



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Aktivität verschiedener Flavonoide im CCID-Assay“

verfasst von / submitted by

Claudia Smöch

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

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

A 449

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

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

ao. Univ.- Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich vor allem bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die nette Betreuung, intensive Unterstützung und fachliche Beratung während der gesamten Diplomarbeit.

Weiters bedanke ich mich bei ao. Univ.-Prof. Dr. Georg Krupitza für die vielen Ratschläge, anregenden Gespräche und die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu können.

Mein Dank gilt außerdem seinem gesamten Team, das den Arbeitsalltag spannend und abwechslungsreich gestaltet hat. Durch deren Unterstützung und Hilfsbereitschaft wurde mir das Erlernen von Arbeitstechniken im Zellkulturlabor sehr erleichtert.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich jedoch bei meinen Eltern, meinen Großeltern, meinem Freund und meinen Freunden, die mir durch ihre motivierenden Worte, viel Zeit und Geduld dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben.

Mit Christina Gradwohl und Elena Rainer-Harbach verbindet mich eine enge Freundschaft. Ohne unsere gute Zusammenarbeit während des gesamten Studiums hätte es viel zu oft an Spaß und Freude gefehlt.

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG, ZIELE, HINTERGRÜNDE	13
I.1 Einleitung und Ziele.....	13
I.2 Allgemeines zu Brustkrebs	15
I.3 Allgemeines zu Darmkrebs	16
I.4 Metastasierung und assoziierte Vorgänge.....	17
I.5 Allgemeine Informationen zu Flavonoiden	18
II MATERIAL UND METHODEN	20
II.1 Materialien.....	20
II.1.1 Zelllinien.....	20
II.1.1.1 Kolonkrebszellen SW620 (CCL-227TM)	20
II.1.1.2 Brustkrebszellen MCF7	21
II.1.1.3 Lymphendothelzellen HDLEC (=LEC)	22
II.1.1.4 Blutendothelzellen HDBEC (=BEC).....	23
II.1.2 Untersuchte Flavonoide	24
II.1.3 Kultivierungsmedien und Substanzen	26
II.1.3.1 Dulbecco´s phosphate buffered saline (DPBS)	26
II.1.3.2 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium.....	27
II.1.3.3 TrypLE TM Express (Trypsin).....	27
II.1.3.4 Endothelial Cell Growth MediumR (EGM)	28
II.1.3.5 Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	28
II.1.3.6 Minimal essential Medium (MEM).....	28
II.1.3.7 Fetales bovines Serum (FBS)	29
II.1.3.8 Carboxymethylcellulose – Natrium.....	29
II.1.3.9 Penicillin, Streptomycin (PenStrep)	29

II.1.3.10 Non-essential amino acids (NEAA).....	30
II.1.3.11 Hygromycin B.....	30
II.1.3.12 Dimethylsulfoxid (DMSO)	31
II.1.3.13 CellTracker™ Green CMFDA	31
II.1.4 Geräte und Technische Ausrüstung	31
II.1.4.1 Mikroskop Axiovert 35 mit integrierter Kamera	32
II.1.4.2 Verbrauchsmaterialien der Zellkultur	32
II.2 Methoden.....	33
II.2.1 Kultivierung der Zellen.....	33
II.2.1.1 Passagierung	33
II.2.1.2 Medienwechsel	34
II.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	35
II.2.2 Herstellung eines Monolayers.....	36
II.2.2.1 Konfluenz als Voraussetzung für ein optimales Ergebnis	36
II.2.2.2 Wahl des Splitverhältnisses und weitere wichtige Parameter	36
II.2.3 Sphäroidherstellung	37
II.2.3.1 Sphäroidbildung (Allgemeines und Methodik)	37
II.2.3.2 Zellzählung und Mengenberechnung.....	39
II.2.4 Chemorepellent induced defects assay	40
II.2.5 Auswertung	41
II.2.5.1 Vermessung der Gaps und Berechnung.....	41
II.2.5.2 Statistische Auswertung.....	41
II.2.5.2.1 Nonparametrischer t-Test (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben)	42
II.2.5.2.2 Nonparametrischer t-Test ANOVA (Kruskal-Wallis-Test).....	42
II.2.5.3 Berechnung der IC50	43

III ERGEBNISSE.....	47
III.1 Baicalein.....	47
III.1.1 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen.....	47
III.1.2 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen	48
III.1.3 Ergebnisse der Versuchsreihe MCF7- Sphäroide auf Lymphendothelzellen.....	49
III.2 Galangin	50
III.2.1 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen.....	51
III.2.2 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen	52
III.2.3 Ergebnisse der Versuchsreihe MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen.....	53
III.3 Chrysin	54
III.3.1 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen.....	54
III.3.2 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen	55
III.3.3 Ergebnisse der Versuchsreihe MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen.....	56
III.4 Pinocembrin	57
III.4.1 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen.....	58
III.4.2 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen	59
III.4.3 Ergebnisse der Versuchsreihe MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen.....	60

III.5 Luteolin.....	61
III.5.1 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen	61
III.5.2 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen	62
III.5.3 Ergebnisse der Versuchsreihe MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen	63
III.6 Quercetin	64
III.6.1 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen	64
III.6.2 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen	66
III.6.3 Ergebnisse der Versuchsreihe MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen	67
III.7 Eriodictyol	68
III.7.1 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Lymphendothelzellen	68
III.7.2 Ergebnisse der Versuchsreihe SW620-Sphäroide auf Blutendothelzellen	69
III.7.3 Ergebnisse der Versuchsreihe MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen	70
IV DISKUSSION	71
IV.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	71
IV.1.1 Versuchsreihe Kolonkrebssphäroide auf Lymphendothelzellen	71
IV.1.2 Versuchsreihe Kolonkrebssphäroide auf Blutendothelzellen.....	72
IV.1.3 Versuchsreihe Brustkrebssphäroide auf Lymphendothelzellen	73
IV.2 Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse aller Versuchsreihen.....	74
V ZUSAMMENFASSUNG	78

VI SUMMARY	79
VII ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	80
VIII TABELLENVERZEICHNIS	82
IX LITERATURVERZEICHNIS	83
X CURRICULUM VITAE	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
ALOX-12	... Arachidonate 12-Lipoxygenase
ATCC	... American Type Culture Collection
BEC	... Blood Endothelial Cells
CCID	... Chemo Repellent Induced Defects
CPA	... Cryo Protective Agents
DMEM	... Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	... Dimethylsulfoxid
DPBS	... Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EGM	... Endothelial cell Growth Medium
FAC	... Fanconi Anemia Protein
FBS	... Fetales Bovines Serum
FITC	... Fluoroisothiocyanate
c-fos	... intermediate early gene (bildet mit c-jun AP-1 aus)
HDBEC	... primary Human Dermal Blood Endothelial Cells
HDLEC	... primary Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells
HEPES	... 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
ICAM-1	... Intercellular Adhesion Molecule 1
IC50	... halfmaximal Inhibitory Concentration
ISO	... International Organization of Standardization
IGFBP	... Insulin-like Growth Factor Binding Proteins
LEC	... Lymphatic Endothelial Cells
MCF7	... Brustkrebszelllinie
MEM	... Minimal Essential Medium
MLC-2	... Myosin Light Chain-2
myb	... myeloblastosis family of transcription factors
myc	... myelocytomatose family of transcription factors

MYPT1	...	Myosin Phosphatase Target subunit 1
NEAA	...	Non Essential Amino Acids
NF- κ B	...	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PenStrep	...	Penicillin/Streptomycin
p53	...	Tumorsuppressor
ras	...	rat sarcoma (Protoonkogen)
rH	...	relative Luftfeuchtigkeit
RPMI	...	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
sis	...	simian sarcoma (Protoonkogen)
SW620	...	Kolonkrebszelllinie
ULPA	...	Ultra Low Particulate Air (Schwebstofffilter)
12-(S)-HETE	...	12-Hydroxyeicosatetraenoic acid

I EINLEITUNG, ZIELE, HINTERGRÜNDE

I.1 Einleitung und Ziele

Ein methanolisches Extrakt aus *Scrophularia lucida* L. (Scrophulariaceae)¹ wurde im Rahmen einer Testung auf Antitumorwirkung, die unterschiedliche Scrophularia-Arten einschloss, als am wirksamsten ermittelt. Das Extrakt zeigte ausgezeichnete Hemmwirkung im CCID-Assay auf die Gap-Bildung in Lymphendothelzellschichten durch Brustkrebszellen (Giessrigl et.al., 2012).

Auf Grund der Wirkqualität wurde an der Universität Wien im Rahmen von Diplomarbeiten eine phytochemische Untersuchung des Extraktes durchgeführt. Hier konnte die Wirkung einiger Fraktionen im CCID-Assay bestätigt werden (Lewenhofer, 2014; Schweighofer, 2014).

Da eine Fraktion, die hauptsächlich das Flavonoid Hispidulin enthielt, besonders starke Wirkung zeigte, wurden strukturell ähnliche Flavonoide ausgewählt, um Struktur-Wirkungsbeziehungen in CCID-Assays näher zu erforschen.

Das CCID-Assay oder „Chemorepellent induced defects-Assay“ vergleicht die Größe der durch Krebszellsphäroide hervorgerufenen Gaps (Löcher) im darunterliegenden Zellrasen aus Endothelzellen unter dem Einfluss der untersuchten Substanzen. Die Gap-Bildung repräsentiert einen Schritt im Metastasierungsgeschehen im menschlichen Körper und lässt daher Aussagen zur Antitumorwirkung einer Substanz zu (Vonach et.al., 2011).

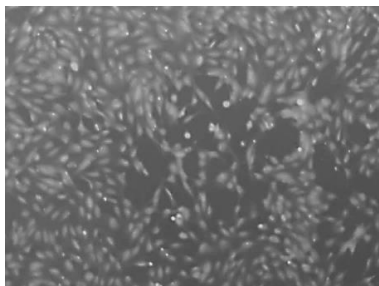


Abbildung 1: Gaps einer Kontrolle ohne Substanzeeinfluss

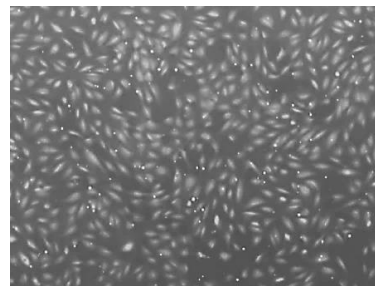


Abbildung 2: Gaps nach Behandlung mit 50 µM Chrysin

¹ <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2587278> (aufgerufen am 02.04.2015)

Im Gegensatz zu den Versuchen mit den methanolischen *Scrophularia*-Extrakten, in denen nur Brustkrebszellsphäroide verwendet wurden, sollten auch Struktur-Wirkungsbeziehungen an Kolonkrebszellsphäroiden untersucht werden, da bei dieser Krebsart eine ausreichende Bioverfügbarkeit nach peroraler Verabreichung denkbar wäre.

Um möglichst viele Informationen über die Auswirkungen von Flavonoiden auf die Metastasierung von verschiedenen Tumoren zu sammeln, wurden mehrere Versuchsvarianten etabliert.

Da Kolonkrebszellen sowohl über das Blut- als auch über das Lymphgefäßsystem streuen können, wurden 2 Ansätze verfolgt:

1. Eine Kombination aus Kolonkrebszellsphäroiden und Lymphgefäßendothelzellen.
2. Eine Kombination aus Kolonkrebszellsphäroiden und Blutgefäßendothelzellen.

Im Gegensatz zu den Kolonkrebszellen erfolgt die Metastasierung von Brustkrebs ausschließlich über das Lymphgefäßsystem, weshalb hier nur ein Versuchsaufbau geprüft wurde:

1. Eine Kombination aus Brustkrebszellsphäroiden und Lymphgefäßendothelzellen.

I.2 Allgemeines zu Brustkrebs

Da Brustkrebs bei Frauen zu den häufigsten Krebserkrankungen zählt, sind sowohl Prävention und Früherkennung, als auch innovative Therapieformen wichtige Forschungsgebiete.

Die Ursachen eines Mammakarzinoms werden nach derzeitigem Wissensstand in sporadische und genetisch determinierte klassifiziert:

- ♦ Klassische Risikofaktoren für ein sporadisches Mammakarzinom sind zum Beispiel *ein erhöhter Östrogenspiegel, frühe Menarche, Nulliparität, höheres Lebensalter und sonstige konstitutionelle Faktoren (Leischner, 2013).*
- ♦ Allerdings entstehen etwa 50 % aller Brustkrebsfälle auf Grund verschiedener genetischer Faktoren, den sogenannten *Breast Cancer Genes*, wobei hier ein ganz besonders frühes Manifestationsalter und die erhöhte Inzidenz von Ovarialkarzinomen charakteristisch sind.

Leitsymptom für das Vorhandensein eines Mammakarzinoms ist prinzipiell ein tastbarer Knoten im Bereich der weiblichen, selten auch der männlichen Brust. Mögliche Hinweise können zusätzlich noch *Veränderungen der Brust wie Größen- oder Formveränderungen, Mamillenretraktion, einseitige, besonders blutige Mamillensekretion, Hauteinziehungen, Mastitis außerhalb der Stillperiode, Orangenhaut (= Peau d'Orange, durch gestörten Lymphabfluss), Brustwarzenekzem, sowie Schwellungen der axillären oder supraklavikulären Lymphknoten oder plötzlich auftretende Schmerzen* sein (Leischner, 2013).

Nach Manifestation eines soliden Tumors erfolgt die Metastasierung in der Regel über das Lymph- und erst wesentlich später auch über das Blutgefäßsystem. Da besonders bei Mammakarzinomen mit einer äußerst frühen Tumorstreuung zu rechnen ist, umfassen die therapeutischen Maßnahmen für gewöhnlich neben der lokalen Entfernung des malignen Gewebes auch eine systemische Therapie, die dem jeweiligen Stadium der Krebserkrankung angepasst wird (Leischner, 2013).

Somit wäre eine Unterbindung beziehungsweise Verlangsamung des Metastasierungsvorganges von großem Interesse. Die Rolle von Flavonoiden in diesem Zusammenhang ist noch unbekannt, wobei die in dieser Arbeit durchgeführten Assays erste Einblicke in mögliche Wirkungen liefern sollen.

I.3 Allgemeines zu Darmkrebs

Bei kolorektalen Karzinomen handelt es sich um epitheliale Neoplasien des Kolons oder Rektums, die sich weder in ihrer Ätiologie noch der Klassifikation unterscheiden, weshalb sich die übergreifende Bezeichnung des kolorektalen Karzinoms weitestgehend etabliert hat. Diese Tumorform zählt zu den häufigsten in Europa, wobei keine Geschlechterpräferenz festzustellen ist.

Multifaktorielle Ursachen, wie verschiedene Umwelteinflüsse und eine genetische Prädisposition können ein kolorektales Karzinom hervorrufen. Beim Großteil der Patienten lässt sich eine adenomatöse Veränderung des epithelialen Gewebes als Ursprung erkennen, wobei zusätzlich zu diesen genetisch verursachten Gewebeumbildungen zahlreiche Umweltfaktoren die tatsächliche Manifestation mitbestimmen.

In diesem Zusammenhang sind in epidemiologischen Studien der „westliche Lebensstil“ beziehungsweise die Lebensumstände als besondere Risikofaktoren nachgewiesen und Ursachen wie *Übergewicht, Bewegungsmangel, Alkohol und Nikotinkonsum und außerdem ein gesteigerter Konsum von tierischem Fett und Fleisch* als klassische Problembereiche gezeigt worden (*Leischner, 2013*). In sozioökonomisch schwachen Ländern ist eine pflanzenreichere Ernährung Usus und die Häufigkeit von kolorektalen Karzinomen entsprechend niedriger.

Die Ausbreitung der soliden Tumormasse erfolgt primär über invasives Wachstum in umliegende Organe wie Blase, Prostata oder Uterus. Eine Metastasierung kann sowohl lymphogen als auch hämatogen stattfinden, wobei häufiger über hämatogene Wege zuerst Leber und Lunge befallen werden. Bei der Therapie können sowohl kurative als auch palliative Strategien verfolgt werden, je nach Malignitätsgrad und Metastasierungsstatus. In beiden Fällen ist die operative Beseitigung des Tumors der wichtigste Schritt, wobei mit einer großflächigen Entfernung der betroffenen Darmabschnitte gerechnet werden muss. Bei bereits diagnostizierter Metastasierung ist neben der systemischen Chemotherapie auch die Entfernung von Leber- und Lungenmetastasen notwendig (*Leischner, 2013*).

Die Tatsache, dass pflanzenreiche Kost die Inzidenz von kolorektalen Karzinomen zu senken scheint, machte die Testung von Flavonoiden an Kolonkrebszellen besonders interessant.

Da der Kontakt von Flavonoiden als Hauptinhaltsstoff zahlreicher Pflanzen mit dem von malignen Neubildungen betroffenen Epithel vielversprechend auch in Hinsicht auf präventive Wirkungen ist, sollten die Auswirkungen dieser Substanzgruppe auf Kolonkrebszellen und deren Metastasierungsverhalten untersucht werden.

I.4 Metastasierung und assoziierte Vorgänge

Unter Metastasierung (griech. „metastasis“ = Wegzug) versteht man die Verschleppung neoplastischer Zellen auf dem Blut- und Lymphweg von einer Körperstelle an eine andere und ihr An- und Weiterwachsen an entfernter Lokalisation. Oft gibt von mehreren tausend verschleppten Zellen nur eine Anlass zur Metastasierung (Erbar, 2002)!

Gerade weil die Metastasierung eines bösartigen Tumors jener entscheidende Faktor ist, der die Überlebenswahrscheinlichkeit eines Patienten deutlich verringert, steht dieser Vorgang im Zentrum des Interesses. Die Metastasierung kann grob in zwei Phasen unterteilt werden (Invasions- und Implantationsphase) und auf 3 verschiedenen Wegen von statten gehen: lymphogen, hämatogen und kavitär/kanalikulär.

Invasionsphase

In dieser Phase erlangt der Tumor Zugang zu Blut- oder Lymphkapillaren, was die Voraussetzung für eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung ist. Es kann zur Ablösung einzelner Zellen oder Zellverbände kommen, die dann mit dem Blut- oder Lymphfluss im Körper verschleppt werden.

Implantationsphase

Durch ihre Wachstumsautonomie ist es für neoplastische Zellen möglich, an anderer Stelle wieder anzuwachsen und dort Zweittumore auszubilden.

Eine andere Variante der Metastasierung stellt die Einwanderung in Körperhöhlen oder präformierte Gänge dar, die kavitäre oder kanalikuläre Metastasierung, wobei

auch hier die Tumormasse in fremde Organsysteme eindringt und dadurch den Körper zusätzlich schwächt.

Lymphogene und hämatogene Metastasierung werden in CCID-Assays im Rahmen von in-vitro Experimenten simuliert.

Tumorzellen besitzen an ihrer Oberfläche verschiedenste histolytisch wirkende Enzyme, die das Eindringen in Gefäßsysteme im Organismus ermöglichen. Vor allem die lymphogene Metastasierung stellt die häufigste Form der Tumoraussaat dar. Hierbei entwickelt sich in Folge eines primären Streuvorganges eine sogenannte Lymphangiosis carcinomatosa, also eine Reihe von Sekundärtumoren entlang der Lymphgefäße und in den Lymphknoten.

Bei der hämatogenen Metastasierung bleiben Tumorzellen, die sich über die Blutbahnen im Körper verteilen, im Kapillarnetz hängen und siedeln sich dort als Zweittumore an.

Somit kann, unabhängig davon, ob es sich um lymphogene oder hämatogene Metastasierung handelt, der wahrscheinliche Ort von Zweittumoren entlang des Blut- und Lymphgefäßsystems, an engmaschigeren Stellen, vorausgesagt werden (Erbar, 2002).

Im CCID-Assay wird der Tumorzelleinbruch in Blut- und Lymphgefäße als dreidimensionales Kokultivierungssystem imitiert.

1.5 Allgemeine Informationen zu Flavonoiden

Chemische Aspekte

Biogenetisch gesehen handelt es sich bei Flavonoiden um Phenylchromanderivate, die durch eine Kondensationsreaktion eines Phenylpropankörpers mit einem Polyketid entstehen. Primäres Produkt dabei sind Chalkone, wobei diese durch eine weitere Kondensation der C₃ Kette mit einer Hydroxylgruppe am Ring A einen Chromanring (Ring B) ausbilden und so das Flavangrundgerüst formieren. Je nach Oxidationsgrad der C-Atome dieses Chromanrings in Position 2,3 und 4 können Flavonoide in weitere Untergruppen unterteilt werden.

- ♦ Flavanone
- ♦ Flavone
- ♦ Flavanonole

- ♦ Flavonole
- ♦ Flavanole
- ♦ Flavandiole
- ♦ Flavylum-Salze

Flavonoide liegen meistens als glykosidische Verbindungen vor, wobei Hydroxylgruppen der Ringe A und C alkyliert oder acyliert sein können. Für die in-vitro Testungen im Rahmen dieser Arbeit wurden nicht-glykosidische Verbindungen verwendet.

Medizinische Verwendung

Die Verwendung von Flavonoiden als Arzneistoffe ist durch ihre geringe Bioverfügbarkeit eingeschränkt. Vor allem der rasche Abbau im menschlichen Gastrointestinaltrakt stellt ein großes Hindernis für die Anwendung als Arznei dar. Somit sind die Wirkungen dieser Substanzen in Zellkultursystemen nicht unbedingt ein Nachweis für eine in-vivo Aktivität, da der Metabolismus der Naturstoffe nicht miteinbezogen werden kann.

Hydrolysierte, lipophilere Metaboliten von Flavonoiden können als Glucuronide resorbiert werden, weshalb Flavonoide beziehungsweise deren Metaboliten eine Vielzahl an Wirkungen zugeschrieben werden.

Dazu gehören unter anderem eine *Lipoxygenasehemmung*, was die Entstehung von entzündungsfördernden Leukotrienen einschränkt, eine Radikalfängereigenschaft, sowie zahlreiche Interaktionen mit Nukleinsäuren, Proteinen, dem menschlichen Immunsystem und verschiedenen Signaltransduktionswegen, wie zum Beispiel jenem von *NF-κB* (Teuscher et.al, 2012).

Die Tatsache, dass Flavonoide in den meisten pflanzlichen Nahrungsmitteln in nennenswerten Konzentrationen vorliegen begründet das rege Interesse an möglichen tumorsuppressiven Eigenschaften.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 Materialien

II.1.1 ZELLINIEN

II.1.1.1 Kolonkrebszellen SW620 (CCL-227TM)

Die Kolonkrebszellsphäroide für die CCID-Assays wurden aus einer SW620-Zelllinie (American Type Culture Collection, VA 20110, USA) hergestellt.

Es handelt sich dabei um eine vom Menschen isolierte Zelllinie, die aus einem Lymphknoten entnommen worden war, nachdem die zu Grunde liegende Krebserkrankung (*Duke's type C colorectal adenocarcinoma*) metastasiert hatte. Der Spender dieser Zelllinie war ein 51-jähriger Kaukasier mit Blutgruppe A und positivem Rhesusfaktor.

Diese Kolonkrebszellen können als Epithelzellen klassifiziert werden, die durch eine Reihe von mutierten Onkogenen, wie zum Beispiel myc⁺, myb⁺, ras⁺, fos⁺, sis⁺, p53⁺, ihre Zellintegrität verloren, und so die Krebserkrankung des Spenders forciert haben.²

SW620 war gut kultivierbar und bei der Herstellung der Sphäroide unter den gewählten Bedingungen wurden zufriedenstellende Resultate erzielt, obwohl im Vergleich zu Brustkrebszellen die Sphäroide deutlich unregelmäßiger in Form und Größe waren. Trotzdem konnte während den Assays eine ausreichende Gap-Bildung induziert werden.

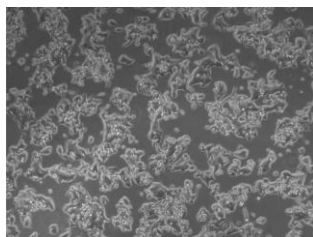


Abbildung 3: SW620-Zellen bei Konfluenz

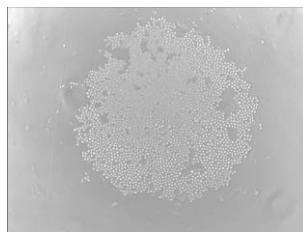


Abbildung 4: Sphäroid nach der Zentrifugation

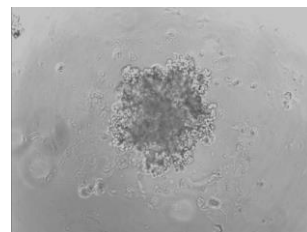


Abbildung 5: Sphäroid nach 4 Tagen

² https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo_country=at&slp=1#generalinformation
(aufgerufen am 04.04.2015)

II.1.1.2 Brustkrebszellen MCF7

Bei der Herstellung der Brustkrebszellsphäroide waren Zellen der MCF7-Linie in Verwendung. Die MCF7-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Kari Alitalo von der Molecular Cancer Biology Research Unit der Universität Helsinki zur Verfügung gestellt.

Die Gewinnung erfolgte hier aus einem Pleuralerguss, der durch die Metastasierung eines Brustadenokarzinoms entstanden war. Die Spenderin litt an einem in den Milchdrüsen lokalisierten östrogensensitivem Brustkrebs, der durch Östrogenstimulation insulin-like growth factor binding proteins zur eigenen Wachstumsstimulation exprimierte.

Auch hier konnten bei der Sphäroidherstellung gute Ergebnisse für das 3D-Assay erzielt werden, weshalb diese Zelllinie für die Versuchsreihe ausgewählt wurde.

In Hinsicht auf Flavonoidwirkungen, muss beim Brustkrebs auf die Problematik der Distribution hingewiesen werden, da Flavonoide nicht unverändert und mit vollem Wirkpotential nach oraler Applikation bis ins Brustgewebe vordringen können. Da aber sämtliche Tests der Scrophulariaextrakte mit MCF7-Sphäroiden ausgeführt worden waren, wurde dieser Versuchsaufbau auch in der vorliegenden Arbeit mitgeführt.

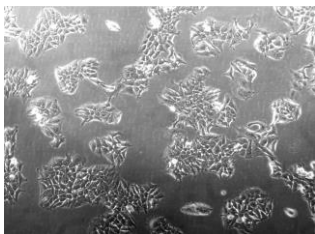


Abbildung 6: MCF7-Zellen bei Konfluenz

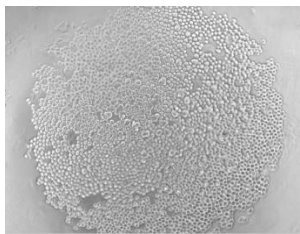


Abbildung 7: Sphäroid nach der Zentrifugation



Abbildung 8: Sphäroid nach 3 Tagen

II.1.1.3 Lymphendothelzellen HDLEC (=LEC)

Bei den verwendeten Lymphendothelzellen handelte es sich um aus Kapillargefäßen entnommene Endothelzellen (Promocell, Heidelberg, Deutschland). Im menschlichen Organismus bilden Lymphendothelzellen eine einzelne Zellschicht im Inneren von Lymphkapillaren und ermöglichen dort einerseits die Diffusion von Sauerstoff, Wasser oder Lipiden, hemmen aber andererseits den Durchgang von Kohlendioxid und Harnstoff, wodurch der Abtransport dieser Toxine im Lymphfluss forciert wird.³

In der vorliegenden Arbeit wurden sogenannte „HDLEC“ verwendet, also „Primary Human Dermal Lymphatic Endothelial Cells“, die der Vorhautdermis eines juvenilen Spenders entnommen worden waren.

Die Zellen wurden nach der Isolierung mit verschiedenen Antikörpern und der Telomerase Reverse-Transkriptase stabil transfiziert, um eine einfachere Handhabung und längere Lebensdauer zu erreichen (*Schoppmann et.al., 2004*).

Im Zusammenhang mit der Metastasierung einiger Tumorarten kommt den Lymphendothelzellen eine wichtige Rolle zu. Da Lymphkapillaren nicht über eine durchgängige Basalmembran verfügen, sind vor allem die Lymphendothelzellen an den pathologischen Vorgängen der Tumormetastasierung beteiligt.⁴ Wird durch die von Tumorzellen produzierten Enzyme eine Migration von LEC forciert, kann eine Art „Durchgangsmöglichkeit“ geschaffen werden und maligne Zellen können in das Lymphgefäßsystem eindringen.

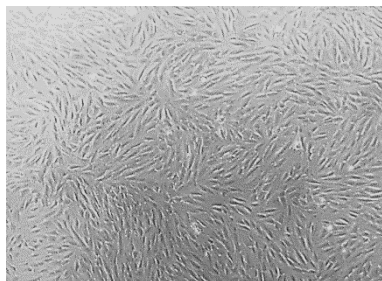


Abbildung 9: Lymphendothelzellen bei Konfluenz

³ <http://www.promocell.com/products/human-primary-cells/endothelial-cells-microvascular/>
(aufgerufen am 12.05.2015)

⁴ <http://www.promocell.com/products/human-primary-cells/endothelial-cells-microvascular/human-dermal-lymphatic-endothelial-cells-hdlec/> (aufgerufen am 12.05.2015)

II.1.1.4 Blutendothelzellen HDBEC (=BEC)

Bei den Blutendothelzellen (Promocell, Heidelberg, Deutschland) handelte es sich um HDBEC also „Primary Human Dermal Blood Endothelial Cells“, die aus Blutkapillargefäßen entnommen worden waren.

Auch diese Zellen bilden eine Barriere für alle im Blut befindlichen Bestandteile. Daher wirken sie an vielen verschiedenen physiologischen und pathologischen Vorgängen mit ⁵ und steuern unter anderem den *Gefäßtonus*, die *Kapillarpermeabilität*, können die *Blutgerinnung oder Fibrinolyse auslösen* und werden für *Studien zu Arteriosklerose, Tumorgenese und Thrombosen eingesetzt*.⁶

Auch diese Zellen wurden der Vorhautdermis eines juvenilen Spenders entnommen und danach mit Antikörpern und der Telomerase Reverse-Transkriptase transfiziert (Schoppmann et.al., 2004).

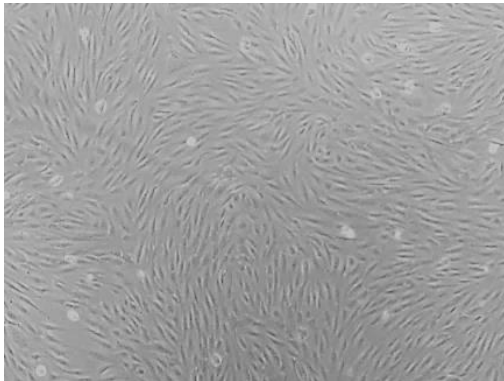


Abbildung 10: Blutendothelzellen bei Konfluenz

⁵ <http://www.promocell.com/products/human-primary-cells/endothelial-cells-microvascular/>
(aufgerufen am 12.05.2015)

⁶ <http://www.promocell.com/products/human-primary-cells/endothelial-cells-microvascular/human-dermal-blood-endothelial-cells-hdbec/> (aufgerufen am 12.05.2015)

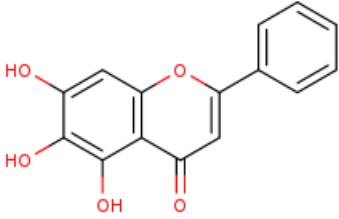
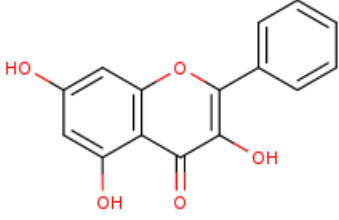
II.1.2 UNTERSUCHTE FLAVONOIDE

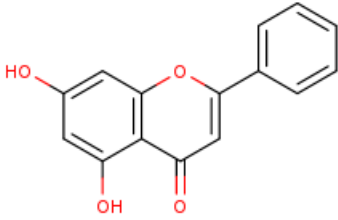
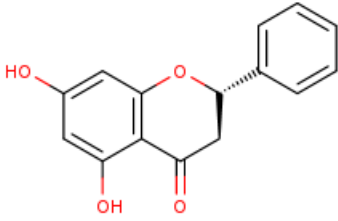
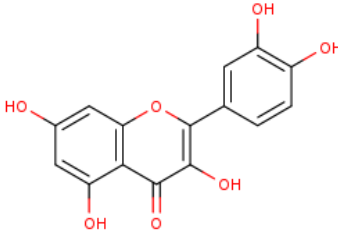
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Flavonoide im CCID-Assay getestet. Die Mengenermittlung für die 100 µL Stammlösungen wurde wie folgt durchgeführt:

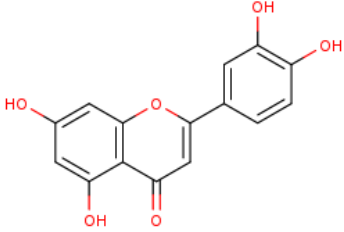
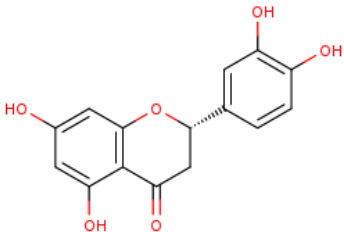
$$c = \frac{m}{V * MW} \quad \rightarrow \quad m = c * V * MW$$

$m = \text{Masse [mg]}$; $c = \text{Konzentration [50 mM]}$; $V = \text{Volumen [100µL]}$;
 $MW = \text{jeweiliges Molekulargewicht}$

Tabelle 1: Flavonoiddaten

Flavonoid-Daten, Strukturformel	Herstellung einer Stocksolution		
Baicalein CAS: 491-67-8 Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) Molekulargewicht: 270,241 g/Mol 	berechnete Menge (mg/100µL)	tatsächliche Einwaage (mg)	DMSO- Menge (µL)
	1,35	1,38	102,2
Galangin CAS: 548-83-4 Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) Molekulargewicht: 270,241 g/Mol 	1,35	1,46	108,1

Flavonoid-Daten, Strukturformel	Herstellung einer Stocksolution		
Chrysin CAS: 480-40-0 Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) Molekulargewicht: 254,242 g/Mol 	berechnete Menge (mg/100µL)	tatsächliche Einwaage (mg)	DMSO- Menge (µL)
	1,27	1,58	124,4
Pinocembrin CAS: 480-39-7 Extrasynthese (Genay, France) Molekulargewicht: 256,258 g/Mol 	1,28	1,32	103,1
Quercetin CAS: 117-39-5 Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) Molekulargewicht: 302,240 g/Mol 	1,51	1,56	103,3

Flavonoid-Daten, Strukturformel	Herstellung einer Stocksolution		
Luteolin CAS: 491-70-3 Extrasynthese (Genay, France) Molekulargewicht: 286,241 g/Mol 	berechnete Menge (mg/100µL) 1,43	tatsächliche Einwaage (mg) 1,48	DMSO- Menge (µL) 103,5
Eriodictyol CAS: 4049-38-1 Extrasynthese (Genay, France) Molekulargewicht: 288,257 g/Mol 	1,44	1,34	93,1

II.1.3 KULTIVIERUNGSMEDIEN UND SUBSTANZEN

II.1.3.1 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)

Bei DPBS (lifeTechnologies, Carlsbad, USA) handelt es sich um eine gepufferte Salzlösung (pH 7,0 - 7,3), die ohne anorganische Calcium- oder Magnesiumsalze beziehungsweise Indikatoren wie Phenolrot für verschiedene Waschschriffe während den Assays benutzt wurde: einerseits zur Reinigung der Lymph- oder Blutendothelzellen, andererseits um Medien- und Carboxymethylcellulose-Rückstände von den Sphäroiden abzutrennen.

Auch bei der Zellkultivierung stellte DPBS eine gute Möglichkeit zur Zellreinigung vor Split-Vorgängen und zur Entfernung von Medienresten dar.⁷

II.1.3.2 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium

Dieses Medium wurde ursprünglich zur Kultivierung von Leukämiezellen entwickelt, in weiterer Folge dann aber auch zur Aufbewahrung und Züchtung zahlreicher anderer Zellen verwendet. Für die Versuchsreihen mit SW620-Zellen wurde dieses Medium, von der Firma lifeTechnologies (Carlsbad, USA) mit L-Glutamin, dem Puffer „HEPES“ und dem Indikator Phenolrot ausgewählt.

RPMI enthält im Gegensatz zu anderen Standardmedien, wie „Eagle’s Minimal Essential Medium“ oder „Dulbecco’s Modified Eagle Medium“ Vitamin B₁₂, Biotin, Paraaminobenzoessäure, Inositol und Cholin.

Bei allen Experimenten wurden RPMI vor der Verwendung 10 % FBS und 1 % PenStrep zugesetzt.

II.1.3.3 TrypLE TM Express (Trypsin)

Bei dem verwendeten Trypsin (lifeTechnologies, Carlsbad, USA) handelt es sich um ein animal origin free Produkt, welches auf rekombinantem Weg produziert wird und eine besonders hohe Reinheit aufweist. Das Enzym wird im Allgemeinen zur Ablösung adhärenter Zellsysteme vom Boden der Kultivierungsflaschen verwendet, wobei die Peptidbindungen an den C-terminalen Enden von Lysinen und Argininen gespalten werden.

Das rekombinante Produkt weist eine hohe Spezifität auf und verringert Schäden an den abzulösenden Zellen, die durch etwaige Verunreinigungen mit anderen Enzymen bei tierischen Produkten entstehen könnten. Außerdem war eine Hemmung dieses Enzyms schon durch die Verdünnung mit entsprechenden Medien, und nicht alleine durch fetales Kälberserum herbeizuführen, was die Handhabung wesentlich erleichterte.⁸

⁷ <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/14190094> (aufgerufen, am 14.04.2015)

⁸ <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/12604013>, (aufgerufen, am 27.04.2015)

II.1.3.4 Endothelial Cell Growth Medium^R (EGM)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die EGMTM-2 MV SingleQuotsTM-Variante (Lonza, Basel, Schweiz) dieses Kultivierungsmediums verwendet. Es enthält neben dem Basalmedium zahlreiche Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere Zusätze⁹, wie *human Epidermal Growth Factor [hEGF]*, *Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF]*, *R3-Insulinlike Growth Factor-1 [R3-IGF-1]*, *Ascorbic Acid*, *Hydrocortisone*, *human Fibroblast Growth Factor-Beta [hFGF-β]*, *Fetal Bovine Serum [FBS]*, und *Gentamicin/Amphotericin-B [GA]*¹⁰.

Neben der Verwendung als Kultivierungsmedium für BEC und LEC in den Kultivierungsflaschen, kam EGM auch während den Assays als Trägermedium für den CellTracker und zur Verdünnung bei der Herstellung der benötigten Flavonoidkonzentrationen zum Einsatz.

II.1.3.5 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM (lifeTechnologies, Carlsbad, USA) wurde während der Herstellung der Sphäroide als Basalmedium und Lösungsmittel für die zugesetzte Carboxymethylcellulose verwendet.

Dieses Medium ist häufig als Basalmedium in Verwendung, da es dank seiner Zusammensetzung das Wachstum zahlreicher Säugetierzellen ermöglicht.

Mit einer 5 %-Lösung von FBS in DMEM konnte das Sphäroidwachstum optimal unterstützt werden. Daher wurde dieses Gemisch als Standardformulierung zur Sphäroidherstellung aus Kolonkrebszellen verwendet.¹¹

II.1.3.6 Minimal essential Medium (MEM)

Dieses Medium wurde freundlicherweise von Frau Nicole Huttary (Department für klinische Pathologie der Medizinischen Universität Wien) zur Verfügung gestellt. Es war mit 10 % FBS, 1 % PenStrep, 1 % NEAA (non essential amino acids) und

9 <http://www.lonza.com/products-services/bio-research/primary-cells/human-cells-and-media/endothelial-cells-and-media/endothelial-cell-growth-media-kits.aspx> (aufgerufen am 05.05.2015)

10 http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_Instructions__Technical_Info_-_Endothelial_Cell_Systems.pdf (aufgerufen am 05.05.2015)

11 <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/21969035?ICID=search-21969035> (aufgerufen am 27.04.2015)

150 µg/ml Hygromycin B supplementiert und kam ausschließlich bei der Kultivierung und der Herstellung der MCF7-Sphäroide zur Anwendung.

II.1.3.7 Fetales bovines Serum (FBS)

In der vorliegenden Arbeit wurde hitzeinaktiviertes Serum (lifeTechnologies, Carlsbad, USA) verwendet, das von der Herstellerfirma für 30 Minuten bei 56 °C unter ständiger Homogenisierung erwärmt wird, um unerwünschte Begleitstoffe zu entfernen.¹²

II.1.3.8 Carboxymethylcellulose – Natrium

Die Carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurde als 1,6 %ige Lösung in DMEM hergestellt, wobei das Pulver in 60 °C heißem Medium gelöst, mit kaltem DMEM vermengt und bei 5000 g für 2 Stunden zentrifugiert wurde.

Diese 1,6 %ige Lösung wurde mit FBS-haltigem DMEM oder MEM für die Sphäroidherstellung weiter verdünnt, um eine Endkonzentration von 0,3 % Carboxymethylcellulose im Kulturmedium zu erhalten, das dann zur Sphäroidherstellung verwendet werden konnte.

II.1.3.9 Penicillin, Streptomycin (PenStrep)

Da eine Kontamination von Zellkulturen unter allen Umständen verhindert werden muss, ist der Einsatz von Antibiotika unumgänglich. Die Kombination aus Penicillin und Streptomycin (1+1; lifeTechnologies, Carlsbad, USA) bildet die optimale Grundlage zur Bekämpfung von grampositiven und gramnegativen Bakterien.

Penicillin wirkt über eine Hemmung der Transpeptidase, wodurch die Peptidoglykan-Synthese unterbrochen und damit der Zellwandaufbau von Bakterien verhindert wird.

¹² https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/B-12637-r1_EU_0804_FBS.pdf
(aufgerufen am 18.05.2015)

Streptomycin wirkt über die Inhibierung der ribosomalen 30S-Untereinheit und unterdrückt damit über ein komplexes Wirkungssystem die Proteinbiosynthese in den Bakterien (*Mutschler et.al., 2013*).

PenStrep wurde allen Basalmedien zugesetzt, wobei jeweils eine Endkonzentration von 1 % die Wirksamkeit der Antibiotika gewährleistete.

II.1.3.10 Non-essential amino acids (NEAA)

Nicht essentielle Aminosäuren wurden ausschließlich MEM (Minimal Essential Medium)-Medium mit einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt, um die Wachstumsgeschwindigkeit und Vitalität der MCF7 Zellen zu verbessern.¹³ Die NEAA-Lösung (lifeTechnologies, Carlsbad, USA) enthielt:

- ♦ Glycin
- ♦ L-Alanin
- ♦ L-Asparagin
- ♦ L-Asparaginsäure
- ♦ L-Glutaminsäure
- ♦ L-Prolin
- ♦ L-Serin¹⁴

II.1.3.11 Hygromycin B

Hygromycin B (Böhringer Ingelheim, Wien, Österreich) gehört zur Gruppe der Aminoglykosidantibiotika, die irreversibel an die 16S-Untereinheit der 30S-Ribosomen binden, um dort durch den Einbau von falschen Aminosäuren die Bildung von Nonsense-Proteinen zu induzieren. Dadurch wird die Membranzstruktur von nicht resistenten Bakterien zerstört, was den Zelltod herbeiführt (*Mutschler et.al., 2013*). Aminoglykosidantibiotika zeigen vor allem gegen gramnegative Bakterien starke Wirkung und verhindern somit eine Kontamination der MCF-Zellen mit solchen Keimen. Zusätzlich wurde Hygromycin auch dazu

¹³ <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11140050> (aufgerufen, am 30.05.15)

¹⁴ <http://www.lifetechnologies.com/at/en/home/technical-resources/media-formulation.165.html>
(aufgerufen am 30.05.15)

verwendet, in den VEGF-C-transfizierten MCF7 Zellen, den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

II.1.3.12 Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dimethylsulfoxid [CAS: 506008 ¹⁵ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)] wurde in den Versuchsreihen einerseits als Lösungsmittel für die getesteten Flavonoide und andererseits als Frostschutzmittel während der Kryokonservierung verwendet.

II.1.3.13 CellTracker™ Green CMFDA

CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) [CAS-Number: 136832-63-8 (lifeTechnologies, Carlsbad, USA)] wurde für die Färbung der Endothelzellen während der Assays verwendet.

Der grüne Farbstoff zeichnete sich durch seine leichte Handhabbarkeit, geringe Toxizität und schnelle Wirkung aus. In den Versuchsreihen wurden 0,2 µL einer Verdünnung von 1:5000 in DMSO pro ml EGM-Medium zugesetzt und die Zellen damit für ca. 1 h inkubiert.

Der CellTracker passiert während der Inkubationszeit die Endothelzellwände, wobei intrazellulär verschiedene Metaboliten gebildet werden, die die Membran nicht mehr passieren können und im Inneren der Zellen eingeschlossen bleiben. Damit kann die intrazelluläre Fluoreszenz zur Detektion verwendet werden. Der Farbstoff verbleibt in den Mutterzellen und kann an Tochterzellen weitergegeben werden, sollte es während den Assays zu Zellteilungen kommen.¹⁶

II.1.4 GERÄTE UND TECHNISCHE AUSRÜSTUNG

Der CO₂-Inkubator (Cytoperm™ 2 CO₂ Inkubator, Thermo scientific, Waltham USA) wurde bei 37 °C, 95 % rH und 5 % CO₂ verwendet, was optimale Bedingungen in der Zellkultur für das Wachstum sämtlicher Zelllinien schuf.¹⁷

¹⁵ <https://www.reaxys.com/reaxys/secured/paging.do?performed=true&action=restore>
(aufgerufen am 18.05.2015)

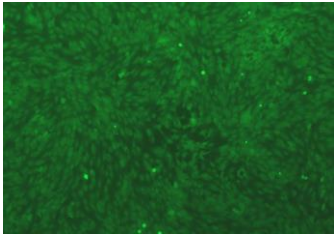
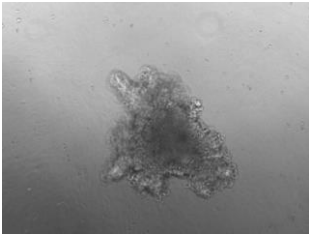
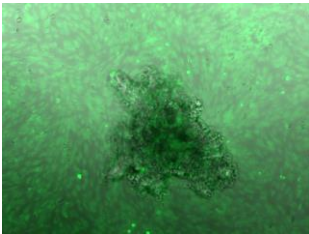
¹⁶ https://www.lifetechnologies.com/at/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=2761old_2 (aufgerufen am 19.05.2015)

¹⁷ <http://www.thermoscientific.de/product/cytoperm-2-co-sub-2-sub-gassed-incubator.html> (26.05.2015)

Die Laminar Air Flow-Werkbank NordicSafeR Low Noise, Class II Microbiological Safety Cabinets (Ehret, Tulln, Österreich) mit 2-ULPA-Filter-System wurde während der Forschungsarbeit mit 0,44 m/s Zuluft- und 0,31 m/s Abluftgeschwindigkeit betrieben und während der Ruhezeiten für eine Stunde mit UV-Licht zur Oberflächen- und Luftdesinfektion bestrahlt.

II.1.4.1 Mikroskop Axiovert 35 mit integrierter Kamera

Zur Kontrolle von Wachstum, Vitalität und Gap-Bildung während der CCID-Assays und der Kultivierung wurde ein inverses Mikroskop mit integrierter Kamera (AxioCam MRc5, ZEISS) verwendet und mit der Zen Imaging Software gesteuert. Um die mit CellTracker markierten Zellen detektieren zu können, wurden FITC-Filter eingesetzt. Mit Hilfe der Software konnten Fotos übereinandergelegt werden. In Bildebene 1 befand sich das mit Hilfe des FITC-Filters aufgenommene und in Bildebene 2 das ohne Filter festgehaltene Bild.

Bildebene 1 (FITC)	Bildebene 2 (kein Filter)	Kombination
		
Abbildung 11: Zellfluoreszenz ohne schwarzweiß-Bildebene	Abbildung 12: Schwarzweiß-Bildebene ohne Fluoreszenzfilter	Abbildung 13: Kombination beider Bildebenen

Somit konnten Sphäroide, Zellrasen und Gaps in einem Bild dargestellt, vermessen und interpretiert werden.

II.1.4.2 Verbrauchsmaterialien der Zellkultur

Alle Zellen wurden in Plastikflaschen passagiert beziehungsweise in Plastikwellplatten zu Sphäroiden oder Zellrasen gezüchtet. Die Flaschen zur Kultivierung (Thermo scientific, Waltham, USA) wurden in den Größen 25 cm² und 75 cm² mit Nennvolumina von 5 ml und 10 ml verwendet. Die Pipetten

(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) fassten jeweils 5 ml oder 10 ml und wurden mit der accu-jetR pro-Pipettierhilfe (BrandTech® Scientific, Essex, UK) bedient. 96-Wellplatten mit U-förmigem Boden (Thermo scientific, Waltham USA) kamen bei der Sphäroidherstellung, 24-Wellplatten mit kantigem Boden (Thermo scientific, Waltham USA) während der Assays zum Einsatz.

II.2 Methoden

II.2.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

II.2.1.1 Passagierung

Die Passagierung der Zellen erfolgte in Kulturflaschen von 25 cm² und 75 cm² für 5 ml und 10 ml Medium. Die Subkultivierung der einzelnen Zelllinien (SW620, MCF7, BEC, LEC) erfolgte bei vollkommener Konfluenz.

Konfluenz kann bei aneinander haftenden Zellen (BEC, LEC) daran erkannt werden, dass der Zellrasen den Boden der Kulturflasche zur Gänze bedeckt. Bei Tumorzellen wäre Wachstum auch bei Konfluenz noch möglich, da nicht der gesamte Flaschenboden mit Zellen bedeckt wird (*Gstraunthaler et.al., 2013*).

Somit verlangte die Bestimmung eines konfluenten Zustandes bei Tumorzellen wesentlich mehr Erfahrung und bessere Kenntnisse der Wachstumseigenschaften als bei den Endothelzellen.

Um die Zellen zu passagieren, wurden sie nach Entfernung des an Nährstoffen verarmten Kulturmediums zuerst mit Trypsin vom Boden der Kulturflaschen abgetrennt, bevor die Trypsinaktivität mit einem FBS-haltigen Kulturmedium gestoppt wurde.

Die Zellsuspension wurde in ein verschließbares Plastikvial eingebracht und für 3 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach der Resuspension des Zellpellets erfolgte der Transfer in das Kulturgefäß, das mit entsprechendem Medium aufgefüllt worden war.

- ♦ Für 5 ml Zellsuspension der SW620-Tumorzelllinie wurde eine Verdünnung von 1:10 eingesetzt, wobei mit vollkommener Konfluenz nach maximal 5 Tagen zu rechnen war.
- ♦ Für MCF7-Tumorzellen war ein maximales Verdünnungsverhältnis von 1:5 einzusetzen, wobei die Zellen auch innerhalb von 5 Tagen konfluent waren.
- ♦ Da bei Blut- und Lymphendothelzellen Zell-Zell-Kontakte für ein ausreichendes Wachstum unbedingt notwendig waren, lag der höchstmögliche Verdünnungsgrad bei 1:4. Dann war nach etwa 4 Tagen ein dichter Zellrasen vorhanden, wobei oft mehrere Medienwechsel beziehungsweise partielle Medienwechsel notwendig waren, um die volle Wachstumskapazität der Zellen ausschöpfen zu können.

II.2.1.2 Medienwechsel

Da es sich bei der durchgeführten Zellkultivierung um eine statische Kultur (batch culture) handelte, mussten die Zellen kontrolliert werden, um ein Absterben durch den Verbrauch der Nährstoffe zu verhindern.

Wenn bei noch nicht erreichter Konfluenz eine zunehmende Wachstumsstagnation oder morphologische Veränderungen der Zellen beobachtet wurden, erfolgte ein Medienwechsel.

Vollkommene Medienwechsel, bei denen das gesamte alte Kulturmedium entfernt und Waschvorgänge mit DPBS durchgeführt werden, sind nicht immer empfehlenswert, da die Zellen großen Milieuschwankungen ausgesetzt sind (*Gstraunthaler et.al., 2013*).

Ein kompletter Medienwechsel bei frisch aufgetauten Zellen ist durchaus angezeigt, da eventuell toxische Rückstände von DMSO innerhalb von 24 h entfernt werden sollten.

Ein partieller Medienwechsel ist für die Zellen schonender. Hierfür wird den Zellen etwa die Hälfte oder ein Drittel des alten Mediums entzogen und die Kulturflaschen mit frischem Medium wieder auf das Nennvolumen aufgefüllt. So wird eine langsame Erhöhung der Nährstoffkonzentration erreicht (*Gstraunthaler et.al., 2013*).

II.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Konservierung

Da alle Zellarten, die während eines Kultivierungszyklus durch fortwährende Passagierung am Leben erhalten werden, früher oder später ihr Wachstum einstellen oder absterben, ist es notwendig, Zellen mit niedriger Passagenzahl zu konservieren.

Für eine erfolgreiche Kryokonservierung mussten die Zellen vom Substrat gelöst und zentrifugiert werden. Das Zellpellet wurde in 900 µL FBS resuspendiert und mit 100 µL DMSO in einem Kryotube zum Vorfrieren auf Eis gelegt, wobei DMSO als Frostschutzmittel diente. DMSO ist ein penetrierendes Cryo Protective Agent, dringt ins Zellinnere ein und verhindert so die Eisbildung innerhalb der Zelle. FBS im Konservierungsmedium bedingt, dass den Zellen während des Auftauvorganges ausreichend Nährstoffe und Wachstumsfaktoren zur Verfügung stehen. Nach dem Vorfrieren des Kryotubes wurde das Gefäß bei -80°C tiefgefroren. Diese Methode der Kryokonservierung ermöglichte jederzeit die Wiederverwendung von Zellen einer bestimmten Passage, weil die Zellen in den meisten Fällen ein identisches Wachstumsverhalten zeigten wie vor dem Einfrieren (*Hennes et.al., 2015*).

Auftauen der Zellsuspension

Beim Auftauen der kryokonservierten Zellen ist eine langsame Anhebung der Temperatur essentiell (*Hennes et.al., 2015*). Deshalb wurde die Zellsuspension nach der Entnahme aus dem Gefrierschrank auf Eis gelegt und dort für mindestens 15 min. belassen.

Danach wurde die gefrorene Zellsuspension in den Händen angewärmt. Die Zellsuspension wurde mit Kulturmedium verdünnt und sofort für 3 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellkonglomerat wurde je nach gewünschtem Verdünnungsgrad in einer entsprechenden Menge Kulturmedium resuspendiert und in eine frische Kultivierungsflasche überführt, die mit einer ausreichenden Menge an Medium befüllt worden war. Nach dem Erwärmen der Zellen musste möglichst schnell gearbeitet werden, um die Kontaktzeit zwischen Zellen und DMSO kurz zu halten und zelltoxische Wirkungen von DMSO zu vermeiden. Waren die Zellen in

den Kulturflaschen nach mehrstündiger Inkubation adhäriert, musste ein kompletter Medienwechsel durchgeführt werden, um etwaige Rückstände von DMSO zu entfernen.

II.2.2 HERSTELLUNG EINES MONOLAYERS

II.2.2.1 Konfluenz als Voraussetzung für ein optimales Ergebnis

Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit transfizierten, telomeraseimmortalisierten Endothelzellen gearbeitet wurde, konnte deren „Normalzustand“ über einen wesentlich längeren Zeitraum aufrechterhalten werden als bei anderen Zellarten. Sowohl Wachstum als auch Vitalität waren über Wochen konstant, wobei in relativ kurzen Zeitabständen mit vollkommener Konfluenz gerechnet werden konnte (*Schoppmann et.al., 2004*). Bei 100 %iger Konfluenz konnte ein optimales Monolayer-Ergebnis erzielt werden.

Die Schritte der Monolayerherstellung entsprachen jenen der Subkultivierung (siehe Kap. II.2.1.1): Trypsinisierung, Enzymstopp, Zentrifugation, Resuspension des Zellpellets, Verdünnung je nach erforderlicher Wachstumszeit.

Die so produzierte Zellsuspension wurde entweder zur weiteren Passagierung der Zellen in die Kulturflasche überführt, oder für die Herstellung eines Monolayers in einer 24-Well-Platte weiter verdünnt.

II.2.2.2 Wahl des Splitverhältnisses und weitere wichtige Parameter

Für den Versuchsaufbau waren jeweils 4 mal 3 Wells einer 24-Well-Platte mit einem Zellrasen zu versehen, da neben der Kontrolle (10 μ M DMSO) jeweils drei verschiedene Konzentrationen jedes Flavonoids (siehe Kap. II.1.2) getestet wurden. Das maximale Füllvolumen der Wells lag bei 1 mL und mit einer Verdünnung der Zellsuspension von 1:3 wurde am darauffolgenden Tag die Konfluenz der Endothelzellen in den Wells erreicht.

Die Wells mussten vor dem Befüllen mit jeweils 1 mL DPBS gut gespült werden, wodurch die Benetzungsfähigkeit des Polystyrolbodens verbessert werden konnte und dadurch Adhäsions- und Wachstumsvorgänge gefördert wurden. Die Zellsuspension wurde mit einer 1000 μ L-Kolbenhubpipette in die Wells pipettiert, wobei die Flüssigkeit langsam, möglichst mittig appliziert werden musste.

Sofort nach der Aussaat wurde die Platte vorsichtig in den Inkubator gebracht und nach ca. 1 h langsam kreisförmig geschwenkt, um noch nicht abgesunkene Zellen gleichmäßig im Well zu verteilen.

II.2.3 SPHÄROIDHERSTELLUNG

II.2.3.1 Sphäroidbildung (Allgemeines und Methodik)

Die Herstellung von Sphäroiden ist eine Standardmethode in dreidimensionalen Kokultivierungssystemen, die benutzt werden kann, um das Metastasierungsverhalten von Kleintumoren möglichst naturgetreu nachzuvollziehen und zu untersuchen.

Diese Kleintumore repräsentieren jene Sauerstoff- und Nährstoff-untersorgten Anteile eines soliden Tumors, die auf Grund der ungünstigen Umgebungsbedingungen ihren Primärtumor verlassen und über das Blut-beziehungsweise Lymphsystem abwandern, um an Stellen mit besserer Sauerstoff- und Nährstoffversorgung wieder anzuwachsen.

Es gibt zahlreiche Methoden, mit denen Sphäroide hergestellt werden können, die bestimmte Eigenschaften aufweisen müssen, um im Zellmodell untersucht werden zu können. Dazu zählen eine hohe Stabilität, eine annähernd sphärische Form und eine optimale Größe, da die Zell-Zellhaftung bei zu kleinen Sphäroiden unzureichend sein kann und es bei zu großen Sphäroiden auf Grund der Nährstoffknappheit im Inneren zur Nekrotisierung kommen kann.

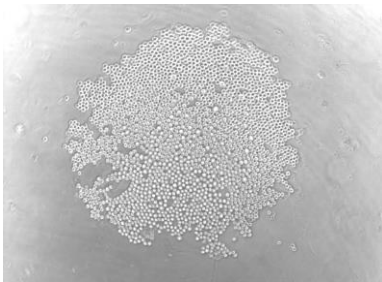
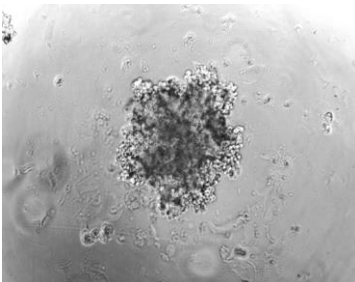
Die verschiedenen Methoden der Sphäroidherstellung:

Bei der Herstellung müssen die Zellen, um eine kugelförmige Struktur annehmen zu können, daran gehindert werden sich am Substrat anzulagern.

- ♦ Spinner-Methode: Die Zellen werden kontinuierlich bewegt und haben keine Möglichkeit mit dem Substrat in Kontakt zu treten.
- ♦ Hanging-Drop-Methode: Bei dieser Variante wird eine vordefinierte Zellzahl im Kulturmedium als Tropfen an einer dafür konstruierten Apparatur befestigt. Da kein Substrat vorhanden ist, an dem die Zellen adhären könnten, wird automatisch eine Sphäroidbildung erreicht.
- ♦ Liquid-Overlay-Methode: Durch antiadhäsiv wirksame Substanzen, wie zum Beispiel Agar oder Cellulose wird ein Anhaften der Zellen am Substrat verhindert (*Nagelkerke et.al., 2013*).
- ♦ Carboxymethylcellulose-Methode: Dem Medium wird Carboxymethylcellulose zugefügt, um eine höhere Viskosität zu erreichen, was die Zellen an der Sedimentation hindert (*Metzger et.al., 2011*).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Carboxymethylcellulose-Methode als einfach durchzuführende und kostengünstige Technik eingesetzt.

Eine 1,6 %ige Carboxymethylcelluloselösung in DMEM wurde mit DMEM + 5 % FBS oder MEM + 10 % FBS zu einer 0,3 %igen Lösung verdünnt und dann zur Tumorzellsuspension zugefügt. Für eine 96-Wellplatte mussten 15 mL Medium bereitgestellt werden. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 1000 rpm mussten die Sphäroide für 3-5 Tage inkubiert werden, um im Assay eingesetzt werden zu können.

Nach der Zentrifugation	Nach 3-5 Tagen
SW620-Zellen	
	
Abbildung 14: SW620-Zellkonglomerat	Abbildung 15: SW620-Sphäroid

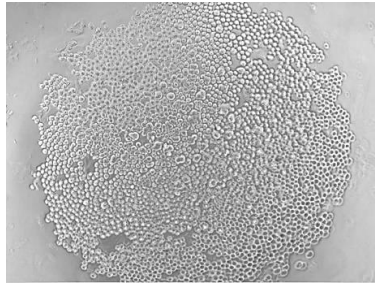
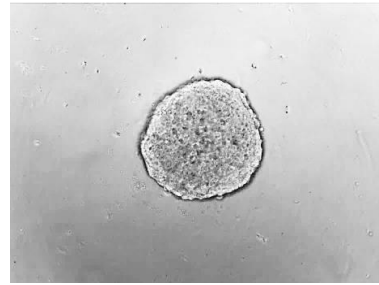
MCF7-Zellen

Abbildung 16: MCF7-Zellkonglomerat

Abbildung 17: MCF7-Sphäroid

II.2.3.2 Zellzählung und Mengenberechnung

Rechenschema:

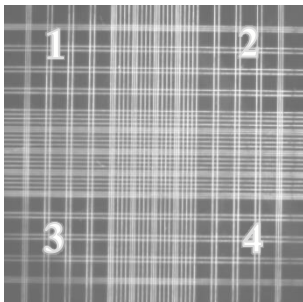


Abbildung 18: Zählkammer

1. Zellzählung: Die durchschnittliche Zellzahl der 4 Zählbereiche 1, 2, 3, 4 (in Abb.18) wurde berechnet.
2. Daraus wurde die Anzahl der Zellen in der vorliegenden 1:10 verdünnten Suspension ermittelt.
3. Da 2000 Zellen bei SW620 und 3000 Zellen bei MCF7 pro Sphäroid nötig waren, konnte je nach berechneter Zellzahl die benötigte Menge an Zellsuspension in die 0,3 %ige Carboxymethylcelluloselösung übergeführt werden.

II.2.4 CHEMOREPELLENT INDUCED DEFECTS ASSAY

Das Chemorepellent induced defects assay (CCID-Assay) ist ein dreidimensionales Kokultivierungssystem, welches frühe Metastasierungsschritte in in-vitro Tests nachvollzieht. 3D-Sphäroide aus Brust- oder Darmkrebszellen wurden auf einem 2D-Zellrasen aus Blut- oder Lymphendothelzellen platziert.

Diese Krebszellsphäroide sind auf Grund ihrer Produktion von zellmotilitätsfördernden Proteinen, Transkriptionsfaktoren und Enzymen und deren Interaktion mit dem Zellrasen in der Lage die Ausbildung von Löchern (Gaps) im Zellrasen zu induzieren (*Teichmann et.al., 2014*). Zu den aktiven Proteinen zählen NF- κ B, MLC-2, MYPT1, FAC, ICAM-1 und ALOX-12, das 12(S)-HETE synthetisiert.

Besonders 12(S)-HETE scheint eine große Rolle während des Metastasierungsgeschehens zu spielen. Werden Krebszellsphäroide auf einem Monolayer von Endothelzellen platziert, ist innerhalb weniger Stunden mit der Bildung von Gaps zu rechnen, die durch Zellmigration hervorgerufen werden (*Kretschy et.al., 2013*).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Flavonoiden auf die Gap-Bildung näher untersucht, um Informationen über Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erhalten.

Die Wirkung von Flavonoiden wurde anhand von Größenänderungen der Gaps mithilfe der IC₅₀-Werte quantifiziert.

Folgender Versuchsaufbau wurde eingesetzt:

1. In 12 Wells einer 24-Wellplatte wurden Zellrasen aus BEC oder LEC gesät.
2. Bei vollkommener Konfluenz erfolgte eine Markierung der Endothelzellen mit CellTrackerTM Green, um zellfreie Zonen unter den Sphäroiden detektieren zu können.
3. Die 3-5 Tage vorher produzierten Sphäroide aus SW620 oder MCF7 Zellen wurden in DPBS gewaschen, um Carboxymethylcelluloserückstände zu entfernen. In jedes Well wurden 8 Sphäroide platziert.
4. Jedes Flavonoid wurde in Konzentrationen von 10, 25 und 75 μ M in EGM-Medium getestet. Als Kontrolle diente 10 μ M DMSO in EGM-Medium. Wenn das Sphäroidattachement durch die höchste Flavonoidkonzentration

gestört wurde oder die Substanz auskristallisierte, musste die Höchstkonzentration auf 50 μM gesenkt werden.

5. Die gewaschenen Sphäroide wurden in die Flavonoid-Lösungen transferiert und für 30 min. bei 37 °C inkubiert.
6. Nach dem Entfernen des CellTrackers aus den Wells wurden die Flavonoid-Lösungen mit den Sphäroiden in die Wells pipettiert.
7. Die weitere Inkubationszeit betrug bei den LEC 4 h und bei den BEC 3 h.
8. Danach erfolgte die Dokumentation der CCIDs mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops, wobei die Größe der Sphäroide und der Gaps vermessen und verglichen wurde (*Kopf et.al., 2013*).

II.2.5 AUSWERTUNG

II.2.5.1 Vermessung der Gaps und Berechnung

Für die Auswertung wurde die „ZEN imaging“ Software sowohl zur Bedienung der Kamerafunktion, als auch zur Größenbestimmung von Sphäroiden und Gaps eingesetzt.

Die mit Hilfe von „ZEN imaging“ vermessenen Werte wurden in Excel eingefügt.

Die Rechenschritte von Excel umfassten:

1. Berechnung des Größenverhältnisses von Gap zu Sphäroid.
2. Die Bestimmung der Mittelwerte.
3. Der Mittelwert des Gap/Sphäroid-Verhältnisses wurde als 100 % verwendet.
4. Die Prozentwerte bildeten die Basis für die statistische Auswertung und deren Mittelwert markierte die Höhe der Balken in den Ergebnisdiagrammen.

II.2.5.2 Statistische Auswertung

Im Zuge dieser Arbeit wurde GraphPadPrism für die statistische Analyse der ermittelten Daten verwendet.

Da die erhaltenen Werte keiner Normalverteilung, sondern einer schiefen Verteilung folgten, konnte die Effektstärke eines Flavonoids nur näherungsweise durch nonparametrische Tests bestimmt werden.

II.2.5.2.1 Nonparametrischer t-Test (Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben)

Hierbei wird ein Vergleich zweier unabhängiger Stichproben auf Rangplatzunterschiede in der abhängigen Variablen durchgeführt (Bühner et.al., 2009). Daher mussten Rangplätze vergeben werden, um Vergleiche anstellen zu können.

Die Rangzuordnung erfolgte getrennt für Kontrolle und Testsubstanzen nach der Werthöhe im Vergleich zu den anderen Daten der jeweiligen Gruppe. Den niedrigsten Rang hatte das kleinste „Gap/Sphäroid Verhältnis“ in Bezug auf den Mittelwert der Kontrolle.

Nun konnte die Anzahl an Rangplatzüberschreitungen und Rangplatzunterschreitungen beim Vergleich der Kontrolle mit der Versuchsgruppe ermittelt werden. Dafür wurde ein Rang der Kontrolle mit allen Rängen der Versuchsgruppe verglichen und bestimmt wie viele Ränge über beziehungsweise unter dem gerade betrachteten Rang lagen. Je größer der Unterschied zwischen der Anzahl an Rangplatzüberschreitungen beziehungsweise Rangplatzunterschreitungen beim Vergleich der Kontrolle mit den verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz war, desto eher konnte die Alternativhypothese bestätigt werden:

0: Die Anzahl der Rangplatzüberschreitungen und Rangplatzunterschreitungen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen Kontrolle und Flavonoid. Alle Werte entstammen derselben Grundgesamtheit.

1: Die Anzahl an Rangplatzüberschreitungen und Rangplatzunterschreitungen ist signifikant verschieden, weshalb die Werte der Kontrolle und Testsubstanz nicht derselben Grundgesamtheit entstammen (Bühner et.al., 2009).

II.2.5.2.2 Nonparametrischer t-Test ANOVA (Kruskal-Wallis-Test)

Der Kruskal-Wallis Test ist das nichtparametrische Äquivalent zur einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) (Toutenburg et.al, 2008).

Es handelt sich deshalb um ein „nichtparametrisches Äquivalent“, weil die Analysenwerte keiner Gauß'schen Normalverteilung folgen. Somit musste eine Rangvarianzanalyse durchgeführt werden, wobei mehrere Verteilungen (Werte der Kontrolle, 10, 25 und 50/75 µM) bezüglich ihrer Lage zueinander überprüft wurden (Toutenburg et.al, 2008).

0: Alle ermittelten Werte der Gap/Sphäroid-Verhältnisse, die in Bezug auf den Mittelwert der Kontrolle berechnet wurden, entstammten derselben Grundgesamtheit. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen. Das untersuchte Flavonoid zeigte daher keine Auswirkungen auf die Gap-Bildung.

1: Mindestens einer der Werte hatte nicht die gleiche Tendenz wie alle anderen Stichproben und unterschied sich signifikant von der Grundgesamtheit. Ein eindeutiger Effekt des getesteten Flavonoids im Zusammenhang mit dessen Konzentration wurde nachgewiesen.

Ermittelt wurde der Unterschied der zentralen Tendenz von Kontrolle, 10, 25 und 50/75 μM der Flavonoidkonzentration. Dafür mussten alle Werte aller Gruppen gemeinsam einer Rangzuordnung unterworfen werden (kleinster Wert aller Gruppen erhält den niedrigsten Rang und vice versa). Waren alle Rangplätze über die verschiedenen Gruppen gleich verteilt, wurde die Nullhypothese bestätigt. Befanden sich in einer Gruppe besonders viele hohe oder niedrige Ränge, unterschied sich diese Gruppe signifikant von den anderen Gruppen. Damit war die Rangplatzverteilung nicht zufällig - das Flavonoid zeigte Wirkung (Bühner et.al., 2009).

II.2.5.3 Berechnung der IC50

Um die Wirkungseigenschaften der Flavonoide im pharmakokinetischen Sinne erforschen zu können, wurde eine Dosis-Wirkungskurve generiert, die mittels dem Auswertungsprogramm „GraphPadPrism“ zur Berechnung von IC_{50} -Werten herangezogen wurde.

Diese Werte ermöglichten den direkten Vergleich von Testergebnissen und erleichterten somit deren Interpretation.

GraphPadPrism: Extrapolation logarithmischer Konzentrationsangaben

Für die Berechnung von IC₅₀ Werten musste eine spezielle Tabellenvariante in GraphPadPrism ausgewählt werden:

Schritt 1:

- ♦ new Table & Graph
- ♦ „XY“
- ♦ nonlinear regression: one phase exponential decay

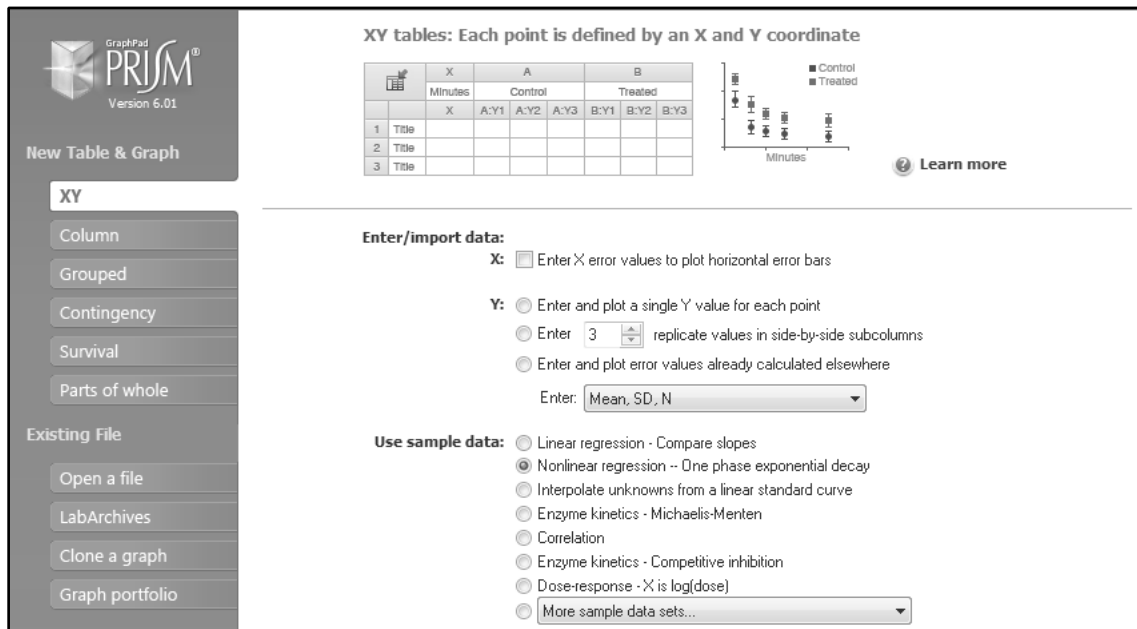


Abbildung 19: Tabellenauswahl GraphPadPrism

In der so erstellten Tabelle konnten die untersuchten Flavonoidkonzentrationen als x-Werte und die ermittelten Effekte als y-Werte eingetragen werden.

Schritt 2:

- ♦ x-values: Konzentrationen (Flavonoide)
- ♦ y-values: Mittelwerte der Gap/Sphäroid Verhältnisse (% vom MW)

Da während der Tests Flavonoidkonzentrationen von 10, 25 und 75 bzw. 50 μM gewählt wurden, musste in einem weiteren Schritt die Extrapolation der x-Achsenwerte auf eine logarithmische Skalierung passieren:

Schritt 3

- ♦ Analyze
- ♦ Transform

Schritt 4:

- ♦ Standard functions
- ♦ Transform X-Values using $X \rightarrow \log(X)$

Ergebnis

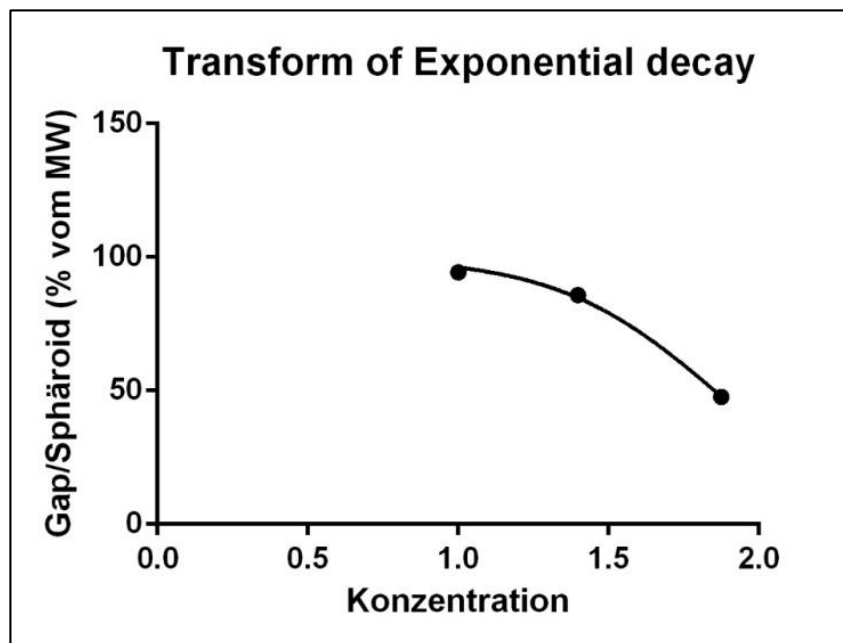


Abbildung 20: Transformierte Daten: Grafik

II.2.5.3.1.1 Dose-Response Kurven

Der vorher ermittelte Graph mit einer logarithmischen Skalierung der Konzentrationen konnte dann zur Extrapolation der IC_{50} -Werte herangezogen werden.

Schritt 5: (Befehle)

- ♦ analyze
- ♦ XY-analysis
- ♦ nonlinear regression (curve fit)

Schritt 6: (Befehle)

- ♦ dose-response: “inhibition”
- ♦ log(inhibitor) vs. normalized response – variable slope
- ♦ least squares fit
- ♦ interpolate unknowns from standard curve: confidence interval (99 %)

III ERGEBNISSE

III.1 Baicalein

Baicalein gehört zur Gruppe der Flavone und ist dreifach hydroxyliert in den Positionen 5, 6 und 7. Es hemmt die Aktivität von Lipoxigenasen und damit die Bildung von 12(S)-HETE (Teuscher, 2012).

Da 12(S)-HETE eine zentrale Rolle während der Gap-Formation spielt, wurde Baicalein in die Testungen aufgenommen.

III.1.1 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

Beim ersten Experiment von Baicalein mit SW620-Sphäroiden wurde das Medium RPMI + 2,5 % FBS zur Herstellung der Sphäroide verwendet. Dabei wurden Sphäroide von unzureichender Stabilität produziert, deren äußerste Zellschicht sich vom Sphäroidzentrum während der Pipettierschritte abtrennte.

Mit den verbleibenden Sphäroidkernen konnte keine CCID-Formation erreicht werden, da die Zellen nekrotisiert waren. Die verwendete FBS Konzentration war offensichtlich zu niedrig gewählt worden, weshalb sie auf 10 % gesteigert wurde. Damit konnten Sphäroide ausreichender Stabilität hergestellt werden, weshalb diese Konzentration in allen weiteren Versuchen mit SW620-Sphäroiden aufrechterhalten wurde.

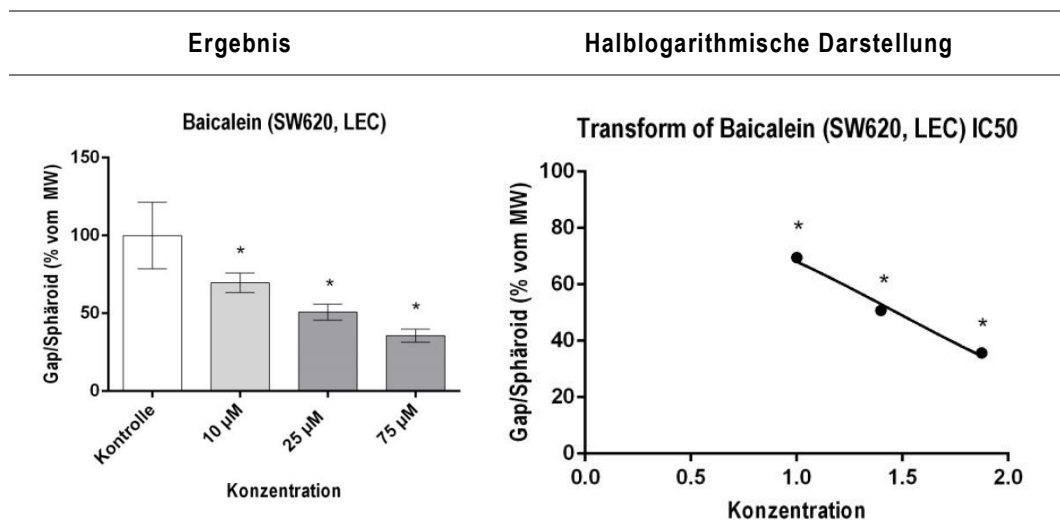


Abbildung 21: Hemmung der Gap-Bildung durch Baicalein (SW620, LEC)

Abbildung 22: Berechnung der IC₅₀-von Baicalein (SW620, LEC)

Tabelle 2: Testung Baicalein (SW620, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	26,86 μ M
10 μ M	14	69,55	
25 μ M	14	50,76	
75 μ M	14	35,71	

In diesem Versuch konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Gap-Entstehung durch Baicalein festgestellt werden. Mit allen Flavonoidkonzentrationen wurde eine statistisch signifikante Hemmung der CCID-Bildung erreicht. Die IC₅₀ von 26,86 μ M mit SW620-Sphäroiden auf LEC war der niedrigste Wert sämtlicher Testungen mit Baicalein.

III.1.2 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF BLUTENDOTHELZELLEN

Bei den Versuchen von SW620-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen wurde eine Inkubationsdauer von 4 Stunden eingehalten, um eine ausreichende Gap-Bildung erreichen zu können. Bei den Blutendothelzellen wurde diese Inkubationsdauer auf 3 Stunden gesenkt, da ansonsten die Gap-Größe die Sphäroidfläche überschritten hätte (siehe Kap. II.2.4.).

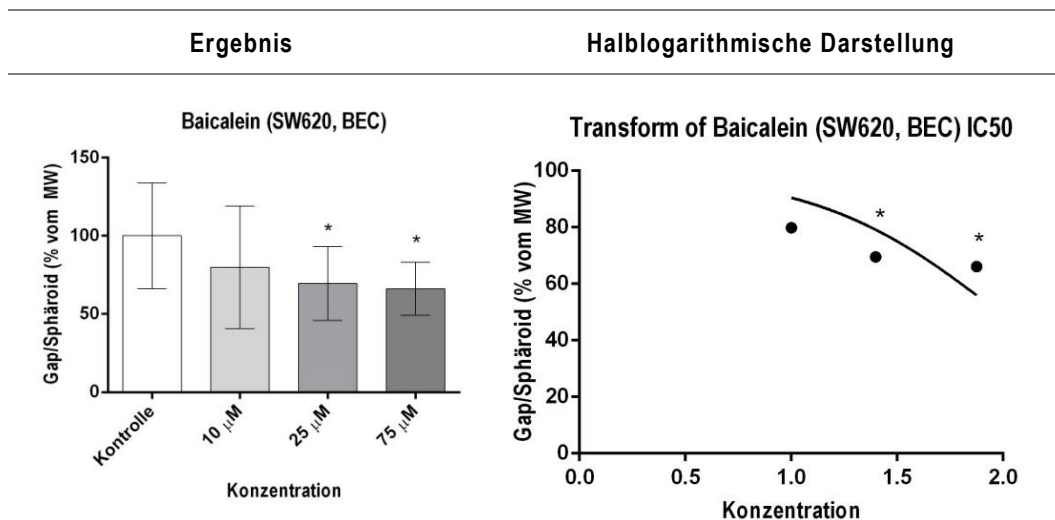


Abbildung 23: Hemmung der Gap-Bildung durch Baicalein (SW620, BEC)

Abbildung 24: Berechnung der IC₅₀-von Baicalein (SW620, BEC)

Tabelle 3: Testung Baicalein (SW620, BEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	95,24 µM
10 µM	12	79,88	
25 µM	12	69,52	
75 µM	14	66,12	

Im Vergleich zur Hemmung der Gap-Bildung durch Baicalein bei der Testung von SW620-Sphäroiden auf LEC (IC₅₀ = 28,86 µM) war die Wirkung auf SW620-Sphäroide auf BEC mit einer IC₅₀ von 95,24 µM wesentlich geringer. Auf Grund der großen Standardabweichung bei 10 µM konnte hier kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden.

Grund dafür waren geringfügige Unregelmäßigkeiten der Sphäroide während des Assays, wobei Fragmentierungen an der Sphäroidoberfläche zu erkennen waren.

III.1.3 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE MCF7-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

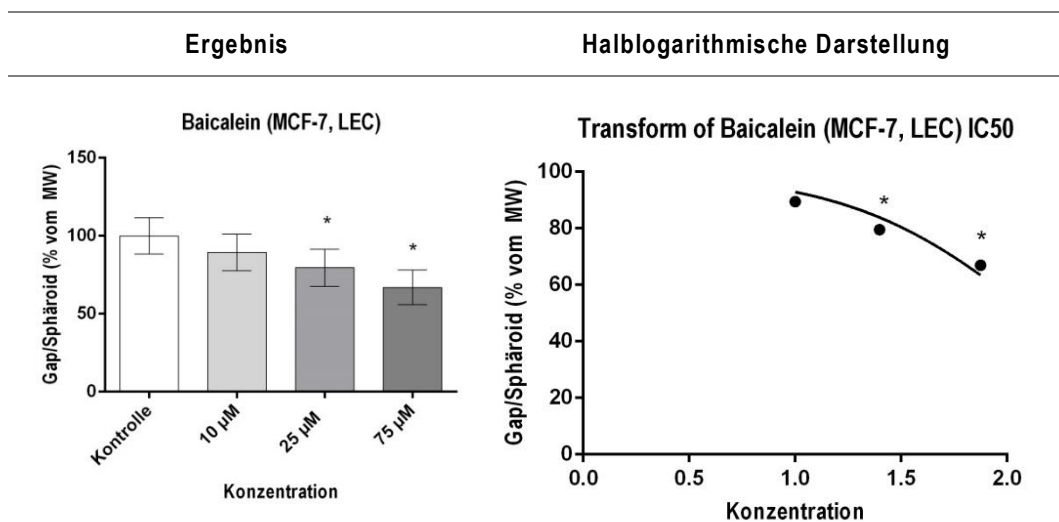


Abbildung 25: Hemmung der Gap-Bildung durch Baicalein (MCF7, LEC)

Abbildung 26: Berechnung der IC₅₀-von Baicalein (MCF7, LEC)

Tabelle 4: Testung Baicalein (MCF7, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	130,20 µM
10 µM	13	89,48	
25 µM	14	79,52	
75 µM	12	66,96	

Die IC₅₀ von 130,20 µM war in dieser Versuchsanordnung noch höher als bei SW620-Sphäroiden auf BEC mit 95,24 µM. Bei 10 µM wurde kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt, obwohl ein eindeutiger Trend zu erkennen war.

Somit wurde festgestellt, dass Baicalein in der Kombination aus SW620-Sphäroiden und Lymphendothelzellen die stärksten Effekte auf die Gap-Bildung aufwies. Schon bei einer niedrigen Flavonoidkonzentration von 10 µM war eine starke Inhibierung der Gap-Formation zu beobachten. Bei den Versuchen mit einem Monolayer aus Blutendothelzellen verringerte sich dieser Effekt und es war keine statistisch signifikante Hemmung der Gap-Formation in der niedrigsten Konzentration sichtbar. Auch bei den MCF7-Sphäroiden war die Wirkung nicht so stark und im Vergleich aller Testsysteme am geringsten ausgeprägt.

III.2 Galangin

Strukturell unterscheidet sich das Flavonol Galangin von Baicalein nur durch die Position einer Hydroxylgruppe. Während Baicalein eine Hydroxylgruppe in Position 6 aufweist, ist diese bei Galangin in Position 3 verknüpft. Wie bei Baicalein, Chrysin und Pinocembrin fehlt Galangin die doppelte Hydroxylierung an Ring B.

III.2.1 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

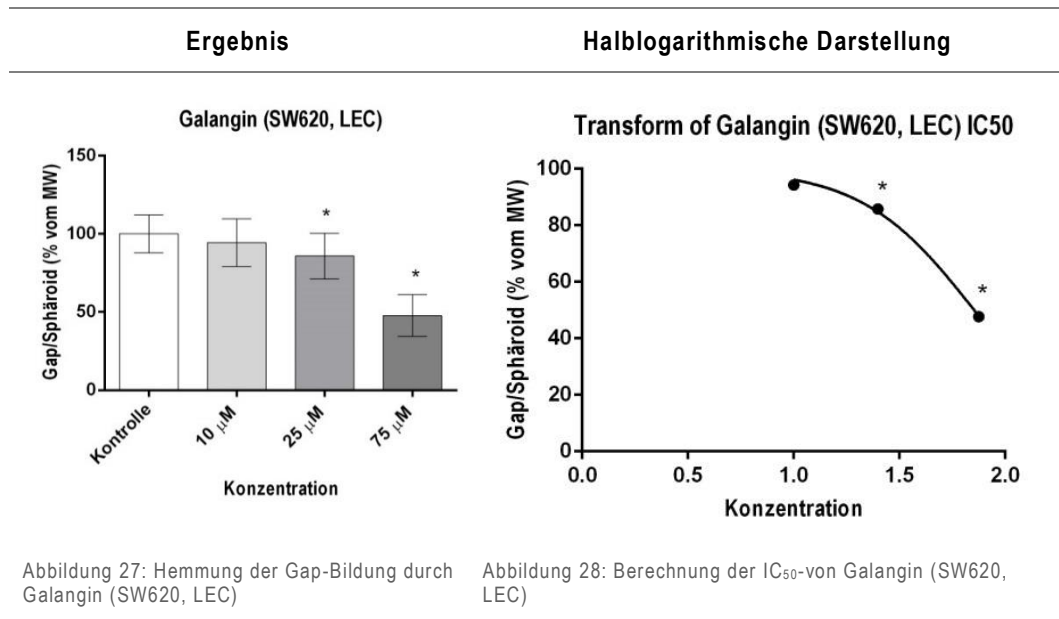


Tabelle 5: Testung Galangin (SW620, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	16	100,00	71,38 µM
10 µM	12	94,31	
25 µM	13	85,76	
75 µM	14	47,75	

Für Galangin wurde erst ab 25 µM ein statistisch signifikanter Effekt festgestellt. Dementsprechend war die IC₅₀ mit 71,38 µM eher hoch. Die Wirkung war im Vergleich zu den anderen getesteten Zellkombinationen als mittelmäßig einzustufen.

Die Effekte auf die Gap-Bildung bei 25 µM waren nur unwesentlich stärker als bei der Kontrolle und 10 µM. Erst bei 75 µM konnten stärkere Auswirkungen auf die CCID-Formation ermittelt werden.

III.2.2 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF BLUTENDOTHELZELLEN

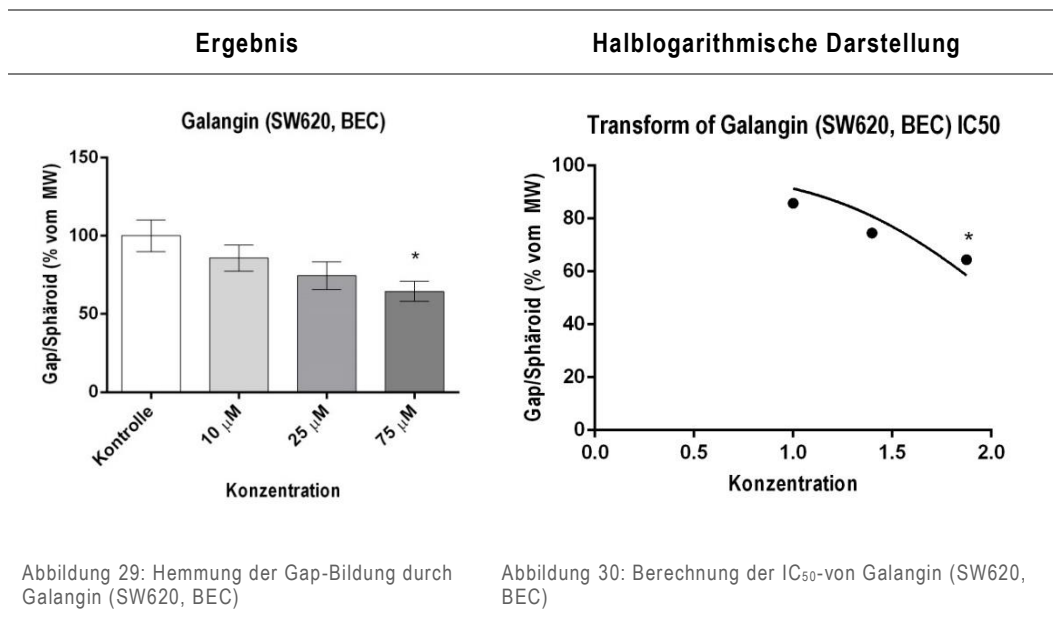


Tabelle 6: Testung Galangin (SW620, BEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	106,00 µM
10 µM	14	85,78	
25 µM	13	74,55	
75 µM	14	64,42	

Bei Galangin ergab sich ein hoher IC₅₀-Wert von über 100,00 µM, ähnlich zu Eriodictyol (179,70 µM) in dieser Versuchsanordnung mit SW620-Sphäroiden auf BEC. Erst in der höchsten Konzentration von Galangin wurden Effekte auf die Gap-Formation beobachtet.

Sowohl in der Kontrolle, als auch bei 10 µM und 25 µM waren die Unterschiede der CCID-Größen zu gering, um in den niedrigen Konzentrationen Signifikanz zu zeigen. Beim Kruskal-Wallis Test wurde die statistische Signifikanz der Gap-Hemmung mit 75 µM Galangin festgestellt.

III.2.3 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE MCF7-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

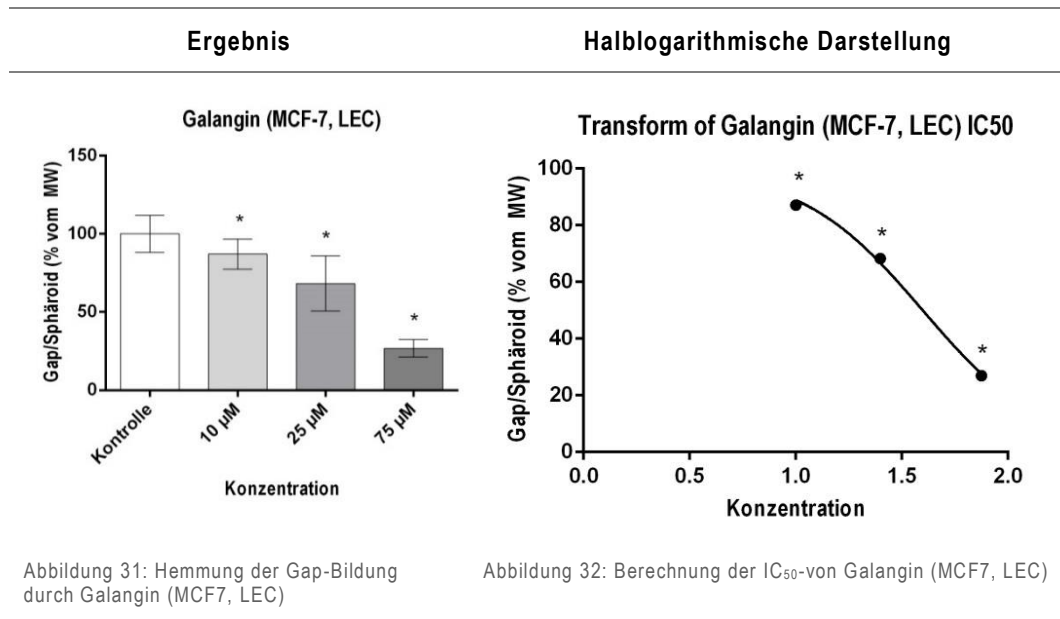


Tabelle 7: Testung Galangin (MCF7, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	39,61 µM
10 µM	15	87,05	
25 µM	15	68,18	
75 µM	14	26,86	

Galangin zeigte in dieser Testserie eine deutlich stärkere Wirkung als in den Versuchen mit SW620-Sphäroiden. Die IC₅₀ betrug 39,61 µM. Schon mit 10 µM wurde eine statistisch signifikante Hemmung der Gap-Bildung festgestellt, was in den anderen Testsystemen nicht beobachtet wurde. Galangin dürfte eine zellspezifische Wirkung auf MCF7-Sphäroide haben, da bei diesen Zellen die Gap-Bildung am stärksten inhibiert wurde. Bei den SW620-Sphäroiden konnte nur ein schwacher Einfluss auf die Gap-Bildung festgestellt werden, wobei in der Kombination mit Blutendothelzellen der geringste Effekt detektiert wurde.

III.3 Chrysin

Chrysin ist wie Baicalein ein Flavon. Im Gegensatz zu Baicalein, weist Chrysin nur eine doppelte Hydroxylierung an Ring A in den Positionen 5 und 7 auf.

III.3.1 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

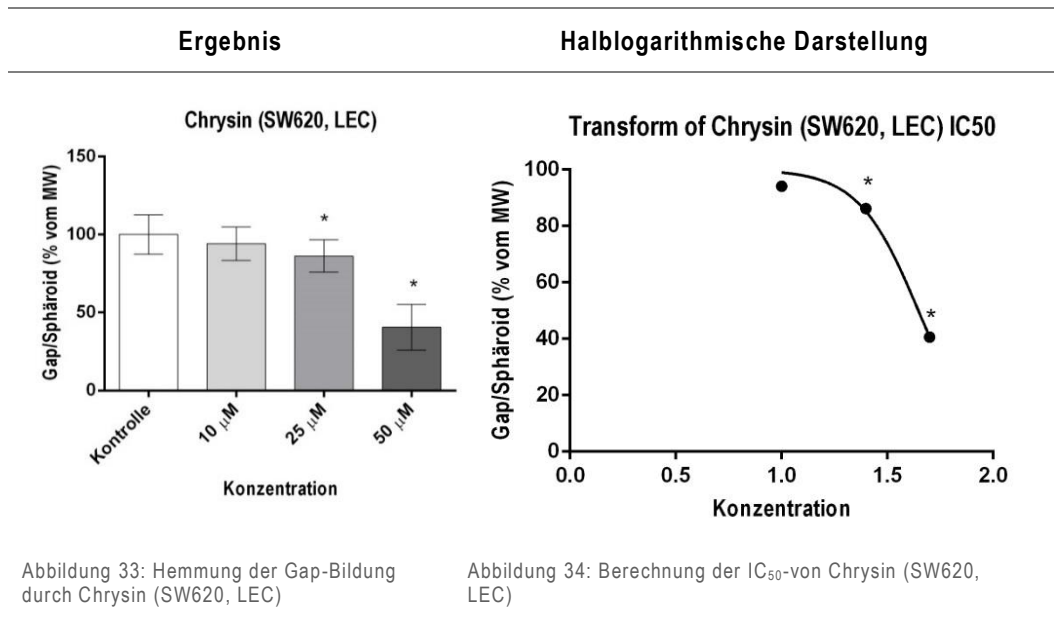


Tabelle 8: Testung Chrysin (SW620, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	44,33 µM
10 µM	17	94,12	
25 µM	17	86,17	
50 µM	15	40,60	

Chrysin kristallisierte in der Konzentration von 75 µM im Medium (siehe Abb. 35-36) aus. Daher wurde die Höchstkonzentration in den Assays auf 50 µM gesenkt, um Löslichkeitsproblemen vorzubeugen.

Kristallbildung bei 75 μM

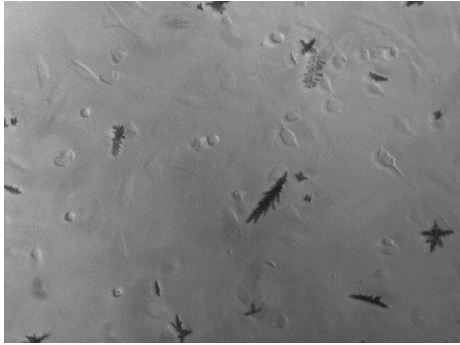


Abbildung 35: Kristallbildung Chrysin Bild1

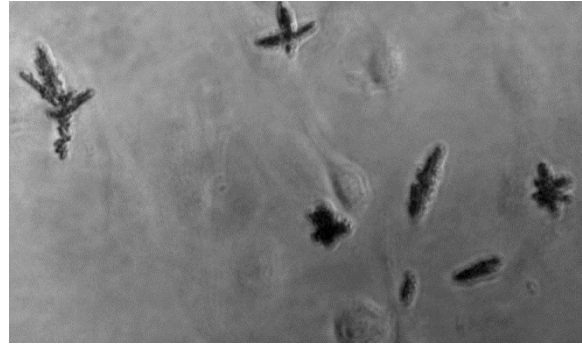


Abbildung 36: Kristallbildung Chrysin Bild2

In dem Versuch mit SW620-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen konnte ab 25 μM eine statistisch signifikante Hemmung der Gap-Bildung detektiert werden. Bei 50 μM war ein starker Effekt auf das 3D-Zellkultursystem zu sehen, während bei 10 μM kein Unterschied zu den Gap/Sphäroid-Verhältnissen der Kontrolle ersichtlich war. Die IC_{50} lag bei 44,33 μM .

III.3.2 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF BLUTENDOTHELZELLEN

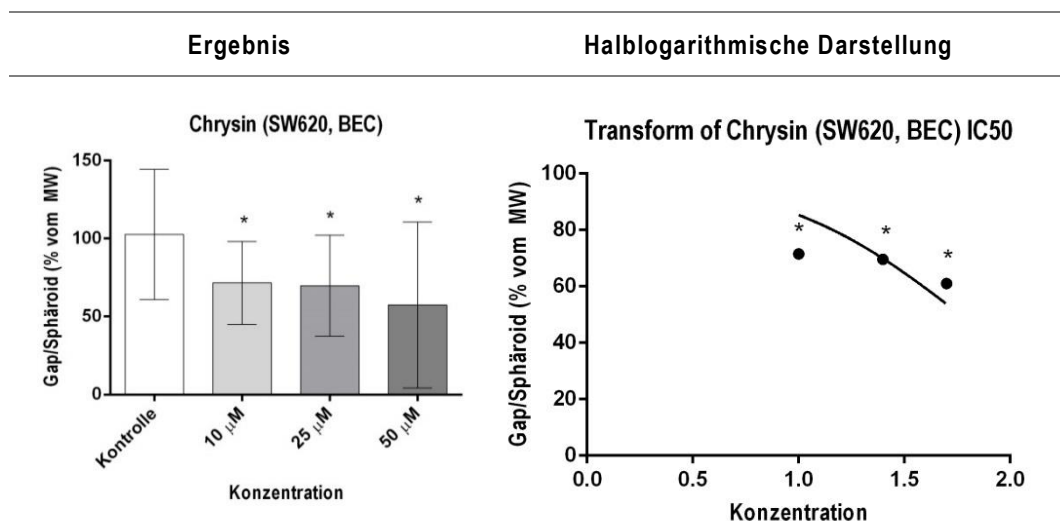


Abbildung 37: Hemmung der Gap-Bildung durch Chrysin (SW620, BEC)

Abbildung 38: Berechnung der IC_{50} -von Chrysin (SW620, BEC)

Tabelle 9: Testung Chrysin (SW620, BEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	58,24 µM
10 µM	14	71,52	
25 µM	15	69,66	
50 µM	13	61,02	

Bei der Testung von Chrysin in diesem Modell kam es zu großen Standardabweichungen und einer Plateaubildung ab 10 µM. Wie schon im Versuch mit SW620-Sphäroiden auf LEC wurde mit einer Höchstkonzentration von 50 µM gearbeitet, um die Kristallbildung zu vermeiden.

Es konnte mit eindeutiger Signifikanz die Wirkung festgestellt und eine IC₅₀ von 58,24 µM ermittelt werden. Die große Standardabweichung bei 50 µM ließ sich auf Probleme beim Attachment der Sphäroide zurückführen.

III.3.3 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE MCF7-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

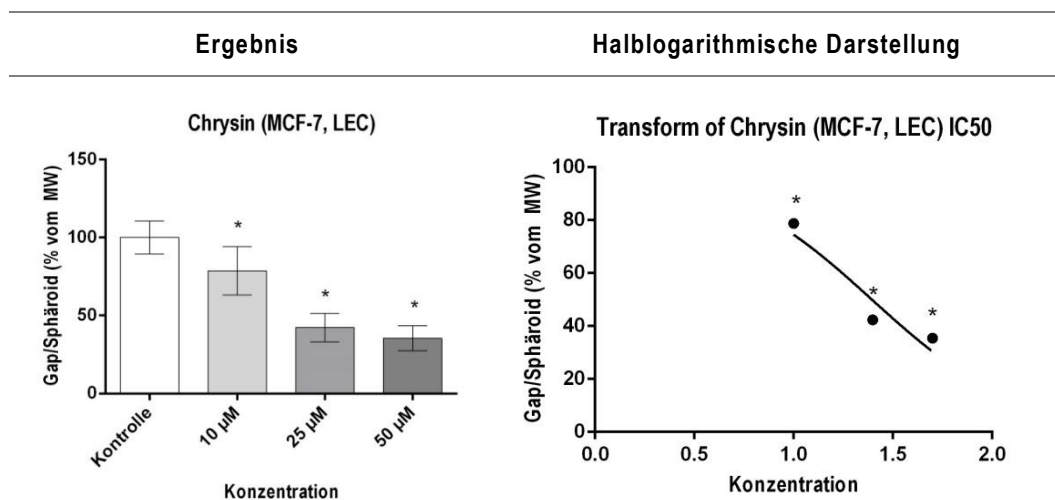


Abbildung 39: Hemmung der Gap-Bildung durch Chrysin (MCF7, LEC)

Abbildung 40: Berechnung der IC₅₀-von Chrysin (MCF7, LEC)

Tabelle 10: Testung Chrysin (MCF7, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	14	100,00	24,76 μ M
10 μ M	14	78,68	
25 μ M	15	42,26	
50 μ M	16	35,41	

Die Wirkung von Chrysin war in dieser Experimentanordnung mit MCF7-Sphäroiden auf LEC sehr stark. Bei 10 μ M kam es zu leichten Unregelmäßigkeiten im Monolayer und die Sphäroide wiesen teilweise irreguläre Formen auf. Trotzdem konnten in dieser niedrigen Konzentration statistisch signifikante Ergebnisse ermittelt werden. Ab 25 μ M war die Wirkung deutlich zu erkennen und die Gap-Größe merklich verkleinert.

Mit einer IC₅₀ von 24,76 μ M hatte Chrysin in der Kombination aus MCF7-Sphäroiden und LEC die stärkste Wirkung. Bei SW620 auf LEC wurde mit 44,33 μ M ein mittelmäßiger Effekt auf das Zellkultursystem ermittelt. Die schwächste Wirkung konnte in der Kombination aus SW620-Sphäroiden auf BEC festgestellt werden.

III.4 Pinocembrin

Pinocembrin gehört zur Gruppe der Flavanone mit einer doppelten Hydroxylierung in den Positionen 5 und 7. Das Substitutionsmuster entspricht somit jenem von Chrysin. Einziger Unterschied dieser Flavonoide ist die fehlende Doppelbindung zwischen den Positionen 2 und 3.

III.4.1 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

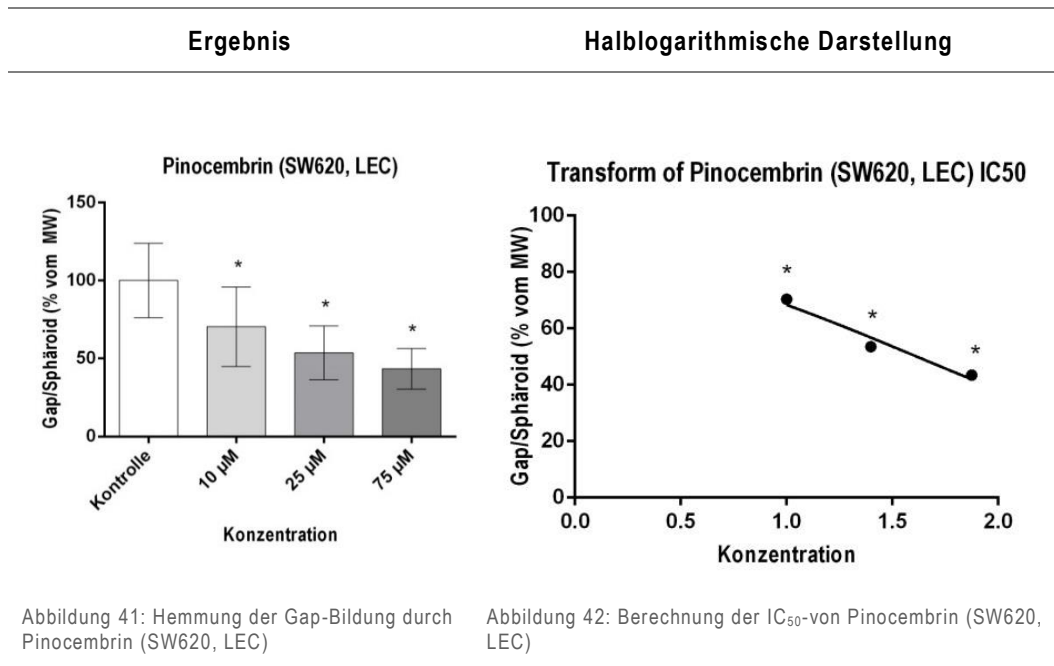


Tabelle 11: Testung Pinocembrin (Dihydrochrysin) (SW620, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	41,35 µM
10 µM	15	70,38	
25 µM	15	53,57	
75 µM	13	43,46	

Bei Pinocembrin konnte für alle Flavonoidkonzentrationen ein statistisch signifikanter Effekt ermittelt werden. Für die Substanz wurde eine IC₅₀ von 41,35 µM berechnet, was mit der Wirkung von Chrysin in der Versuchsanordnung mit SW620 auf Lymphendothelzellen (IC₅₀=44,33 µM) vergleichbar war. Beide Verbindungen schienen auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten analoge Einflüsse auf die Gap-Inhibition zu haben.

III.4.2 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF BLUTENDOTHELZELLEN

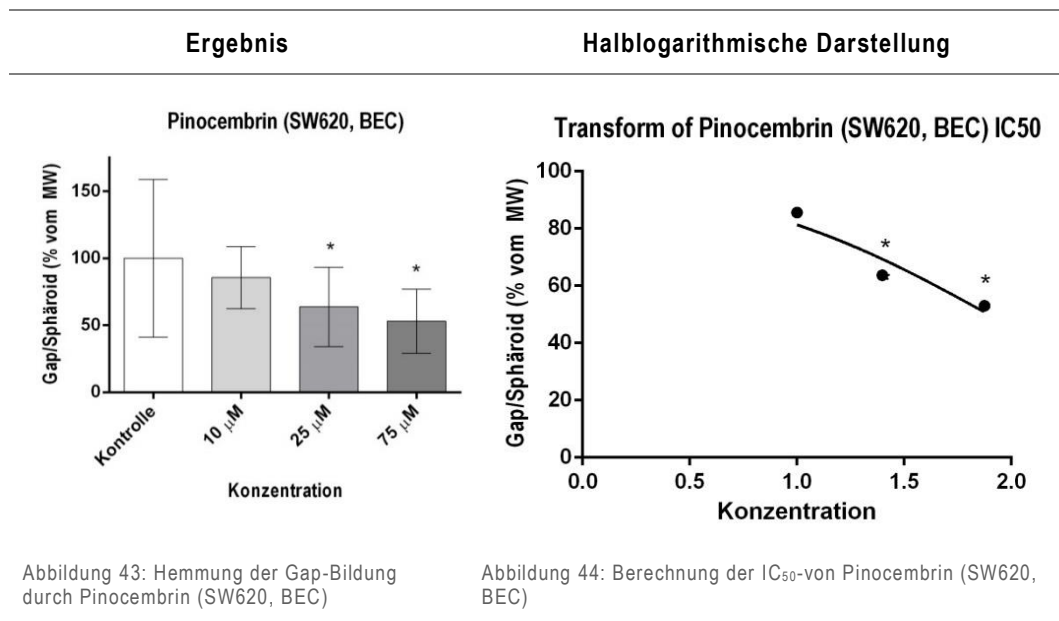


Tabelle 12: Testung Pinocembrin (Dihydrochrysin) (SW620, BEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	14	100,00	78,30 µM
10 µM	14	85,56	
25 µM	14	63,64	
75 µM	13	52,95	

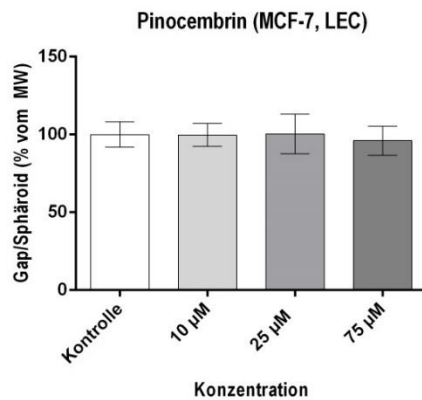
In diesem Testaufbau war mit einer IC₅₀ von 78,30 µM eine deutlich schwächere Wirkung im Vergleich zu der Kombination aus SW620-Sphäroiden auf LEC zu beobachten (IC₅₀ bei SW620, LEC: 41,35µM). Die Standardabweichung in der Kontrolle war sehr groß, was eventuell auf Inhomogenitäten im verwendeten Zellrasen der Kontrollwells zurückzuführen war.

Die gebildeten Gaps differierten je nach Zelldichte unter den Sphäroiden relativ stark. In der Rangvarianzanalyse wurde auch keine statistische Signifikanz bei der Behandlung mit 10 µM festgestellt, da der Unterschied zur Kontrolle zu gering war.

III.4.3 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE MCF7-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

Ergebnis

**Halblogarithmische
Darstellung**



nicht berechnet

Abbildung 45: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Pinocembrin (MCF7, LEC)

Tabelle 13: Testung Pinocembrin (Dihydrochrysin) (MCF7, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	17	100,00	-
10 µM	14	99,71	
25 µM	14	99,71	
75 µM	16	96,10	

Bei Pinocembrin konnte keine Wirkung auf die Gapgröße durch MCF7-Sphäroide auf Lymphendothelzellen festgestellt werden. Pinocembrin schien auf Grund einer zellspezifischen Inaktivität keine Wirkungen auf die Brustkrebszellsphäroide ausüben zu können.

Dieses Flavonoid zeigte die stärkste Wirkung auf die Versuchsanordnung mit SW620-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen. Die Gap-Inhibierung war bei Blutendothelzellen weniger ausgeprägt und bei MCF7-Sphäroiden wurden keine Einflüsse auf die CCID-Formation festgestellt.

III.5 Luteolin

Luteolin aus der Gruppe der Flavone weist eine vierfache Hydroxylierung in den Positionen 5, 7, 3' und 4' auf. Die Hydroxylierungen in diesen Positionen hat Luteolin mit Quercetin und Eriodictyol gemein.

III.5.1 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

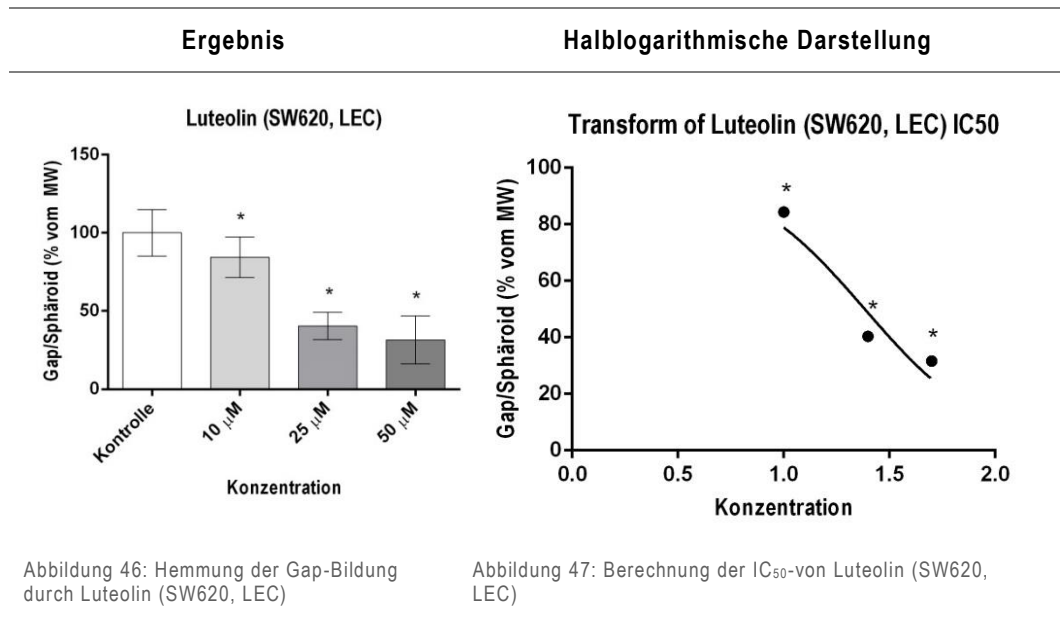


Tabelle 14: Testung Luteolin (SW620, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	14	100,00	24,20 µM
10 µM	14	84,37	
25 µM	13	40,39	
75 µM	13	31,59	

Luteolin zeigte mit einer IC_{50} von $24,20 \mu M$ im Vergleich zu Baicalein ($IC_{50} = 28,86 \mu M$) eine etwas stärkere Wirkung und erreichte damit den niedrigsten IC_{50} -Wert in der Versuchsreihe mit SW620-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen.

Der Einfluss auf die Gap-Größe durch Luteolin wurde in diesem Assay mit $50 \mu M$ als Höchstkonzentration vermessen, da beim Zusatz von $75 \mu M$ kein Sphäroidattachement mehr festzustellen war.

III.5.2 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF BLUTENDOTHELZELLEN

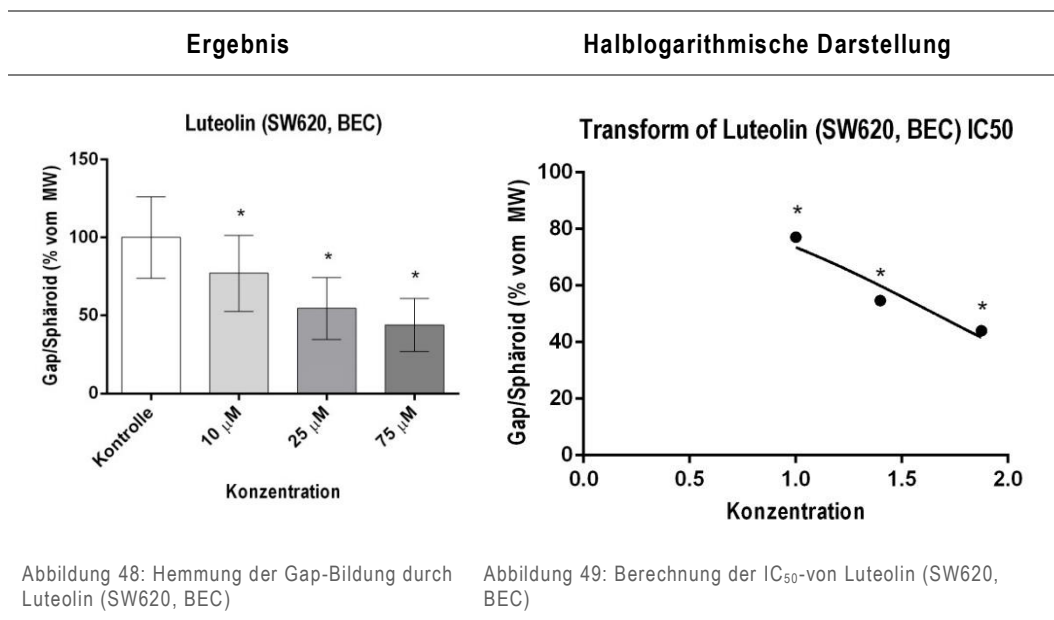


Tabelle 15: Testung Luteolin (SW620, BEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC_{50}
Kontrolle	15	100,00	45,26 μM
10 μM	15	77,01	
25 μM	14	54,62	
75 μM	14	43,93	

Die CCID-Flächen nahmen in diesem Experiment mit steigender Flavonoidkonzentration kontinuierlich ab.

Mit einem IC_{50} -Wert von $45,26 \mu M$ war aber die Wirkintensität verglichen zum Testaufbau aus SW620-Sphäroiden auf LEC niedriger, wo ein IC_{50} -Wert von $24,20 \mu M$ ermittelt worden war.

Luteolin konnte in diesem Fall auch in einer Höchstkonzentration von $75 \mu M$ untersucht werden, da keine Beeinträchtigung des Sphäroidattachments beobachtet wurde.

III.5.3 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE MCF7-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

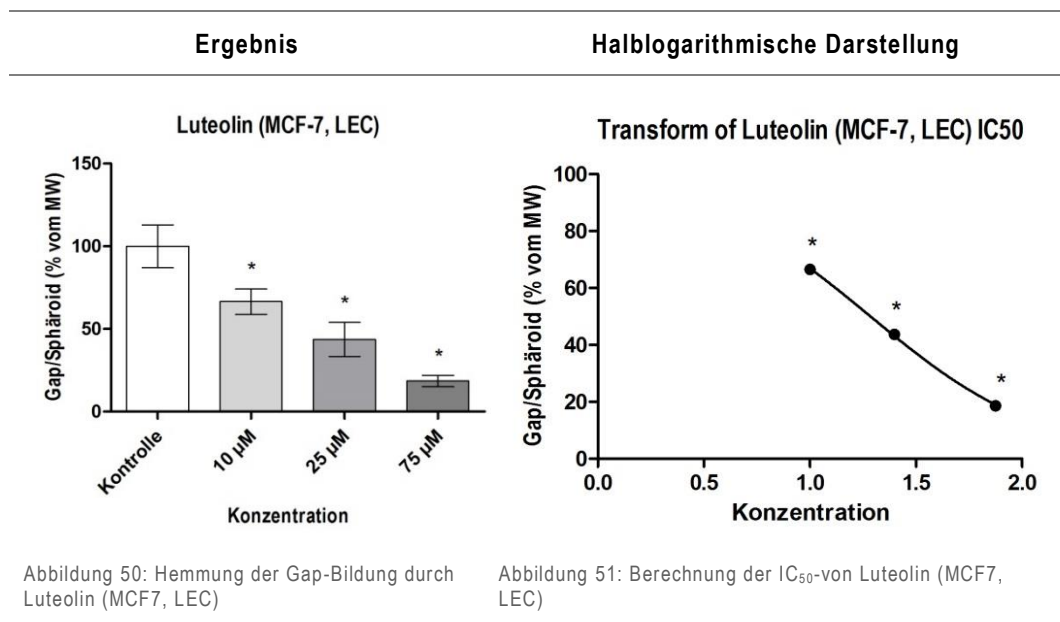


Tabelle 16: Testung Luteolin (MCF7, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC_{50}
Kontrolle	14	100,00	19,31 μM
10 μM	13	66,53	
25 μM	13	43,74	
75 μM	12	18,60	

Hier konnte eine statistisch signifikante Inhibierung der Gap-Bildung in allen getesteten Flavonoidkonzentrationen festgestellt werden. Luteolin zeigte mit einer

IC₅₀ von 19,31 µM die stärkste Wirkung in der Versuchsreihe mit MCF7-Sphäroiden auf LEC.

Bei Luteolin waren außerdem die stärksten Effekte auf das 3D-Zellkultursystem im Vergleich aller getesteten Zellkombinationen zu sehen. Mit einer Konzentration von 24,20 µM konnte Luteolin auch die CCID-Flächen bei SW620-Sphäroiden und LEC auf die Hälfte reduzieren. Am geringsten ausgeprägt waren die Wirkungen von Luteolin bei SW620-Sphäroiden auf Blutendothelzellen. In allen Zellkombinationen konnten statistisch signifikante Werte ab 10 µM festgestellt werden.

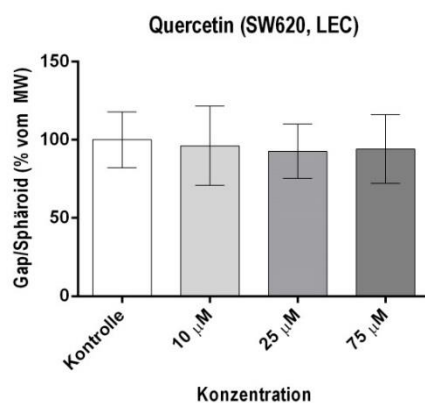
III.6 Quercetin

Quercetin gehört wie Galangin zur Gruppe der Flavonole. Allerdings weist es zusätzlich zu den Positionen 3, 5 und 7 noch weitere Hydroxylgruppen an den Positionen 3' und 4' auf. Durch diese fünffache Hydroxylierung war Quercetin deutlich hydrophiler als alle anderen untersuchten Flavonoide.

III.6.1 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

Ergebnis

Halblogarithmische
Darstellung



nicht berechnet

Abbildung 52: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Quercetin (SW620, LEC)

Tabelle 17: Testung Quercetin (SW620, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	-
10 µM	14	96,16	
25 µM	16	92,73	
75 µM	14	94,10	

Bei Quercetin konnte im Gegensatz zu allen anderen Flavonoiden in der Versuchsvariante mit SW620-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen keine Wirkung ermittelt werden. Da Luteolin trotz starker struktureller Ähnlichkeit die intensivste Wirkung aller Verbindungen gezeigt hatte, wurde die Wirkung von Quercetin in einem zweiten Assay verifiziert (siehe Abb. 53).

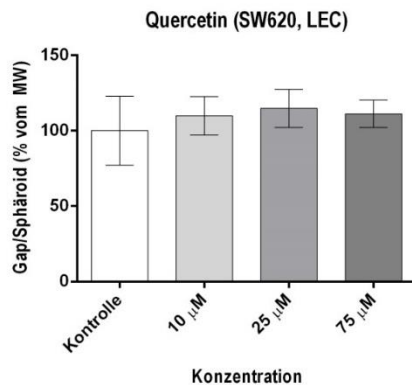


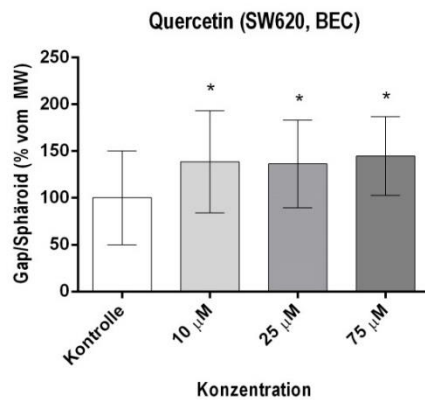
Abbildung 53: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Quercetin Versuch 2 (SW620, LEC)

Wie in Abb.53 sichtbar, wurde hier sogar eine leichte, allerdings nicht statistisch signifikante Steigerung der Gap-Bildung beobachtet.

III.6.2 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF BLUTENDOTHELZELLEN

Ergebnis

Halblogarithmische
Darstellung



nicht berechnet

Abbildung 54: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Quercetin (SW620, BEC)

Tabelle 18: Testung Quercetin (SW620, BEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	14	100,00	-
10 µM	14	138,66	
25 µM	14	136,36	
75 µM	13	144,65	

Schon bei der Testung von Quercetin an SW620-Sphäroiden auf LEC war eine leichte allerdings nicht signifikante Steigerung der Gap-Bildung beobachtet worden (Abb.53). Bei der Behandlung von SW620-Sphäroiden auf BEC konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Gap-Größe nahm schon bei 10 µM zu und war nicht konzentrationsabhängig.

Obwohl von mutagenen Effekten von Quercetin in anderen in-vitro Systemen berichtet worden war, konnten diese in-vivo bisher nicht bestätigt werden (Teuscher et.al, 2012). Es wäre allerdings möglich, dass solche Effekte das verwendete Assay beeinflusst haben.

III.6.3 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE MCF7-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

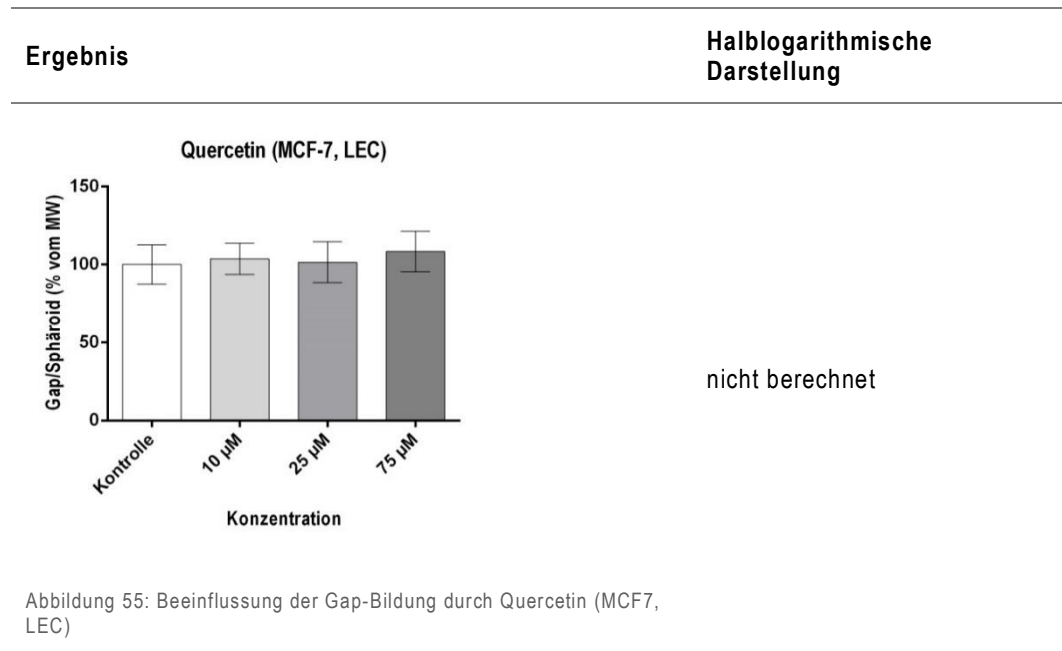


Tabelle 19: Testung Quercetin (MCF7, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	14	100,00	-
10 µM	13	103,57	
25 µM	14	101,49	
75 µM	14	108,34	

Quercetin zeigte in diesem Experiment wiederum keine Wirkung, was den Ergebnissen der anderen Versuchsreihen weitestgehend entsprach.

Bei 75 µM war erneut ein leichter Anstieg der Gap-Bildung zu beobachten, der allerdings nicht statistisch signifikant war.

Somit konnte für Quercetin in keinem der drei Testsysteme ein hemmender Effekt auf die Gap-Bildung festgestellt werden. Bei der Versuchsanordnung aus SW620-Sphäroiden auf BEC wurde eine stimulierende Wirkung auf die Gap-Bildung ermittelt.

III.7 Eriodictyol

Das Substitutionsmuster von Eriodictyol ist mit jenem von Luteolin ident (Hydroxylierungen in den Pos. 5,7,3',4'). Einziger Unterschied ist die fehlende Doppelbindung zwischen den Positionen 2 und 3. Eriodictyol ist wie Pinocembrin der Gruppe der Flavanone zuzuordnen.

III.7.1 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

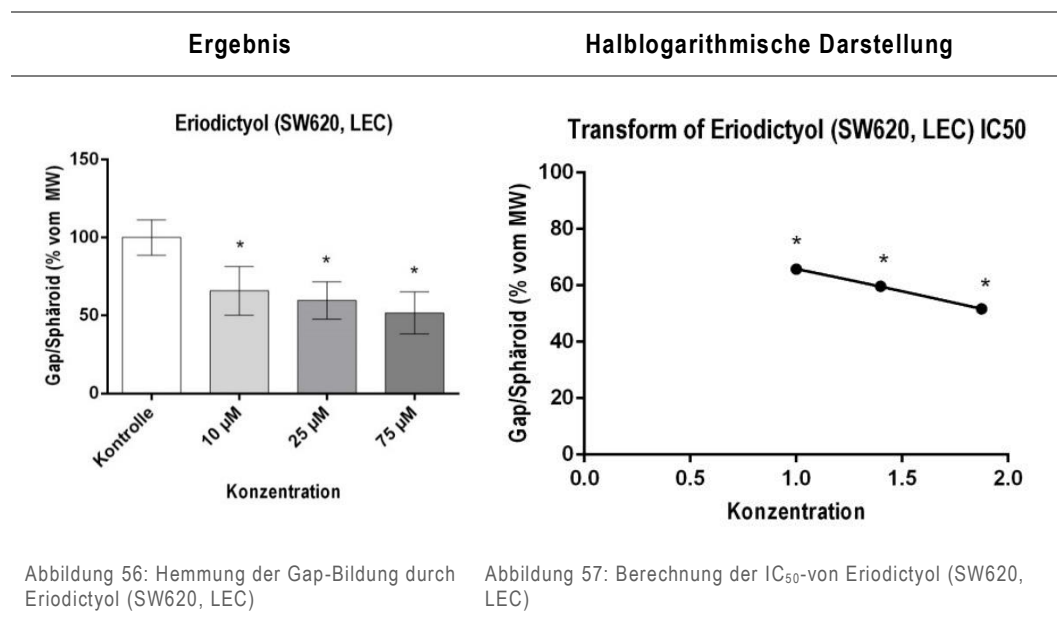


Tabelle 20: Testung Eriodictyol (SW620, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	15	100,00	94,77 µM
10 µM	14	65,79	
25 µM	13	59,69	
75 µM	16	54,67	

Die Wirkung dieses Flavonoids war statistisch signifikant. Mit 94,77 µM zeigte Eriodictyol allerdings einen sehr geringen Effekt auf die CCID-Bildung. Nur Quercetin war in der Versuchsanordnung aus SW620-Sphäroiden auf LEC noch

schwächer wirksam. Obwohl das Substitutionsmuster jenem von Luteolin entspricht war die Wirkung von Eriodictyol wesentlich geringer. Somit ließen die Ergebnisse vermuten, dass die Doppelbindung von Luteolin zwischen Position 2 und 3 für den hemmenden Effekt auf die Gap-Formation von Vorteil ist.

III.7.2 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE SW620-SPHÄROIDE AUF BLUTENDOTHELZELLEN

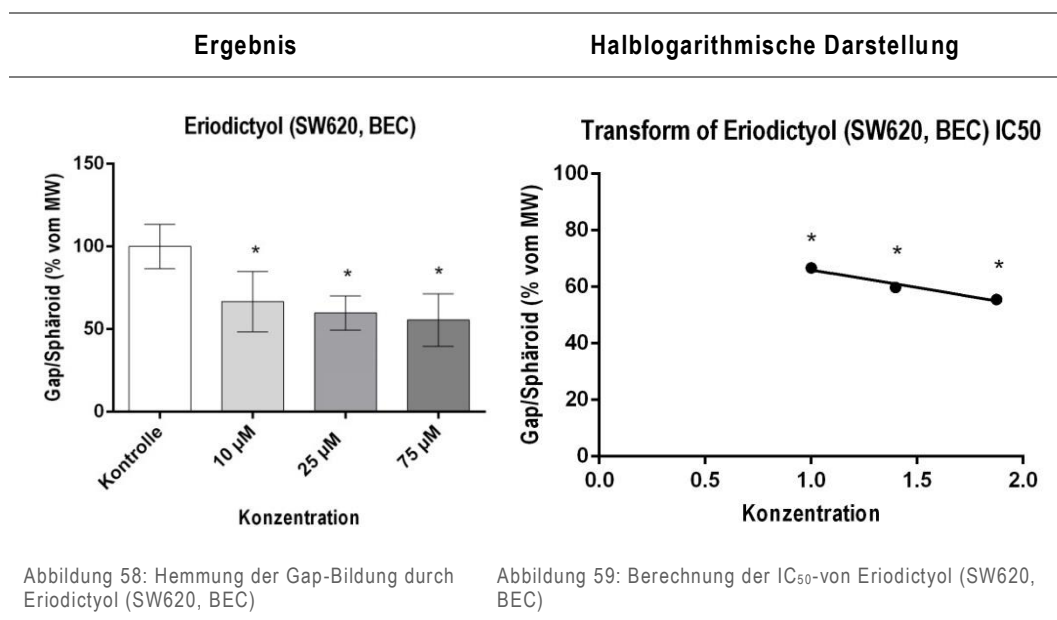


Tabelle 21: Testung Eriodictyol (SW620, BEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	12	100,00	179,70 µM
10 µM	14	66,70	
25 µM	13	59,77	
75 µM	14	55,55	

Bei Eriodictyol kam es in diesem Testsystem zu einer starken Plateaubildung in der Wirkung. Die IC₅₀ konnte mit 179,90 µM extrapoliert werden. Die Hemmwirkung von Eriodictyol dürfte schon zwischen 10 µM und 25 µM ein Maximum erreicht haben, das selbst bei starker Steigerung der Flavonoidkonzentration kaum mehr erhöht werden konnte.

III.7.3 ERGEBNISSE DER VERSUCHSREIHE MCF7-SPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

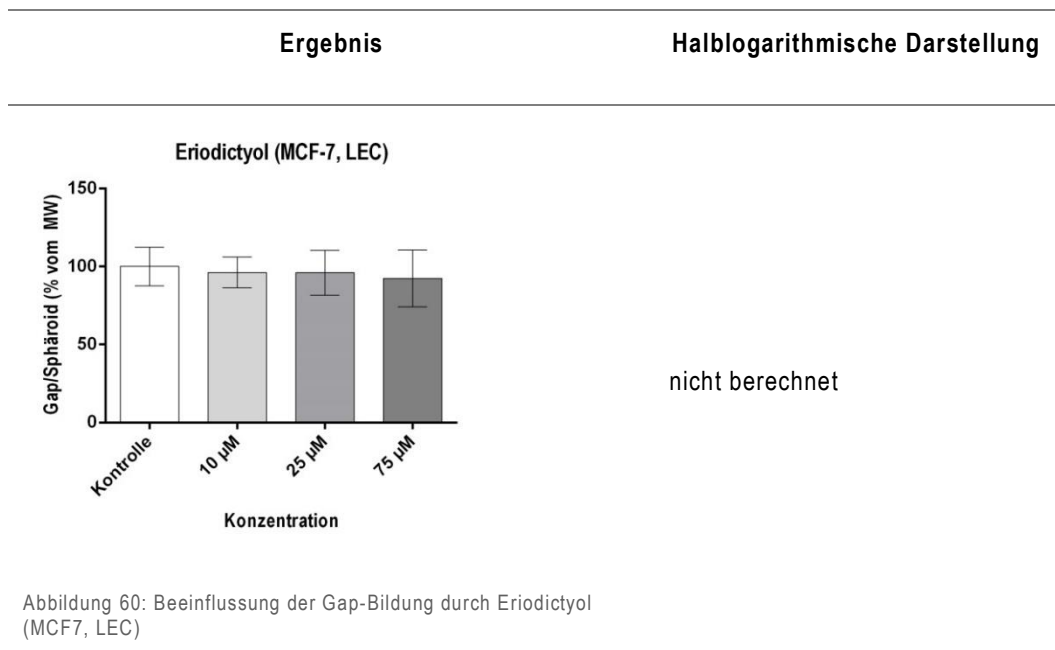


Tabelle 22: Testung Eriodictyol (MCF7, LEC)

Konzentrationen	vermessene Sphäroide (Anzahl)	MW des Gap/Sphäroidverhältnisses (% vom MW)	IC ₅₀
Kontrolle	14	100,00	-
10 µM	14	96,23	
25 µM	16	96,01	
75 µM	14	92,39	

Eriodictyol war in diesem Testsystem unwirksam, obwohl bei den Versuchsvarianten von SW620-Sphäroiden auf LEC und BEC eine Wirkung festgestellt worden war. Somit hatte Eriodictyol offenbar zellspezifisch auf MCF7-Sphäroide keine Wirkung.

Die Substanz zeigte in der Versuchsanordnung mit SW620 und LEC die beste Wirkung mit einer IC₅₀ von 94,77 µM, gefolgt von SW620 auf BEC mit einer IC₅₀ von 179,70 µM. Keine Wirkung war mit MCF7 und LEC zu sehen. Insgesamt waren die Effekte in allen Testsystemen im Vergleich zu den anderen Flavonoiden gering ausgeprägt.

IV DISKUSSION

IV.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen

IV.1.1 VERSUCHSREIHE KOLONKREBSSPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

Tabelle 23: IC₅₀-Werte der Flavonoide in der Versuchsreihe SW620, LEC

<u>Substanz</u>	<u>IC₅₀</u>
Luteolin	24,20 µM
Baicalein	26,86 µM
Pinocembrin	41,35 µM
Chrysin	44,33 µM
Galangin	71,38 µM
Eriodictyol	94,77 µM
Quercetin	keine Wirkung

Beim Vergleich der IC₅₀-Werte in der Versuchsvariante mit SW620 Sphäroiden auf LEC waren vor allem Baicalein und Luteolin gut wirksam (siehe Tab.23). Chrysin und Pinocembrin zeigten dagegen eine etwa halb so starke Wirkung während Galangin und Eriodictyol nur sehr schwache Effekte aufwiesen. Quercetin blieb völlig unwirksam, wobei sogar eine geringfügige Vergrößerung der Gaps ermittelt wurde. Die Wirkung aller Flavonoide war deutlich stärker als bei der Testung an SW620-Sphäroiden und BEC (siehe Tab. 24).

Flavonoide, die keine Hydroxylierung in den Positionen 3' und 4', also einen deutlich lipophileren Ring B aufweisen, zeigten eine stärkere Wirkung. Dazu gehörten Baicalein, Pinocembrin, Chrysin und Galangin. Nur bei Luteolin wurden starke Effekte auf die Gap-Bildung beobachtet, obwohl eine doppelte Hydroxylierung am Ring B vorliegt. Quercetin unterscheidet sich von Luteolin nur durch eine Hydroxylgruppe in Position 3 und bewirkte eine Gap-Vergrößerung, weshalb angenommen wurde, dass steigende Hydrophilie mit abnehmenden Effekten korrelierte.

IV.1.2 VERSUCHSREIHE KOLONKREBSSPHÄROIDE AUF BLUTENDOTHELZELLEN

Tabelle 24: IC₅₀-Werte de Flavonoide in der Versuchsreihe SW620, BEC

<u>Substanz</u>	<u>IC₅₀</u>
Luteolin	45,26 µM
Chrysin	58,24 µM
Pinocembrin	78,30 µM
Baicalein	95,24 µM
Galangin	106,00 µM
Eriodictyol	179,70 µM
Quercetin	Gap-Vergrößerung

In dieser Versuchsanordnung war Luteolin ebenfalls die wirksamste Substanz, wies aber einen deutlich höheren IC₅₀ –Wert als bei SW620 auf LEC auf (45,26 µM im Vergleich zu 24,20 µM). Chrysin und Pinocembrin zeigten eher mittelmäßige Effekte, während Baicalein und Galangin mit einer IC₅₀ von ca. 100 µM vergleichsweise schlecht wirkten. Eriodictyol hatte eine IC₅₀ von annähernd 200 µM und somit die geringsten Hemmeffekte auf die CCID-Bildung. Bei Quercetin wurde in dieser Versuchsanordnung sogar eine schwache, nicht konzentrationsabhängige Förderung der Gap-Bildung nachgewiesen.

Insgesamt waren die Auswirkungen auf die Gap-Formation bei den Versuchen mit SW620-Sphäroiden auf BEC eher schwächer als bei SW620- beziehungsweise MCF7-Sphäroiden auf LEC.

Da Darmkrebs vor allem über hämatogene Wege oder durch invasives Wachstum metastasiert, ist es plausibel, dass die Gap-Bildung von SW620-Sphäroiden auf Blutendothelzellen äußerst effektiv erfolgt. Die Resultate lassen darauf schließen, dass die Effekte der Flavonoide auf dieses Zellkultursystem deshalb eher gering waren, weil die zugrundeliegenden Mechanismen wesentlich schlechter zu inhibieren waren als in anderen Versuchsanordnungen.

IV.1.3 VERSUCHSREIHE BRUSTKREBSSPHÄROIDE AUF LYMPHENDOTHELZELLEN

Tabelle 25: IC₅₀-Werte der Flavonoide in der Versuchsreihe MCF7, LEC

<u>Substanz</u>	<u>IC₅₀</u>
Luteolin	19,31 µM
Chrysin	24,76 µM
Galangin	39,60 µM
Baicalein	130,20 µM
Quercetin	keine Wirkung festgestellt
Pinocembrin	keine Wirkung festgestellt
Eriodictyol	keine Wirkung festgestellt

Luteolin war mit einer IC₅₀ von 19,31 µM das wirksamste Flavonoid in der Versuchsvariante mit MCF7-Sphäroiden auf LEC und im Vergleich aller Zellkultursysteme. Chrysin war ebenfalls gut wirksam, gefolgt von Galangin mit eher mittelmäßiger Wirkung. Baicalein zeigte den höchsten IC₅₀-Wert in dieser Versuchsreihe.

Außerdem traten einige zellspezifische Wirkungen auf: Pinocembrin und Eriodictyol konnte in der Kombination aus MCF7 und LEC keine Wirkung mehr nachgewiesen werden. Pinocembrin zeigte sowohl bei SW620 mit LEC als auch auf BEC Wirkung. Genauso Eriodictyol, dessen Wirkintensität allerdings schon bei den Kolonkrebszellexperimenten nicht sehr hoch war (IC₅₀ von 94,77 µM und 179,70 µM.).

Quercetin war wie in der Versuchsanordnung aus SW620-Sphäroiden und LEC unwirksam.

IV.2 Zusammenfassende Interpretation der Ergebnisse aller Versuchsreihen

Tabelle 26: Vergleich der IC₅₀ Werte in den unterschiedlichen Versuchsvarianten

<u>Substanz</u>	<u>SW620, LEC</u>	<u>SW620, BEC</u>	<u>MCF7, LEC</u>
Luteolin	24,20 µM	45,26 µM	19,31 µM
Chrysin	44,33 µM	58,24 µM	24,76µM
Galangin	71,38 µM	106,00 µM	39,61µM
Baicalein	26,86 µM	95,24 µM	130,20 µM
Pinocembrin	41,35 µM	78,30 µM	keine Wirkung
Eriodictyol	94,77 µM	179,70 µM	keine Wirkung
Quercetin	keine Wirkung	Gap-Vergrößerung	keine Wirkung

Die beste Wirkung in allen Versuchsanordnungen zeigte Luteolin, dessen IC₅₀-Werte immer am niedrigsten waren.

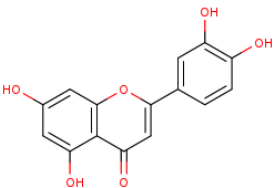
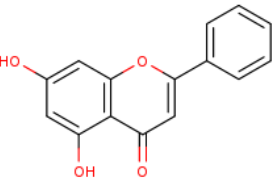
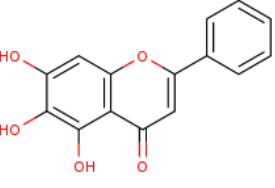
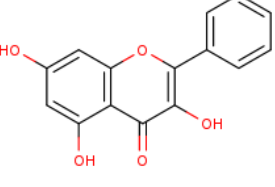
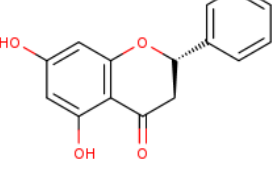
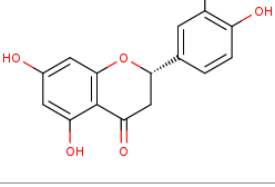
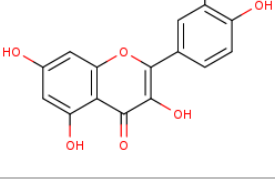
Chrysin und Galangin wiesen bei MCF7-Sphäroiden auf LEC die größten Hemmeffekte im CCID-Assay auf, und waren bei SW620-Sphäroiden auf einem Blutendothelzellmonolayer schlechter wirksam als auf einem Lymphendothelzellrasen.

Beim Vergleich aller Substanzen und Versuchsreihen, fielen die Ergebnisse dreier Substanzen auf, da die errechneten IC₅₀-Werte kontinuierlich im Verlauf der experimentellen Arbeit anstiegen. Dazu zählten Baicalein, Pinocembrin und Eriodictyol.

Bei Pinocembrin und Eriodictyol konnte in der Versuchsanordnung aus MCF7-Sphäroiden auf LEC keine Wirkung mehr festgestellt werden. Baicalein zeigte in diesem Zellkultursystem sehr schwache Effekte auf die Gap-Bildung.

Bei Quercetin konnten keine Auswirkungen auf die Gap-Bildung ermittelt werden, außer mit SW620-Sphäroiden auf BEC, wobei eine leichte Vergrößerung der CCIDs festgestellt wurde.

Tabelle 27: Substanzen nach absteigender Wirksamkeit geordnet

<u>Substanz</u>	<u>Testvariante</u>	<u>bester IC₅₀-Wert</u>	<u>chem. Struktur</u>	<u>logP</u>
Luteolin	MCF7, LEC	19,31 µM		2,261
Chrysin	MCF7, LEC	24,76 µM		2,842
Baicalein	SW620, LEC	26,86 µM		2,493
Galangin	MCF7, LEC	39,61 µM		2,613
Pinocembrin	SW620, LEC	41,35 µM		2,688
Eriodictyol	SW620, LEC	94,77 µM		2,107
Quercetin	-	keine oder promovierende Wirkung		2,032

Die hohe Wirksamkeit von Luteolin unterschied sich deutlich von allen anderen Flavonoiden, die in Position 3', 4' hydroxyliert waren und keine oder eine sehr geringe Wirkung zeigten. Mit einem logP von 2,261 war Luteolin zwar deutlich hydrophiler als Chrysin und Baicalein (logP von 2,842 und 2,493), hatte aber trotzdem den größten Einfluss auf die CCID-Bildung.

Beim Vergleich von Luteolin und Quercetin schien ausschließlich die Hydroxylgruppe in Position 3 für die Wirksamkeit entscheidend zu sein, da Luteolin die stärkste Wirkung aller Flavonoide ohne jene Hydroxylgruppe hatte, während Quercetin sogar die Gap-Bildung förderte. Auch bei Chrysin und Galangin konnte diese Hypothese bestätigt werden, da Chrysin (logP von 2,842) ohne die Hydroxylierung in Position 3 deutlich besser wirkte als das Flavonol Galangin (logP von 2,613).

Bei Chrysin und Baicalein waren die besten IC₅₀-Werte annähernd gleich, wobei Chrysin mit nur 2 Hydroxylgruppen in Ring A und einem logP-Wert von 2,842 im Vergleich zu Baicalein mit einem logP von 2,493 etwas lipophiler und auch wirksamer war (IC₅₀ von 24,76 µM und 26,86 µM). Pinocembrin mit einer fehlenden Doppelbindung zwischen den Positionen 2 und 3 war schwächer wirksam als das strukturell verwandte Chrysin (logP von Pinocembrin 2,688 und von Chrysin 2,842). Das Flavanon Eriodictyol wirkte sich deutlich weniger stark auf die Gap-Bildung aus, als das Flavon Luteolin mit dem gleichen Hydroxylierungsmuster. Die Substanz weist wie Quercetin Hydroxylgruppen in den Positionen 3' und 4' auf. Quercetin war noch an Position 3 hydroxyliert und blieb als einzige Substanz ohne jede Wirkung oder führte zu einem leicht Gap-bildungsförderndem Effekt in den Zellkultursystemen. Diese Verbindung wies die geringste Lipophilie aller Flavonoide mit einem logP von 2,032 auf.

Insgesamt zeigte sich, dass die Wirkung der Flavonoide mit steigender Hydroxylierung eher verringert wurde. Somit schienen lipophilere Eigenschaften der Substanzen deutlich von Vorteil zu sein, was die IC₅₀- und logP Werte von allen Flavonoiden außer Luteolin verifizierten. Auch eine Doppelbindung zwischen den Positionen 2 und 3 hatte positive Effekte auf die Wirkung, was beim Vergleich von

Chrysin mit Pinocembrin (IC_{50} von 24,76 μ M und 41,35 μ M) und Luteolin mit Eriodictyol (IC_{50} von 19,31 μ M und 94,77 μ M) deutlich wurde.

Flavonole wie Galangin und Quercetin zeigten ebenfalls geringere Effekte auf die CCID-Formation als die strukturell verwandten Flavone mit identischem Substitutionsmuster. Somit schien die Hydroxylgruppe in Position 3 negative Eigenschaften in Bezug auf die Hemmung der Gap-Bildung zu haben.

V ZUSAMMENFASSUNG

Gaps oder CCIDs sind durch Tumorzellsphäroide verursachte Löcher im Endothelzellrasen eines 3D-Kokultivierungssystems, das als CCID-Assay bezeichnet wird. Diese Assays dienen der in-vitro Testung einiger Metastasierungsschritte. Da die Tumorstreuung bei Krebserkrankungen häufig letale Folgen mit sich bringt, stehen damit assoziierte Geschehnisse im Zentrum der onkologischen Forschung. Ein methanolisches Pflanzenextrakt aus *Scrophularia lucida* L. (Scrophulariaceae)¹⁸ zeigte bei Testungen in CCID-Assays eine inhibierende Wirkung auf die Gap-Formation. Eine Fraktion die überwiegend Hispidulin enthielt konnte als jene mit der besten Wirkung ermittelt werden, weshalb strukturell ähnliche Flavonoide in CCID-Assays untersucht werden sollten.

Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Flavonoide mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften in drei Versuchsvarianten getestet: SW620-Sphäroide auf einem BEC-Monolayer, SW620-Sphäroide auf LEC und MCF7-Sphäroide mit LEC. Untersucht wurden Flavonoide mit differierendem Hydroxylierungsmuster, die in 2 Gruppen unterteilt werden konnten: Einerseits Flavonoide mit Hydroxylierungen in den Positionen 3' und 4' und andererseits solche ohne Hydroxylgruppen in Ring B.

Bei Luteolin mit Hydroxylierung in den Positionen 3' und 4' war die stärkste Wirkung festzustellen, wohingegen Quercetin, dessen chemische Struktur sich von Luteolin nur durch die Hydroxylgruppe in Position 3 unterschied, eine Vergrößerung der Gaps im CCID-Assay bewirkte.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass insbesondere Flavonoide mit hoher Lipophilie und geringem Hydroxylierungsgrad eine bessere Wirkung aufwiesen. Dazu gehörten Baicalein, Galangin, Chrysin und Pinocembrin. Weitere Testungen an Flavonoiden mit stärker lipophilen Eigenschaften wären daher interessant, um diese Hypothese zu bestätigen.

18 <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2587278> (aufgerufen, am 02.04.2015)

VI SUMMARY

Gaps or CCIDs are small cell-free areas within endothelial cell monolayers caused by tumour cell spheroids placed on that monolayer in a three dimensional co-cultivation system. CCID-Assays mimic important steps of metastasis in vitro and this test system is used in oncologic research to simulate this fatal stadium of cancer diseases. A methanolic extract of *Scrophularia lucida* L. (Scrophulariaceae)¹⁹ showed significant inhibitory effects in tests in CCID-Assays on gap formation. A fraction containing mainly hispidulin from an extract of *Scrophularia lucida* L. (Scrophulariaceae) had the strongest impact on that cell system. Thus flavonoids with structural analogies were selected to be tested in further CCID-Assays.

In this study different flavonoids, showing diverse chemical properties were tested in three test systems: SW620-spheroids on LEC-monolayers, SW620-spheroids on BEC-monolayers and MCF-7 spheroids with LEC-monolayers. Flavonoids with differing hydroxylation-pattern were of interest. Those flavonoids were selected from two groups: the ones with hydroxylation at 3'and 4'and those without hydroxygroups in ring B.

Luteolin showed strong effects in CCID-Assays despite its hydroxylation in position 3'and 4', while quercetin, which differs from luteolin only in one hydroxylation in position 3, appeared to have a promoting effect on gap formation. Except luteolin the results of all tests confirmed that higher lipophilicity improved the effects of flavonoids, including baicalein, galangin, chrysin, and pinocembrin. Based on these results further tests with other higher lipophilic flavonoids would be of interest to confirm this assumption.

19 <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2587278> (aufgerufen, am 02.04.2015)

VII ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Gaps einer Kontrolle ohne Substanzeinfluss	13
Abbildung 2: Gaps nach Behandlung mit 50 μ M Chrysin	13
Abbildung 3: SW620-Zellen bei Konfluenz	20
Abbildung 4: Sphäroid nach der Zentrifugation	20
Abbildung 5: Sphäroid nach 4 Tagen	20
Abbildung 6: MCF7-Zellen bei Konfluenz	21
Abbildung 7: Sphäroid nach der Zentrifugation	21
Abbildung 8: Sphäroid nach 3 Tagen	21
Abbildung 9: Lymphendothelzellen bei Konfluenz	22
Abbildung 10: Blutendothelzellen bei Konfluenz	23
Abbildung 11: Zellfluoreszenz ohne schwarzweiß-Bildebene	32
Abbildung 12: Schwarzweiß-Bildebene ohne Fluoreszenzfilter	32
Abbildung 13: Kombination beider Bildebenen	32
Abbildung 14: SW620-Zellkonglomerat	38
Abbildung 15: SW620-Sphäroid	38
Abbildung 16: MCF7-Zellkonglomerat	39
Abbildung 17: MCF7-Sphäroid	39
Abbildung 18: Zählkammer	39
Abbildung 19: Tabellenauswahl GraphPadPrism	44
Abbildung 20: Transformierte Daten: Grafik	45
Abbildung 21: Hemmung der Gap-Bildung durch Baicalein (SW620, LEC)	47
Abbildung 22: Berechnung der IC_{50} -von Baicalein (SW620, LEC)	47
Abbildung 23: Hemmung der Gap-Bildung durch Baicalein (SW620, BEC)	48
Abbildung 24: Berechnung der IC_{50} -von Baicalein (SW620, BEC)	48
Abbildung 25: Hemmung der Gap-Bildung durch Baicalein (MCF7, LEC)	49
Abbildung 26: Berechnung der IC_{50} -von Baicalein (MCF7, LEC)	49
Abbildung 27: Hemmung der Gap-Bildung durch Galangin (SW620, LEC)	51
Abbildung 28: Berechnung der IC_{50} -von Galangin (SW620, LEC)	51
Abbildung 29: Hemmung der Gap-Bildung durch Galangin (SW620, BEC)	52
Abbildung 30: Berechnung der IC_{50} -von Galangin (SW620, BEC)	52
Abbildung 31: Hemmung der Gap-Bildung durch Galangin (MCF7, LEC)	53
Abbildung 32: Berechnung der IC_{50} -von Galangin (MCF7, LEC)	53

Abbildung 33: Hemmung der Gap-Bildung durch Chrysin (SW620, LEC)	54
Abbildung 34: Berechnung der IC ₅₀ -von Chrysin (SW620, LEC)	54
Abbildung 35: Kristallbildung Chrysin Bild1	55
Abbildung 36: Kristallbildung Chrysin Bild2	55
Abbildung 37: Hemmung der Gap-Bildung durch Chrysin (SW620, BEC)	55
Abbildung 38: Berechnung der IC ₅₀ -von Chrysin (SW620, BEC)	55
Abbildung 39: Hemmung der Gap-Bildung durch Chrysin (MCF7, LEC)	56
Abbildung 40: Berechnung der IC ₅₀ -von Chrysin (MCF7, LEC)	56
Abbildung 41: Hemmung der Gap-Bildung durch Pinocembrin (SW620, LEC)	58
Abbildung 42: Berechnung der IC ₅₀ -von Pinocembrin (SW620, LEC)	58
Abbildung 43: Hemmung der Gap-Bildung durch Pinocembrin (SW620, BEC)	59
Abbildung 44: Berechnung der IC ₅₀ -von Pinocembrin (SW620, BEC)	59
Abbildung 45: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Pinocembrin (MCF7, LEC)	60
Abbildung 46: Hemmung der Gap-Bildung durch Luteolin (SW620, LEC)	61
Abbildung 47: Berechnung der IC ₅₀ -von Luteolin (SW620, LEC)	61
Abbildung 48: Hemmung der Gap-Bildung durch Luteolin (SW620, BEC)	62
Abbildung 49: Berechnung der IC ₅₀ -von Luteolin (SW620, BEC)	62
Abbildung 50: Hemmung der Gap-Bildung durch Luteolin (MCF7, LEC)	63
Abbildung 51: Berechnung der IC ₅₀ -von Luteolin (MCF7, LEC)	63
Abbildung 52: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Quercetin (SW620, LEC)	64
Abbildung 53: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Quercetin Versuch 2 (SW620, LEC)	65
Abbildung 54: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Quercetin (SW620, BEC)	66
Abbildung 55: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Quercetin (MCF7, LEC)	67
Abbildung 56: Hemmung der Gap-Bildung durch Eriodictyol (SW620, LEC)	68
Abbildung 57: Berechnung der IC ₅₀ -von Eriodictyol (SW620, LEC)	68
Abbildung 58: Hemmung der Gap-Bildung durch Eriodictyol (SW620, BEC)	69
Abbildung 59: Berechnung der IC ₅₀ -von Eriodictyol (SW620, BEC)	69
Abbildung 60: Beeinflussung der Gap-Bildung durch Eriodictyol (MCF7, LEC)	70

VIII TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.: Flavonoiddaten	24
Tabelle 2: Testung Baicalein (SW620, LEC)	48
Tabelle 3: Testung Baicalein (SW620, BEC)	49
Tabelle 4: Testung Baicalein (MCF7, LEC)	50
Tabelle 5: Testung Galangin (SW620, LEC)	51
Tabelle 6: Testung Galangin (SW620, BEC)	52
Tabelle 7: Testung Galangin (MCF7, LEC)	53
Tabelle 8: Testung Chrysin (SW620, LEC)	54
Tabelle 9: Testung Chrysin (SW620, BEC)	56
Tabelle 10: Testung Chrysin (MCF7, LEC)	57
Tabelle 11: Testung Pinocembrin (Dihydrochrysin) (SW620, LEC)	58
Tabelle 12: Testung Pinocembrin (Dihydrochrysin) (SW620, BEC)	59
Tabelle 13: Testung Pinocembrin (Dihydrochrysin) (MCF7, LEC)	60
Tabelle 14: Testung Luteolin (SW620, LEC)	61
Tabelle 15: Testung Luteolin (SW620, BEC)	62
Tabelle 16: Testung Luteolin (MCF7, LEC)	63
Tabelle 17: Testung Quercetin (SW620, LEC)	65
Tabelle 18: Testung Quercetin (SW620, BEC)	66
Tabelle 19: Testung Quercetin (MCF7, LEC)	67
Tabelle 20: Testung Eriodictyol (SW620, LEC)	68
Tabelle 21: Testung Eriodictyol (SW620, BEC)	69
Tabelle 22: Testung Eriodictyol (MCF7, LEC)	70
Tabelle 23: IC ₅₀ -Werte der Flavonoide in der Versuchsreihe SW620, LEC	71
Tabelle 24: IC ₅₀ -Werte de Flavonoide in der Versuchsreihe SW620, BEC	72
Tabelle 25: IC ₅₀ -Werte der Flavonoide in der Versuchsreihe MCF7, LEC	73
Tabelle 26: Vergleich der IC ₅₀ Werte in den unterschiedlichen Versuchsvarianten	74
Tabelle 27: Substanzen nach absteigender Wirksamkeit geordnet	75

IX LITERATURVERZEICHNIS

- Bühner et.al. (2009, 1. Auflage) Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler: Kap. 6.3. Kruskal-Wallis-Test (S. 378-385), Pearson Education Deutschland GmbH, München, ISBN: 978-3-8273-7274-1
- Erbar P. (2002, 4. Auflage) Onkologie, CompactLehrbuch: Pathophysiologie, Klinik und Therapie maligner Tumoren: Kap 2. Tumorentstehung, Tumorwachstum, Metastasierung und körpereigene Abwehr (S. 23-26), Schattauer GmbH, Stuttgart, ISBN 3-7945-2205-2
- Giessrigl B. et.al. (2012): Effects of Scrophularia extracts on tumor cell proliferation, death and intravasation through lymphoendothelial cell barriers, *Int. J. Oncol.* 40 (6), 2063-2074
- Gstraunthaler G. et.al. (2013, 7. Auflage) Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen: Kap. 5.2. Züchtung von Zellen auf Plastikmaterial (S. 54-55), Kap. 6.1.3. Serum (S. 74-76), Kap. 10.1 Mediumwechsel bei Monolayerkulturen (S. 109), Kap. 11.1.5 Einsäen der Zellen (S. 118), Springer Science+Business Media, Berlin Heidelberg, ISBN 978-3-642-33112-1
- Hennes A. et.al. (2015) Safe and effective cryopreservation methods for long-term storage of human-amniotic-fluid-derived stem cells, *Prenatal Diagnosis* 35 (5), 456-462
- Kopf S. et.al. (2013) In vitro characterisation of the anti-intravasive properties of the marine product heteronemin, *Arch Toxicol* 87, 1851-1861
- Kretschy N. et.al. (2013) In vitro inhibition of breast cancer spheroid induced lymphendothelial defects resembling intravasation into the lymphatic vasculature by acetohexamide, isoxsupride, nifedipin and proadife,. *British Journal of Cancer* 108, 570-578
- Leischner H. (2013, 3. Auflage) Onkologie Basics: Kap. 13. Mammakarzinom (S. 36-38), Kap. 29. Kolorektales Karzinom (S. 76-78), Elsevier GmbH, München, ISBN Print 978-3-437-42328-4
- Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*: Kap. 1. Einleitung (S. 1)
- Metzger W. et.al. (2011) The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells, *Cytotherapy* 13, 1000-1012
- Mutschler E. et.al. (2013, 10. Auflage) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Pharmakologie, Klinische Pharmakologie, Toxikologie: Kap. 3.3.2. Dosis- bzw. Konzentration-Wirkungs-Beziehungen (S. 75-76), Kap. 21.1.5.1. Betalaktam-Antibiotika (S. 740),

- Kap. 21.1.6.1. Aminoglykoside (S. 757), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, ISBN 978-3-8047-2898-1
- Nagelkerke A. et.al. (2013) Generation of multicellular tumor spheroids of breast cancer cells: How to go three-dimensional, *Analytical Biochemistry* 437, 17–19
- Schoppmann S.F. et.al. (2004) Telomerase-immortalized lymphatic and blood vessel endothelial cells are functional stable retain their lineage specificity, *Microcirculation* 11(3), 261-269
- Schweighofer L. (2014) *Aktivitätsgeleitete Untersuchungen von Scrophulara lucida L.: Kap. 1. Einleitung (S. 2)*
- Teichmann M. et.al. (2014) Inhibition of tumour spheroid-induced prometastatic intravasation gates in the lymph endothelial cell barrier by carbamazepine: drug testing in a 3D model, *Arch Toxicol* 88 (3), 691-699
- Teuscher E. et.al. (2012, 7. Auflage) *Biogene Arzneimittel, Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie: Kap. 18.7. Phenylchromanderivate, 18.7.1. Chemie, Verbreitung, Biogenese (S. 299-302), 18.7.2. Flavonoide als Arzneistoffe-Pharmakologie (S. 307-308), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, ISBN 978-3-8047-2495-2*
- Toutenburg H. et.al (2008, 2. Auflage) *Six Sigma: Methoden und Statistik für die Praxis: Kap 4.2.6.7 Nichtparametrische Tests (S. 169-177), Springer Science & Business Media, Berlin Heidelberg, ISBN: 978-3-540-85137-0*
- Vonach C. et.al. (2011) NF- κ B mediates the 12(S)-HETE-induced endothelial to mesenchymal transition of lymphendothelial cells during the intravasation of breast carcinoma cells, *Br. J. Cancer* 105 (2), 263-271

X CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name Claudia Smöch
Geburtsdatum 02.02.1992 in Wien
Familienstand ledig
Nationalität Österreich

Studium und Schulbildung

10/2010 – laufend **Hauptuniversität Wien**
 - Pharmazie
 09/2002 - 06/2010 **BRG/BORG St.Pölten**
 - Musikalische Langform
 - Matura mit ausgezeichnetem Erfolg am 11.06.2010

Berufliche Erfahrungen

12/2014 – 12/2015 **Apotheke Traisenpark**
 - geringfügig beschäftigt

- Magistrale Rezepturen: Individuelle Herstellung von Arzneimitteln
- Telefonische Kundenbetreuung

 - regelmäßige Feriapraktika seit 2009

Extracurriculare Aktivitäten

03/2015 – 06/2015 **Tutorin in den Übungen „Pharmazeutische Qualität biogener Arzneimittel“, „Gewinnung und instrumentelle Analytik“, „Identitäts- und Reinheitsprüfung biogener Arzneimittel“**
 10/2015 – 01/2016
 - Studentenbetreuung
 - Bedienung sämtlicher technischer Hilfsmittel
 10/2013 – 01/2014 **Tutorin in den Übungen zu „Allgemeine Mikrobiologie und Hygiene“**
 - Unterstützung von jüngeren Studenten in sämtlichen Belangen
 - Überprüfung des erlangten Wissens während den Übungen