahren als Heilpflanze genutzt und findet dort auch heute noch rege Verwendung. Durch unterschiedliche Darreichungsformen wird es als Mittel gegen Übelkeit, Erkältungen, Koliken, Muskel- und Gelenkschmerzen, krampfartige Schmerzen, zur Entgiftung und Stärkung der Abwehrkräfte sowie zur Behandlung vieler weiterer Erkrankungen eingesetzt [Lemanczyk, 1999].

Die Verwendung von Ingwer beschränkt sich nicht mehr nur auf die Traditionelle Medizin, sondern auch die Pharmaindustrie hat ein reges Interesse an diesem vermeintlichen „Allheilmittel“ entwickelt. In den letzten Jahren wurden die Wirkmechanismen und die einzelnen Komponenten von Ingwer auf ihre pharmazeutische Wirkung untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Ingwer eine stimulierende Wirkung auf Speichelfluss und Magensaftsekretion besitzt, die wiederum eine appetitanregende und verdauungsfördernde Wirkung haben. Diese Wirkung wird insbesondere dem [6]-Gingerol zugesprochen, welches eine vermehrte Sekretion der Galle bewirkt [Teuscher, 2003].

Des Weiteren wurde seine antiemetische Wirkung bestätigt. Es wirkt effektiv gegen Reisekrankheit, Schwangerschaft bedingter Übelkeit sowie Erbrechen und lindert Übelkeit bei einer Chemotherapie. Jedoch lässt sich nicht jede Übelkeit und jedes Erbrechen durch Ingwer lindern. So hilft es zum Beispiel nicht bei postoperativer Übelkeit. Die Wirkmechanismen sind noch nicht vollständig entschlüsselt [Bode & Dong, 2011].

Die Anwendung gegen Übelkeit und Erbrechen ist nicht die einzige, die untersucht wurde. Es wurde auch bestätigt, dass Ingwer und seine Komponenten einen anti-inflammatorischen Effekt besitzen [Ali *et al.*, 2007]. In diesem Zusammenhang ist auch die Rede von einer Linderung der Schwellungen und Schmerzen bei Arthritis, die jedoch noch nicht ganz bewiesen ist [Srivastava & Mustafa, 1992].

Ein besonderes Interesse der Forschung gilt der krebshemmenden Wirkung von Ingwer. Dabei wurden Ingwer selbst und insbesondere seine Komponenten, 6-Gingerol und 6-Shogaol, in verschiedenen Krebsarten untersucht. Es wurde eine Vielzahl von Wirkungsweisen des Ingwers bestätigt. Hierzu zählen die Verminderung von oxydativem Stress, die Senkung des Cholesterinspiegels, die antiulzerogene und antimikrobielle Wirkung [Teuscher, 2003]. Mit diesem Spektrum an Anwendungs-

bereichen hat sich Ingwer mit Recht den vermeintlichen Ruf eines „Allheilmittels“ erworben.

1.1.3 Inhaltsstoffe des Ingwers

Bis zu 160 verschiedene Komponenten wurden im Ingwer-Extrakt analysiert. Die wohl wichtigsten Komponenten sind die phenolischen Verbindungen. Dazu gehören die Gingerole, Shogaole, Paradole, Gingerdione, 6-Gingesulfonsäure und Zingeron. In dieser Gruppe stechen zwei Stoffverbindungen besonders hervor, die Gingerole ([3], [4], [5], [6], [8], [10], [12]) und die Shogaole ([4], [6], [8], [10]). Das [6]-Gingerol ist besonders für die scharfschmeckende Wirkung des Ingwers verantwortlich. Durch Trocknung des Ingwers wird das [6]-Gingerol durch Dehydratisierung in [6]-Shogaol umgewandelt, welches den scharfen Geschmack von Ingwer noch verstärkt.

Diesen beiden Verbindungen wird eine besondere pharmakologische Wirkung zugesprochen. Im Fokus hierbei steht die angeblich krebshemmende Wirkung [Butt & Sultan, 2011], die noch getestet wird. Erste Ergebnisse zeigen, dass diese beiden Substanzen Einfluss auf den Zellzyklus nehmen. Die mögliche pharmazeutische Wirkung der noch weiter im Ingwer enthaltenen Substanzen wurde noch nicht erforscht.

1.2 Krebs

Krebs stellt nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der Welt dar. Beispielsweise erkrankten im Jahre 2008 in Deutschland 469.800 Menschen an Krebs, davon 246.700 Männer und 223.100 Frauen [Kaatsch *et al.*, 2012].

1.2.1 Krebsentstehung

Krebs ist keine typspezifische Krankheit. Sie kann jeden befallen, tritt jedoch vermehrt im Alter auf. Die Erkrankung junger Menschen ist nicht ausgeschlossen, aber eher seltener. Je älter die Zellen, umso mehr mögliche Fehler können entstehen [Kaatsch *et al.*, 2012]. Es ist nicht bewiesen, dass eine bestimmte Lebensweise Auslöser dieser Krankheit ist. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass dadurch das Risiko an Krebs zu erkranken erhöht wird [Alberts *et al.*, 2004].

Krebs ist keine Krankheit, die plötzlich auftritt. Es ist ein mehrstufiger Prozess, der sich über Jahre entwickelt. Es wird angenommen, dass Krebs aus einer fehlgeschalteten Zelle entsteht [Layer, van Kaick & Delorme, 2006]. Bis aus einer normalen Zelle eine fehlgeleitete Zelle und damit aus ihr ein maligner Tumor entsteht, muss sie gewisse Selektionsvorteile anderen Zellen gegenüber besitzen [Alberts *et al.*, 2012].

Entsteht bei der Zellteilung eine abnorme Zelle, so ist dieses nicht dramatisch. Ist diese Zelle jedoch genetisch so verändert, dass sie nicht mehr dem normalen Zellwachstum und der Apoptose unterliegt, kommt es zur Katastrophe. Die Zelle kann sich nun ungehindert teilen und ist so gesehen unsterblich [Gronau, 2010]. Sie bildet Tochterzellen, die wie sie genetisch mutiert sind. Aus diesen Zellen muss nicht unbedingt ein maligner Tumor entstehen. Besitzen die mutierten Zellen nur die Fähigkeit sich unbeschränkt fortzupflanzen, aber nicht die Eigenschaft in Gewebe einzudringen und es zu verdrängen, handelt es sich um einen benignen Tumor. Maligne Tumore besitzen beide Eigenschaften, dieses macht sie so gefährlich. Wenn sich von einem Tumor Teile ablösen und durch die Blutbahn an andere Stellen des Körpers gelangen, bilden sich dort Metastasen [Hiddemann, 2010].

Für die Entstehung von Krebs gibt es verschiedene Ursachen. Hier sind der Einfluss von Karzinogenen, die Spontanmutation oder die genetische Vorbelastung zu nennen. Eine einzelne Mutation verursacht noch keinen malignen Tumor. Wie viele Mutationen für seine Entstehung notwendig sind, ist noch unklar. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass hieran mehrere Mutationen beteiligt sind, die in zwei speziellen Genarten vorkommen [Lodish *et al.*, 2001]. Einmal sind dieses die sogenannten Onkogene, die im Grunde genommen als Protoonkogene bezeichnet werden müssen, da nur das mutierte Gen als Onkogen bezeichnet wird. Ihre ursprüngliche Aufgabe ist es, den Zellzyklus und die Zellteilung zu regulieren. Die verheerende Wirkung zeigt sich schon, wenn ein Allel die Mutation trägt. Die zweite Gruppe bilden die Tumorsuppressorgene. Sie sind wachstumshemmende Gene, die die Proliferation einer Zelle zur richtigen Zeit wieder beenden. Des Weiteren gehören sie zu den „Reparatur-Genen“ und besitzen somit eine Schutz- und Regulationsfunktion. Ihre Funktion ist es, Schäden in der DNA zu beheben und die Zelle vor unkontrollierter Zellteilung zu schützen sowie gegebenenfalls die Apoptose

einzuweisen. Eine Gefährdung ist jedoch erst gegeben, wenn beide Allele von einer Mutation betroffen sind [Campel & Reece, 2009].

1.2.2 Molekulare Grundlagen der Karzinogenese

Die Entstehung eines malignen Tumors ist nicht nur auf eine einzelne Ursache zurückzuführen, vielmehr treffen viele verschiedene endogene und exogene Faktoren zusammen. Die exzessive Lebensweise eines Menschen, wie erhöhter Alkoholkonsum, intensives Rauchen und eine schlechte Ernährungsweise, können das Risiko an Krebs zu erkranken erhöhen. Weitere tumorfördernde Einflüsse sind Infektionen, genetische Faktoren, UV-Strahlung und Umwelteinflüsse. Die Ausbildung eines malignen Tumors kann sich über Jahre hinziehen [Alberts *et al.*, 2004].

Um den eindeutigen Prozess der Tumorbildung zu verstehen, hat man das Dreistufenmodell der Karzinogenese aufgestellt. Es wird in drei unterschiedliche Abschnitte geteilt, der Initiation, Promotion und Progression [Gronau, 2012].

In der ersten Phase, der Initiation, kommt es zu einer Mutation in der Zelle, welche durch Karzinogene verursacht werden kann. In den meisten Fällen wird der Schaden in der DNA durch bestimmte Reparaturmechanismen behoben oder der programmierte Zelltod eingeleitet. Werden diese Schritte jedoch nicht vorgenommen, so ist die Mutation irreversibel. Für den weiteren Verlauf der Karzinogenese ist es wichtig, dass die Mutation in Genen auftritt, die für die Kontrolle des Zellzyklus und der Zellteilung zuständig sind. Meistens sind Tumorsuppressorgene und Protoonkogene betroffen. Die Ausreifung eines Tumors in der Karzinogenese wird durch die Promotion vorangetrieben. Die mutierte Zelle wird zum Wachstum angeregt. Sie erfährt einen Wachstumsreiz, bei dem es sich zum Beispiel um ein Hormon handeln kann. Die initiierte Zelle gibt durch die Zellproliferation ihren DNA-Schaden an die Tochterzelle weiter. Für diese Zelle ist das Risiko weiterer Mutationen der Gene erhöht. Durch ständige Wachstumsstimulation und Zellproliferation entsteht eine Vorstufe eines Tumors, ein präneoplastischer Fokus, ein benigner Tumor. Bis jetzt ist der Tumor noch nicht metastasiert und wächst begrenzt. Das Risiko, sich in einen malignen Tumor zu wandeln, ist durch die ständige Zellproliferation erhöht. In der Progression erfahren die Zellen des präneoplastischen Fokus weitere Mutationen in den Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen. Durch die nun zahlreich

vorliegenden Mutationen findet die eigentliche Ausbildung eines malignen Tumors statt. Die Zelle ist nun unsterblich geworden, sie ist immortal. Die zur Tumorzelle umgewandelte Zelle bricht aus ihrem Zellverband, verdrängt dabei gesundes Gewebe und besitzt die Fähigkeit der Metastasierung. Die Metastasierung ist der gefährlichste Abschnitt der Krebserkrankung, der in wenigen Monaten zum Tod führen kann [Hiddemann, 2010].

1.3 Mechanismen des Zellzyklus

Der Mensch besteht aus einer Vielzahl von Zellen, welche eine bestimmte Lebensdauer besitzen. Ist sie abgelaufen, so sterben die Zellen. Um den Organismus am Leben zu erhalten, muss ein Mechanismus bestehen, der diese Zellen ersetzt. Dabei handelt es sich um den Zellzyklus, den die meisten eukaryotischen Zellen besitzen. Es entstehen aus einer Mutterzelle zwei genetisch identische Tochterzellen.

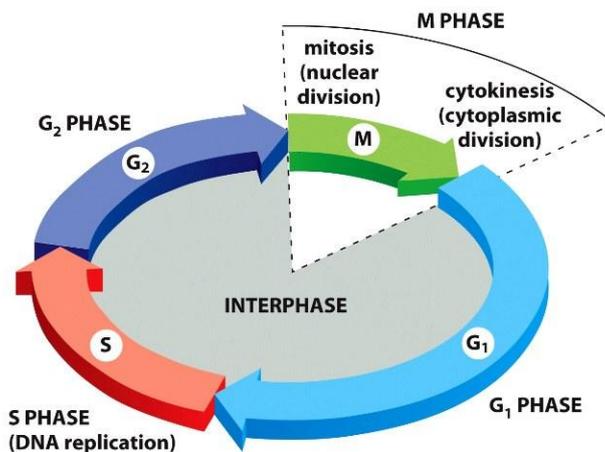


Abbildung 1.3: Darstellung des Zellzyklus

Die Zellteilung besteht aus verschiedenen Phasen nach einer bestimmten Abfolge. Sie durchläuft zuerst das Stadium der Interphase, welches aus der G₁-Phase, der S-Phase und der G₂-Phase zusammengesetzt ist. In der G₁-Phase baut die Zelle Kompartimente auf, die für die Zellteilung benötigt werden. In der G₂-Phase erfolgen letzte Modifikationen von Enzymen und Proteinen. Die Teilung des Zellkerns und des Cytoplasmas erfolgt in der M-Phase [3].

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen (siehe Abb. 1.3). Die ersten 3 Phasen werden auch als Interphase bezeichnet, in der die Zelle sich auf die eigentliche Teilung vorbereitet.

Der Zellzyklus beginnt mit der G₁-Phase (G=.gap, Lücke). In dieser Phase bekommt die Zelle Zeit zum Wachsen. Sie überbrückt die Zeitspanne zwischen dem Abschluss der M-Phase und dem Beginn der S-Phase. Des Weiteren bilden sich in dieser Phase Zytoplasma, Zentriolen und funktionelle Zellbestandteile wie Enzyme für die DNA-Synthese.

Hat die Zelle diesen Prozess abgeschlossen, tritt sie in die S-Phase (S=Synthese) ein. Nun beginnt sie damit ihre DNA zu replizieren und RNA sowie Proteine zu synthetisieren. Zum Abschluss der S-Phase besitzt die Zelle einen diploiden Chromosomensatz mit zwei Chromatiden.

Im Anschluss an die S-Phase beginnt eine zweite Gap-Phase, die G₂-Phase. Sie bildet den Übergang von der S-Phase zur M-Phase. In ihr produziert die Zelle für die bevorstehende Zellteilung vorwiegend Mikrotubuli. Sie löst die Zellkontakte zu anderen Zellen und rundet sich ab.

Die letzte Phase des Zellzyklus ist die M-Phase, in ihr entwickeln sich aus der vorhandenen Zelle (Mutterzelle) zwei Tochterzellen. Die M-Phase lässt sich in 2 große Abschnitte teilen, die Mitose und die Cytokinese. Die Mitose bezeichnet die Teilung des Zellkerns. Sie ist in 5 weitere Stadien geteilt [Campell & Reece, 2009].

Prophase bezeichnet das erste Stadium, in welchem sich die Zentrosomen an die entgegengesetzten Pole bewegen und die Mitosespindel ausbilden, dabei fungieren sie als Mikrotubuli-Organisationszentrum. Die replizierten Chromosomen beginnen sich zu verdichten.

Beginnt sich die Kernhülle aufzulösen, so erreicht die Zelle die Prometaphase. Die Spindelfasern können nun ungehindert mit den im Zentrum gesammelten Chromosomen in Kontakt treten. Sie binden an die Chromosomen über die Kinetochore an die Mikrotubuli der Spindel und bewegen sie.

Dieses ebnet den Beginn der Metaphase. In ihr richten sich die Chromosomen in der Äquatorialebene aus, das bedeutet, dass sich die Chromosomen in der Mitte zwischen den beiden Spindelpolen befinden.

Die darauf folgende Phase wird als Anaphase bezeichnet, in der die Chromosomentrennung erfolgt. Dieses ist auf zwei Vorgänge zurückzuführen, die Spindelfasern verkürzen sich und die Spindelpole bewegen sich voneinander weg. Es erfolgt eine Trennung der Schwesterchromatiden, nun liegen jeweils ein Chromosomensatz an jedem Spindelpol vor.

Die letzte Phase der Mitose ist die Telophase. Um die an den Spindelpolen befindlichen Chromosomensätze bildet sich eine Kernhülle. Damit entstehen zwei „neue“ Zellkerne und die Mitose ist beendet.

Den Abschluss des Zellzyklus bildet die Cytokinese, in der die Teilung des Cytoplasmas erfolgt. Anzeichen dieser Teilung sind schon in der Anaphase zu erkennen, in der sich die Membranfurche und der kontrahierende Ring ausbildenden. Durch die Kontraktion des Ringes schnürt sich das Cytoplasma immer weiter zusammen bis es letztendlich zweigeteilt ist und zwei genetisch identische Zellen entstehen. Der kontrahierende Ring existiert nur eine kurze Zeitspanne. Er verschwindet, wenn die Plasmamembran mit der Teilungsfurche den Midbody (Mittelkörper, Flemming-Körper) bildet. [Alberts *et al.*, 2012]

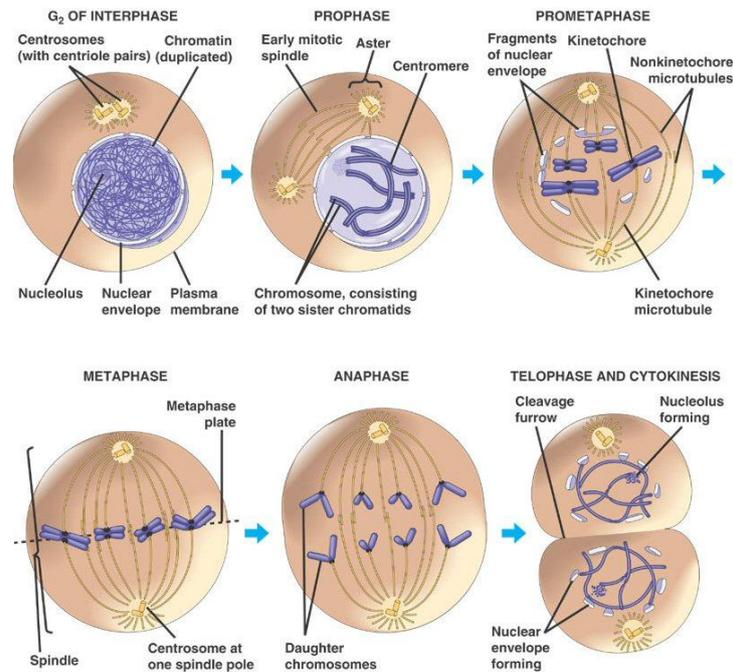


Abbildung 1.3: Verschiedene Abschnitte der Mitose

Die Mitose besteht aus verschiedenen Entwicklungsstadien. Diese sind die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. Nach dem Eintritt in die Prophase aus der Interphase kondensiert die DNA im Zellkern zu Chromosomen und bildet eine aus Mikrotubuli bestehende Mitosespindel aus. In der Prometaphase bilden sich die Mikrotubulifasern weiter aus und binden nach Auflösen der Kernhülle an die Kinetochore der Chromosomen. In der Metaphase richten sich die Chromosomen in der Äquatorialebene aus. Die Mikrotubuli bewegen in der Anaphase die Schwesterchromatiden in die jeweils entgegengesetzte Richtung, damit jede ein vollständigen Chromosomensatz besitzt. Danach bildet sich die Kernhülle in der Telophase und die Verdichtung der Chromosomen nimmt ab. Parallel dazu beginnt die Zelle mit der Cytokinese, in der sich eine Teilungsfurche bildet und die Abschnürung beginnt. [4]

1.3.1 Funktion des Midbody

Der Midbody ist eine vorübergehende Struktur, eine dünne Brücke zwischen den Tochterzellen, der nach der Abtrennung von einer Tochterzelle an die andere übergeht und langsam von dieser abgebaut wird. Seine Hauptfunktion ist es, die Abtrennungsstelle zu flankieren, an der die Tochterzellen sich voneinander lösen. Er besteht aus einer Mehrzahl an überlappenden Mikrotubuli und interagierenden Proteinen. Seine genaue Zusammensetzung ist noch nicht entschlüsselt [Hu *et al.*, 2012]. Lange Zeit ging man davon aus, dass es sich bei dem Midbody um molekularen Abfall der Zelle handelt. Von dieser Annahme wird in der letzten Zeit Abstand genommen. Seine genaue Funktion ist noch unklar. Die Forscher des Dresdener Max-Planck-Instituts beobachteten an Stammzellen, dass diese ihren Midbody nach der Zellteilung auch an die Zellumgebung abgeben. Dieses Verhalten

konnten sie bei Krebszellen und unsterblich gemachten Zellen weniger häufig erkennen. Aus diesen Ergebnissen vermuteten sie, dass der Midbody eine Funktion in der Ausdifferenzierung von Zellen einnimmt [Ettinger *et al.*, 2011].

1.3.2 Das Zellzyklus-Kontrollsystem

Bei dem Zellzyklus handelt es sich um einen komplexen Vorgang, bei dem viele Fehler auftreten können, wie zum Beispiel ein DNA-Schaden. Um zu verhindern, dass diese Fehler oder eine falsch regulierte Zelle entstehen, besitzt der Zellzyklus sein ganz eigenes Kontrollsystem. An bestimmten Stellen des Zellzyklus befinden sich Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus angehalten werden kann, um Fehler zu beheben.

Diese Kontrollen basieren auf 2 Proteinfamilien, den Cyklinen und den cyklin-abhängigen Kinasen (Cdk = Cyclin dependent kinase). Wie der Name der Cdk schon sagt, wird die Kinase von dem Cyklin aktiviert und bildet einen regulatorischen Cyklin-Cdk-Komplex. Diese Enzymkomplexe befinden sich an den wichtigen Kontrollpunkten des Zellzyklus und prüfen durch ihre Aktivierung wichtige Prozesse in den Zellzyklusabschnitten. Eine Aufgabe ist die Überprüfung der Chromosomenkondensation durch Proteinphosphorylierung. Der Abbau des Cyklin-Cdk-Komplexes sowie auch seine Aktivierung wird über die schwankende Konzentration der Cykline gesteuert. Dabei werden die Cykline über Ubiquitin abgebaut [Lodish, 2001].

Am Zellzyklus sind unterschiedliche Cyklin-Cdk-Komplexe beteiligt. Durch ihre Phosphorylierung werden sie an verschiedenen Stellen des Zellzyklus aktiv. Beispielsweise befindet sich am Übertritt von der G₂-Phase zur M-Phase das M-Cdk. Es induziert durch Phosphorylierung eines Schlüsselproteins die für die Einleitung der Mitose wichtigen Vorgänge. Dieses können die Kondensation der Chromosomen, Auflösen der Kernhülle und die Veranlassung der Ausbildung der Mitosespindel sein [Alberts *et al.*, 2012].

An den verschiedenen Kontrollpunkten gibt die Zelle Auskunft über ihren Zustand und Umgebung. Am G₁-Kontrollpunkt muss die Zelle ein extrazelluläres Signal, ein Mitogen erhalten, damit sie ihre Zellteilung beginnt. Das Mitogen wird von anderen Zellen gebildet werden. Erhält sie dieses Signal nicht, geht die Zelle in den Zustand der Nichtteilung, der G₀-Phase über [Lodish *et al.*, 2001]. Bei Unregelmäßigkeiten in der Zelle oder schlechten Umgebungsbedingungen wird durch bestimmte Signale der

Zellzyklus angehalten. Diese Signale werden durch Cdk-Inhibitoren vermittelt. Sie blockieren zum Beispiel Cdk in der G₁-Phase und verhindern deren Aktivierung durch Cykline. Hierdurch wird der Eintritt in die S-Phase verhindert. Ebenso sind sie in der Lage, an Cyklin-Cdk-Komplexe zu binden und sie zu hemmen. Zu nennen ist hier das p21^{cip}, welches bei DNA-Schaden zunimmt und durch das Tumorsuppressor-Protein p53 positiv reguliert wird. Es verursacht einen Zellzyklusarrest und stoppt die Replikationsgabel, damit die Zelle genug Zeit für Reparaturen hat. Funktioniert das Kontrollsystem nicht mehr, wachsen die Zellen unkontrolliert und es entstehen Tumorzellen [Knippers, 2006].

1.4 Zielsetzung

Viele Pflanzen dienen nicht nur einem kulinarischen Zweck, sondern besitzen auch pharmakologisches Potenzial. Hierzu zählt auch Ingwer, dem nicht nur eine sondern mehrere Wirkungsweisen zugesprochen werden. Seine antioxidative, antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkung wird in der Medizin zur Entwicklung von Therapien genutzt.

Von hohem Interesse ist seine wahrscheinlich krebshemmende Wirkung. In einigen Studien wurde die Auswirkung von Ingwer auf Krebszellen getestet. Dabei zeigte sich, dass Ingwer eine hemmende Wirkung auf Dickdarm-, Magen-, Eierstock-, Leber-, Haut-, Brust- und Prostatakrebs besitzt [Butt & Sultan, 2011].

Die genaue molekulare Wirkungsweise und die für die krebshemmende Wirkung verantwortlichen Substanzen wurden bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Einige der in Ingwer enthaltenen Komponenten wurden in *in vitro* Versuchen auf ihre Wirkung auf die verschiedenen Krebsarten getestet. Ingwer und seinen Komponenten 6-Gingerol und 6-Shogaol wird eine Antitumorwirkung zugesprochen [Bode & Dong, 2011].

Ziel dieser Arbeit ist es, die proliferatorische Wirkung von Ingwer-Extrakt-Fractionen auf Tumorzellen zu untersuchen. Die aus einer vorhergehenden Bachelorarbeit stammende Erkenntnis, dass Ingwer-Extrakt eine inhibierende Wirkung auf HeLa-Zellen besitzt, soll vertieft werden. Mittels Größenausschlusschromatographie soll der aus frischem Ingwer hergestellte Extrakt aufgetrennt werden, um die

verschiedenen bioaktiven Komponenten zu separieren. Diese Fraktionen sollen auf ihren inhibierenden und stimulierenden Effekt auf HeLa-Zellen mit verschiedenen Methoden untersucht werden. Es sollen mikroskopische Untersuchungen vorgenommen und die zellulären Mechanismen der Wachstumsinhibierung differenzierter untersucht werden.

2 Methoden

2.1 Kultivierung von Zellen

Beim Kultivieren von Zellen ist insbesondere darauf zu achten, dass die Handhabung unter sterilen Bedingungen erfolgt, um eine ungewollte Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden. Deshalb wurden alle Arbeiten mit den Zellen unter der Sterilwerkbank der Klasse II getätigt. Die Luft der Sterilwerkbank wurde kontinuierlich staub- und keimfrei gefiltert, um eine sterile Umgebung zu schaffen. Die Arbeitsfläche der Sterilwerkbank wurde regelmäßig mit 70 % Ethanol desinfiziert und mit UV-Licht bestrahlt.

Bei der verwendeten Gebärmutterhalskrebszelllinie HeLa handelte es sich um adhärente Zellen. Diese wuchsen an Oberflächen von Zellkulturflaschen, da diese einen aktivierten Boden besitzen, an den sich die Zellen haften können. Die HeLa-Zellen wurden in T-75-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährstoffquelle diente das DMEM-Medium (siehe Tabelle 2.1). Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und einer gesättigten Wasserdampfathmosphäre im Brutschrank.

Tabelle 2.1: Puffer und Medien für die Kultivierung von HeLa-Zellen

Puffer und Medium	Zusammensetzung
Kultivierungsmedium für HeLa-Zellen	370 ml dd H ₂ O 50 ml Dulbecco`s MEM 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren 15 ml 7,5% NaHCO ₃ 5 ml 200 mM L-Glutamin 5 ml Penicillin/ Steptomycin 10.000 µg/ml 5 ml Na-Pyruvat 50 ml FKS (dekomplementiert bei 56°C)
PBS	0,8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,1 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Trypsin/EDTA	0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS

2.2 Aussaat der HeLa-Zellen

Bei der verwendeten Zelllinie handelte es sich um HeLa-Zellen, die zuvor in DMSO-haltigem Medium in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren waren. Um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurden sie schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in T-75-Zellkulturflaschen mit 20 ml Nährmedium überführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C , 5 % CO_2 -Gehalt und einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Nach 4 Stunden waren die Zellen am Boden der Flasche angewachsen und es konnte ein Mediumwechsel vorgenommen werden. So wurde das zytotoxische DMSO, in dem die Zellen eingefroren waren, entfernt.

2.3 Passagieren

Die Zellen wurden durch Subkultivierung in Kultur gehalten. Bei einer konfluenten Wachstumsfläche kommt es bei adhären Zellen zu einem starken Absinken der Proliferationsrate. Die Zellen brauchen ausreichend Platz um zu wachsen, müssen deshalb ausgedünnt und in eine neue Kulturflasche überführt werden. Tumorzellen können zwar noch weiterwachsen, jedoch kommt es bei einer zu hohen Zelldichte zum Absterben der Zellen. Aus diesem Grund wurden bei einer Zelldichte von 80 % die Zellen alle 3 bis 4 Tage gesplittet und durch Umsetzen in eine neue Kulturflasche verdünnt.

Bei der Erzeugung von Subkulturen gibt es verschiedene Verfahren, die Zellen von der Kulturflaschenoberfläche zu lösen. Eine der gängigsten Methoden ist die Verwendung von Trypsin/EDTA. Die dabei verwendeten Lösungen wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die im Brutschrank kultivierten Zellen wurden unter der Sterilwerkbank passagiert. Als erstes wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Durch das Waschen mit PBS wurden Serumreste entfernt, die die Wirkung des Trypsin beeinträchtigt und die Einwirkdauer verlängert hätten. Zum Ablösen der adhären Zellen wurde 5 ml Trypsin/EDTA zugegeben und die Kulturflasche geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Trypsin/EDTA-Lösung zu garantieren. Davon wurden 4 ml wieder abgenommen, so dass nur noch 1 ml Trypsin in der Kulturflasche verblieb. Diese wurde zurück in den Brutschrank gestellt und für 5 - 10 Minuten inkubiert. Trypsin ist eine Protease, die die Verbindung der Zelle zur Oberfläche und zu anderen Zellen löst. EDTA

unterstützt diesen Prozess, indem es die zweiwertigen Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) komplexiert, welche die Zelle nun nicht mehr für den Zell-Zellkontakt verwenden kann. Bei einer zu langen Einwirkzeit von Trypsin/EDTA-Lösung können die Zellen irreversibel geschädigt werden. Die Zellen wurden während der Inkubation mehrmals geschwenkt. Mittels Mikroskop wurde überprüft, ob sich die Zellen vollständig von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst hatten. Die Zellen sind abgelöst, wenn sie in der Lösung schwimmen und abgerundet sind. Der cytotoxische Effekt des Trypsins wurde durch die Zugabe von 9 ml Medium mit Serum (FKS) inaktiviert. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette wurden die Zellen gut suspendiert und mögliche Zellklumpen gelöst. In eine mit 20 ml Kulturmedium gefüllte Kulturflasche wurde 1 ml der Zellsuspension überführt und wieder im Brutschrank kultiviert. Dies entspricht einer 1:10 Verdünnung, denn 1/10 der Zellen der Ausgangsflasche wurden in eine neue, gleich große Zellkulturflasche überführt.

2.4 Herstellung des Ingwer-Extrakts

Der verwendete frische Ingwer aus dem Herkunftsland Thailand wurde auf dem Wochenmarkt erworben. Um den frischen Ingwer in eine für die Größenausschlusschromatographie und die Zellkultur geeignete Form zu bringen, wurde aus dem frischen Ingwer ein Extrakt hergestellt.

10 g des frischen Ingwers wurden von seiner Schale befreit und auf einer Petrischale klein gehackt. Der klein gehackte Ingwer wurde durch eine 1 ml Spritze gepresst und erhielt so eine breiige Konsistenz.

Durch diesen Schritt wurde die Wurzelstruktur aufgebrochen, um so besser an die Inhaltstoffe des frischen Ingwers gelangen zu können. In einem 15 ml abgeschnittenen Falconröhrchen wurde das Mus mit einem umgedrehten 1 ml Spritzenkolben ausgepresst. Die dabei emporkommende Flüssigkeit wurde abgenommen und bei 4°C gelagert. Das verbleibende Mus wurde auf fünf 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und über Nacht bei Raumtemperatur mit jeweils 600 µl HeLa-Medium ohne FKS mit Hilfe eines Laborrades extrahiert. So wurde sichergestellt, dass Inhaltstoffe, die nicht durch Auspressen gewonnen werden konnten, in das Medium übergehen. Am nächsten Tag wurde unter der Sterilwerkbank durch erneutes Pressen des Muses die Flüssigkeit abgenommen und

mit der bei 4°C gelagerten Flüssigkeit vereinigt. Dieser Extrakt wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße: 0,22 µm) sterilfiltriert. Bei allen Schritten wurde darauf geachtet, möglichst steril zu arbeiten und nur sterile Reaktionsgefäße und Spritzen zu verwenden. Der erhaltene Extrakt hatte ein Volumen von 6 ml, davon wurden 4 ml für die Größenausschluss-chromatographie verwendet, der restliche Extrakt wurde bei 4°C gelagert.

2.5 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie oder auch Gelchromatographie trennt ein Stoffgemisch nach dem Prinzip der Größe. Wie bei allen chromatographischen Verfahren erfolgt eine Trennung zwischen zwei Phasen, einer festen stationären Phase und einer beweglichen mobilen Phase [Lottspeich & Engels, 2012].

Die stationäre Phase befindet sich in einer gepackten Säule und besteht aus gelartigen Partikeln eines hydrophilen, porösen und quervernetzten Materials mit definierter Porengröße. Die verwendeten Materialien besitzen einen hohen Siebeffekt mit einer geringen Ionenaustausch- und Absorptionseigenschaft [Latscha & Klein, 1994]. Dazu zählen Agarose oder Sephadex [Lottspeich & Engels, 2012]. Die mobile Phase ist eine wässrige Lösung, die keine absorptiven Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht.

Die Moleküle des Stoffgemisches werden mit der mobilen Phase durch die stationäre Phase getragen. Große Moleküle werden schnell eluiert, da sie nicht in das Kornvolumen der stationären Phase eindringen können. Mittlere Moleküle dringen teilweise in das Porenvolumen ein und durchqueren die stationäre Phase etwas langsamer. Das gesamte Porensystem steht nur den kleinen Molekülen zur Verfügung. Dieses verlängert ihre Aufenthaltszeit in der Säule wesentlich, so dass große Moleküle vor den kleinen Molekülen eluieren. Nachteil dieser Methode ist, dass gleich große Moleküle nicht getrennt werden können, sie eluieren gleichzeitig. In der Regel wird zur Detektion der Substanzen ein UV- oder Durchflussphotometer benutzt, wobei diese mit einem Schreiber oder Computerprogramm gekoppelt werden [Lottspeich & Engels, 2012].

Für die Trennung des Ingwer-Extrakts wurde eine Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 HR-Säule mit einem Säulenvolumen (SV) von 120 ml gewählt. Als mobile Phase wurde HeLa-Medium ohne FKS verwendet. Um sicherzustellen, dass während der Trennung keine störenden Substanzen eluiert werden, die auf der Säule von vorhergehenden Versuchen verblieben sind, wurde die Säule zunächst mit 2 Säulenvolumen Laufpuffer über Nacht bei einer Flussrate von 0,2 ml/min äquilibriert. Der pH-Indikator, der im HeLa-Medium enthalten ist, besitzt eine Eigenabsorption. Durch eine Kalibrierung des UV-Detektors wird die Nulllinie auf den Absorptionswert des pH-Indikators eingestellt. Alle verwendeten Lösungen wurden vor Versuchsbeginn zweimal mittels Vakuumfiltration entgast, um Luftblasen in der Säule zu vermeiden.

Bei der verwendeten Apparatur handelte es sich um einen sehr einfachen Aufbau. Die Säule wurde an einen UV-Detektor, ein Sechswegventil, einen Fraktionssammler und einen Schreiber angeschlossen. Nach Starten der Säule wurden 4 ml des Ingwer-Extrakts, die sich in der zuvor beladenen Probenschleife befanden, auf die Säule injiziert. Dabei wurde eine Flussrate von 0,75 ml/min eingestellt. Das Eluat wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen mit einem Fraktionssammler aufgefangen und die Fraktionen bei 4°C gelagert. Nach einem 1,5-fachen Säulenvolumen wurde der Laufpuffer gegen Wasser ausgetauscht und die Säule noch mit 1 Säulenvolumen eluiert. Der Säulenverlauf wurde nach 2,5 Säulenvolumen beendet. Ein weiterer Waschschrift erfolgte mit 1,5 Säulenvolumen Tris-Puffer pH 8,5. Dieser ermöglichte eine Lagerung der Säule für bis zu 2 Wochen. Nach Beendigung der Experimente wurde die Säule mit 1,5 Säulenvolumen 20 % Ethanol gewaschen. Das Waschen erfolgte ebenfalls über Nacht bei einer Flussrate von 0,3 ml/min.

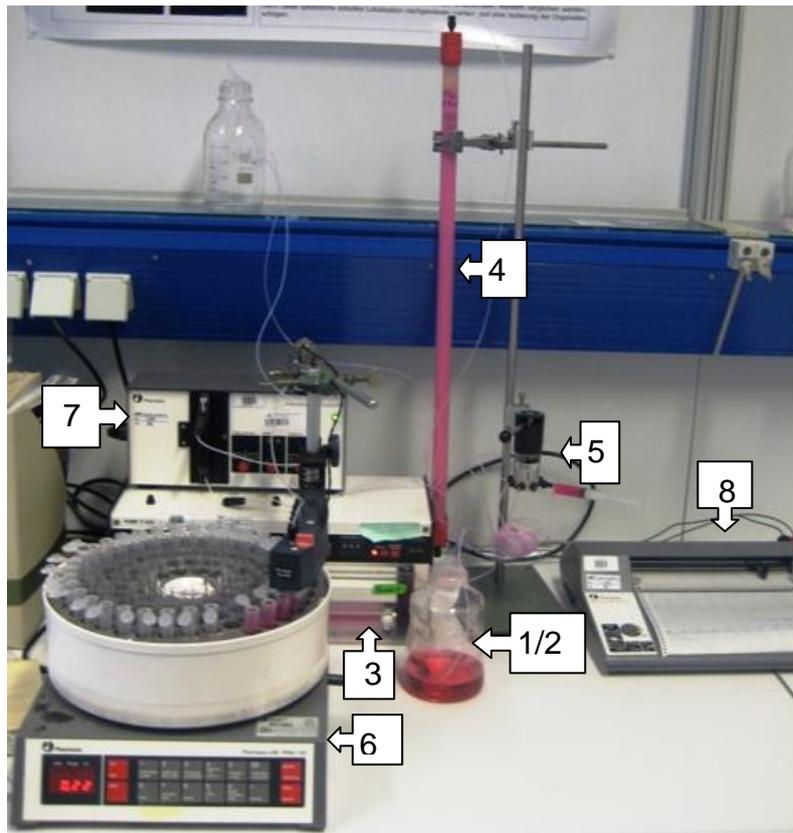


Abbildung 2.1: Bild der verwendeten Größenausschlusschromatographieanlage

Dieses Bild zeigt die selbst zusammengestellte Größenausschlusschromatographieanlage. Der Laufpuffer (1) bzw. der Waschpuffer (2) wird über die Pumpe (3) zur Säule (4) befördert. Über das Probenventil (5) wird der Ingwer – Extrakt auf die Säule aufgegeben. Der UV-Detektor (7) detektiert das Eluat und gibt die Signale an den Schreiber (8) weiter. Die während der Elution gesammelten Fraktionen werden mit dem Fraktionssammler (6) aufgefangen. Die Anlage wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Birger Anspach zur Verfügung gestellt.



Abbildung 2.2: Mit Ingwer-Extrakt beladene Säule

Dargestellt ist die mit 4 ml Ingwer-Extrakt beladene Säule. Vor Aufgabe der Probe wurde die Säule mit dem Laufpuffer äquilibriert. Die Rosafärbung der Säule ist auf den im Laufmittel enthaltenen pH-Indikator zurückzuführen. Nach Aufgabe der Probe konnte man diese deutlich durch ihre Gelbfärbung erkennen (Pfeil).

2.6 Aussaat auf 24-Well-Platten

Um die Auswirkungen der einzelnen Fraktionen des frischen Ingwers reproduzierbar zu bestimmen, wurde eine genaue Anzahl an Zellen benötigt. Aus diesem Grund wurden die HeLa-Zellen mit einer definierten Zelldichte in 24-Well-Platten ausgesät.

Bei einem Bewuchs von 80 % einer T-75-Zellkulturflasche mit HeLa-Zellen wurde die gleiche Verfahrensweise angewandt wie beim Passagieren (Kapitel 2.3). Nach dem Quenchen von Trypsin/EDTA mit FKS wurden 0,5 ml der gut durchmischten Zellsuspension abgenommen und im Countess® Cell Counter die Zellen wie in Kapitel 2.8 gezählt. Die Zellsuspension wurde dementsprechend mit HeLa-Medium mit FKS auf eine Zellkonzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well verdünnt (siehe Abb. 2.3). Diese für die Versuche optimale Konzentration wurde durch vorhergehende Versuche ermittelt. Die verdünnte und gut durchmischte Zellsuspension wurde auf die 24-Well-Platten mit jeweils 1 ml pro Well pipettiert. Dabei wurden immer nur 4 Wells gleichzeitig pipettiert, da sich die Zellen sehr schnell absetzen und sonst eine ungleiche Verteilung zu Stande gekommen wäre. Vor jedem Pipettier-Schritt wurde die Zellsuspension erneut resuspendiert. Durch eine Inkubation von 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 -Konzentration wurde gewährleistet, dass die Zellen genug Zeit zur Adhäsion hatten.



Abbildung 2.3: Aufnahme der HeLa-Zellen mit der Aussaatdichte von $5 \cdot 10^4$ pro Well mit Hilfe eines Lichtmikroskops in einer 100-fachen Vergrößerung

Die Aufnahme zeigt HeLa-Zellen nach einer Adhäsionszeit von 1 Std. nach der Aussaat auf eine 24-Well-Platte in einer 100-fachen Vergrößerung.

2.7 Inkubation der HeLa-Zellen mit dem Ingwer-Extrakt und dessen Fraktionen

Nachdem die Zellen einen Tag auf den 24-Well-Platten angewachsen waren, wurden sie mit den einzelnen Fraktionen in unterschiedlicher Konzentration inkubiert. Um das ganze Spektrum der Säule zu erfassen, wurde 1 ml von jeweils 10 Fraktionen zu einer großen Fraktion zusammengefügt (Tabelle 2.2). Das FKS-haltige Medium wurde aus den Wells entfernt und die Zellen mit 1 ml einer so vereinigten Fraktion inkubiert. Es wurden jeweils 2 Wells mit der gleichen Fraktion inkubiert (Doppelwerte), ebenso wurden eine Kontrolle mit FKS-haltigem Medium und eine Referenz mit FKS-freiem Medium durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank für 48 Stunden inkubiert.

2.8 Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl der inkubierten 24-Well-Platten mit den Fraktionen des Ingwer-Extrakts wurde der Countess® Cell Counter der Firma Invitrogen verwendet. Das Gerät ist in der Lage, die Gesamtzellzahl, die Lebendzellzahl und die Anzahl der toten Zellen zu bestimmen, sofern die Zellen zuvor mit Trypanblau behandelt wurden. Trypanblau ist ein blauer, an Proteine bindender Farbstoff, der nur in Zellen mit defekter Zellmembran eindringt und sie anfärbt. Mittels dieser Methode können die lebenden (hell) von den toten Zellen (blau) unterschieden werden. Die lebenden Zellen sind blau umrandet, während die toten Zellen komplett blau gefärbt sind.

Vor der Zugabe des Trypanblau wurden die Zellen wie beim Passagieren abgelöst. Nachdem das Zellmedium entfernt wurde, erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 1 ml PBS pro Well. Der Ablösevorgang wurde mit 300 µl Trypsin/EDTA vorgenommen und anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt in der Atmosphäre inkubiert. Auch hier wurde das Ablösen der Zellen per Mikroskop (siehe Kapitel 2.3) überprüft. Bei erfolgreichem Ablösen wurden 700 µL Zellmedium (mit FKS) hinzu pipettiert. Mit einer abgeschnittenen 1000 µl Pipettenspitze wurde die Zellsuspension vorsichtig resuspendiert und die Zellen vom Boden des Wells mit der Zellsuspension abgespült, so dass die Zellsuspension gut durchmischt war und möglichst nur Einzelzellen für die Zellzählung vorlagen. Es

wurde beim Pipettieren von Zellen immer eine abgeschnittene Pipettenspitze verwendet, da ansonsten zu hohe Scherkräfte entstehen würden, die einen schädigenden Einfluss auf die Zellen nehmen und das Ergebnis verfälschen. In das mit 50 µl 0,4 % Trypanblau vorgelegte Reaktionsgefäß wurden 50 µl der gut durchmischten Zellsuspension pipettiert. Nach dem Durchmischen der Trypanblau-Zellsuspension wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert und in die Öffnung des Countess® Cell Counter geführt. Zu beachten war, dass zwischen der Inkubation mit Trypanblau und dem Messen der Probe nicht zu viel Zeit verstrich, da es sich bei Trypanblau um ein Zellgift handelt, das eine schädigende Wirkung auf die Zellen ausübt. Nach ca. 30 Sekunden zeigte sich ein scharfes Bild. Mit der Zoomtaste und dem Fokussierungsrad wurde das Bild scharf gestellt, um eine präzise Messung zu erhalten. Ein weiteres Kriterium für eine präzise Messung ist eine gute Durchmischung der Zellen. Vor jedem Pipettierschritt wurden die Zellen gut resuspendiert, so dass eine homogene Verteilung vorlag und die Zellverbände gelöst wurden. Des Weiteren wurde beachtet, dass nicht zu viel Zeit bei den Pipettierschritten verstrich, da die Zellen sich sehr schnell absetzen und dieses ein falsches Ergebnis erzeugen kann. Von jedem Well wurde eine Vierfachbestimmung durchgeführt.

2.9 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Mit Hilfe der Indirekten Immunfluoreszenzanalyse ist es möglich, spezifische Proteine und deren Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Bei der Indirekten Immunfluoreszenz werden zwei Antikörper nacheinander verwendet. Bevor die Zelle mit den Antikörpern inkubiert wird, muss diese erst fixiert und permeabilisiert werden. Somit kann der Primärantikörper an das Protein binden, jedoch noch nicht detektiert werden, da ihm ein Fluoreszenzfarbstoff fehlt, mit dem der Sekundärantikörper gekoppelt ist. Der Sekundärantikörper richtet sich gegen den Primärantikörper. Durch die Bindung des markierten Sekundärantikörpers kann dieser nun erkannt werden und führt gleichzeitig zu einer Verstärkung des Signals. Nun kann der Fluoreszenzfarbstoff durch Licht der richtigen Wellenlänge angeregt und sichtbar gemacht werden [Lottspeich & Engels, 2012].

Für die Indirekte Immunfluoreszenzanalyse wurden die Well-Platten mit autoklavierten Glasdeckgläschen bestückt, auf denen die Zellen für die mikroskopische Untersuchung anwachsen sollten. Dazu wurden die Zellen entsprechend den Verfahrensschritten wie bei der Aussaat auf 24-Well-Platten vorbereitet. Für die Fixierung der Zellen wurde das Medium abgenommen und zweimal kurz mit PBS gewaschen. Unter Verwendung von 1 ml Extraktionspuffer „PIPES“ wurden die Zellen für die Extraktion und die Permeabilisierung der Zelle für 1 Minute inkubiert. Nun erfolgte die Fixierung mit 1 ml -20°C kalten Methanols für 4 Minuten. Daran schlossen sich drei weitere Waschschrte mit 1 ml PBS für je 5 Minuten an. Beim letzten Waschschrte verblieb das PBS im Well und die jeweiligen Glasdeckgläschen wurden in eine vorher vorbereitete Petrischale, die mit feuchtem Filterpapier ausgelegt und mit Parafilm bedeckt war, gelegt. In dieser feuchten Atmosphäre wurden die Glasdeckgläschen bei Raumtemperatur mit 50 μl des Primärantikörpers (Maus α -Tubulin 1:300), der in PBS + 10% FKS verdünnt wurde, für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Deckgläschen ein weiteres Mal dreimal je 5 Minuten mit 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte nun eine Inkubation von 30 Minuten mit 50 μl des Sekundärantikörpers (Cy3- α -Maus 1:300) mit dem Fluoreszenzfarbstoff, der ebenfalls mit PBS + 10% FKS verdünnt wurde. Ebenso wie bei der ersten Inkubation befanden sich die jeweiligen Glasdeckgläschen in einer vorbereiteten Petrischale. Auch hier wurde erneut dreimal mit PBS für jeweils 5 Minuten gewaschen. Zum Anfärben des Zellkerns wurde die DNA-bindende Substanz DAPI verwendet. Die DAPI-Lösung wurde auf eine Konzentration von 2 mg/ml mit PBS verdünnt. Im Well wurden 0,5 ml der DAPI-Lösung auf die jeweiligen Glasdeckgläschen pipettiert und für 2 Minuten inkubiert. Bevor die Glasdeckgläschen nacheinander auf einen Objektträger eingebettet werden konnten, wurden sie jeweils kurz in ddH_2O getaucht und der Überschuss an Wasser an einem Zellstofftuch abgetupft. Auf einem Objektträger wurden 5 μl Mowiol vorgelegt und die Glasdeckgläschen zur Einbettung jeweils mit der Zellseite nach unten auf den Tropfen gelegt.

Tabelle 2.2: Verwendete Lösungen für die Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Lösungen	Zusammensetzung/Hersteller
PIPES-Extraktionspuffer	80 mM k-Pipes (7,55 g/250 ml ddH ₂ O) 5 mM EGTA (0,47 g/250 ml ddH ₂ O) 1 mM MgCl ₂ 0,5 % Triton X-100 pH 6,8 mit KOH
Mowiol	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 6 ml ddH ₂ O 12 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)
Maus α-Tubulin	Sigma
Cy3 α-Maus	Sigma
Methanol	Roth

3 Ergebnisse

3.1 Größenausschlusschromatographie

In einer vorrausgehenden Bachelorarbeit [Rützel, 2012] wurde beschrieben, dass frischer Ingwer-Extrakt eine inhibierende Wirkung auf HeLa-Zellen besitzt. Für eine weitergehende Untersuchung dieses Effekts in der vorliegenden Arbeit wurde mittels Größenausschlusschromatographie Ingwer-Extrakt in höherer Konzentration und abgewandelter Herstellungsweise aufgetrennt. Der Ingwer-Extrakt wurde aus 10 g Ingwer hergestellt und sterilfiltriert (siehe Kapitel 2.4). 4 ml des frisch hergestellten Extrakts wurden auf die Säule (HiPrep 16/60 Sephacryl S-200-HR; SV = 120 ml) injiziert und mit HeLa-Medium als Laufpuffer mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,75 ml/min von der Säule gespült und in 2 ml Fraktionen aufgefangen. In Abbildung 3.1 ist das Spektrum der Größenausschlusschromatographie dargestellt. Dieses wurde mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgenommen. Bei dieser Wellenlänge detektieren ausschließlich Proteine. Die abgebildeten Peaks stellen also das Elutionsprofil der im Ingwer enthaltenen Proteine dar.

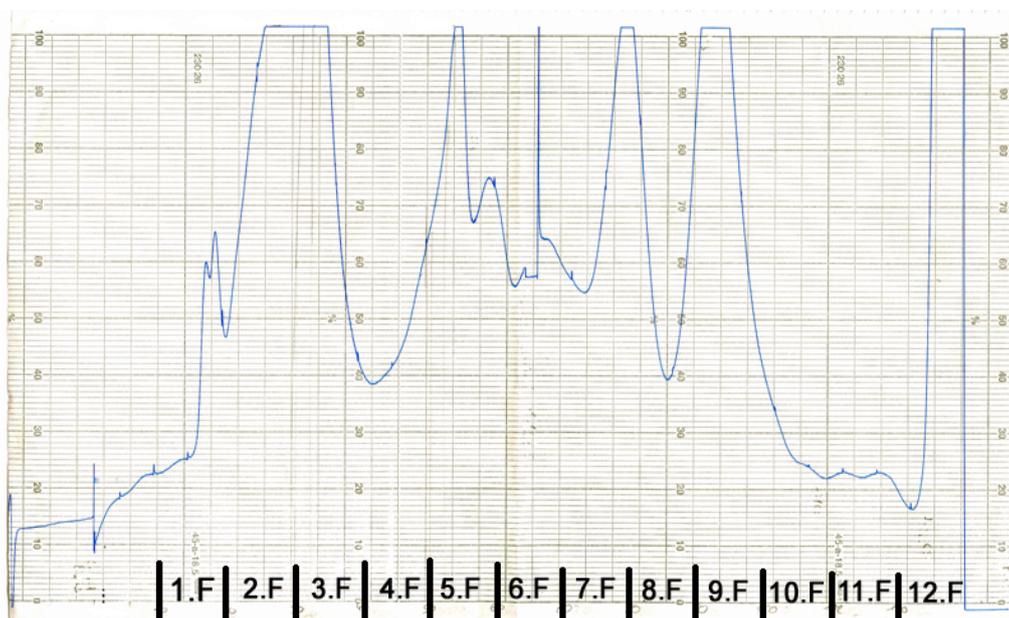


Abbildung 3.1: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Extrakts von Ingwer

Dargestellt ist der Verlauf der Absorption während der Auftrennung des Extrakts von Ingwer durch eine Größenausschlusschromatographie. Das Chromatogramm stellt in der vertikalen Ebene die Absorption bei 280 nm und in der horizontalen Ebene die Fraktionen dar. Unter Verwendung von HeLa-Medium ohne FKS als Laufpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,75 ml/min wurde auf eine Hi-Prep Sephacryl S-200 Säule mit einem Säulenvolumen von 120 ml ein Probenvolumen von 4 ml aufgetragen und in Fraktionen von 2 ml gesammelt. Die abgebildeten Fraktionen ("F") beziehen sich auf jeweils 10 vereinigte 2 ml-Fraktionen, wie sie in der nachfolgenden Proliferationsanalyse verwendet wurden.

3.2 Einfluss von Ingwer-Fractionen auf die Proliferation von HeLa- und CHO-Zellen

Bei den im Ingwer aktiven Stoffen kann es sich auch um niedermolekulare Stoffe handeln. Vor allem wird den phenolischen Verbindungen, wie Gingerol oder Shogaol, eine Wirkung auf den Zellzyklus zugesprochen (siehe Kapitel 1.5). Deshalb wurden nicht nur einzelne willkürlich ausgewählte Fraktionen, sondern das ganze Spektrum der Säule auf seine Aktivität getestet. Teile des in 2 ml-Reaktionsgefäßen aufgefangenen Eluats wurden für die aufwendige Analyse wieder zu Fraktionen von jeweils 12 Eluatfraktionen vereinigt.

Tabelle 3.1 : Vereinigte Fraktionen

Fraktionen	Vereinigte Chromatographie-Fraktionen
1	11 - 20
2	21 - 30
3	31 - 40
4	41 - 50
5	51 - 60
6	61 - 70
7	71 - 80
8	81 - 90
9	91 - 100
10	101 - 110
11	111 - 120
12	121 - 130

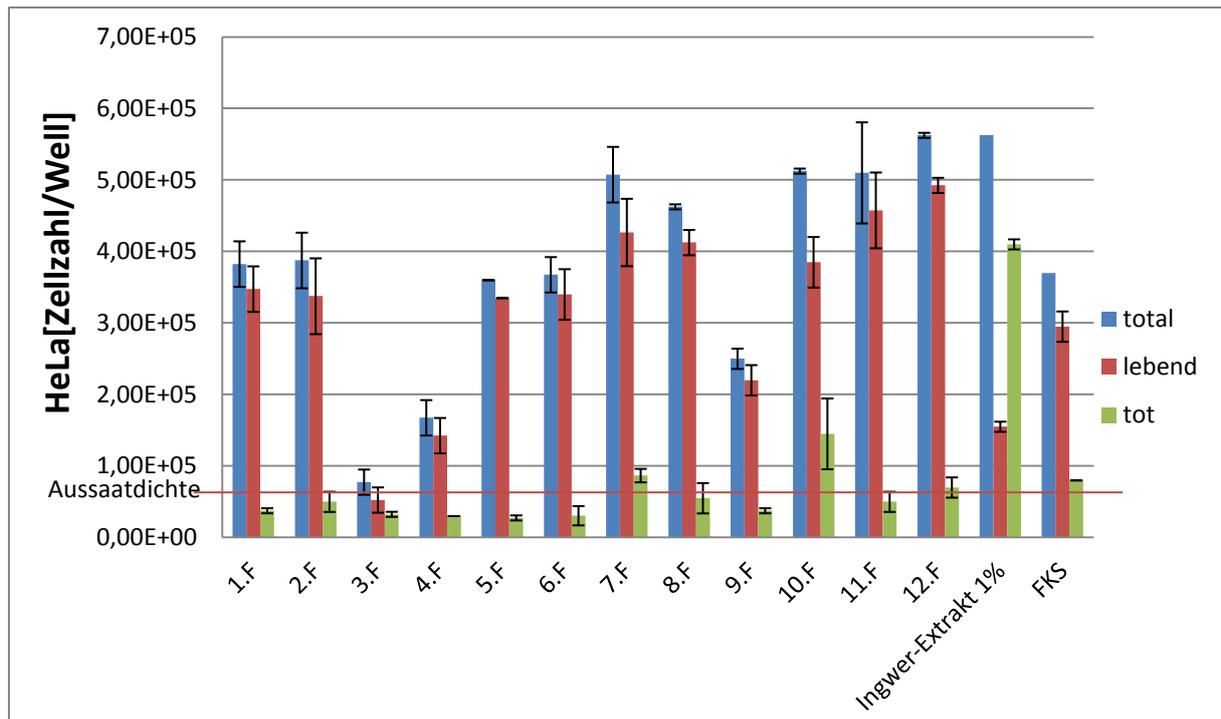


Abbildung 3.2: Einfluss hochkonzentrierter (60%) Ingwer-Fractionen auf die Proliferation von HeLa-Zellen

Dargestellt ist die Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss verschiedener Fraktionen in einer Konzentration von 60 % aus der Größenausschlusschromatographie des Ingwer-Extrakts. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: 5×10^4 Zellen pro Well) in FKS-freies Medium mit entsprechender Konzentration der Fraktionen bzw. in FKS-haltiges Medium (Referenz) überführt. Außerdem wurde der Ingwer-Extrakt, welcher auf die Säule gegeben wurde, parallel in 1%iger Konzentration getestet. Nach 48 h Inkubation wurde die Gesamtzellzahl (total, blau) sowie die Zahl an lebenden (lebend, rot) und toten (tot, grün) Zellen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Vierfachbestimmung dar.

Um die einzelnen Fraktionen genauer auf ihre Aktivität untersuchen zu können, wurden diese dem Kulturmedium in einer Konzentration von 60 % zugesetzt, zu den in 24-Welltestplatten vorbereiteten HeLa-Zellen gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Für diesen Versuch wurden jeweils 600 μ l der einzelnen Fraktionen (entsprechend Abb. 3.1) mit 400 μ l HeLa-Medium ohne FKS verdünnt. Die HeLa-Zellen wurden einen Tag zuvor mit einer Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen pro Well auf die 24-Wellplatten ausgesät. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die Zellen mit HeLa-Medium mit 1 %igem Ingwer-Ausgangsextrakt und zur Kontrolle gleichzeitig mit HeLa-Medium mit FKS inkubiert.

In Abbildung 3.2 ist der Einfluss der einzelnen Fraktionen auf die Proliferation von HeLa-Zellen dargestellt. Die gezeigten Balken zeigen die Gesamtzellzahl (blau), die Lebendzellzahl (rot) und die Anzahl der toten Zellen (grün) pro Well.

Besonders auffällig ist, dass die Fraktionen 3 und 4 einen stark inhibierenden Effekt auf die HeLa-Zellen aufweisen. Ihre Gesamtzellzahl wie auch die der Lebend- und Totzellzahl ist viel geringer als die der Kontrolle. Wie deutlich in der Abbildung 3.2 zu sehen ist, hat die 3. Fraktion einen stärkeren Effekt auf die HeLa-Zellen als die 4. Fraktion, die Gesamtzellzahlen liegen kaum über der Aussaatdichte. Der 1 %ige Ingwer-Extrakt weist auch eine stark inhibierende Wirkung auf die HeLa-Zellen auf, wie an den vielen toten Zellen zu erkennen ist. Es sieht so aus, als ob er aber nicht nur eine inhibierende, sondern auch eine stimulierende Wirkung besitzt, da seine Gesamtzellzahl wesentlich höher als die der FKS-haltigen Referenz ist. Jedoch ist die Lebendzellzahl geringer als die der FKS-haltigen Referenz. Auch die 9. Fraktion zeigt einen deutlichen inhibierenden Effekt auf die HeLa-Zellen. Er ist wesentlich geringer als der der 3. und 4. Fraktion, aber seine Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl ist geringer als die der FKS-haltigen Referenz und der nicht inhibierenden Fraktionen. Aus dem Diagramm lässt sich nicht nur ein inhibierender Effekt der Fraktionen auf die HeLa-Zellen feststellen, es hat auch den Anschein, dass die Fraktionen 7, 8, 10, 11 und 12 eine stimulierende Wirkung auf die Zellen besitzen. Ihre Gesamtzellzahl und Lebendzellzahl ist erheblich höher als die der FKS-haltigen Referenz. Dagegen ist bei der 10. Fraktion die Anzahl der toten Zellen geringfügig höher als die der FKS-haltigen Referenz und der anderen Fraktionen.

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Effekte wurde der gleiche Versuch mit einer Konzentration der Fraktionen im HeLa-Medium ohne FKS von 5 % durchgeführt. In der Abbildung 3.3 ist zu erkennen, dass der Diagrammverlauf dem des Diagramms in Abbildung 3.2 ganz grob ähnelt, dass die Effekte aber entsprechend der viel geringeren Konzentration weniger deutlich ausfallen.

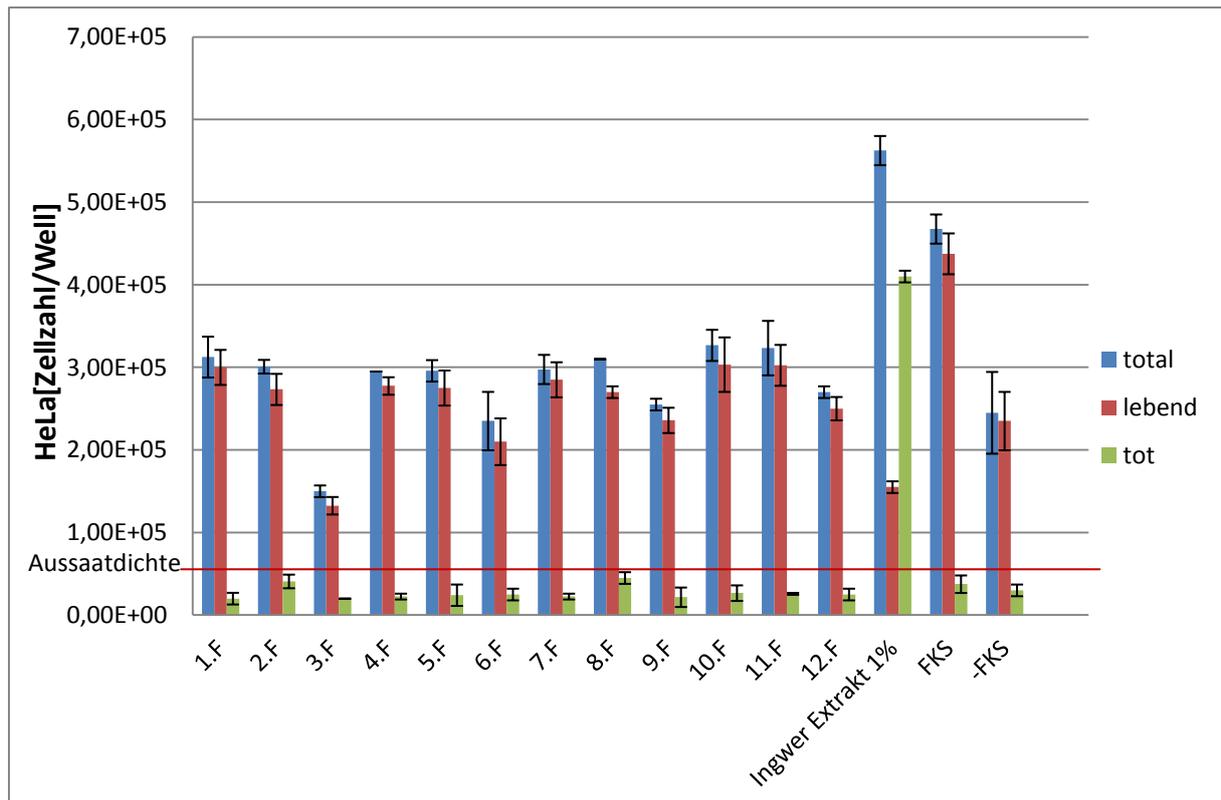


Abbildung 3.3: Einfluss niedrig konzentrierter (5%) Ingwer-Fractionen auf die Proliferation von HeLa-Zellen

Dargestellt ist die Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss verschiedener Fraktionen in einer Konzentration von 5 % aus der Größenausschlusschromatographie des Ingwer-Extrakts. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: 5×10^4 Zellen pro Well) in FKS-freies Medium mit entsprechender Konzentration der Fraktionen, in FKS-freies (Kontrolle) bzw. in FKS-haltiges Medium (Referenz) überführt. Außerdem wurde der Ingwer-Extrakt, welcher auf die Säule gegeben wurde, parallel in 1%iger Konzentration getestet. Nach 48 h Inkubation wurde die Gesamtzellzahl (total, blau) sowie die Zahl an lebenden (lebend, rot) und toten (tot, grün) Zellen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Vierfachbestimmung dar.

Wie in Abbildung 3.2 hat auch in Abbildung 3.3 die 3. Fraktion einen inhibierenden Effekt, der jedoch etwas geringer ist, welches an der etwas höheren Gesamt- und Lebendzellzahl zu erkennen ist. Dagegen ist ein inhibierender Effekt der 4. Fraktion nicht und bei der 9. Fraktion nur ganz schwach festzustellen. Ihre Gesamt-, Lebend- und Totzellzahl ähneln den Zellzahlen der FKS-freien Kontrolle.

Außerdem wird der zuvor stark wachstumsstimulierende Effekt bei der 10., 11. und 12. Fraktion bei weitem nicht mehr so deutlich, bei der 12. Fraktion ist er nicht mehr feststellbar. Bei der 10. und der 11. Fraktion liegen die Werte bei 5%igem Einsatz nur etwas über dem Niveau des FKS-freien Grundmediums („-FKS“), das auch als Elutionsmittel bei der Fraktionierung eingesetzt wurde. Im Hinblick auf die FKS-haltige Referenz gesehen sind die beiden Fraktionen um einiges schlechter

gewachsen als bei der Zugabe von 60 % der jeweiligen Fraktionen zum Medium. Wie schon das Diagramm Abb. 3.2 zeigt, hat auch hier der 1%ige Ingwer-Extrakt einen immensen Einfluss auf die HeLa-Zellproliferation.

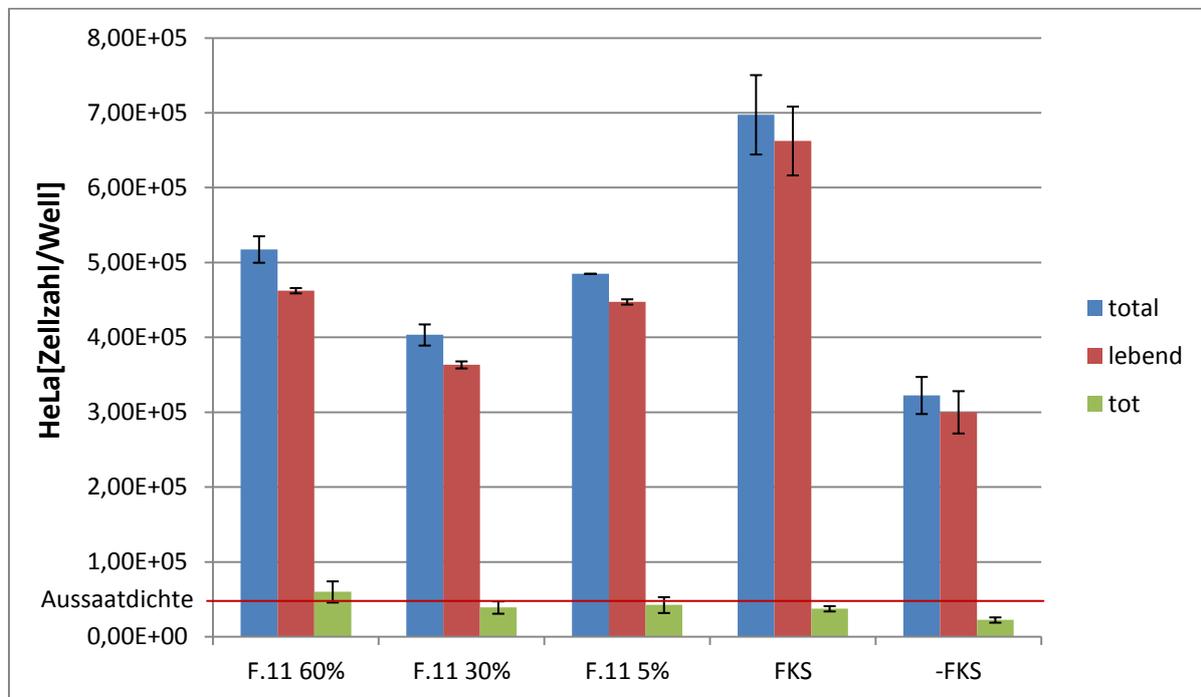


Abbildung 3.4: Einfluss verschiedener Konzentrationen der 11. Fraktion des Ingwer-Extrakts auf die Proliferation von HeLa-Zellen

Dargestellt ist die Proliferation von HeLa-Zellen unter Einfluss verschiedener Konzentration der 11. Fraktion aus der Größenausschlusschromatographie des Ingwer-Extrakts. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: 5×10^4 Zellen pro Well) in FKS-freies Medium mit entsprechender Konzentration (5-60 %) der 11. Fraktionen, in FKS-haltiges (Referenz) bzw. FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Nach 48 h Inkubation wurde die Gesamtzellzahl (total, blau) sowie die Zahl an lebenden (lebend, rot) und toten (tot, grün) Zellen pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Vierfachbestimmung dar.

Für eine differenzierte Betrachtung des stimulierenden Effekts der 10., 11. und 12. Fraktion wurden die HeLa-Zellen mit den verschiedenen Konzentrationen 60 %, 30 % und 5 % der 11. Fraktion für 48 Stunden inkubiert. Ebenso wurde zum Vergleich eine FKS-haltige Referenz und eine FKS-freie Kontrolle aufgetragen. Wie schon in den vorgehenden Versuchen wurden auch hier die HeLa-Zellen einen Tag vor Inkubation der Fraktion in einer Verdünnung von 5×10^4 Zellen pro Well auf eine 24-Wellplatte ausgesät.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in dem Diagramm der Abbildung 3.4 dargestellt. Sowohl bei der Zugabe von 60 %, 30 % und 5 % der 11. Fraktion ist ein stimulierender Effekt im Vergleich zur FKS-freien Kontrolle (= Elutionspuffer der

Chromatographie) zu erkennen. Vergleicht man die verschiedenen Konzentrationen mit der FKS-haltigen Referenz („FKS“) und der FKS-freien Kontrolle („-FKS“), so ist ihre Gesamt- und Lebendzellzahl zur FKS-haltigen Referenz zwar geringer, aber zur FKS-freien Kontrolle deutlich höher. Die Totzellzahl aller Proben ist ungefähr gleich, es liegen nur minimale Unterschiede vor. Den größten stimulierenden Effekt weisen die 60 % der 11. Fraktion auf. Minimal darunter liegt die Gesamt- und Lebendzellzahl der 11. Fraktion mit 5 %. Die Zellzahl der 60 % stimmt etwa mit der in Abbildung 3.2 überein. Auffällig ist, dass 30 % der 11. Fraktion in ihrer Gesamt- und Lebendzellzahl unter der von 60 % und 5 % liegt, aber ihre stimulierende Wirkung dennoch geringfügig höher als die der FKS-freien Kontrolle ist. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei dieser Konzentration sich zwei stimulierende und inhibierende Effekte überlagern und es so zu einem geringeren Wachstum kommt. Es könnte auch eine einfache Schwankung innerhalb der Messungen sein. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine stimulierende Wirkung der 11. Fraktion auf das Wachstum von HeLa-Zellen.

Als nächstes wurde untersucht inwieweit die beobachteten Ergebnisse nur für die Krebszelllinie HeLa gelten oder auch für Nichttumorzellen, wie CHO-Zellen, die gleichen Effekte zeigen. In Abbildung 3.5 ist die Proliferation der in HeLa-Zellen aktiven Fraktionen (Abbildung 3.2 und 3.3), 3.F., 4.F., 9.F. und 11.F., auf CHO-Zellen in einer Konzentration von 60 % und 5 % abgebildet.

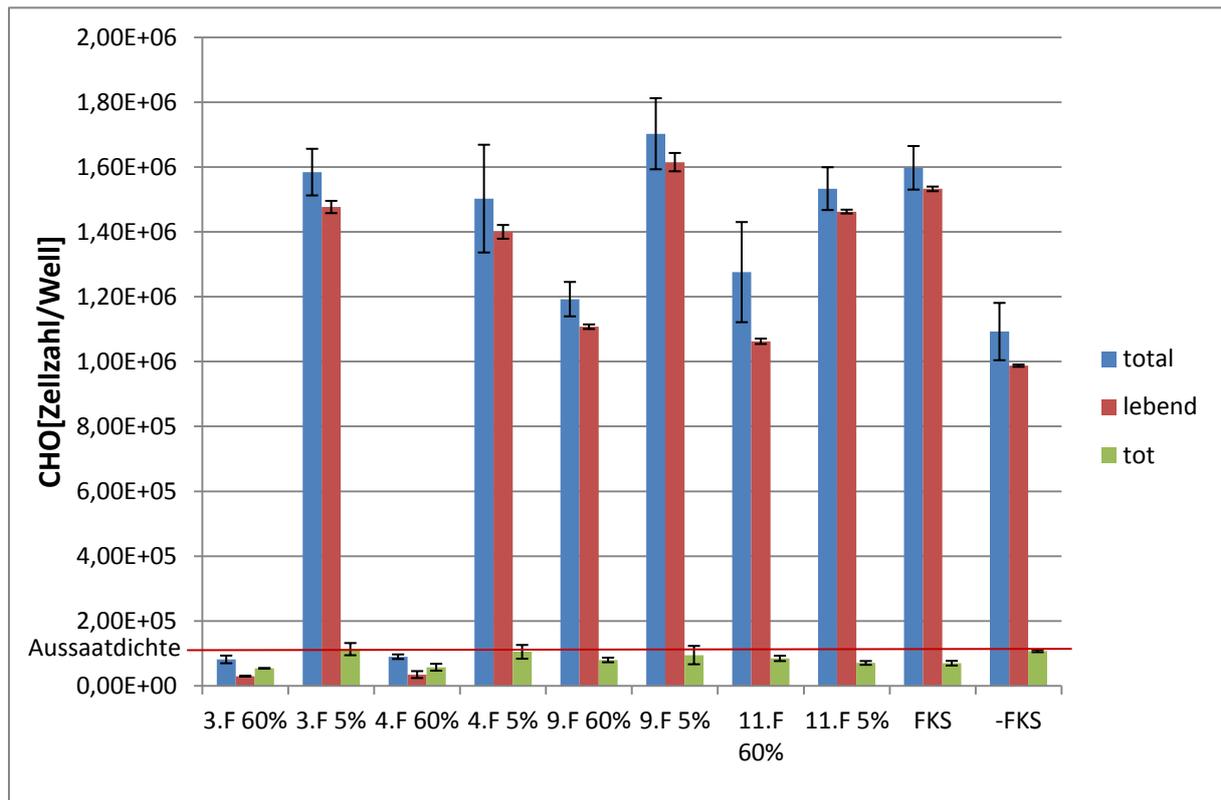


Abbildung 3.5: Einfluss ausgewählter Fraktionen des Ingwer-Extrakts in einer Konzentration von 5 % und 60 % auf die Proliferation von CHO-Zellen

Dargestellt ist die Proliferation von CHO-Zellen unter Einfluss ausgewählter Fraktionen in einer Konzentration von 5 % und 60 % aus der Größenausschlusschromatographie des Ingwer-Extrakts. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: 1×10^5 Zellen pro Well) in FKS-freies Medium mit entsprechender Konzentration der Fraktionen, in FKS-haltiges (Referenz) bzw. FKS-freies (Kontrolle) Medium überführt. Nach 48 h Inkubation wurde die Gesamtzellzahl (total, blau) sowie die Zahl an lebenden (lebend, rot) und toten (tot, grün) Zell pro Well ermittelt und die Mittelwerte berechnet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Vierfachbestimmung dar.

Die 3. und 4. Fraktion haben bei einer Konzentration von 60 % verglichen mit Abbildung 3.2 den gleichen inhibierenden Effekt auf CHO-Zellen wie auf HeLa-Zellen, vielleicht ist er sogar noch etwas stärker ausgeprägt. Bei einem Vergleich der Diagramme (Abb. 3.2 und 3.5) wird aber auch deutlich, dass sich die Fraktionen 3 und 4 bei einer Konzentration von 5 % erheblich in ihrer Wirkung auf CHO- und HeLa-Zellen unterscheiden. In Abbildung 3.2 besitzt die 3. Fraktion noch eine klar inhibierende Wirkung auf die HeLa-Zellen. Bei CHO-Zellen (Abbildung 3.5) ist bei der gleichen Konzentration dieser Effekt jedoch nicht mehr zu sehen. Es hat den Anschein, dass sowohl die 3. als auch die 4. Fraktion in der 5%igen Konzentration auf die CHO-Zellen sogar eine stimulierende Wirkung besitzen, da ihre Gesamt- und Lebendzellzahl nahezu der von der FKS-haltigen Referenz entsprechen und die Zellzahlen der FKS-freien Kontrolle weit überschreiten. Die Totzellzahl der Fraktionen beider Konzentrationen weist keine Unterschiede auf.

Bei der 9. und 11. Fraktion ist im Vergleich zur FKS-freien Kontrolle in einer Konzentration von 60 % kein merklicher Effekt auf die CHO-Zellen zu erkennen. Im Vergleich zu den HeLa-Zellen weisen sie in der Konzentration von 60 % weder einen inhibierenden noch einen stimulierenden Effekt auf (vgl. Abb. 3.2). Ihre Gesamt- und Lebendzellzahl entspricht annähernd der Zellzahl der FKS-freien Kontrolle. In der geringeren Konzentration von 5 % ist zu erkennen, dass sowohl die 11. als auch die 9. Fraktion einen stimulierenden Effekt auf die CHO-Zellen besitzt. Ihre Lebend- und Gesamtzellzahl ist der von der FKS-haltigen Referenz ebenbürtig. Die 9. Fraktion übersteigt sogar die Zellzahl der FKS-haltigen Referenz. In Abbildung 3.3 ist in der Konzentration von 5 % kein stimulierender Effekt der 9. und der 11. Fraktion zu sehen. Die Fraktionen 9 und 11 unterscheiden sich somit in ihrer Wirkung auf HeLa- und CHO-Zellen (vgl. Abb. 3.3 und Abb. 3.5). Insgesamt dominieren bei CHO-Zellen bei 5%iger Konzentration die stimulierenden Effekte und die inhibierenden treten nicht mehr zu Tage.

3.3 Auswirkungen der Ingwer-Fraktionen auf die Morphologie von HeLa-Zellen

In Bezug auf die hiergezeigte (Kapitel 3.2) stimulierende und inhibierende Wirkung der Ingwer-Fraktionen auf HeLa-Zellen, sollten durch nähere Betrachtung der Morphologie der HeLa-Zellen und ihres Zytoskeletts die zellulären Auswirkungen der Ingwer-Fraktionen untersucht werden. Dazu wurden die HeLa-Zellen im Lichtmikroskop betrachtet und eine Indirekte Immunfluoreszenzanalyse des Mikrotubuligerüsts vorgenommen.

3.3.1 HeLa-Zellen im Lichtmikroskop

Wie schon in Kapitel 3.2 beschrieben wurden die HeLa-Zellen nach 24 Stunden Adhäsionszeit auf der 24-Wellplatte mit Fraktionen, Ingwer-Extrakt und FKS-haltige Referenz für 48 Stunden inkubiert (siehe Kapitel 2.7). Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop im Phasenkontrast mit unterschiedlicher Vergrößerung betrachtet.

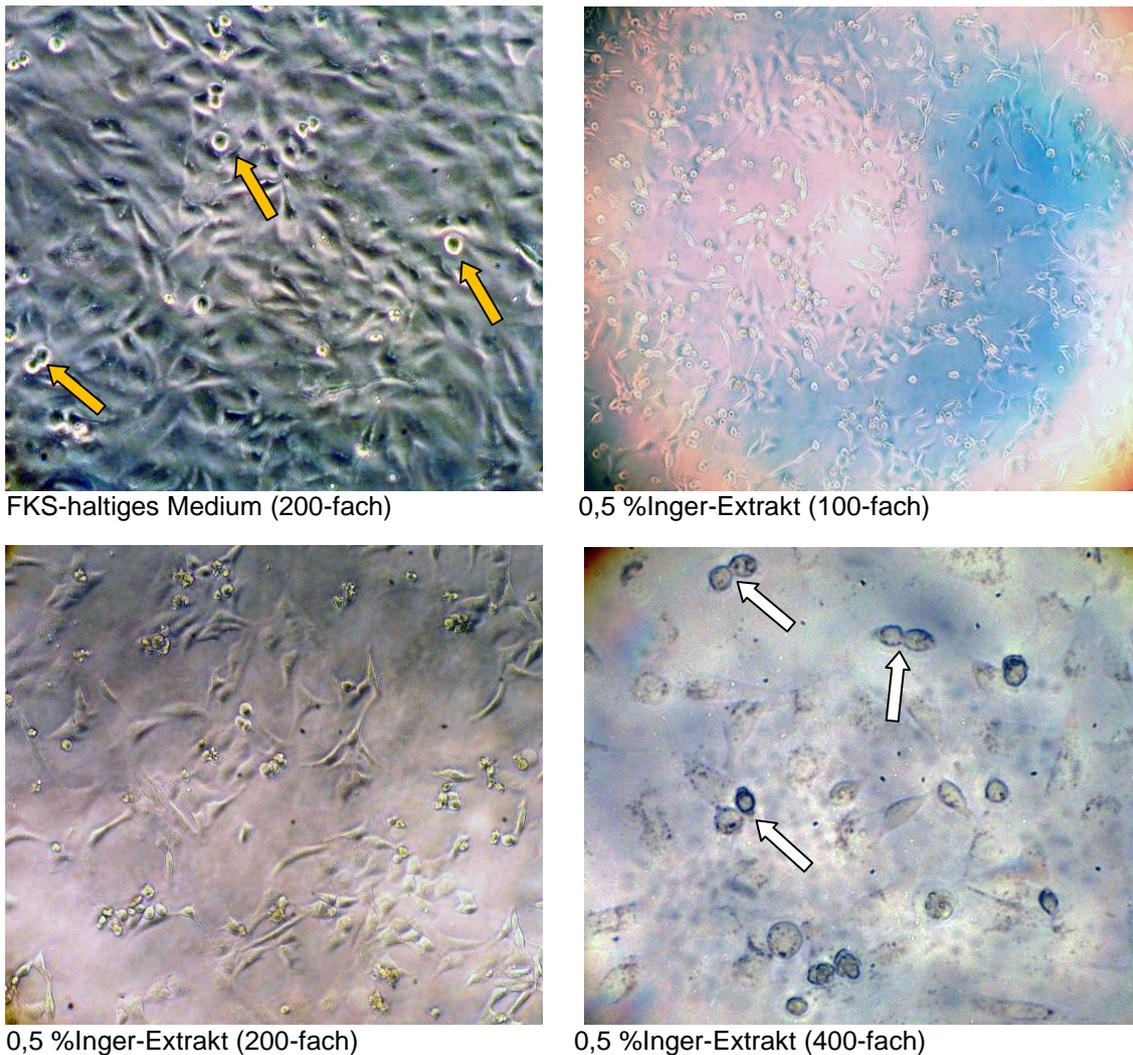


Abbildung 3.6: Aufnahme von HeLa-Zellen mit FKS-haltigem Medium (Referenz) und mit 0,5 % Ingwer-Extrakt

Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: 5×10^4 Zellen pro Well) mit FKS-haltigem Medium (Referenz) und mit 0,5 % des Ingwer-Extrakts im Medium bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank für 48 h inkubiert (gelber Pfeil = tote Zellen, weißer Pfeil = nicht getrennte Zellen).

Nur durch einen direkten Vergleich der FKS-Referenz und des Ingwer-Extrakts kann eine Aussage über die Morphologieänderungen der HeLa-Zellen auf Grund der Ingwer-Komponenten getroffen werden. In Abb. 3.6 ist die FKS-Referenz abgebildet, sie zeigt die typische Morphologie von HeLa-Zellen in dem üblichen FKS-haltigen Kulturmedium. Die HeLa-Zellen bilden einen konfluenten Zellrasen. Sobald sie angewachsen sind, nehmen sie, wie hier zu sehen ist, eine epitheliale Form an. Bei niedrigen Konzentrationen neigen sie zu einer leicht länglichen Morphologie. Die Zellen haben die Kulturfläche dicht bewachsen. Es sind vereinzelt abgerundete tote Zellen (gelber Pfeil) zu erkennen. Ebenfalls sind in der Abb. 3.6 die mit 0,5 % Ingwer-Extrakt inkubierten HeLa-Zellen dargestellt. Der Vergleich der Referenz mit den

unterschiedlichen Vergrößerungen der mit Ingwer-Extrakt inkubierten Zellen bestätigt die schon in Kapitel 3.2 erlangte Kenntnis, dass der Ingwer-Extrakt eine inhibierende Wirkung auf die HeLa-Zellen besitzt. In 100-facher Vergrößerung zeigt sich, dass die HeLa-Zellen bei gleicher Aussaatdichte nicht so konfluent wachsen wie in der Referenz. Es sind deutlich viele freie Stellen zu erkennen, an denen sich keine Zelle befindet. Auch befinden sich mehr tote Zellen unter ihnen. In der 200-fachen Vergrößerung ist dieses noch eindeutiger zu erkennen. Einen ersten Hinweis auf die morphologischen Charakteristika und auf die mögliche zelluläre Ursache des Absterbens der mit Ingwer-Extrakt inkubierten HeLa-Zellen gibt die 400-fache Vergrößerung. Es ist zu vermuten, dass einige der HeLa-Zellen sich in der letzten Phase des Zellzyklus befinden, sich aber nicht mehr richtig physisch voneinander trennen können. Diese Zellen sind abgerundet, hängen aber noch aneinander (weißer Pfeil). Bei noch höheren Extrakt-Konzentrationen war es nicht möglich Aufnahmen zu fertigen, da bei über 1 % des Ingwer-Extrakts die Zellen lysiert und abgelöst waren.



5 % 3. Fraktion (100-fach)



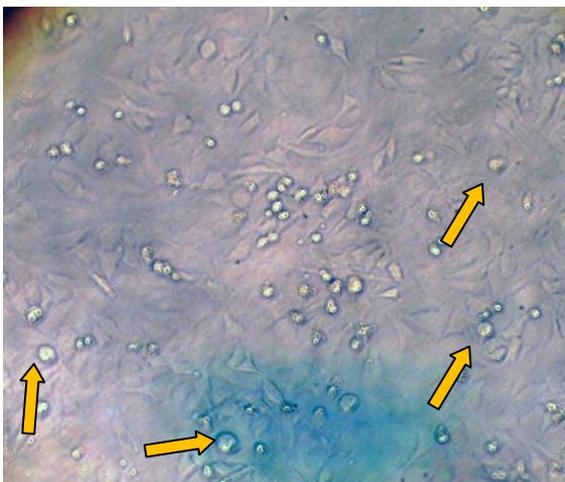
5 % 3. Fraktion (200-fach)



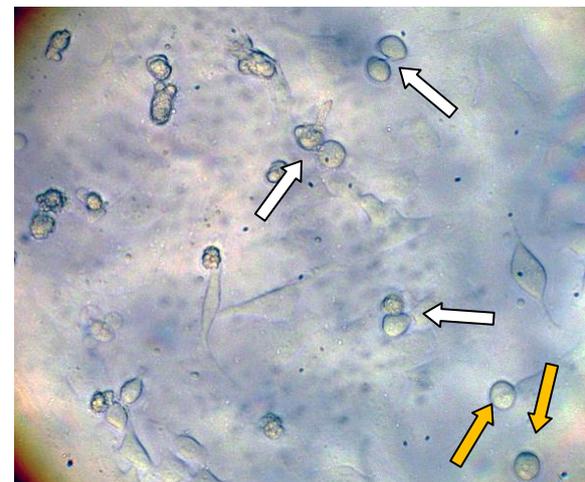
5 % 3. Fraktion (400-fach)



5 % 4. Fraktion (100-fach)



5 % 4. Fraktion (200-fach)



5 % 4. Fraktion (400-fach)

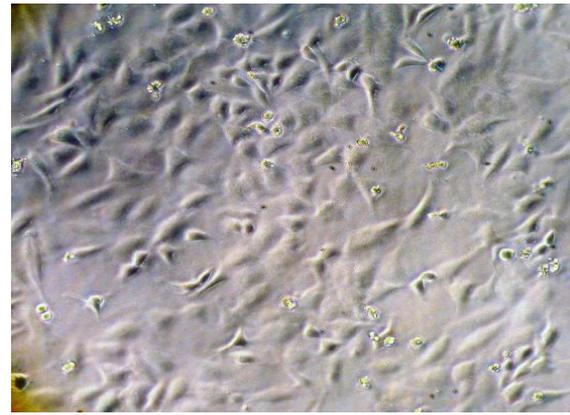
Abbildung 3.7: Phasenkontrast-Aufnahme von HeLa-Zellen unter Einfluss von 5 % der 3. und 4. Fraktion

Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: 5×10^4 Zellen pro Well) mit mit 5 % der 3. und 4. Fraktion bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank für 48 h inkubiert (gelber Pfeil = tote Zellen, weißer Pfeil = nicht getrennte Zellen, roter Pfeil = Zellgruppierungen).

Neben dem Ingwer-Extrakt sollten im Folgenden auch die verschiedenen chromatographischen Fraktionen auf die Zellmorphologie von HeLa-Zellen analysiert werden. In Abbildung 3.7 ist der Einfluss von 5 % der 3. und 4. Fraktion auf die Morphologie der HeLa-Zellen zu sehen. Wie auch schon in Kapitel 3.2 für die Proliferation erwähnt, ist auch in Bezug auf die Morphologie ein Unterschied zwischen Fraktion 3 und 4 zu sehen. Im Vergleich der 100-fachen Vergrößerung der Fraktionen zur Referenz (Abb. 3.6) wird deutlich, dass die 3. Fraktion immens von der Referenz abweicht. Die Zellen sind nicht dicht bewachsen, es sind sehr viele freie Stellen zu sehen. Auch die Anzahl der lebenden und toten Zellen ist gesunken. Bei 200-facher Vergrößerung zeigt sich, dass die meisten Zellen tot (gelber Pfeil) und abgerundet sind. Auffällig ist, dass die toten Zellen nicht abgelöst im Medium schwimmen, sondern sich gruppieren. Eindeutig ist eine Aggregation (roter Pfeil) in der 400-fachen Vergrößerung der 3. Fraktion zu erkennen. Es hat den Anschein, als ob die Zellen sich nicht mehr voneinander trennen können. Ein derart extremes Bild zeigt sich weder bei der Referenz noch bei den HeLa-Zellen, die mit 0,5 % Ingwer-Extrakt inkubiert wurden. Ebenso wenig ist dieser Effekt bei der 4. Fraktion zu erkennen. Sie ähnelt bei der 100-fachen Vergrößerung eher der Referenz. In 200- und 400-facher Vergrößerung wird der Unterschied deutlicher. Es sind auch hier mehr abgerundete tote Zellen zu sehen, die sich nicht mehr richtig voneinander trennen können, wie in Abbildung 3.6 beim Ingwer-Extrakt in 400-facher Vergrößerung zu beobachten ist.



60 % 9. Fraktion (100-fach)



60 % 9. Fraktion (200-fach)



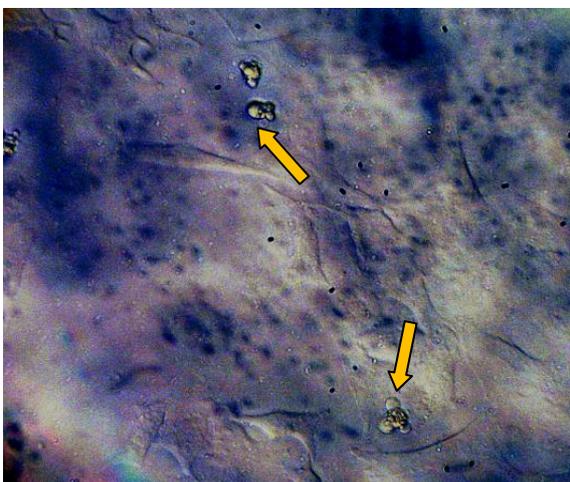
60 % 9. Fraktion (400-fach)



60 % 11. Fraktion (100-fach)



60 % 11. Fraktion (200-fach)



60 % 11. Fraktion (400-fach)

Abbildung 3.8: Phasenkontrast-Aufnahme von HeLa-Zellen unter Einfluss von 60 % der 9. und 11. Fraktion

Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaaddichte: 5×10^4 Zellen pro Well) mit 60 % der 9. und 11. Fraktion bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank für 48 h inkubiert (gelber Pfeil = tote Zellen).

Im Anschluss sollten auch die Fraktionen 9 und 11 getestet werden, die im Proliferationsstest eine inhibierende bzw. stimulierende Wirkung gezeigt hatten (Abb. 3.3). In Abbildung 3.8 ist die Wirkung der 9. und 11. Fraktion auf die Morphologie der HeLa-

Zellen dargestellt. Verglichen mit den in Abbildung 3.7 gezeigten Bildern der 3. und 4. Fraktion sehen die Zellen der 9. und 11. Fraktion wesentlich unbeeinflusster aus. In allen 3 Vergrößerungen der 9. und 11. Fraktion ist eine wesentlich höhere Anzahl an lebenden Zellen zu sehen als in den Fraktionen 3 und 4 (vgl. Abb. 3.7). Vielmehr ähneln die Zellen eher der Referenz (vgl. Abb. 3.6). In der 100-fachen Vergrößerung sind im Zellrasen der 9. Fraktion noch einige Lücken zu erkennen, an denen keine Zellen gewachsen sind. Diese freien Flächen treten in der 3. und 4. Fraktion häufiger auf. Ebenso sind in der 9. Fraktion weniger abgerundete tote Zellen (gelber Pfeil) zu sehen und der Effekt der Aggregation, der sich in der 3. Fraktion gezeigt hat, bleibt hier aus. In der 11. Fraktion ist in keiner der Vergrößerungen etwas Auffälliges zu erkennen. Sie ähnelt sehr der unbehandelten Referenz (vgl. Abb. 3.6).

3.4 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von HeLa-Zellen

In Kapitel 3.3 wurde festgestellt, dass sich die HeLa-Zellen bei Inkubation mit der 3. und 4. Fraktion nicht mehr richtig trennen können, sie aggregieren und ihre Gesamtzellzahl ist stark minimiert. Um genauere Einblicke in die zellulären Ursachen der Effekte, die die Ingwer-Fraktionen auf HeLa-Zellen haben, zu bekommen, wurde die Methode der Indirekten Immunfluoreszenz gewählt. Mit dieser Methode lässt sich erkennen, welchen Einfluss die Ingwer-Fraktionen auf den Zellzyklus, das Zytoskelett und auf den Zellkern haben.

3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Die HeLa-Zellen, die für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet wurden, erfuhren die gleiche Behandlung wie die HeLa-Zellen zur Zellzahlbestimmung und lichtmikroskopischen Analyse. Im Unterschied hierzu wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen, die sich in den Wells befanden, ausgesät. Diese Methode ermöglichte eine Fixierung der Zellen, die Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper, die Anfärbung der Zellkerne und die Analyse mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Dabei wurde für die Zellkerne eine blaue (DNA-Farbstoff DAPI) und für das mit einem spezifischen Erstantikörper detektierte Tubulin eine rote Färbung, Cy3-markierter Zweitantikörper, gewählt (siehe Kapitel 2.9).

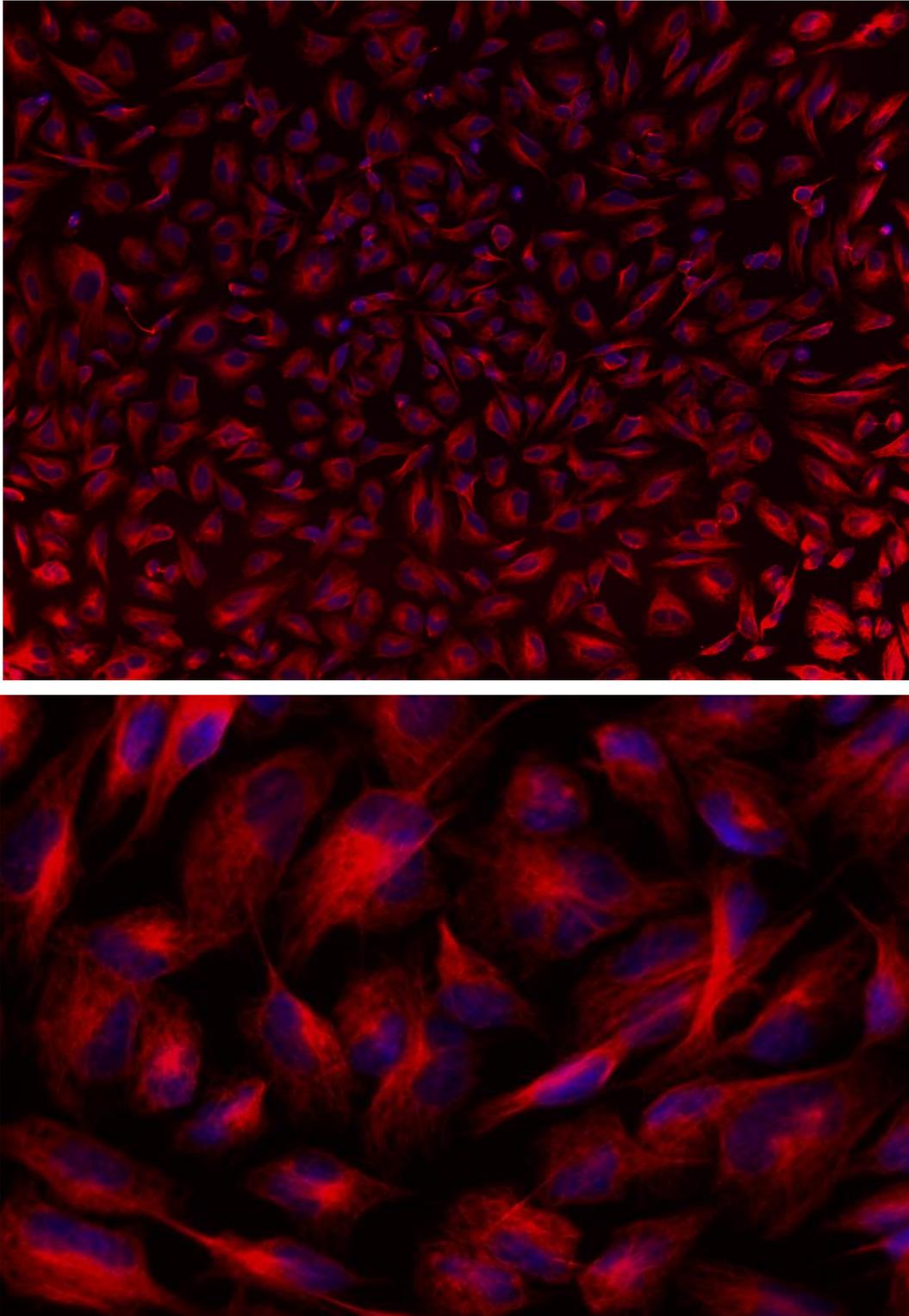


Abbildung 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen in FKS-haltigem Medium

Dargestellt sind HeLa-Zellen in FKS-haltigem Standardmedium (Referenz). Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte HeLa-Zellen: $5 \cdot 10^4$) auf Glasdeckgläschen mit dem FKS-haltigen Medium für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mittels Methanol-Fixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus α -Tubulin (1:300) und als rot fluoreszierender Sekundärantikörper Cy3- α -Maus (1:300) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Zellen im oberen Bild sind 100-fach und die unteren 400-fach vergrößert.

Als Vergleich zu der Betrachtung der mit den Ingwer-Fractionen inkubierten Zellen wurden auch HeLa-Zellen in FKS-haltigem Standardmedium (Referenz) untersucht. Das Ergebnis dieser HeLa-Zellen ist in Abbildung 3.9 dargestellt. In der 100-fachen Vergrößerung zeigt sich das Mikrotubuli-Zytoskelett rot gefärbt und der Zellkern blau. Die Zellen sind dicht aneinander gewachsen und besitzen ein normal strukturiertes Mikrotubuligerüst, das vom perinuklearen Mikrotubuliorganisationszentrum in die Peripherie ausstrahlt. Vereinzelt sind einige HeLa-Zellen im Verlauf der Zellteilung zu erkennen. Sie sind fest mit dem Untergrund verhaftet. Die 400-fache Vergrößerung bestätigt dieses Bild. Wie für HeLa-Zellen typisch besitzen einige von ihnen nicht nur einen, sondern mehrere Zellkerne.

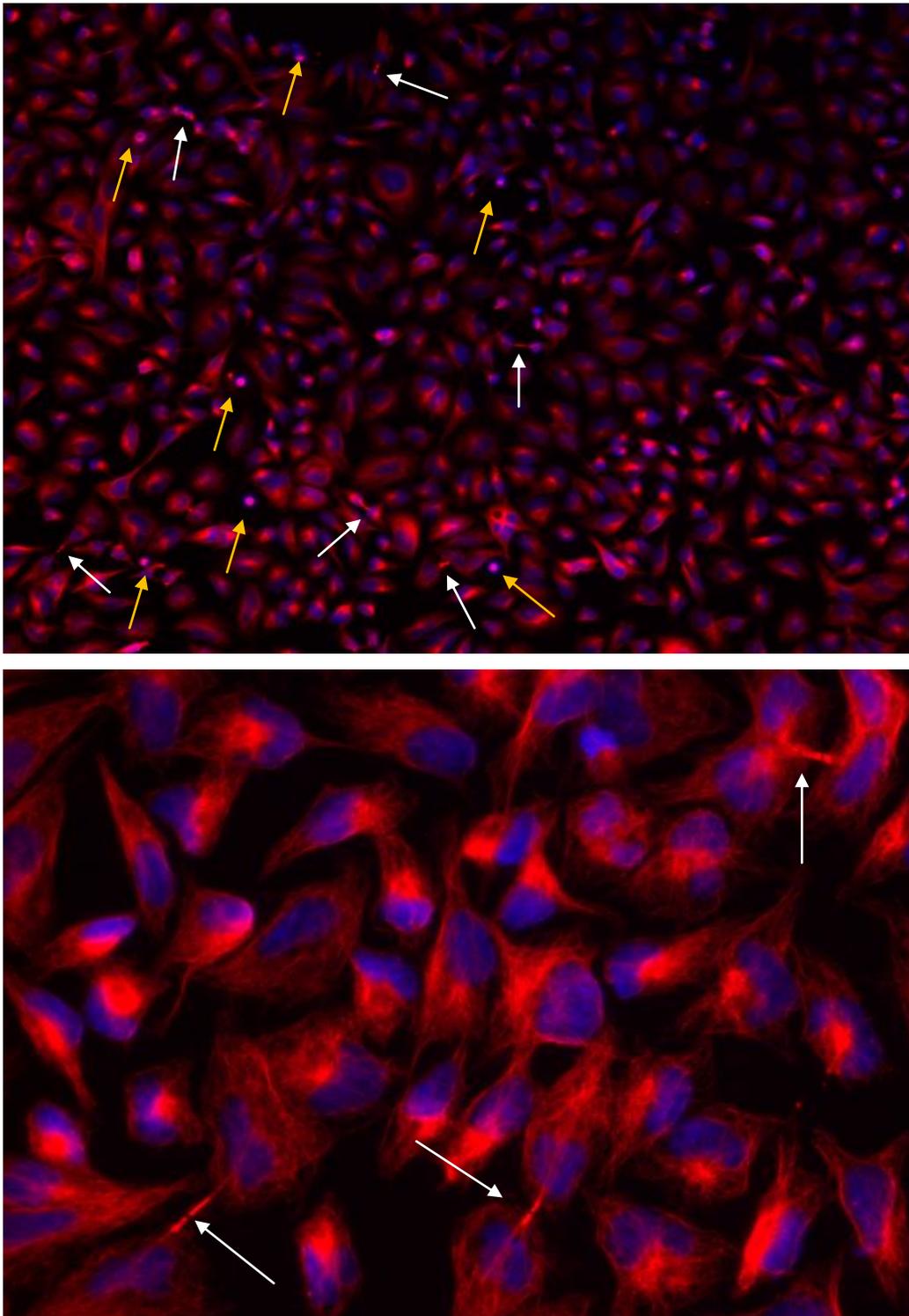


Abbildung 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen in FKS-freiem Medium mit 1 % der 3. Fraktion

Dargestellt sind HeLa-Zellen in FKS-freiem Standardmedium mit 1 % der 3. Fraktion behandelten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well) auf Glasdeckgläschen mit FKS-freiem Medium, das 1 % der 3. Fraktion enthielt, für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mittels Methanol-Fixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus α -Tubulin (1:300) und als rot fluoreszierender Sekundärantikörper Cy3- α -Maus (1:300) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Zellen im oberen Bild sind 100-fach und die unteren 400-fach vergrößert (weißer Pfeil = sich nicht trennende Zellen; gelber Pfeil = Zellen in der Zellteilung).

In Abbildung 3.10 sind die Auswirkungen von der 3. Fraktion auf HeLa-Zellen zu erkennen. Erst bei einer Konzentration von 1 % der 3. Fraktion im FKS-freien Medium war es möglich, die Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu betrachten. In höheren Konzentrationen waren die Zellen so empfindlich und lose gebunden, dass sie am Ende des Verfahrens der Indirekten Immunfluoreszenz nicht mehr auf den Deckgläschen hafteten. Der Einfluss von 1 % der 3. Fraktion ist in der 100-fachen Vergrößerung auf die HeLa-Zellen eindeutig zu erkennen. Im Gegensatz zum normalen Bild der Zellen (siehe Abb. 3.9) sind viele der Zellen abgerundet und befinden sich in Stadien der Zellteilung, der Mitose (gelber Pfeil). Eine weitere Beobachtung ist, dass sich auffällig viele Zellen am Ende der Cytokinese befinden, also sich schon zwei identische Tochterzellen gebildet haben, die aber immer noch über eine Tubulin-haltige Brücke miteinander verbunden sind. Diese Strukturen zeigen sich überdurchschnittlich häufig. Die HeLa-Zellen, die mit der 3. Fraktion behandelt wurden, weisen eine höhere intensivere Färbung des Tubulins auf als die unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 3.10). Ebenso hat es den Anschein, dass im Unterschied zur Referenz die Zellen allgemein kleiner sind und sich nicht mehr so weit auf dem Untergrund ausgebreitet haben. Die höhere Konzentration auf engem Raum könnte eine Erklärung für die intensivere Färbung des Tubulins sein.

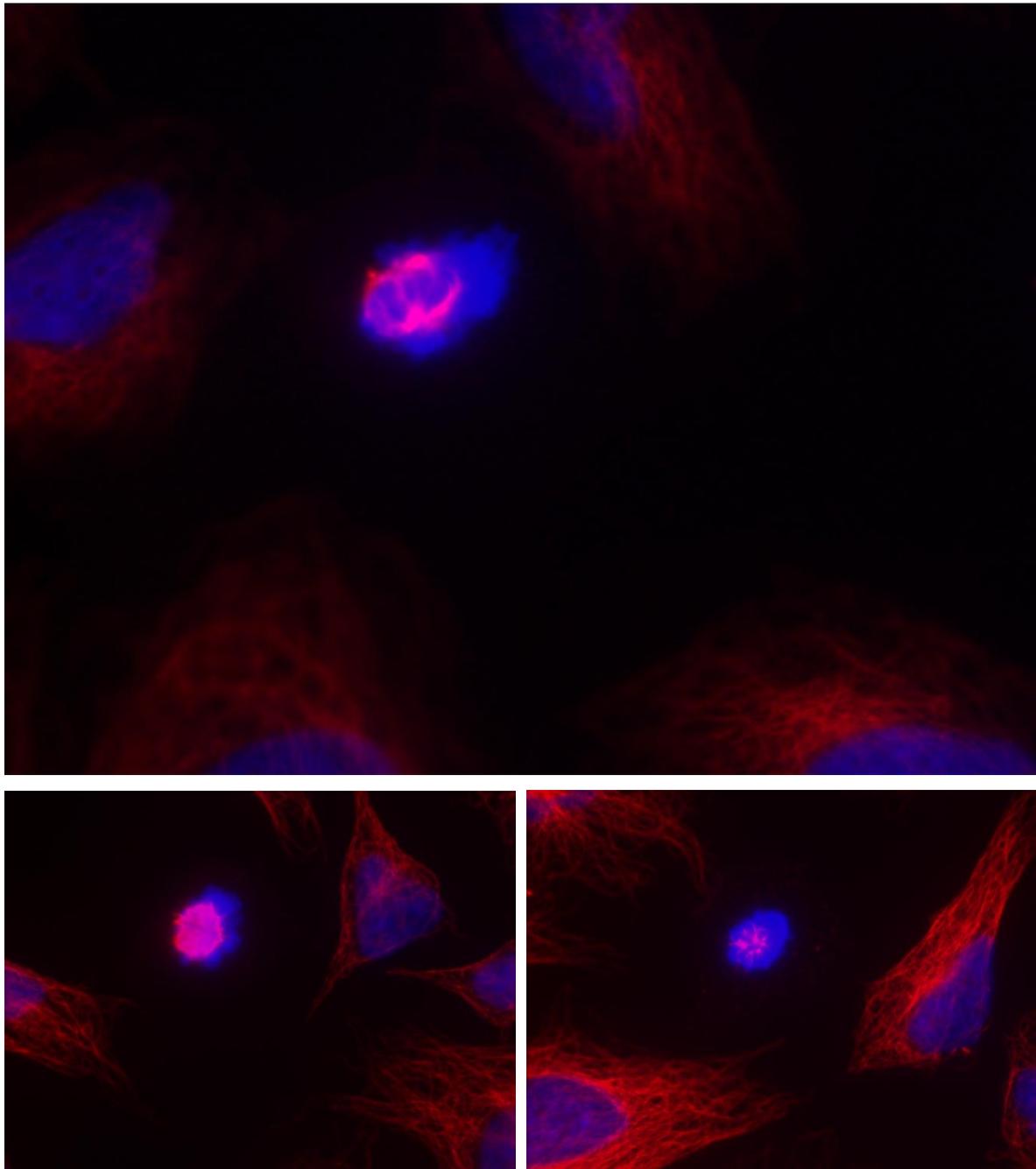


Abbildung 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-freiem Medium mit 1 % der 3. Fraktion in 1000-facher Vergrößerung

Dargestellt sind HeLa-Zellen in FKS-freiem Standardmedium mit 1 % der 3. Fraktion behandelten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well) auf Glasdeckgläschen mit FKS-freiem Medium, dass 1 % der 3. Fraktion enthielt, für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mittels Methanol-Fixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus α -Tubulin (1:300) und als rot fluoreszierender Sekundärantikörper Cy3- α -Maus (1:300) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Zellen wurden 1000-fach vergrößert.

Um die Effekte aus Abbildung 3.10 genauer analysieren zu können, wurden sie mit 1000-facher Vergrößerung aufgenommen (siehe Abb. 3.11 u. 3.12). Die Abbildung 3.11 zeigt drei HeLa-Zellen, die sich alle gerade in einem morphologisch ähnlichen Stadium der Mitose befinden. Es ist zu erkennen, dass sich die Kernhülle aufgelöst hat und der Kern zwar verdichtet, aber sonst sehr unstrukturiert vorliegt. Im Standard-medium kultivierte Zellen zeigen dieses Stadium der Zellteilung eher selten (vgl. Abb. 3.9). Es ist anzunehmen, dass dieses eine Folge der Zugabe von 1 % der 3. Fraktion ist. Die Ausbildung des Spindelapparates ist sehr ungeordnet. Die normalerweise sehr strukturierten Spindelfasern aus Mikrotubuli sind chaotisch verteilt. Es scheint, dass einige HeLa-Zellen die Mitose nicht vollständig durchschreiten und somit auch nicht die Zellteilung gänzlich abschließen können. Dieses könnte eine Erklärung für das beobachtete Zellsterben in Abbildung 3.2 und 3.7 sein.

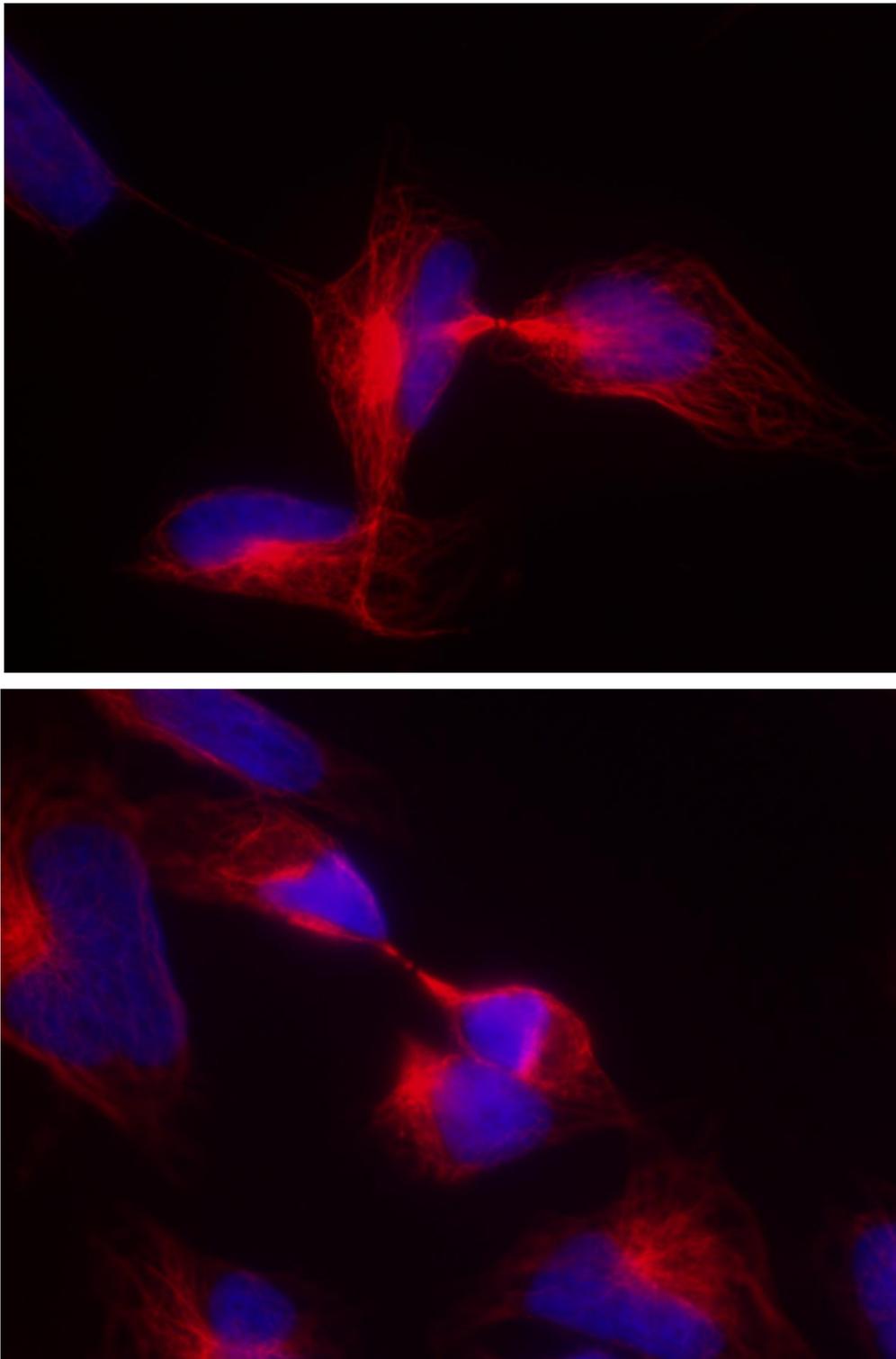


Abbildung 3.12: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-freiem Medium mit 1 % der 3. Fraktion in 1000-facher Vergrößerung

Dargestellt sind HeLa-Zellen in FKS-freiem Standardmedium mit 1 % der 3. Fraktion behandelten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdicht: $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well) auf Glasdeckgläschen mit FKS-freiem Medium, dass 1 % der 3. Fraktion enthielt, für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mittels Methanol-Fixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus α -Tubulin (1:300) und als rot fluoreszierender Sekundärantikörper Cy3- α -Maus (1:300) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Zellen wurden 1000-fach vergrößert.

In Abbildung 3.12 ist entsprechend der 400-fachen Vergrößerung in Abbildung 3.10 der zweite im Fluoreszenzmikroskop beobachtete Effekt, der von der Zugabe von 1% der 3. Fraktion verursacht wird, gezeigt. Jeweils zwei Zellen befinden sich am Ende der Cytokinese. In beiden Bildern sind zwei sich gegenüberstehende Zellen, die jeweils einen Zellkern und ein flach ausgebreitetes charakteristisches Mikrotubuligerüst besitzen, abgebildet. Die Zellen sind noch miteinander über eine typische Tubulin-haltige Brücke verbunden. Ebenso wie in Abbildung 3.10 endet natürlicherweise die Zellteilung erst in einem späteren Stadium. Die HeLa-Zellen können den Zellzyklus offensichtlich nicht vollständig zum Abschluss bringen.

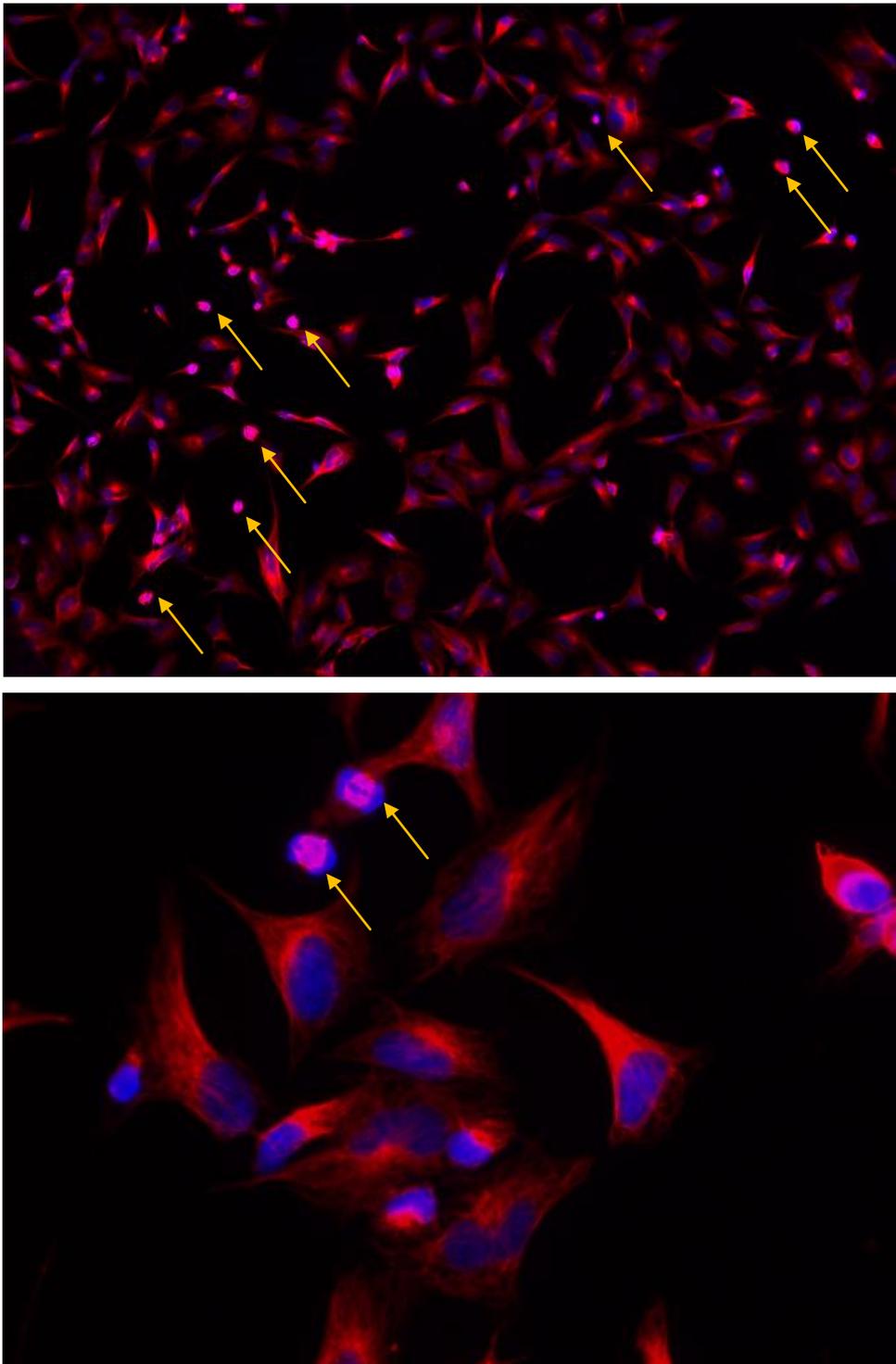


Abbildung 3.13: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-freiem Medium mit 5 % der 4. Fraktion in 400-facher Vergrößerung

Dargestellt sind HeLa-Zellen in FKS-freiem Standardmedium mit 5 % der 4. Fraktion behandelten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well) auf Glasdeckgläschen mit FKS-freiem Medium, dass 5 % der 4. Fraktion enthielt, für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mittels Methanol-Fixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus α -Tubulin (1:300) und als rot fluoreszierender Sekundärantikörper Cy3- α -Maus (1:300) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Zellen wurden 100-fach und 400-fach vergrößert (gelbe Pfeile = Zellen in der Zellteilung)

Auch bei der Inkubation der HeLa-Zellen auf Glasdeckgläschen mit der 4. Fraktion war es erst ab einer niedrigen Konzentration von 5 % möglich, noch angeheftete Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu betrachten. In Abbildung 3.12 sind die Auswirkungen der Fraktion auf die Zellen gezeigt. Zum einen hat sich die Anzahl der Zellen merklich reduziert. Die Zellen sind nicht mehr dicht beieinander wie in Abbildung 3.9. Die von der 3. Fraktion verursachten Effekte treten auch bei der Inkubation der HeLa-Zellen mit einer Konzentration von 5 % der 4. Fraktion auf. Viele der Zellen sind abgerundet und befinden sich in der Mitose. Abweichend von den Kontrollzellen haben sich hier die Zellen und dementsprechend auch das Mikrotubuligerüst länglich ausgebreitet. Außerdem ist auffällig, dass sich Pseudopodien, die mit Mikrotubuli ausgefüllt sind, ausgebildet haben. Ebenso auffällig ist, dass einige Teile des Mikrotubuligerüsts eine sehr starke intensive Rotfärbung des Tubulins aufweisen, die im Vergleich zu den unbehandelten HeLa-Zellen nicht zu sehen ist (vgl. 3.9).

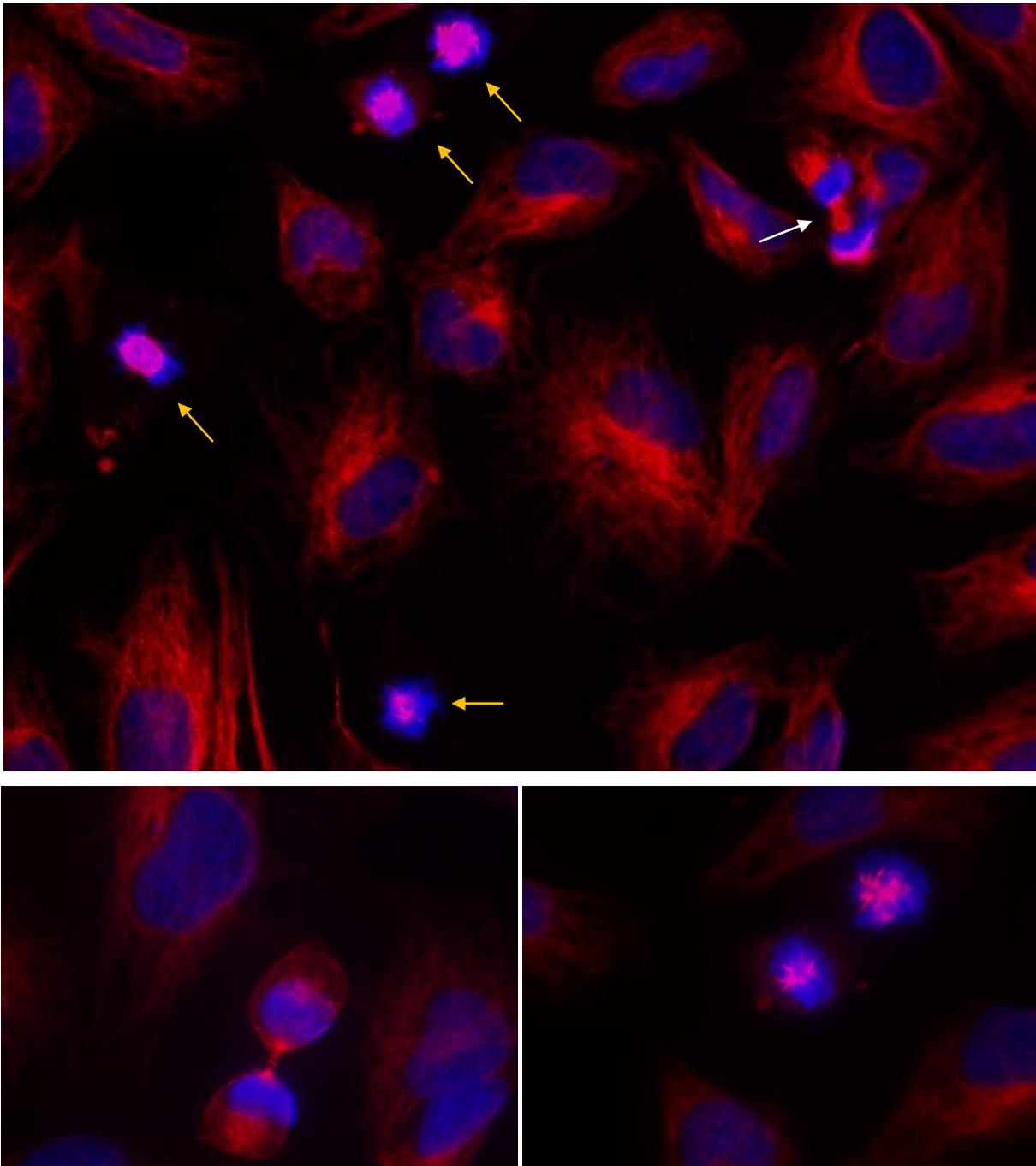


Abbildung 3.14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-freiem Medium mit 1 % der 4. Fraktion in 1000-facher Vergrößerung

Dargestellt sind HeLa-Zellen in FKS-freiem Standardmedium mit 1 % der 4. Fraktion behandelten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdicht: $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well) auf Glasdeckgläschen mit FKS-freiem Medium, dass 1 % der 4. Fraktion enthielt, für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mittels Methanol-Fixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus α -Tubulin (1:300) und als rot fluoreszierender Sekundärantikörper Cy3- α -Maus (1:300) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Zellen wurden 400-fach und 1000-fach vergrößert (gelber Pfeil = Zellen in der Zellteilung; weißer Pfeil = sich nicht trennende Zellen).

Auch bei einer niedrigeren Konzentration von 1 % der 4. Fraktion zeigen die HeLa-Zellen ebenfalls eine deutliche Beeinflussung ihrer Morphologie (s. Abb.3.14). Das Mikrotubuligerüst in vielen Zellen wirkt in der 400-fachen Vergrößerung sehr diffus, welches zur Annahme führen könnte, dass die 4. Fraktion eine destabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli besitzt, so dass diese ihre wohlstrukturierte Form verlieren. Ferner sind in der Abbildung Zellen zu sehen, die sich gerade teilen. In der 1000-fachen Vergrößerung ist zu erkennen, dass sie sich in der Mitose befinden (vgl. 3.14 unten rechts). Die Mikrotubuli bilden die Kernteilungsspindel aus und strahlen normalerweise sternförmig von den Polen des Spindelapparats aus. In diesem Fall verläuft der Aufbau des Spindelapparats unstrukturiert. Auch hier haben die Mikrotubuli ihre typische Struktur weitgehend verloren. Hieraus ist zu schließen, dass der Aufbau der Mikrotubuli durch Einfluss der 4. Fraktion gestört wird. Des Weiteren zeigt sich auch hier eine Zellteilung in dem Endstadium des Zellzyklus, der Cytokinese (Abb. 3.14 unten links). Es haben sich bereits zwei Zellkerne gebildet und das Cytoskelett. Dennoch erfolgte keine Abtrennung der beiden Zellen, sie sind noch über eine brückenartige Verbindung miteinander verknüpft.

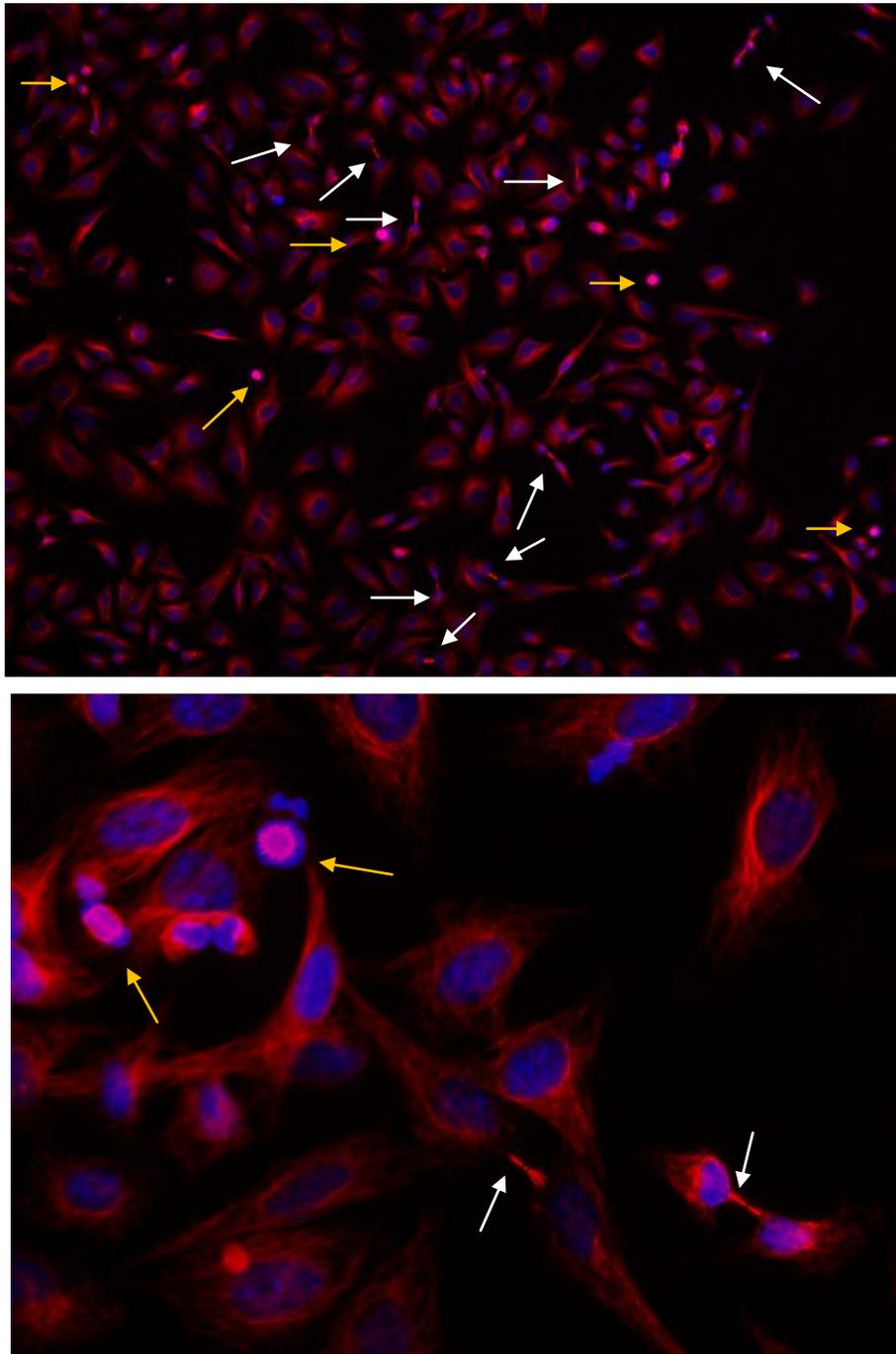


Abbildung 3.15: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-freiem Medium mit 60 % der 9. Fraktion in 100-facher und 400-facher Vergrößerung

Dargestellt sind HeLa-Zellen in FKS-freiem Standardmedium mit 60 % der 9. Fraktion behandelten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well) auf Glasdeckgläschen mit FKS-freiem Medium, das 60 % der 9. Fraktion enthielt, für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mittels Methanol-Fixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus α -Tubulin (1:300) und als rot fluoreszierender Sekundärantikörper Cy3- α -Maus (1:300) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Zellen wurden 100-fach und 4000-fach vergrößert (gelber Pfeil = Zellen in der Zellteilung; weißer Pfeil = sich nicht trennende Zellen).

Im Gegensatz zu der 3. und 4. Fraktion haben die 9. (Abb. 3.15) und 11. Fraktion (Abb. 3.16) nur in hoher Konzentration einen Einfluss auf die Zellstruktur und Zellteilung der HeLa-Zellen, welcher mit dem Vergleich der Diagramme aus der Proliferationsanalyse mit der Konzentration von 5 % und 60 % der Fraktionen übereinstimmt (vgl. Abb. 3.2 u. 3.3).

In Abbildung 3.15 wird die Auswirkung von 60 % der 9. Fraktion gezeigt. Das Mikrotubuligerüst und der Zellkern sind nicht mehr so stark beeinflusst. Ebenso hat ihre Zellzahl nicht so dramatisch abgenommen wie bei der 4. Fraktion (vgl. Abb. 3.13). Vereinzelt sind noch Pseudopodien zu erkennen. Wie auch schon der Einfluss der vorherigen Fraktionen gezeigt hat, verläuft der Zellzyklus nicht mehr strukturiert und vollständig ab. Es sind vermehrt Zellen zu finden, die sich offenbar nicht mehr voneinander trennen können. Es sind auch einige wenige Zellen zu erkennen, die sich in einem früheren Zellzyklustadium befinden.

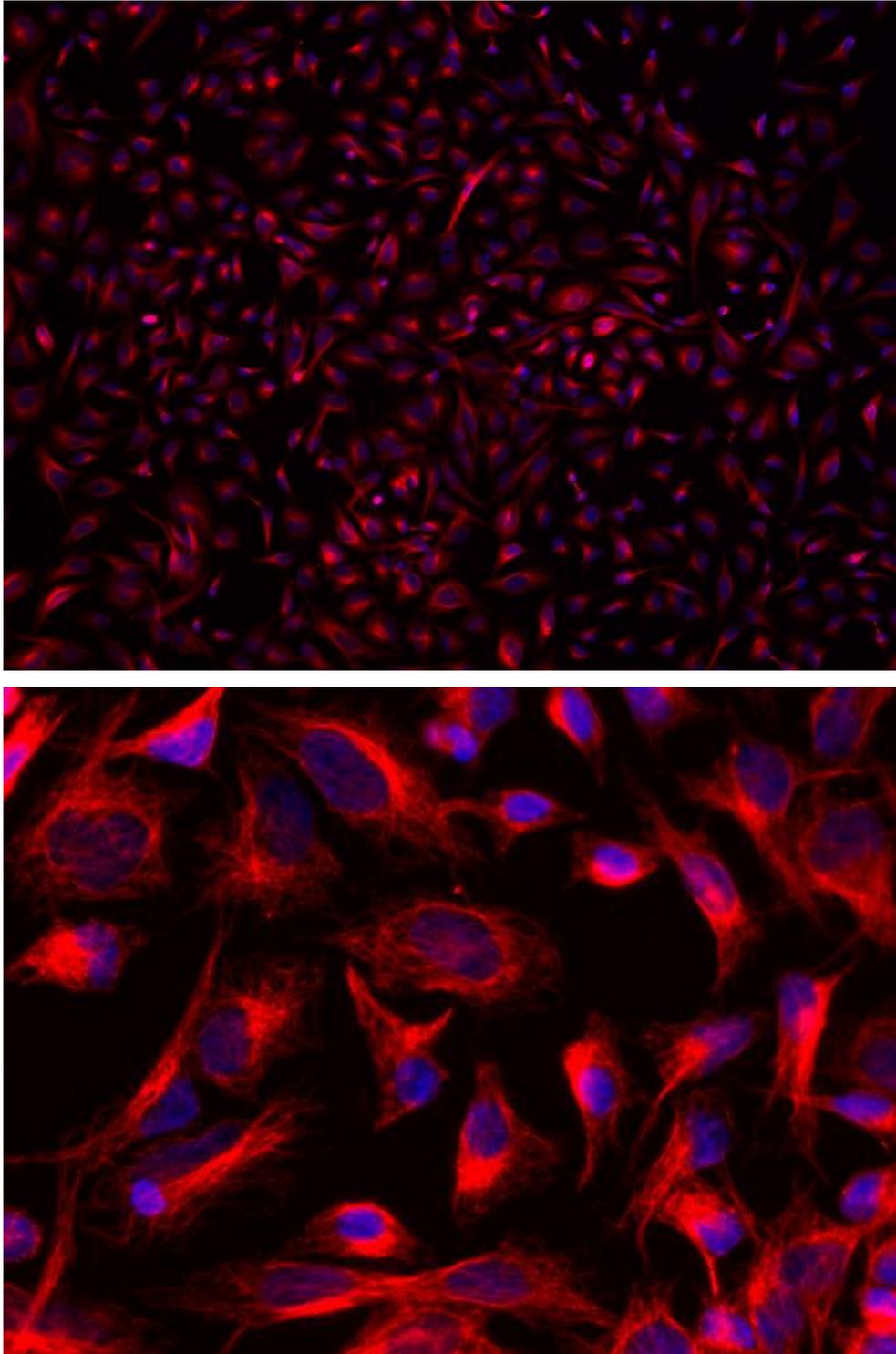


Abbildung 3.16: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-freiem Medium mit 60 % der 11. Fraktion in 100-facher und 400-facher Vergrößerung

Dargestellt sind HeLa-Zellen in FKS-freiem Standardmedium mit 60 % der 11. Fraktion behandelten HeLa-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat (Aussaatdichte: $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Well) auf Glasdeckgläschen mit FKS-freiem Medium, dass 60 % der 11. Fraktion enthielt, für 48 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mittels Methanol-Fixierung fixiert und gefärbt. Als Primärantikörper wurde Maus α -Tubulin (1:300) und als rot fluoreszierender Sekundärantikörper Cy3- α -Maus (1:300) verwendet. Die Zellkerne wurden mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Die Zellen wurden 100-fach und 4000-fach vergrößert.

Die 11. Fraktion mit 60% scheint keine merkliche morphologische Veränderung bei HeLa-Zellen hervorzurufen. Die Mikrotubuli sind wie in Kontrollzellen über die gesamte Zelle organisiert. Vermehrt Zellen, die sich gerade in der Mitose befinden, stark abgerundete Zellen oder Zellen, die sich in der Teilungsphase scheinbar verharrend gegenüber stehen, sind nicht zu erkennen. Sowohl in der 100-fachen als auch in der 400-fachen Vergrößerung entsprechen die Zellen in Bild und Struktur den unbehandelten HeLa-Zellen (vgl. Abb. 3.9).

4 Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es, die in einer vorangegangenen Bachelorarbeit [Rützel, 2012] entdeckten inhibierenden Effekte von Ingwer-Extrakt auf die Proliferation von Tumorzellen tiefergehend in Bezug auf die aktiven Komponenten und ihre zelluläre Wirkung zu untersuchen. Dazu wurden durch chromatographische Auftrennung des Ingwer-Extrakts verschiedene bioaktive Fraktionen hergestellt und ihr Einfluss auf Zellproliferation und die Zellteilung analysiert.

4.1 Proliferation von HeLa-Zellen und CHO-Zellen unter dem Einfluss von Ingwer-Fraktionen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proliferation von verschiedenen Fraktionen des Ingwer-Extrakts auf HeLa-Tumorzellen untersucht. Die Fraktionierung eines selbst hergestellten Ingwer-Extrakts erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie. Die Ergebnisse einer vorangegangenen Bachelorarbeit [Rützel, 2012], in der ein wachstumshemmender Effekt von Ingwer-Extrakt auf HeLa-Zellen nachgewiesen wurde, konnte reproduziert werden. Durch ein verändertes Herstellungsverfahren besaß der Ingwer-Extrakt eine wesentlich stärkere inhibierende Wirkung, welche sich schon bei einer Zugabe in serumfreies HeLa-Medium von 1% zeigte. Anstelle von nur 1 g wurden 10 g Ingwer verwendet und ein etwas intensiveres Auspressverfahren gewählt (siehe Kapitel 2.4). Dadurch sollte gewährleistet werden, dass während der Größenausschlusschromatographie der Ingwer-Extrakt nicht zu sehr verdünnt wird, um möglichst auszuschließen, dass Aktivitäten der Analyse entgehen.

In der Proliferationsanalyse (siehe Abb. 3.2 - 3.5) wird deutlich, dass die verschiedenen Fraktionen unterschiedliche Auswirkungen auf HeLa-Zellen und CHO-Zellen besitzen. Prinzipiell fanden sich sowohl stimulierende als auch inhibierende Aktivitäten, die sich überlagern. Die Ergebnisse zeigen im Detail, dass die 3. Fraktion den größten Einfluss auf das Wachstum der HeLa-Zellen ausübt. Sowohl bei einer Konzentration von 60 % als auch von 5 % im serumfreien HeLa-Medium ist ein starker wachstumshemmender Effekt auf die HeLa-Zellen zu sehen. Dieses impliziert, dass in der 3. Fraktion eine Substanz enthalten sein muss, die das Wachstum der Zellen verhindert. Auch bei der 4. und 9. Fraktion kann ein Rückgang der Zellzahlen beobachtet werden, jedoch hier nur bei einer vergleichsweise hohen

Konzentration von 60 % (siehe Abb. 3.2 und 3.3). Ebenso wie in der 3. Fraktion scheint in der 4. und 9. Fraktion eine Komponente enthalten zu sein, die einen inhibierenden Effekt auf HeLa-Zellen ausübt. Das Ergebnis, dass die genannten Fraktionen in den jeweiligen Konzentrationen so unterschiedlich auf die Tumorzellen wirken, lässt schlussfolgern, dass die hierfür verantwortlichen Substanzen entweder in verschieden hoher Konzentration in den einzelnen Fraktionen enthalten sind oder dass es sich um jeweils unterschiedliche Substanzen handelt, die besondere Aktivitäten aufweisen. Diese Annahme wird durch andere Studien gestärkt. Sie zeigen, dass Ingwer-Extrakt eine Vielzahl von Komponenten enthält, die das Tumorwachstum vieler Krebsarten verhindern oder unterdrücken [Bode & Dong, 2011]. In verschiedenen *in vitro* Versuchen wurde das Wachstum von Krebszellen inhibiert und Apoptose eingeleitet, verursacht von [6]-Gingerol, [6]-Paradol [Lee & Surh, 1998,], [6]-Shogaol [Pan et al., 2009] und Zerumbone, [Abdul et al., 2008]. Naheliegender ist daher, dass eine dieser oder auch das Zusammenspiel mehrerer dieser Substanzen Auslöser der inhibierenden Wirkung der 3., 4. und 9. Fraktion ist.

Die Untersuchung dieser Fraktionen auf ihre proliferatorische Wirkung auf CHO-Zellen (siehe Abb. 3.4) bestätigt die Annahme, dass Komponenten von Ingwer das Potenzial für die Entwicklung eines therapeutischen Mittels für die Linderung von Krebs besitzen könnten. Hierfür ist es notwendig, dass die zu bekämpfenden Krebszellen sich empfindlicher gegenüber dem Wirkstoff zeigen als die gesunden Körperzellen. Aus der Abbildung 3.5 ist zu erkennen, dass die 3., 4. und 9. Fraktion bei niedrigen Konzentrationen wie 5 % keinen negativen Einfluss auf das Wachstum von CHO-Zellen haben, sondern das Wachstum im Vergleich zu HeLa-Zellen sogar fördern. Aus Pflanzen wurden schon mehrere Chemostatika, wie das Zytostatikum Vincristin gewonnen, welches durch Blockieren von Tubulin die Ausbildung der Mikrotubuli hemmt [Wagener & Müller, 2012]. Im Rahmen der Testung der Auswirkung eines Ingwer-Extrakts wurde festgestellt, dass dieser die Proliferation der Brustkrebszelllinien MCF-7, MDA-MB-231 hemmt und keine signifikante Wirkung auf die normale Brustepithelzelllinie MCF-10A hat [Elkady, 2012]. Auch die in Ingwer enthaltene Komponente [6]-Shogaol wurde nicht nur auf seine toxische Wirkung gegenüber Krebszellen (HCT-116, H-1299), sondern auch gegenüber Nicht-tumorzellen (CCD-18Co, IMR-90) untersucht. Es wurde festgestellt, dass [6]-Shogaol eine höhere Toxizität gegenüber den Krebszellen als den Nichttumorzellen besitzt [Zhu et al., 2013]. Insgesamt zeigt sich somit, dass Ingwer und die in ihm enthaltenen

Komponenten ein viel versprechender Kandidat für die Behandlung von Krebs sein kann.

Die Ergebnisse der Zellzählung zeigen des Weiteren, dass die späteren Fraktionen 10, 11 und 12 sich positiv auf die Proliferation auswirken, sowohl von HeLa- als auch von CHO-Zellen (siehe Abb. 3.2 - 3.5). Exemplarisch für diese Fraktionen wurde die 11. Fraktion genauer untersucht (Abb. 3.4). Es hat sich gezeigt, dass ihre wachstumsstimulierende Wirkung mit der Konzentration im Medium auf HeLa-Zellen schwankt. Bei einer Konzentration von 30 % ist die Zellzahl der HeLa-Zellen etwas niedriger als bei 60 % und 5 %. Vermutlich ist eine Konzentration von 30 % optimal für die inhibierenden, aber nicht für die stimulierenden Substanzen, so dass, wenn sich die beiden Effekte überlagern, die Inhibierung dominiert. Interessant ist auch, dass diese Ingwer-Fraktion eine stimulierende Wirkung auf CHO-Zellen besitzt, die dem des FKS gleichkommt (siehe Abb. 3.5). Bei der 11. Fraktion zeigt sich diese in hohen, aber auch in niedrigen Konzentrationen. In niedriger Konzentration ist die stimulierende Wirkung auch bei der 3., 4. und 9. Fraktion zu sehen. Diese kann durch verschiedene Faktoren begründet sein. Ingwer enthält viele bekannte förderliche Stoffe wie Kohlenhydrate, Proteine, Enzyme, Vitamine und Mineralien [Butt & Sultan, 2011], die auch im FKS enthalten sind. Auf Grund der Fülle an Komponenten im Ingwer kann ebenso ein noch nicht bekannter Wachstumsfaktor für die stimulierende Wirkung verantwortlich sein.

4.2 Einfluss der Ingwer-Fractionen auf Zellmorphologie und Zellteilung

Um ein Bild zu bekommen, welche morphologischen Auswirkungen die bei der Proliferationsanalyse identifizierten, inhibierenden und stimulierenden Fraktionen besitzen, wurden die HeLa-Zellen zunächst unter dem Lichtmikroskop untersucht.

Es bestätigt sich auch hier das Ergebnis, dass die 3. Fraktion das stärkste inhibierende Potenzial besitzt (siehe Abb. 3.6 - 3.8). Die HeLa-Zellen, die mit 5 % der 3. Fraktion inkubiert worden sind, weisen eine extreme Schädigung auf. Nicht nur ihre Zellzahl hat sich minimiert, sie zeigen auch ein abnormes Verhalten in Form von Zusammenlagerung von Zellen (siehe Abb. 3.7), über welches zuvor noch nicht berichtet wurde. Dieses führt zu der Annahme, dass die Zellen Schwierigkeiten

haben sich zu trennen. Da viele von ihnen abgerundet und nicht getrennt sind, kommt die Vermutung auf, dass ihr Zellzyklus durch bioaktive Substanz gestört wird. Darüber hinaus wäre es möglich, dass auch eine verstärkte Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Adhäsion Grund für die beobachtete Gruppierung darstellt. Im Vergleich hierzu wurde gezeigt, dass ein ethanolischer Ingwer-Extrakt morphologische Veränderungen von Brustkrebszellen (MCF-7, MDA-MB-231) in Form von Schrumpfen, Unregelmäßigkeiten in der Zellform und Abnahme der Koloniebildung aufweist [Elkady *et al.*, 2012]. Es wäre auch möglich, dass die Zusammenlagerung von Zellen spezifisch ist für HeLa-Zellen, die mit Ingwer inkubiert wurden. Zu bedenken ist außerdem, dass dieses erst durch die Fraktionierung des Ingwer-Extrakts verursacht sein könnte, welches auf die Wirkungsweise einzelner oder mehrerer Komponenten in bestimmter Kombination zurückzuführen ist. Ebenso kann es sein, dass die Gruppierung durch das Ethanol unterbunden wird. Ebenfalls wurde beobachtet, dass [6]-Gingerol in HeLa-Zellen eine Schrumpfung der Zellen und eine Blasenbildung der Membran verursacht [Chakraborty *et al.*, 2012]. Es findet sich in diesem Punkt mit den hier gezeigten Ergebnissen keine Übereinstimmung, da keine Blasenbildung der Zellen zu beobachten ist. Dieses lässt wiederum darauf schließen, dass die hier gezeigten Effekte nicht auf die Wirkungsweise von [6]-Gingerol zurückzuführen sind, sondern möglicherweise hierfür einzelne oder mehrere Komponenten in bestimmter Kombination in Betracht kommen.

Dass diese morphologische Auffälligkeit auch in abgeschwächter Form bei mit der 4. Fraktion behandelten HeLa-Zellen zu sehen war, lässt ebenso darauf schließen, dass entweder noch weitere ähnlich wirkende Substanzen für die zusammen gelagerten Zellen verantwortlich sind oder die Trennung des einen Faktors durch die Größenausschlusschromatographie nicht effizient war.

Bei den durch die 11. Fraktion zum Wachstum angeregten HeLa-Zellen ließen sich keine Veränderungen in der Morphologie nachweisen. In Zellwachstum und Aussehen entsprachen sie den im FKS-haltigen Medium kultivierten Zellen. Die schon zuvor erlangten Erkenntnisse, dass diese Fraktion eine stimulierende Substanz enthält, die als möglicher Ersatz in der Zellkultur für FKS eingesetzt werden kann, scheinen sich durch die morphologische Analyse zu bestätigen.

4.3 Wirkung von Ingwer-Fractionen auf das Mikrotubuli-Zytoskelett und den Zellzyklus

Durch die fluoreszenzmikroskopischen Analysen sollten die Auswirkungen, die die inhibierenden und stimulierenden Ingwer-Fractionen auf das Zytoskelett und den Zellzyklus haben, untersucht werden. Da die durchgeführten Versuche, die Vermutung aufkommen ließen, dass die Ingwer-Fractionen eine mögliche Störung der Zellteilung verursachen, wurden das Tubulingerüst und die DNA angefärbt. Durch die gewählte Anfärbung ließen sich das Mikrotubulingerüst und besonders der Zellzyklus gut beobachten.

Der Rückgang der Zellzahl, der bei der Proliferationsanalyse und morphologischen Untersuchung mit dem Lichtmikroskop bei Konzentrationen von 60 % und 5 % der 3. Fraktion zu sehen war, zeigte sich nicht in der Immunfluoreszenzanalyse (siehe Abb. 3.10). Dieses ist aller Wahrscheinlichkeit nach darauf zurückzuführen, dass die Immunfluoreszenzanalyse aufgrund der schlechten Zellhaftung auf Glasdeckgläschen erst bei einer Konzentration von 1 % durchgeführt werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen erheblich durch die 3. Fraktion geschädigt werden und die inhibierende Wirkung erst bei 1 % etwas nachlässt. Ebenso gilt dieses für die 4. Fraktion, jedoch weniger ausgeprägt, da eine Untersuchung der Zellen schon bei 5 % der Fraktion möglich war und auch ein deutlicher Rückgang der Zelldichte zu erkennen ist (siehe Abb. 3.13). In diesen beiden Fraktionen müssen die am stärksten inhibierenden Substanzen enthalten sein, da bei der 9. Fraktion erst bei 60 % eine Abnahme der Zellzahl zu sehen ist (siehe Abb. 3.15).

Mögliche Gründe der inhibierenden Wirkung von der 3., 4. und 9. Fraktion sind für alle drei Fraktionen in der detaillierten Analyse der Zellstruktur zu erkennen. In den Fluoreszenzaufnahmen sind vermehrt Zellen zu sehen, die noch miteinander verbunden sind (siehe Abb. 3.10, 3.12, 3.14 und 3.15). In Abbildung 3.11 und 3.13 ist in der 1000-fachen Vergrößerung zu erkennen, dass die Zellen die Zellteilung offensichtlich nicht erfolgreich abschließen können. Dieses Verharren in dieser Phase erklärt das häufige Auftreten dieser Struktur im Vergleich zu Kontrollzellen. Durch die Anfärbung der DNA zeigt sich, dass beide Zellen schon einen eigenen Zellkern besitzen, um das sich ihr Zytoskelett organisiert hat. Sie befinden sich im Grunde genommen schon am Ende der Zellteilung, sind jedoch noch über eine Tubulin-haltige Brücke verbunden, dabei handelt es sich um den Midbody. Dieser

besteht aus einer kompakten, dichten Matrix von Proteinen, welche in die überlappende Mikrotubuliregion eingebettet sind [Otegui *et al.*, 2005]. Der Midbody ist eine im Grunde genommen kurzlebige Struktur, die in die Zellperipherie abgestoßen wird oder an eine der Zellen übergeht und von dieser abgebaut wird [Ettinger *et al.*, 2011]. Er entsteht am Ende der Zytokinese. Die eigentliche Abtrennung können die mit Ingwer-Fractionen behandelten Zellen nicht mehr vollziehen, welches vielleicht auf die Schädigung der Mikrotubuli zurückzuführen ist. Dafür spricht, dass ein wässriger Ingwer-Extrakt die Interphase-Mikrotubuli beeinflusst und Apoptose einleitet [Choudhury, 2010]. Ebenso wurde berichtet, dass das im Ingwer enthaltene [6]-Shogaol in HGC-27-Zellen mit den Sulfhydrylgruppen des Tubulins reagiert und damit eine Schädigung der Mikrotubuli verursacht [Ishiguro *et al.*, 2008]. Dieses könnte eine Erklärung für die Nichtabtrennung der Zellen vom Midbody sein.

Eine weitere mögliche zelluläre Ursache für die inhibierenden Effekte der Fraktionen ist ebenfalls in den drei Fraktionen 3, 4 und 9 zu finden. Viele der Zellen sind abgerundet und befinden sich mitten in der Zellteilung. Die Chromosomen sind kondensiert und die Mitosespindel bildet sich aus (siehe Abb. 3.11 und 3.13). Dieses ist ein Hinweis darauf, dass sich die Zelle bereits in der Mitose befindet. Da in Abbildung 3.11 sich die Spindelfasern schon ausbilden, befinden sich die Zellen wahrscheinlich in der Prometaphase. An Hand der Aufnahmen ist kein weiteres Stadium zu erkennen, so dass sich daraus schließen lässt, dass in dieser Phase ein Zellzyklusarrest erfolgt und möglicherweise die Apoptose eingeleitet wird. Der Grund für den unstrukturierten Aufbau des Spindelapparats ist auf die chaotische Verteilung der Mikrotubuli zurückzuführen. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass sowohl [6]-Shogaol als auch Zerumbone in Krebszellen den Zellzyklus in dem G₂/M-Kontrollpunkt arretieren und die Apoptose einleiten. Dabei wurden in den morphologischen Untersuchungen die typischen Anzeichen der Apoptose beobachtet, wie Chromatin-Kondensation und Kern-fragmentierung [Liu *et al.*, 2012, Abdelwahab *et al.*, 2012, Xian *et al.*, 2006]. Dieses stimmt nicht ganz mit dem hier beobachteten Zellzyklusarrest überein. Die hier gezeigten Zellen befinden sich schon weiter in der Mitose, es ist keine Chromatin-Kondensation und Kernfragmentierung zu sehen. Jedoch wird in einer weiteren Studie Gan *et al.*, 2011 über Shogaol berichtet, dass [4]- und [6]- Shogaol in Dickdarmkrebszellen (HCT-116) einen G₂/M Zellzyklusarrest verursachen, der mit einer Abnahme von G₂-Kontrollpunktprotein

und Spindel-Kontrollpunktprotein einhergeht. Mit den Ergebnissen, dass Shogaol Mikrotubulischäden verursacht [Ishiguro *et al.*, 2008], kamen sie zu der Erkenntnis, dass sowohl der Verlust der Kontrollpunktproteine als auch die durch die geschädigten Mikrotubuli indirekte Störung der Mitosespindel, die Ursache für eine abweichende Mitose ist [Gan *et al.*, 2011]. Dieses könnte auch ein möglicher Grund für den hier gezeigten Effekt sein. Jedoch zeigen die HeLa-Zellen keinen G₂/M-Zellzyklusarrest. Dieses könnte daran liegen, dass Zellen sofort die Apoptose einleiten und somit in den Fluoreszenzaufnahmen nicht erfasst wurden. Ebenso könnte die Konzentration an Shogaol nicht ausreichen, um die Zellen im G₂/M-Kontrollpunkt zu arretieren. Die Zellen werden in der bestehenden Konzentration nur soweit geschädigt, dass keine vollständige Mitose mehr abläuft. Ebenso ist es möglich, dass [6]-Gingerol Einfluss auf die inhibierende Wirkung nimmt, da es einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase verursacht und Apoptose einleitet [Park *et al.*, 2006]. Dieses ist auf den Fluoreszenzaufnahmen nicht zu erkennen. Eine Erklärung könnte hierfür sein, dass die starke Wirkung der 3. und 4. Fraktion auf die HeLa-Zellen, die dadurch wahrscheinlich die Anheftung auf die Glasdeckgläschen verloren haben, zurückzuführen ist, da [6]-Gingerol auch die Adhäsion von Krebszellen unterbindet [Lee, Seo, Kang & Kim, 2008].

Der Zustand der mit 60 % der 11. Fraktion inkubierten HeLa-Zellen ist eher unauffällig. Ihre stimulierende Wirkung wird bestätigt, da die Zelldichte der mit FKS-inkubierten Zellen übereinstimmt. Es sind keine besonders auffallenden Zellen in der Mitose zu finden, welche bestätigen, dass es sich bei den inhibitorisch aktiven Fraktionen um 3, 4 und 9 handelt.

4.4 Ausblick

Auch wenn die Frage, welche Fraktionen einen stimulierenden und inhibierenden Effekt auf die Tumor- und Nichttumorzellen besitzen, geklärt werden konnte, so wurden die dafür verantwortlichen Substanzen nicht identifiziert. Dazu müssten die bisher aus jeweils 10 chromatographischen Einzelfractionen vereinigten Fraktionen einzeln untersucht werden. Darüber hinaus müsste mit weiteren Trennmethode versucht werden, die überlappenden inhibitorischen und stimulatorischen Aktivitäten zu separieren und damit *in vitro* Versuche durchgeführt werden. Langfristiges Ziel

wäre, dass diese aktivierende Substanz als Ersatz für FKS eingesetzt werden könnte. Ebenso könnte eine aufgereinigte Komponente der hier identifizierten, inhibierenden Fraktionen als mögliches zytostatisches Therapeutikum dienen.

5 Zusammenfassung

Seit Jahren ist Ingwer auf Grund seiner vielfältigen Wirkungsweisen, u. a. auch wegen seiner hemmenden Wirkung auf das Wachstum von Krebszellen, Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Fraktionen eines Ingwer-Extrakts hinsichtlich ihrer Wirksamkeit auf Tumor- und Nichttumorzellen zu charakterisieren. Mittels Größenausschlusschromatographie wurde versucht, die möglichen stimulierenden und inhibierenden Faktoren zu trennen.

Mit Hilfe der Proliferationsanalyse wurde analysiert, welche Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie von Ingwer-Extrakt inhibierend oder stimulierend auf die HeLa-Zellen wirken. Eine unterschiedlich starke inhibierende Wirkung zeigten dabei die 3., 4, und 9. Fraktion. Interessanterweise erweisen sich Nichttumorzellen als weit weniger empfindlich gegenüber den inhibitorischen Fraktionen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die später eluierenden Fraktionen 10-12 einen stimulierenden Effekt auf HeLa-Zellen sowie auf CHO-Zellen besitzen.

Um Hinweise auf die zellulären Mechanismen für die wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Effekte der spezifischen Fraktionen zu erhalten, wurden sowohl die Zellen im Lichtmikroskop untersucht als auch eine Fluoreszenzanalyse durchgeführt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Ergebnisse der Proliferationsanalyse gefestigt. Die Zellen, die mit der 3. Fraktion inkubiert wurden, zeigten nicht nur eine Abnahme der Tumorzellen, sondern auch eine Agglomeration der Zellen, welches einen ersten Hinweis auf die zelluläre Wirkungsweise der inhibierenden Fraktion gab. Weiterhin wurden mittels der Immunfluoreszenzanalyse die Auswirkungen der aktiven Fraktionen auf Zytoskelett und DNA untersucht. Dabei wurden zwei Effekte entdeckt, die den inhibierenden Effekt der wachstumshemmenden Fraktionen verursachen könnten. Beide weisen darauf hin, dass die Zelle ihren Zellzyklus stoppt. Die Zellzyklusarreste induzieren sie jeweils an verschiedenen Stellen. Die Zelle wird wahrscheinlich in der Prometaphase am Spindel-Kontrollpunkt arretiert. Der zweite Zellzyklusarrest erfolgt erst viel später in Cytokinese.

Zukünftiges Ziel sollte es sein, die hier identifizierten förderlichen und hemmenden Aktivitäten besser voneinander zu trennen und sie in Zellkulturen als wachstumsstimulierender FKS-Ersatz und in der Krebstherapie als hemmendes Zytostatikum einsetzen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Abdelwahab Siddig Ibrahim, Abdul Aham Bustamam, Zain Zetty Nadia Mohd, Hadi A. und Hamid A. 2012 *Zerumbone inhibits interleukin-6 and induces apoptosis and cell cycle arrest in ovarian and cervical cancer cells.* International Immunopharmacology

Abdul, A.B.H., Al-Zubairi, A.S., Tailan, N.D., Wahad, S.I.A., Zain, Z.N.M., Ruslay S. und Syam, M.M. 2008. *Anticancer Activity of Natural Compound (Zerumbone) Extracted from Zingiber zerumbet in Human HeLa Cervical Cancer Cells.* Journal of Pharmacology

Abdullah, S., Abidin, S.A.Z., Murad, N.A., Suzana M., Ngah W.Z.W. und Yusof Y.A.M. 2010. *Ginger extract (Zingiber officinale) triggers apoptosis and G₀/G₁ cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines.* African Journal of Biochemistry Research

Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts und Watson, D. 2012. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* Weinheim: Wiley-VCH

Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts und Walters. 2004. *Molekularbiologie der Zellen* Weinheim: Wiley-VCH

Ali, B.H., Blunden, G., Tanira M.O. und Nemmar A. 2007. *Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinal Roscoe): A review of recent research.* Food and Chemical Toxicology

Bode, Ann M. und Dong, Zigang. 2011. *The Amazing and Mighty Ginger.* Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical. Aspects

Butt, Masood Sadiq und Sultan, M. Tauseef. 2011. *Ginger and its Health Claims: Molecular Aspects.* Food Science and Nutrition

Campbell, Neil A., Reece und Jane B. 2009. *Biologie-Der neue Campbell.* Addison-Wesley Verlag

Chakraborty, D., Bishayee, K., Ghosh, S., Biswas, R., Mandal, S.K. und Khuda-Bukhsh, A.R. 2012 *[6]-Gingerol induces caspase 3 dependent apoptosis and autophagy in*

cancer cells: Drug–DNA interaction and expression of certain signal genes in HeLa cells European Journal of Pharmacology

Choudhury, D, Das, A., Bhattachary, A. und Chakrabarti, G. 2010. *Aqueous extract of ginger shows antiproliferative activity through disruption of microtubule of network of cancer cells.* Food and Chemical Toxicology

Elkady, A.I., Abuzinadah, O.A., Baeshen, N.A. und Rahmy, T.R.. 2012. *Differential Control of Growth, Apoptotic Activity, and Gene Expression in Human Breast Cancer Cells by Extracts Derived from Medicinal Herbs Zingiber officinale.* Journal of Biomedicine and Biotechnology

Ettinger A.W., Wilsch-Bräuninger M., Marzesco A., Bickle M., Lohmann A., Maliga Z., Karbanova J., Corbeil D., Hyman A.A. und Huttner H.B. 2011. *Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour.* Nature Communication

Gan, F., Nagle, A.A., Ang, X., Ho, O.H., Tan, S., Yang, H., Chui W. und Chew E. 2011. *Shogaols at proapoptotic concentrations induce G₂/M arrest and aberrant mitotic cell death associated with tubulin aggregation.* Apoptosis

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

Hiddeman, W., Bartam, C. und Huber, H. 2004. *Die Onkologie.* Springer Medizin Verlag

Henning, Wolfgang. 2002 *Genetik.* Springer

Hu, R., Zhou, P., Xu, X., Ma, J., Liu, Q., Zhang, L., Wen, X., Qi, L., Gao, N. und Li P. 2012. *6-Shogaol Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinoma Cells and Exhibits Anti-Tumor Activity In Vivo through Endoplasmic Reticulum Stress.* Plos One

Ishiguro Kazuhiro, Ando Takafumi, Watanabe Osamu, Goto Hidemi. 2008. *Specific reaction of α,β -unsaturated carvonyl compounds such as 6-shogaol with sulfhydryl groups in tubulin leading to microtubule damage.* Federation of European Biochemical Societies

Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A. und Hentschel S. 2012. *Krebs in Deutschland 2007/2008.* Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.

Kalg, Andreas, 2009, *Chinesische Arzneipflanzen Wesensmerkmale und klinische Anwendung.* Elsevier Urban & Fischer Verlag

Knippers, Rolf. 2006. *Molekulare Genetik.* Thieme Verlag

Latscha, Klein. 1994. *Chemie. Basiswissen. Anorganische Chemie - Organische Chemie - Analytische Chemie.* Springer

Layer, Günter, van Kaick, Gerhard und Delome, Stefan 2006 *Radiologische Diagnostik in Der Onkologie Band 1.* Springer DE

Lee, H.S., Seo, E.Y.S., Kang, N.E. und Kim, W.K. 2008. *[6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells.* Journal of Nutritional Biochemistry

Lee, Eunyong und Surth Young-Joon. 1998. *Induction of apoptosis in HL-60 cells by pungent vanilloids, [6]-gingerol and [6]-paradol.* Cancer Letters

Lemanczyk, Wanda. 1999. *Würzig essen, länger leben: Die gesündesten Gewürze aus aller Welt.* Georg Thieme Verlag

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

Lui, Q., Peng, Y., Qi, L., Cheng, X., Xu, X., Liu, L., Lui, E. und Li, P. 2012. *The Cytotoxicity Mechanism of 6-Shogaol-Treated HeLa Human Cervical Cancer Cells Revealed by Label-Free Shotgun Proteomics and Bioinformatics Analysis.* Evid Based Complement Alternat Med.

Otegui, M.S., Verbrugghe, K.J., Skop, A.R.. 2005. *Midbodies and phragmoplasts: analogous structures involved in cytokinesis.* TRENDS in Cell Biology

Park, Y.J., Wen, J., Bang, S.O.S.W. und Song S.Y. 2006. *[6]-Gingerol Induces Cell Cycle Arrest and Cell Death of Mutant p53-expressing Pancreatic Cancer Cells.* Yonsei Medical Journal

Teuscher, Eberhard. 2002 *Gewürzdrogen: Ein Handbuch der Gewürze, Gewürzkräuter.* Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaften

Rützel, Katharina. 2012 *Analyse der inhibierenden und stimulierenden Effekte von Ingwer auf das Wachstum von Säugetierzellen.* Bachelorarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Schink, Kay O. und Stenmark, Harald. 2011. *Cell Differentiation: Midbody Remnants - Junk or Fate Factors?* Current Biology

Shukla, Yogshwer und Singh, Madhulika. 2006. *Cancer preventive properties of ginger: A brief review.* Food and Chemical Toxicology

Srivastava Kc. und Mustafa T. 1992. *Ginger (Zingiber officinale) in rheumatism and musculoskeletal disorders.* Medical Hypotheses

Wagener, Christoph und Müller, Oliver. 2010 *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte.* Georg Thieme Verlag KG

Xian, M., Ito, K., Nakazato, T., Shimizu, T., Chen, C., Yamato, K., Murakami, A., Ohigashi, H., Ikeda, Y. und Kizaki, M.. 2007. *Zerumbone, a bioactive sesquiterpene, induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells via a Fas- and mitochondria-mediated pathway.* Cancer Science

Zhu, Y., Warin, R.F., Soroka, D.N., Chen, H., Sang S. 2013. *Metabolites of Ginger Component [6]-Shogaol Remain Bioactive in Cancer Cells and Have Low Toxicity in Normal Cells: Chemical Synthesis and Biological Evaluation.* PLoS One

6.1 Quellenverzeichnis der Abbildungen

- [1] **Köhler Eugen, Pabst Gustav, Vogtherr Max, Gürke M.. 1896.** *Köhler's Medizinal-Pflanzen* F.E. Köhler Verlag

- [2] Kochbuchfotos Abbildung vom Ingwer 26.02.'13 <http://www.kochbuchfotos.de/24/ingwer>

- [3] **Cancer BattleField** Abbildung vom Ingwer 26.02.'13 <http://cancerbattlefield.com/functional-food/ginger/>

- [4] **Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Watson, D. 2012.** *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* Weinheim: Wiley-VCH

- [5] **Campbell, Neil A., Reece, Jane B. 2009.** *Biologie-Der neue Campbell.* Addison-Wesley Verlag

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Zingiber officinale ROSCOE	4
Abbildung 1.2:	Zingiberis Rhizoma	5
Abbildung 1.3:	Darstellung des Zellzyklus	10
Abbildung 1.4:	Verschiedene Abschnitte der Mitose	13
Abbildung 2.1:	Bild der verwendeten Größenausschlusschromatographieanlage	22
Abbildung 2.2:	Mit Ingwer-Extrakt beladene Säule	22
Abbildung 2.3:	Aufnahme der HeLa-Zellen mit der Aussaatdichte von $6 \cdot 10^4$ pro Well mit Hilfe eines Lichtmikroskops in einer 100-fachen Vergrößerung	23
Abbildung 3.1:	Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Extrakts von Ingwer	28
Abbildung 3.2:	Einfluss hochkonzentrierter (60%) Ingwer-Fractionen auf die Proliferation von HeLa-Zellen	30
Abbildung 3.3:	Einfluss niedrig konzentrierter (5%) Ingwer-Fractionen auf die Proliferation von HeLa-Zellen	32
Abbildung 3.4:	Einfluss der 11. Fraktion der Größenausschlusschromatographie des Ingwer-Extrakts in verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation von HeLa-Zellen	33
Abbildung 3.5:	Einfluss ausgewählter Fractionen des Ingwer-Extrakts in einer Konzentration von 5 % und 60 % auf die Proliferation von CHO-Zellen	35
Abbildung 3.6:	Aufnahme von HeLa-Zellen mit FKS-haltigem Medium (Referenz) und mit 0,5% Ingwer-Extrakt	37
Abbildung 3.7:	Phasenkontrast-Aufnahme von HeLa-Zellen unter Einfluss von 5 % der 3. und 4. Fraktion	39
Abbildung 3.8:	Phasenkontrast-Aufnahme von HeLa-Zellen unter Einfluss von 60 % der 9. und 11. Fraktion	41
Abbildung 3.9:	Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli-Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen in FKS-haltigem Medium	43

- Abbildung 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli- 45
Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen in FKS-
freien Medium mit 1 % der 3. Fraktion
- Abbildung 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli- 47
Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-
freien Medium mit 1 % der 3. Fraktion in 1000-facher
Vergrößerung
- Abbildung 3.12: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli- 49
Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-
freien Medium mit 1 % der 3. Fraktion in 1000-facher
Vergrößerung
- Abbildung 3.13: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli- 51
Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-
freien Medium mit 5 % der 4. Fraktion in 400-facher
Vergrößerung
- Abbildung 3.14: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli- 53
Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-
freien Medium mit 1 % der 4. Fraktion in 1000-facher
Vergrößerung
- Abbildung 3.15: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli- 55
Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-
freien Medium mit 60 % der 9. Fraktion in 100-facher und
400-facher Vergrößerung
- Abbildung 3.16: Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Mikrotubuli- 57
Zytoskeletts und der Zellkerne von HeLa-Zellen im FKS-
freien Medium mit 60 % der 11. Fraktion in 100-facher und
400-facher Vergrößerung

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Puffer und Medien für die Kultivierung von HeLa-Zellen	17
Tabelle 2.2: Verwendete Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenz-analyse.....	27
Tabelle 3.1: Vereinigte Fraktionen	29

7.3 Material

7.3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav	Systec GmbH
Digitalkamera	Canon
Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Fraktionssammler	Pharmacia
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr
Inkubator	Binder
Inverses Mikroskop	Zeiss
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Laborrad	Fröbel Labortechnik GmbH
Pump P-500	Pharmacia
Pipetten	Gilson
Pipettierhilfe	Brand
Reinstwasseranlage	Millipore
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR Säule	GE Healthcare
Schwenktisch	European Molecular Biology Laboratory
Spülmaschine	Miele
Sterilwerkbank Klasse 2	Thermo Electron Corporation
UV Detector	Pharmacia
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 chamber 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 ₃	BIOCHROM AG
Na-Pyruvate	BIOCHROM AG
Nicht-essentielle Aminosäuren	BIOCHROM AG
Penicillin/Streptomycin 10.000 µg/ml	BIOCHROM AG
Trypan Blue Stain 0,4%	GIBCO
Trypsin/EDTA 0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS	BIOCHROM AG
Triton-X 100	Roche
Methanol	ROTH

7.3.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Maus α - Tubulin	Sigma
Cy3 α -Maus	Sigma

7.3.5 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 5.0	Adobe
Countess Software	Invitrogen
Microsoft Excel 2010	Microsoft
Microsoft Word 2007	Microsoft
Cell [^] F	Olympus

7.4 Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cdk	Cyclin dependent kinase
CHO	Chinese Hamster Ovary
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ddH ₂ 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
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde(n)
HeLa	Henrietta Lacks
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter

NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ PO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na-Pyruvate	Natrium-Pyruvate
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
w/v	engl. = <i>weight per volume</i> ; Gewicht pro Volumen

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, 28. Februar 2013

Mareike Renger