



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Flavonoiden im
CCID-Assay“

verfasst von

Julia Eichsteiner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Pharmazie

Betreut von: ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn

Danksagung

Ich bedanke mich bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Liselotte Krenn für die herzliche Betreuung und die hilfreiche Unterstützung während der gesamten Diplomarbeit.

Weiters bedanke ich mich bei ao. Univ.-Prof. Dr. Georg Krupitza für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am AKH Wien und die lehrreiche Betreuung vor Ort.

Mein Dank gilt außerdem seinem gesamten Team, das für ein freundliches Arbeitsklima gesorgt hat und mir immer mit einem offenen Ohr für Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist.

Außerdem möchte ich mich bei ao. Univ.-Prof. Dr. Gerhard Ecker für die Berechnung der logP-Werte bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mir nicht nur durch ihre finanzielle Unterstützung dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben, sondern auch immer Interesse an meinem Studium gezeigt und mich in allen Lebenslagen emotional unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Freund, meinen Freunden und den lieben Menschen, die ich während des Studiums kennengelernt habe, bedanken, die für die notwendige Abwechslung zum Studienalltag gesorgt haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Dreidimensionale Zellkultursysteme	1
1.1.1. CCID-Assay	1
1.1.2. Sphäroide	2
1.2. Metastasierung	3
1.3. Flavonoide	6
2. Hintergrund und Ziel der Diplomarbeit	8
3. Material	10
3.1. Zellen	10
3.2. Medien und Material für die Zellkultur	10
3.3. Technische Ausstattung	12
3.4. Testsubstanzen	13
4. Methoden	15
4.1. Zellkultur	15
4.1.1. Passagieren	15
4.1.2. Aussaat der Endothelzellen	16
4.1.3. Sphäroidbildung	17
4.1.4. Einfrieren und Auftauen der Zellen	19
4.2. CCID-Assay	20
5. Ergebnisse	24
5.1. Ergebnisse der CCID-Assays	24
5.1.1. Wirkung von Hispidulin	24
5.1.1.1. Wirkung von Hispidulin auf SW620-Sphäroide auf BECs	25
5.1.1.2. Wirkung von Hispidulin auf SW620-Sphäroide auf LECs	25
5.1.1.3. Wirkung von Hispidulin auf MCF7-Sphäroide auf LECs	26
5.1.2. Wirkung von Apigenin	27
5.1.2.1. Wirkung von Apigenin auf SW620-Sphäroide auf BECs	27
5.1.2.2. Wirkung von Apigenin auf SW620-Sphäroide auf LECs	28
5.1.2.3. Wirkung von Apigenin auf MCF7-Sphäroide auf LECs	29
5.1.3. Wirkung von Naringenin	30
5.1.3.1. Wirkung von Naringenin auf SW620-Sphäroide auf BECs	31

5.1.3.2. Wirkung von Naringenin auf SW620-Sphäroide auf LECs	32
5.1.3.3. Wirkung von Naringenin auf MCF7-Sphäroide auf LECs	32
5.1.4. Wirkung von Acacetin	33
5.1.4.1. Wirkung von Acacetin auf SW620-Sphäroide auf BECs	34
5.1.4.2. Wirkung von Acacetin auf SW620-Sphäroide auf LECs	35
5.1.4.3. Wirkung von Acacetin auf MCF7-Sphäroide auf LECs	35
5.1.5. Wirkung von Scutellarein	36
5.1.5.1. Wirkung von Scutellarein auf SW620-Sphäroide auf BECs	37
5.1.5.2. Wirkung von Scutellarein auf SW620-Sphäroide auf LECs	37
5.1.5.3. Wirkung von Scutellarein auf MCF7-Sphäroide auf LECs	38
5.1.5.4. Wiederholung des Experiments mit Scutellarein mit SW620-Sphäroiden auf BECs	39
5.1.6. Wirkung von Kämpferol	41
5.1.6.1. Wirkung von Kämpferol auf SW620-Sphäroide auf BECs	41
5.1.6.2. Wirkung von Kämpferol auf SW620-Sphäroide auf LECs	42
5.1.6.3. Wirkung von Kämpferol auf MCF7-Sphäroide auf LECs	42
5.1.7. Wirkung von Herbacetin	44
5.1.1.1. Wirkung von Herbacetin auf SW620-Sphäroide auf BECs	45
5.1.1.2. Wirkung von Herbacetin auf SW620-Sphäroide auf LECs	46
5.1.1.3. Wirkung von Herbacetin auf MCF7-Sphäroide auf LECs	46
5.2. Korrelation der logP-Werte mit der Wirkung der Flavonoide	48
5.2.1. Hemmung der CCID-Bildung durch SW620-Sphäroide in BEC-Monolayern	48
5.2.2. Hemmung der CCID-Bildung durch SW620-Sphäroide in LEC-Monolayern	50
5.2.3. Hemmung der CCID-Bildung durch MCF7-Sphäroide in LEC-Monolayern	51
6. Diskussion	52
7. Zusammenfassung	54
8. Summary	55
9. Abbildungsverzeichnis	56
10. Tabellenverzeichnis	57
11. Literaturverzeichnis	58

1 Einleitung

1.1 Dreidimensionale Zellkultursysteme

3-D Modelle in der Zellkultur sind aus dem Forschungsalltag nicht mehr wegzudenken. Sie können die physiologischen Gegebenheiten viel besser abbilden als herkömmliche, zweidimensionale Modelle, da Form und zelluläre Nachbarschaft eine wichtige Rolle für Genexpression und biologisches Verhalten spielen [1].

Daher werden solche Modelle z.B. zur Untersuchung der Genregulierung unter speziellen Umweltbedingungen, etwa schlechter Sauerstoffversorgung, zur experimentellen Gewebeneubildung von Organen wie z.B. der Leber [1] oder der Epidermis [2], in der Neurowissenschaft zur Erforschung von Krankheiten wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson oder in der Pharmakologie zur Ermittlung der Rolle von Ionenkanälen auf die Herzarbeit verwendet [1]. Weiters wurde gezeigt, dass sich pluripotente Stammzellen in dreidimensionalen Kulturen unter gleichen Bedingungen anders entwickeln, als in 2-D Modellen [3].

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet ist die Onkologieforschung. Hier können neue Erkenntnisse über Proteinexpression, Angiogenese, Invasion und Metastasierung durch solche Assays gewonnen werden [1], [2].

Trotz all dieser Vorteile können diese 3-D Modelle in-vivo Tests nicht ersetzen, da das physiologische Milieu wie z.B. extrazelluläre Matrix oder Mikrogefäßsysteme zwar teilweise, aber nicht vollständig nachgeahmt werden kann [1].

1.1.1 CCID-Assay

Der CCID-Assay (CCID = circular chemorepellent-induced defects) gehört zu den neueren dreidimensionalen Versuchsanordnungen im Bereich der Krebsforschung.

Bei diesem Assay handelt es sich um ein plastisches Modell aus Tumorzellsphäroiden und Blut- bzw. Lymphendothelzellen (= BECs bzw. LECs).

Durch die Co-Kultivierung der beiden Zelltypen besteht die Möglichkeit, einen frühen Schritt einer Metastasierung, die sogenannte Intravasation, in-vitro zu beobachten und auf einen möglichen inhibitorischen Effekt von Testsubstanzen zu schließen. Wird dieser entscheidende Prozess der Intravasation unterbunden, kann sich der Tumor nicht mehr verbreiten und damit die Prognose für betroffene Patienten verbessert werden.

1.1.2 Sphäroide

Sphäroide sind kugelförmige Gebilde aus mehreren tausend Zellen. Durch ihre dreidimensionale Form verhalten sie sich bezüglich Wachstum, Nährstoffversorgung, Produktion von Botenstoffen, etc. wie echte Tumore und sind daher bestens für in-vitro Forschungsmodelle geeignet [4].

Sphäroide besitzen außerdem den gleichen Aufbau wie echte Tumore im Anfangsstadium, sind aber viel regelmäßiger, als es in echten Geweben der Fall wäre: außen lebende, teilungsfähige Zellen, die sehr locker adhäriert sein können und dadurch leichter abbrechen, darunter eine Schicht aus lebenden, aber ruhenden Zellen und ein nekrotischer Kern. Als Grund für die Nekrose im Inneren wurde früher eine mangelnde Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen angenommen. Heute geht man davon aus, dass die Nekrose eventuell sekundär durch vermehrte Apoptose im Sphäroidkern entstehen kann. Die genauen Ursachen und Mechanismen sind jedoch noch immer nicht vollständig bekannt [5].

Obwohl diese Merkmale auf alle Sphäroide zutreffen, unterscheiden sie sich je nach Zellart in Größe, der Zeit ihrer Bildung, der Ausprägung der Nekrose im Kern oder ihrer Stabilität. Diese Unterschiede sind in Abb. 1 (Seite 3) zu sehen.

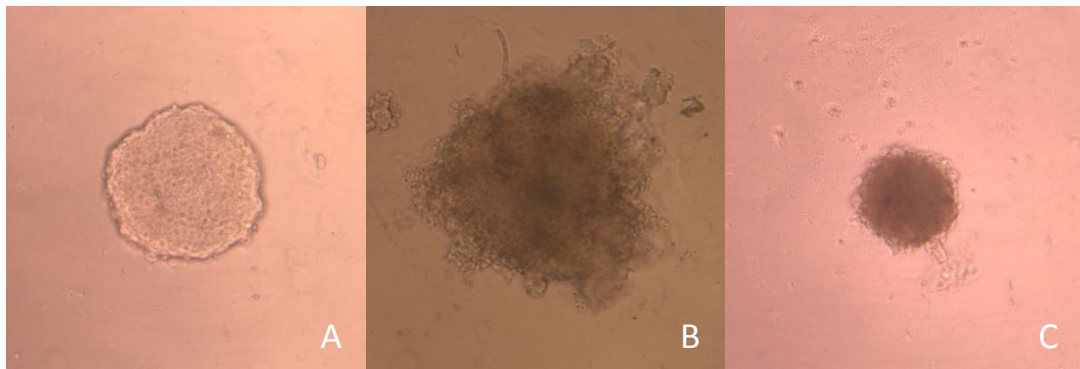


Abb. 1 Sphäroidtypen

A: MCF-7-Sphäroid, B: SW620-Sphäroid, C: MDA-MB-Sphäroid; für den Transfer auf die Endothelzellen

Im CCID-Assay sollen die Sphäroide die Zellaggregate nachahmen, die sich vom Primärtumor absiedeln und in den Extrazellulärraum und die Gefäßbahnen eindringen [6].

1.2 Metastasierung

Metastasierender Krebs verschlechtert die Prognose für betroffene Patienten beträchtlich. Oft sind Metastasen bedrohlicher einzustufen als der ursprüngliche Tumor, da sie auch Jahre nach der Diagnose des Primärtumors in verschiedensten Organen auftreten können [7], [8], [9].

Die Entwicklung von Metastasen erfolgt in mehreren Schritten:

- Dissoziation einzelner Krebszellen oder Krebszellaggregate vom Primärtumor
- Invasion (Infiltration) in die extrazelluläre Matrix
- Intravasation
- Wanderung im Blut- oder Lymphstrom
- Extravasation
- Anheftung an entfernte Organe und Bildung eines Sekundärtumors

Jeder dieser Schritte ist entscheidend für die erfolgreiche Entstehung einer Tochtergeschwulst [9], [10].

Damit sich einzelne Tumorzellen oder Aggregate von Tumorzellen vom Haupttumor ablösen können, müssen Zell-Zell-Kontakte innerhalb des Primärtumors gelöst werden. Wichtig für Zell-Zell-Kontakte sind z.B. tight junctions (TJ), adherens junctions (AJ), gap junctions (GJ), Integrine oder Desmosome, die im Laufe der Tumorprogression gelöst werden, indem z.B. die Expression der relevanten Proteine downreguliert wird.

Zur Invasion in die extrazelluläre Matrix ist ein Überwinden der Basalmembran notwendig. Hierfür sind Matrix-Metalloproteinasen von Bedeutung, die Proteine der extrazellulären Matrix abbauen können und so den Tumorzellen die Invasion ermöglichen. Außerdem müssen die Zellen migrieren können, was z.B. durch die Ausbildung von fokalen Adhäsionen bewerkstelligt wird. Dabei interagiert eine Vielzahl von Proteinen mit dem Actin-Zytoskelett und führt so zu einer Wanderung der Zellen.

Die Intravasation in Blut- und/oder Lymphgefäße ermöglicht den Tumorzellen die Verbreitung über weite Strecken und damit die Metastasierung in entfernte Organe. Oft geschieht das während der Angiogenese des Tumors neu entstandene Gefäße, die mit dem restlichen Gefäßsystem in Verbindung stehen und den Krebszellen weite Wege durch die extrazelluläre Matrix ersparen.

Bei der anschließenden Wanderung der Zellen im Blut- oder Lymphstrom sind die Krebszellen Zellen des Immunsystems bzw. Scherkräften ausgesetzt. Werden diese Abwehrmechanismen überwunden, folgt die Extravasation.

Man nimmt an, dass Selectine einen wichtigen Beitrag zur Extravasation liefern. Sie dürften die Adhäsion zirkulierender Krebszellen an Gefäßwände regulieren.

Nach der anschließenden Auswanderung aus den Gefäßen kann sich der Tumor an der Stelle der Extravasation festsetzen. Es wurde beobachtet, dass bestimmte Krebsarten häufig in bestimmte Organe metastasieren. Daraus entstand die sogenannte „Seed and Soil“- Theorie, die besagt, dass Tumorzellen nur in Gewebe und Organe eindringen können, die die optimalen Bedingung für die Ausbildung eines Sekundärtumors bieten. So metastasiert Brustkrebs hauptsächlich in Lunge, Leber, Gehirn und Knochen, während Darmkrebs mit Abstand am häufigsten Sekundärtumoren in der Leber bildet, gefolgt von Lunge und Nieren [9].

Obwohl für den Erfolg der Metastasierung zahlreiche Schritte erforderlich sind und nur wenige Tumorzellen, die ins Blut- und Lymphsystem gelangen, einen Sekundärtumor bilden, findet man bei jedem zweiten Patienten bereits bei der Erstdiagnose Tochtergeschwülste. Man geht davon aus, dass die Zahl durch noch nicht detektierbare Mikrometastasen noch höher sein könnte [6], [9].

Es gibt eine Vielzahl von Hypothesen und Modellen, wie ein Tumor die Fähigkeit zu Metastasierung erlangt. Allerdings kann keines dieser Modelle eine endgültige Antwort geben. Die genauen Mechanismen sind immer noch unbekannt und bedürfen intensiver Forschung [7].

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Testung von Substanzen im CCID-Assay beschäftigt, sollen die aktuellen Forschungsergebnisse zu Mechanismen der Intravasation hier genauer erläutert werden. Sie sind Gegenstand intensiver Forschungsarbeit.

In diversen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen unter dem Einfluss von Tumorzellsphäroiden nicht absterben, sondern auseinanderweichen und so dem Tumor Platz zum Einwandern in die Gefäßbahnen geben. Als Triggersubstanz wurde 12(S)-HETE identifiziert, die durch ALOX15 aber auch durch ALOX12 aus Arachidonsäure synthetisiert wird und von den Sphäroiden konstant sezerniert wird. Unter Behandlung mit dem ALOX12/15-Inhibitor Baicalein, einem Flavonoid, wurde die Bildung von CCIDs reduziert [6], [8].

Außerdem fand man heraus, dass auch NF- κ B eine Rolle bei der Bildung von CCIDs in Endothelmonolayern spielt. Dieser Transkriptionsfaktor erhöht die Expression von Adhäsionsproteinen, wodurch der Kontakt zwischen den Tumorzellen und Endothelzellen ermöglicht wird, welches eine Voraussetzung für Tumorintravasation ist. Die stabile Anheftung von Sphäroiden an den Monolayer durch ICAM-1 wird durch NF- κ B gesteuert, was durch die Verhinderung des Attachments der Sphäroide am Monolayer unter Einfluss von Bay11-7082, eines spezifischen Inhibitors von NF- κ B, bewiesen wurde [11]. Darüberhinaus beeinflusst NF- κ B die Bindungen zwischen LECs negativ und vermindert die Expression von VE-cadherin, wodurch das Auseinanderweichen der Zellen erleichtert wird [8].

Diese Daten wurden in Versuchen mit MCF-7 Sphäroiden erhoben. Im Zuge der Untersuchungen wurde festgestellt, dass MCF-7 Sphäroide, die auf BECs

platziert wurden, wesentlich geringere CCIDs bildeten als auf LECs, was man auf eine geringere Sensibilität der BECs auf 12(S)-HETE zurückführt [6].

Aktuell wird versucht, auch die Mechanismen der CCID-Bildung bei der Colonkarzinomzelllinie SW620 (=CCL227) zu erforschen. Da Darmkrebs sowohl über Blut- als auch Lymphgefäße metastasiert, erfolgt die Testung mit SW620-Sphäroiden an beiden Endothelzelltypen. Durch Platzieren von SW620-Sphäroiden auf BECs als auch auf LECs konnten CCIDs induziert werden. Bisher weiß man, dass auch diese Zelllinie 12(S)-HETE produziert, und dass auch NF- κ B und das Cytochromsystem eine Rolle bei der Bildung von CCIDs spielen dürften. Die genauen Mechanismen sind aber bis dato noch nicht aufgeklärt [12], [13].

1.3 Flavonoide

Unter dem Begriff Flavonoide werden Derivate des Flavans zusammengefasst, die sich durch Oxidationszustand und der Doppelbindung in Ring B unterscheiden.

Flavonoide sind typische Pflanzeninhaltsstoffe in allen höheren Pflanzen und liegen meist in Form von Glykosiden vor. Diese im menschlichen Körper nicht gebildete Substanzklasse zeigt in zahlreichen Untersuchungen positive Einflüsse auf physiologische und pathophysiologische Vorgänge im Organismus. So wurden durch Radikalfang, Komplexbildung mit Schwermetallen oder durch Interaktionen mit verschiedensten Enzymen antioxidative, antiinflammatorische, anti-atherosklerotische, aber auch antitumorale und antimikrobielle Effekte nachgewiesen.

Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen finden Flavonoide therapeutische Anwendung:

- Flavonoide als Venotonika: z.B. Rotes Weinlaub (*Vitis vinifera* folium)
- Flavonoide als Kardiotonika: z.B. Weißdorn (*Crataegi folium cum flore*)
- Flavonoide als Diuretika: z.B. Birke (*Betulae folium*)
- Flavonoide als Diaphoretika: z.B. Holunder (*Sambuci flos*)
- Flavonoide als Hepatika: z.B. Mariendistel (*Silybi mariani fructus*)
- Flavonoide als Nootropika: z.B. Ginkgo (*Ginkgo folium*)
- Flavonoide als Chologoga: z.B. Schafgarbe (*Millefolii herba*)
- Flavonoide als Sedativa: z.B. Passionsblume (*Passiflorae herba*)

Allerdings ist die Bioverfügbarkeit von Flavonoidglykosiden durch Abbau im Gastrointestinaltrakt und eine geringe Resorptionsrate limitiert und auch Flavonoidaglyka werden metabolisiert. Deshalb sind in-vitro gewonnene Daten nicht direkt auf tatsächliche Wirkungen im menschlichen Organismus umzulegen [14].

2 Hintergrund und Ziel der Diplomarbeit

Schon seit Jahrhunderten werden verschiedene *Scrophularia*-Arten in der Volksmedizin bei Hautkrankheiten, aber auch bei entzündlichen Erkrankungen und Tumoren angewendet. Weil über die antineoplastischen Eigenschaften dieser Pflanzenarten wenig bekannt war, untersuchten Giessriegl et al. (2012) methanolische Extrakte verschiedener *Scrophularia*-Arten hinsichtlich Zellproliferation, Zelltod und Intravasation von MCF7-Brustkrebszellen ins Lymphgefäßssystem [15].

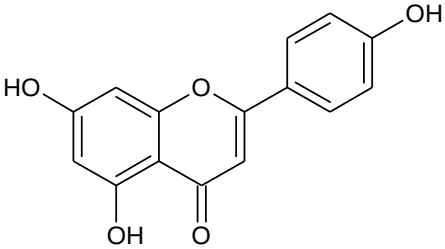
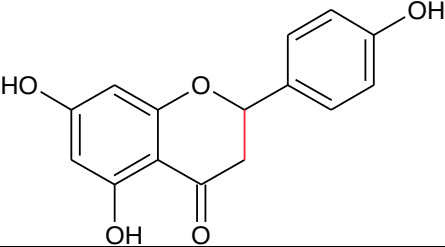
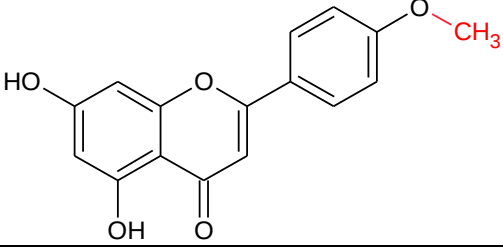
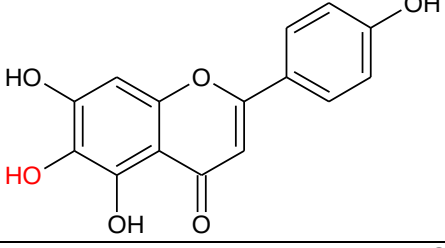
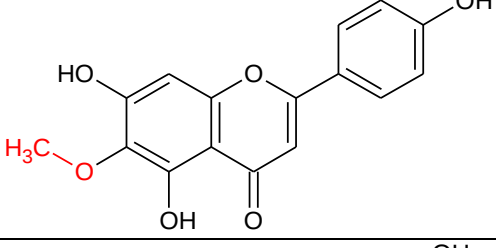
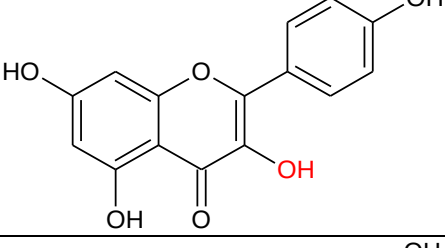
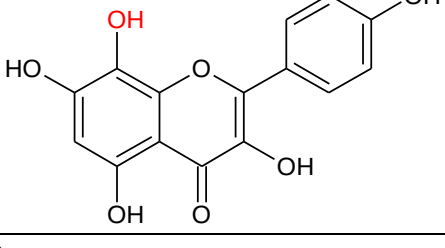
Scrophularia lucida (L.) zeigte in diesen Versuchen sowohl eine starke Wachstumshemmung von promyeloischen leukämischen Zellen durch Apoptose, als auch die beste Wirkung im CCID-Assay an MCF7-Sphäroiden auf Lymphendothelzellen. Durch Inhibierung von NF- κ B konnte ein Mechanismus, der mit der Bildung von CCIDs in Verbindung gebracht wird, gehemmt werden [8], [11].

Da es zu *Scrophularia lucida* noch keine phytochemischen Untersuchungen gab, wurde im Zuge vorangegangener Diplomarbeiten das Extrakt weiter fraktioniert um die Inhaltsstoffe dieser Art aufzuklären. Im Rahmen dieser Auftrennungen wurden die einzelnen Fraktionen im CCID-Assay getestet. In einer der wirksamsten Fraktionen wurde das Flavonoid Hispidulin in hoher Konzentration nachgewiesen [16, 17, 18].

Auch ein anderes Flavonoid, Baicalein, hatte eine gute Wirkung gegen die CCID-Bildung gezeigt [6]. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung struktureller Eigenschaften von Flavonoiden auf ihre Wirkung im CCID-Assay untersucht werden.

Metastasierung spielt nicht nur bei Brustkrebs eine wichtige Rolle, sondern auch bei Darmkrebs, der sowohl in Blut- als auch in Lymphgefäße metastasiert. Deshalb sollte die Testung auch an einer Darmkrebszelllinie (SW620) durchgeführt werden.

Tab. 1. Flavonoide für die Testung

Apigenin	
Naringenin *	
Acacetin *	
Scutellarein *	
Hispidulin *	
Kämpferol *	
Herbacetin *	

* Veränderungen abgeleitet von Apigenin

Ausgehend vom Hispidulin wurde eine Reihe von 4'-Hydroxy- bzw 4'-Methoxyflavonoiden untersucht. Die jeweiligen Veränderungen in der Strukturformel werden in Tabelle 1 (Seite 9) ausgehend vom Apigenin, der einfachsten Verbindung dieser Reihe, in rot dargestellt.

3 Material

Im Zuge der praktischen Arbeit wurden folgende Materialien verwendet:

3.1 Zellen

Die verwendeten Colonkarzinomzellen (SW620) stammten von der Firma ATCC. Die Mammakarzinomzellen (MCF7) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Kari Alitalo von der Molecular Cancer Biology Research Unit der Universität Helsinki zur Verfügung gestellt.

Sowohl Blut- als auch Lymphendothelzellen stammten aus einer Mischung mikrovaskulärer Endothelzellen aus humaner Haut (PromoCell) und wurden nach der Isolierung mit diversen Antikörpern [19] mit TERT (telomerase reverse transcriptase) immortalisiert.

3.2 Medien und Material für die Zellkultur

RPMI-1640 Medium zur Kultivierung der Darmkrebszellen und wurde von der Firma Life Technologies bezogen. Das Medium enthielt bereits L-Glutamin und 25 mM HEPES als Puffer und wurde zusätzlich mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum, bezogen von der Firma Life Technologies) und 1 % P/S (Penicillin/Streptomycin, Firma Gibco) supplementiert. RPMI Medium zur Bildung von SW620-Sphäroiden,

die auf LECs getestet wurden, wurde ebenfalls mit 1 % P/S, jedoch mit nur 2,5 % FCS versetzt, da die Sphäroide dadurch stabiler wurden als mit 10 % RPMI.

DMEM Medium zur Sphäroidbildung für SW620-Sphäroide, die mit BECs co-inkubiert wurden, stammte ebenfalls von der Firma Life Technologies. Es beinhaltete 4,5 g/L D-Glucose und 0,11 g/L Pyruvat, allerdings kein L-Glutamin. Vor der Verwendung wurden 5 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % P/S zugesetzt.

MEM Medium zur Kultivierung der MCF7-Brustkrebszellen wurde von Frau Nicole Huttary vom Department für klinische Pathologie des AKH Wien bereitgestellt. Das Medium war mit 10 % FCS, 1 % P/S, 1 % NEAA (non essential amino acids) und 150 µg/ml Hygromycin B supplementiert. Für die Bildung von Sphäroiden aus den kultivierten MCF7-Zellen wurde dieses Medium ohne FCS und Hygromycin B eingesetzt.

EGM-2MV Medium zur Erhaltung der Endothezellen wurde von der Firma Lonza angekauft. Es bestand aus dem Basalmedium EBM und wurde mit dem CC4147-Kit der Firma Lonza supplementiert. Dieses Kit enthielt:

- 25 ml FBS (fetal bovine serum)
- 2 ml hFGF-b (human recombinant Fibroblast Growth Factor-Beta)
- 0,5 ml VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)
- 0,5 ml R3-IGF-1 (Insulin-like Growth Factor)
- 0,5 ml Ascorbinsäure
- 0,5 ml hEGF (human Epidermal Growth Factor)
- 0,5 ml GA-1000 (Gentamicin/Amphotericin B)
- 0,2 ml Hydrocortison

Weiters wurde DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; Life Technologies) zum Waschen der Zellen bzw. Kulturflaschen, Trypsin (TrypLE™ Express, Life Technologies) zum Dissoziieren der Zellen und grüner Celltracker (CellTracker™

Green CMFDA Dye; Life Technologies) als Fluoreszenzmarker zum Färben der Zellen verwendet.

Die zur Sphäroidbildung benötigte Methylcellulose wurde von der Firma Sigma-Aldrich angekauft. 1,5 g Methylcellulose wurden in 100 ml DMEM gelöst und diese Lösung während der Sphäroidbildung zu Medium und Zellsuspension zugesetzt.

Außerdem wurden 96-Well-Plates (Cellstar®, Greiner Bio-One) zur Anzucht der Sphäroide und 24-Well-Plates (Costar®, Corning Incorporated) für die Aussaat der Monolayer und die Durchführung der Experimente verwendet. Die Kryotubes zum Einfrieren der Zellen stammten ebenfalls von Corning Incorporated.

3.3 Technische Ausstattung

Als Brutschrank für Zellkultur und Inkubation der Assays diente ein Heraeus Cytoperm 2 CO₂ - Inkubator. Die Temperatur im Inkubator betrug 37°C bei einer CO₂-Konzentration von 5% und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Die Assay-Platten wurden mit einem Axiovert-Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss fotografiert und mit der dazugehörigen Software (ZEN Pro Imaging Software 2012, Zeiss) verarbeitet. Die nachfolgende Auswertung der Fotos erfolgte mit der ZEN lite Software der Firma Zeiss.

Dosis-Wirkungs-Beziehungen und statistische Berechnungen wurden mit der Prism 5 Software der Firma GraphPad erstellt.

3.4 Testsubstanzen

Aus folgenden Reinsubstanzen wurden 50mM- bzw. 100mM-Stammlösungen in DMSO hergestellt und verwendet:

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Apigenin
Sigma Aldrich
Steinheim, Deutschland
Nr: SLBG8924V | <ul style="list-style-type: none">• Hispidulin
Sigma Aldrich
Steinheim, Deutschland
Nr: SML0582-5MG |
| <ul style="list-style-type: none">• Naringenin
Sigma Aldrich
Steinheim, Deutschland
Nr: N5893-1G | <ul style="list-style-type: none">• Scutellarein
Sigma Aldrich
Steinheim, Deutschland
Nr: SLBB1966V |
| <ul style="list-style-type: none">• Kämpferol
Carl Roth GmbH
Karlsruhe, Deutschland
Nr: 3689559 | <ul style="list-style-type: none">• Herbacetin
Extrasynthese
Genay Cedex, Frankreich
Nr: 11091301 |
| <ul style="list-style-type: none">• Acacetin
Carl Roth GmbH
Karlsruhe, Deutschland
Nr: 5010 | |

100 mM Stammlösungen von Apigenin und Hispidulin waren bereits vorrätig. Aus den übrigen Substanzen wurden 50 mM Stammlösungen in einer Menge von etwa 100 µl nach folgender Berechnung hergestellt:

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

$$\begin{aligned} 50 \text{ mM} &= 50 \text{ mmol/l} \\ 100 \text{ µl} &= 0,0001 \text{ l} \end{aligned} \quad \Rightarrow \quad m [\text{mg}] = 50 * 0,0001 * MW$$

MW = Molekulargewicht, V = Volumen, c = Konzentration

Tab.2: berechnete Substanzeinwaagen zur Bereitung der 50 mM Stammlösungen

Substanz	Molekulargewicht [mg/mmol]	berechnete Einwaage [mg]
Acacetin	284,26	1,42
Herbacetin	302,24	1,51
Kämpferol	286,23	1,43
Naringenin	272,26	1,36
Scutellarein	286,24	1,43

Da sich diese kleinen Massen nicht genau einwiegen lassen, wurden die berechneten Mengen näherungsweise in Eppendorfgefäße eingewogen und das Volumen des Lösungsmittels für die exakte Konzentration angepasst.

$$V[\mu\text{l}] = \frac{m}{c * MW} * 10^6$$

Die DMSO-Volumina ergaben sich wie folgt:

Tab. 3: Bereitung der Stammlösungen

Substanz	Einwaage [mg]	zugesetzte DMSO-Menge [µl]
Acacetin	1,58	111,2
Herbacetin	1,65	109,2
Kämpferol	1,53	106,9
Naringenin	1,53	112,4
Scutellarein	1,91	133,5

Diese Volumina wurden mit einer Eppendorfpipette in die Mikroreaktionsgefäße überführt und die Substanzen vollständig gelöst. Anschließend wurden die Stammlösungen auf Aliquote von 11 µl aufgeteilt und bei -20 °C für die einzelnen Versuche aufbewahrt.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Die Zellen wurden in 75 cm² bzw. in 25 cm² Flaschen kultiviert.

Die verwendeten Colonkarzinomzellen (SW620) wurden in RPMI Medium 1640, das mit 10% FCS (fetal calf serum) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, kultiviert. Etwa alle 3-4 Tage musste das Medium gewechselt bzw. die Zellen passagiert werden.

Die Mammakarzinomzellen wurden in mit 10 % FCS, 1 % P/S, 1 % NEAA und 150 mg/ml Hygromycin B supplementierten MEM Medium kultiviert. Etwa 1x pro Woche wurden die Zellen passagiert.

Sowohl Blut- als auch Lymphendothelzellen wurden in EGM-2MV-Medium kultiviert. Auch hier wurde das Medium mindestens 2x wöchentlich gewechselt bzw. die Zellen gesplittet.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C bei 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt.

4.1.1 Passagieren

Die Zellen wurden mindestens 2x pro Woche bei einer Konfluenz von 80-90% passagiert.

Dafür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde 1ml Trypsin zupipettiert und die Kulturflasche etwa 3-4 min in den Inkubator gestellt. Der vorangegangene Waschschrift zur

Entfernung von FCS-Rückständen ist essentiell, da sonst die Funktionsweise des Enzyms gestört wäre. Trypsin löst die adhärenenten Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche und trennt die Zellen voneinander. Da es auch die Zellmembranen angreift, muss die Einwirkzeit genau kontrolliert werden. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 9 ml RPMI Medium gestoppt und die erhaltene Zellsuspension zur vollständigen Entfernung des Enzyms 3 min mit 1000 n/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet im jeweiligen Medium resuspendiert. Ein Teil dieser Suspension wurde in neue Kulturflaschen überführt und inkubiert.

Die Karzinomzellen wurden meist im Verhältnis 1:10 passagiert, die Endothelzellen im Verhältnis 1:3 – 1:5, da diese für ein gutes Wachstum Zell-Zell-Kontakte benötigen.

Für Zellen, die in kleinen Flaschen kultiviert wurden, wurde jeweils die Hälfte der angegebenen Reagenzmenge eingesetzt.

4.1.2 Aussaat der Endothelzellen

Für die Experimente war ein konfluent Monolayer aus Endothelzellen notwendig, wofür die Endothelzellen 1 – 2 Tage vor dem Versuch in 24-Well-Platten ausgesät wurden. Die Versuche liefen üblicherweise in 3 Wiederholungen ab, wofür 12 Wells benötigt wurden. Die Aussaat erfolgte aufgrund ähnlicher Arbeitsschritte jeweils während des Passagierverfahrens (Kap. 4.1.1, Seite 15f).

Einzelne Pellets aus dem Passagierverfahren wurden in 10 ml EGM-2MV-Medium resuspendiert und ein Teil dieser Suspension entnommen, mit weiterem Medium im Verhältnis 1:2 oder 1:3 verdünnt und 1 ml in jedes der markierten 12 Wells pipettiert. Anschließend wurde für 24 h – 48 h inkubiert, bevor der entstandene Monolayer verwendet werden konnte.

4.1.3 Sphäroidbildung

Die Bildung der Sphäroide war einer der heikelsten Arbeitsschritte, da sie mehrere Tage zur Ausbildung der benötigten Form und Stabilität brauchten. Eine zu frühe Verwendung hätte aufgrund fehlender Stabilität zum Zerfall der Sphäroide geführt, zu lange Kultivierung hingegen zur Ausbildung eines zu großen nekrotischen Kerns.

Für die Sphäroidbildung wurde das Erhaltungsmedium abgesaugt, die Zellen gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 5 ml RPMI Medium resuspendiert und die Zellen ausgezählt, um die benötigte Menge Zellsuspension zu berechnen (2000 Zellen/Sphäroid bei Colon-, 3000 Zellen/Sphäroid bei Mammakarzinomsphäroiden), die zu einem Gemisch aus Medium und Methylcelluloselösung addiert wurde. Diese Mischung wurde in 96-Well-Platten übergeführt, wobei ein Volumen von 150 µl pro Sphäroid gebraucht wurde, Berechnung siehe Kapitel 4.1.3.1, Seite 18 f.

Colonkarzinomsphäroide für das Aufbringen auf BECs wurden in DMEM + 5% FCS kultiviert, für die Applikation auf LECs in RPMI + 2,5% FCS und Mammakarzinomsphäroide für das Platzieren auf LECs in MEM ohne FCS. Diese unterschiedlichen Kultivierungsmethoden waren notwendig, um die notwendige Stabilität der Sphäroide und eine optimale Interaktion mit dem jeweiligen Monolayer zu garantieren. Zum Beispiel hafteten SW620-Sphäroide, die in DMEM + 5 % FCS kultiviert wurden, nicht ausreichend am Lymphendothel-Monolayer an, um eine CCID-Bildung zu beobachten. Bei Anzucht in RPMI + 2,5 % FCS war das Attachment und damit die CCID-Bildung zufriedenstellend. In allen Fällen betrug die Konzentration an Methylcelluloselösung 20%.

Abschließend wurden die Platten noch 1-2x mit 1000 n/min für 15 min zentrifugiert, um die Zellen in Kontakt zu bringen und so die Bildung von Sphäroiden zu erleichtern und 4-5 Tage inkubiert. Abb. 2 (S. 18) zeigt den Verlauf des Sphäroidwachstums innerhalb von 5 Tagen. Man kann beobachten, dass sich das Sphäroid zuerst scheinbar zusammenzieht, bevor es durch Zellteilung und Wachstum wieder kugeliger und größer wird.

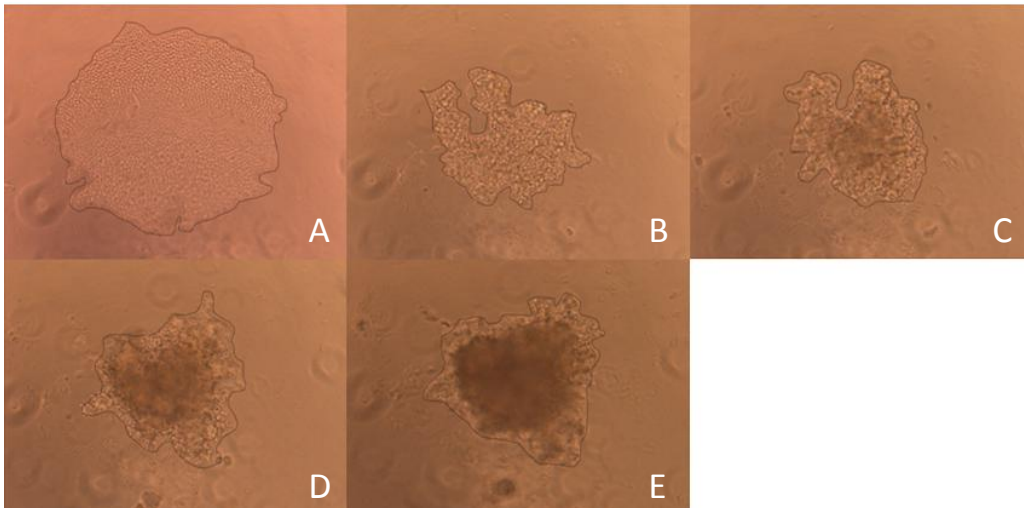


Abb. 2: Verlauf des Sphäroidwachstums

A: Tag 1 nach dem Zentrifugieren; B: Tag 2; C: Tag 3; D: Tag 4; E: Tag 5

Für jedes Sphäroid wurde ein Volumen von 150 μl eines Gemischs aus Medium, Methylcelluloselösung und Zellsuspension eingesetzt. Für 100 Sphäroide wurden 15 ml bereitet.

Da die benötigte Menge an Zellsuspension vernachlässigbar gering ist, floss dieses Volumen nicht in die Berechnung mit ein. Die Endkonzentration der Methylcellulose im Gemisch betrug 0,3 %.

Die Zelldichte bei Konfluenz in einer 75 cm^2 Kulturflasche betrug $8,4 \cdot 10^6$ Zellen, in einer 25 cm^2 Kulturflasche $2,8 \cdot 10^6$ Zellen.

Die nach dem Zentrifugieren und Resuspendieren erhaltene Suspension enthielt also $x \cdot 10^6$ Zellen und wurde vor dem Auszählen noch einmal 1:10 verdünnt, um das Zählen zu erleichtern, wodurch man auf eine Zellzahl von $x \cdot 10^5$ kommt.

Ausgezählt wurde mit Hilfe einer Bürker-Türk-Zählkammer, indem die Anzahl der Zellen in den vier Großquadraten bestimmt wurde und aus den erhaltenen Werten der Mittelwert berechnet wurde.

Die notwendige Menge an Zellsuspension (= X) wurde anschließend folgendermaßen berechnet:

$$X = \frac{\text{benötigte Zellmenge}}{\text{vorhandene Zellmenge}}$$

Da pro Sphäroid 2000 Zellen (bzw. 3000 bei MCF-7-Sphäroiden) benötigt wurden, brauchte man insgesamt 2 (bzw. 3) * 10⁵ Zellen.

Die errechnete Menge Zellsuspension wurde zur Medium-Methylcellulose-Mischung zupipettiert.

4.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Für die Aufrechterhaltung von Kulturen mit niedriger Passagezahl wurden immer wieder Zellen bei -80 °C gelagert.

Beim Einfrieren mussten sich die Zellen noch in der Teilungsphase befinden und eine Konfluenz von etwa 70 % aufweisen. Die Zellen einer 75 cm²-Kulturflasche wurden auf 3 Kryotubes verteilt.

Vorbereitend wurden 3 Kryotubes beschriftet, mit je 100 µl DMSO befüllt und auf Eis gestellt.

Die Zellen wurden gewaschen, mit Trypsin versetzt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde je nach Zellart entweder in 2,7 ml Medium (Tumorzellen) oder FCS (Endothelzellen) resuspendiert und je 900 µl der Suspension in die Kryotubes übergeführt und mit dem vorgelegten DMSO gemischt. Hier musste schnell gearbeitet werden und die Mischung sofort auf Eis gestellt werden, da DMSO zytotoxisch wirkt. Nach 15-minütigem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen in einem Gefrierschank bei -80 °C aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden 2 ml erwärmtes Medium vorbereitet. Sobald die Zellsuspension aufgetaut war, wurde sie in das vorbereitete Medium übergeführt und zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Nach Absaugen des Überstandes wurde in frischem Medium resuspendiert und die Suspension in eine 25 cm² Kulturflasche übergeführt, wo die Zellen anwachsen konnten. Je nach Wachstum wurden die Zellen nach 1-3 Tagen in eine große Kulturflasche gebracht und konnten nach dem Anwachsen für die Experimente verwendet werden.

4.2 CCID-Assay

Vor dem Start des Experiments musste die Konfluenz des Monolayers und die Qualität der Sphäroide überprüft werden. Der Assay wurde immer in EGM-2MV durchgeführt.

Um die Endothelzellen für die Auswertung sichtbar zu machen, wurde der Monolayer zuerst mit DPBS gewaschen und anschließend mit Celltracker Green (0,2 µl/ml Medium, mindestens 1 h Inkubation) angefärbt.

Während der Inkubation mit dem Celltracker wurde für jedes Well ein 15-ml-Tube vorbereitet, in dem 1 ml DPBS vorgelegt wurde. In jedes dieser Röhrchen wurden 8 Sphäroide übergeführt, wobei die Spitzen einer 1-ml-Eppendorfpipette abgeschnitten wurde, um zu große Scherkräfte auf die Sphäroide und damit deren Zerfall zu verhindern.

Nach dem Transfer wurden in neuen 15-ml-Tubes je 3 ml Medium vorgelegt, in welchen die Flavonoid-Stammlösungen zu den jeweiligen Endkonzentrationen (10 µM, 25 µM, 75 µM bzw. 50 µM bei Acacetin) verdünnt wurden.

Zuerst wurden die 50 mM Stammlösungen in Eppendorfgefäßen mit DMSO auf 10 mM und 25 mM verdünnt. 100 mM Stammlösungen wurden auf 10 mM, 25 mM und 75 mM verdünnt.

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

Tab. 4: Berechnung aus 50 mM Stammlösung

Konzentration	Menge Stammlösung	DMSO
25 mM	2,5 µl der 50 mM St.lsg*	2,5 µl
10 mM	1 µl der 50 mM St.lsg*	4,0 µl

*St.lsg = Stammlösung

Tab. 5: Berechnung aus 100 mM Stammlösung

Konzentration	Menge Stammlösung	DMSO
75 mM	7,5 µl der 100 mM St.lsg	2,5 µl
25 mM	3 µl der 75 mM St.lsg	6,0 µl
10 mM	2,8 µl der 25 mM St.lsg	4,2 µl

*St.lsg = Stammlösung

Von den hergestellten Verdünnungen wurden je 3 µl zum Medium in den Tubes hinzugefügt, um die gewünschten Endkonzentrationen der Substanzen zu erhalten. Für die Endkonzentration von 75 µM aus 50 mM Stammlösung wurden je 4,5 µl der Stammlösung zum Medium zupipettiert.

In einem weiteren 15-ml-Tube wurden ebenfalls 3 ml Medium vorgelegt und mit DMSO versetzt, sodass am Ende eine Konzentration von 0,1 % bzw. 0,15 % DMSO im Medium bestand. Dies diente zur Kontrolle, um Lösungsmittelleffekte auszuschließen.

Nach dem Absetzen der Sphäroide konnte Überstand vollständig abgesaugt werden. Anschließend wurden je 3 Tubes mit je 1 ml der verschiedenen Testsubstanzen bzw. der Kontrolllösung versetzt, wobei die Sphäroide leicht aufgewirbelt wurden, um einheitlichen Kontakt mit der Untersuchungslösung zu gewährleisten, und 30 min inkubiert.

Nachdem der Celltracker mindestens 1 Stunde auf die Endothelzellen eingewirkt und sie angefärbt hatte, musste er vollständig entfernt werden und anschließend 1x mit 1 ml DPBS und danach 1x mit je 1 ml Medium gewaschen werden. Das Medium wurde bis zum Transfer der Sphäroide auf dem Monolayer belassen und verhinderte das Austrocknen der Zellen. Dann wurde es abgesaugt, und der Inhalt jedes Tubes in ein Well mit übergeführt.

Abschließend wurden SW620-Sphäroide die auf BECs platziert wurden und MCF7-Sphäroide, die auf LECs aufgebracht wurden für 3 h bzw. SW620-Sphäroide, die auf LECs appliziert wurden für 4 h inkubiert.

Auswertung

Nach der Inkubation wurde für etwa 10 min im Kühlschrank abgekühlt und danach unter einem Axiovert Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Dabei wurden pro Sphäroid zwei Fotos gemacht: eines mit üblicher Beleuchtung und eines mit UV-Licht und FITC-Filter, wodurch die gefärbten Endothelzellen sichtbar gemacht wurden.

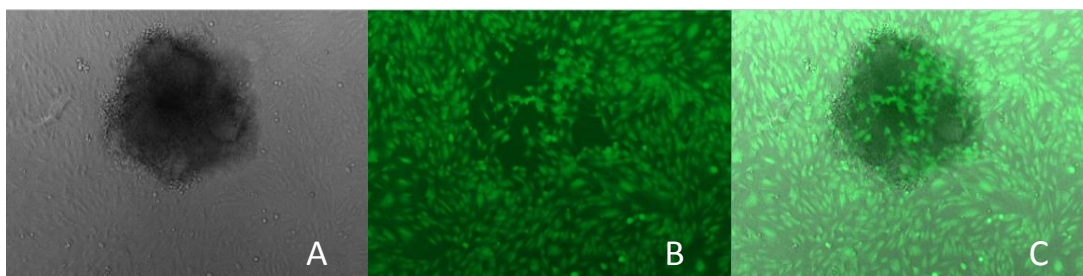


Abb. 3: Axiovert Fotos. A: Normalbeleuchtung B: UV-Licht und FITC-Filter C: beide Fotos übereinandergelegt

Für die Auswertung wurde die Größe der von den Sphäroiden im Monolayer gebildeten CCIDs im Bezug auf die Sphäroidgröße gemessen. Dazu wurden die Konturen der Sphäroide bzw. der entstandenen Löcher (= CCIDS) mit Hilfe der Zen lite Software umrandet und automatisch die Flächen berechnet. Diese wurden in einer Excel-Datei normiert, indem $\text{CCID-Fläche} / \text{Sphäroidfläche}$ berechnet wurde.

Für jede Konzentration der Testsubstanzen bzw. für die Kontrolle wurden jeweils mindestens 12 Sphäroide und die gebildeten CCIDs zur Berechnung herangezogen. Von den erhaltenen CCID/Sphäroid-Werten der Kontrolle wurde der Mittelwert berechnet und als 100 % - Wert gesetzt. Von den CCID/Sphäroid-Werten der mit Untersuchungslösung behandelten Sphäroide, wurden die Prozentwerte im Bezug auf den Mittelwert der Kontrolle berechnet und diese in die Prism-Dateien eingefügt. Dasselbe galt auch für die Werte der Kontrolle.

Aus diesem Datensatz wurden die Dosis-Wirkungs-Grafiken erstellt und Statistikberechnungen durchgeführt. Signifikanzberechnungen beruhten auf einem gepaarten t-Test, zusätzlich wurde ein Kruskal-Wallis-Test ausgeführt.

5 Ergebnisse

Die sieben Testsubstanzen wurden jeweils in 3 Systemen getestet:

1. SW620-Sphäroide + BECs
2. SW620-Sphäroide + LECs
3. MCF7-Sphäroide + LECs

Die Versuche wurden wie in Kapitel 4.2 (Seite 20ff) beschrieben durchgeführt.

5.1 Ergebnisse der CCID-Assays

5.1.1 Wirkung von HISPIDULIN

Hispidulin stellte die Hauptkomponente einer wirksamen Fraktion des methanolischen Extrakts von *Scrophularia lucida* dar [18] und war der Ausgangspunkt für die Testung.

Zur Testung von Hispidulin wurden die Colonkarzinomsphäroide in beiden Versuchen mit RPMI + 10 % FCS gebildet. Da die Sphäroide dadurch sehr groß und wenig stabil waren, wurden andere Medien auf ihre Eignung zur Kultivierung untersucht. Die besten Ergebnisse bezüglich Größe, Form, Stabilität und Attachment der Sphäroide erzielte man mit DMEM + 5 % FCS für SW620-Sphäroide + BECs und RMPI + 2,5 % FCS für SW620-Sphäroide + LECs, weshalb die Sphäroide für die weiteren Versuche in diesen Medien kultiviert wurden. Die Inkubationszeit für die Kombination SW620-Sphäroide + LECs wurde aufgrund des immer noch suboptimalen Attachments der Sphäroide am Monolayer von 3 h auf 4 h angepasst.

5.1.1.1 Wirkung von Hispidulin auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tab. 6: Parameter Hispidulin mit SW620 + BECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	13	100	52,93 µM
10 µM	14	81,33	
25 µM	14	66,71	
75 µM	14	39,51	

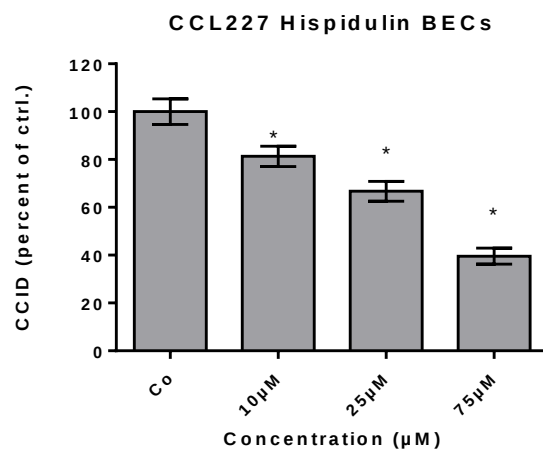


Abb. 4: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Hispidulin für SW620-Sphäroide auf BECs.

Die Substanz führte zu einer dosisabhängigen Inhibierung der CCID-Formation in Blutendothelzellschichten. Die IC₅₀ wurde in der höchsten Konzentration unterschritten.

5.1.1.2 Wirkung von Hispidulin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tab. 7: Parameter Hispidulin mit SW620 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	13	100	45,75 µM
10 µM	14	77,26	
25 µM	11	54,73	
75 µM	12	43,33	

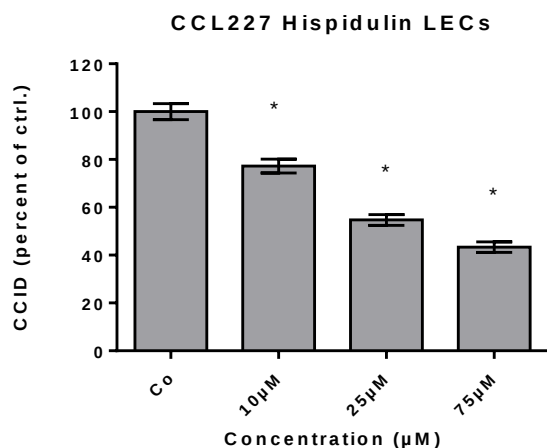


Abb. 5: Dosis-Wirkungs- Verlauf von Hispidulin für SW620-Sphäroide auf LECs.

Auch auf Lymphendothelzellen war eine gute Hemmung der CCID-Bildung in Abhängigkeit zur Konzentration der Substanz zu beobachten.

5.1.1.3 Wirkung von Hispidulin auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tab. 8: Parameter Hispidulin mit MCF7 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	12	100	88,65 µM
10 µM	14	85,28	
25 µM	14	84,52	
75 µM	13	57,38	

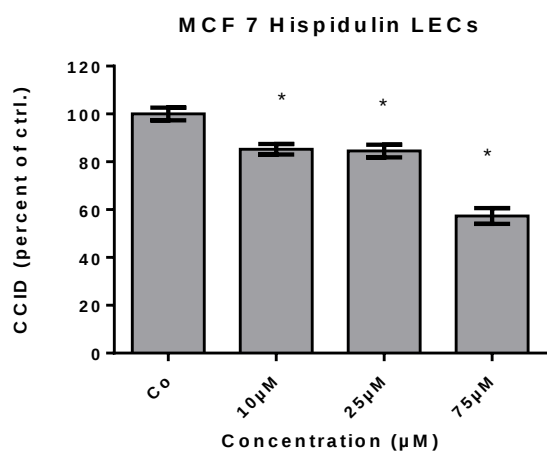


Abb. 6: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Hispidulin für MCF7-Sphäroide auf LECs.

In diesem Testsystem war eine Abhängigkeit von der Dosis weniger gut sichtbar, die Wirkung von Hispidulin auf MCF7-Sphäroide war nicht so gut wie auf SW620-Sphäroide. Die IC₅₀ wurde nicht erreicht, der extrapolierte IC₅₀-Wert liegt bei 88,65 µM.

Wie nach der Extraktion des Flavonoids aus einer wirksamen Fraktion des methanolischen Extrakts von *Scrophularia lucida* erwartet, zeigte die Substanz einen antiintrasvasiven Effekt im Assay. Die beste Wirkung erzielte man mit einer Konzentration von 75 µM mit Darmkrebssphäroiden auf Blutendothelzellen. Auf Lymphendothelzellen wurde zwar bereits in geringeren Konzentrationen eine bessere Hemmung der CCID-Bildung erzielt, allerdings flachte die Wirkung mit zunehmender Konzentration ab. An Brustkrebssphäroiden auf LECs wurde die geringste Wirkung beobachtet.

5.1.2 Wirkung von APIGENIN

Apigenin ist die strukturell einfachste Verbindung der gesamten Testreihe. Sie unterscheidet sich vom Hispidulin durch das Fehlen der Methoxy-Gruppe in Position 6.

5.1.2.1 Wirkung von Apigenin auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tab. 9 Parameter Apigenin mit SW620 + BECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	12	100	39,88 µM
10 µM	14	82,80	
25 µM	12	62,11	
75 µM	14	26,92	

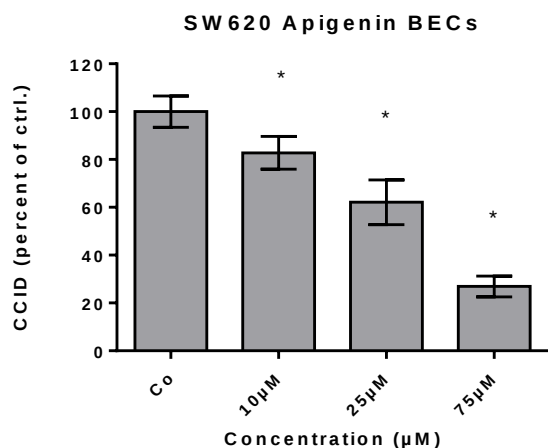


Abb. 7.: Dosis-Wirkungs- Verlauf von Apigenin für SW620-Sphäroide auf BECs.

Die Behandlung mit Apigenin zeigte sich eine etwas höhere Standardabweichung als bei Hispidulin, wobei eine deutliche Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit und eine starke Hemmung der CCIDs bei einer Konzentration von 75 µM zu beobachten waren.

5.1.2.2. Wirkung von Apigenin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tab. 10: Parameter Apigenin mit SW620 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	14	100	18,91 µM
10 µM	12	78,46	
25 µM	13	31,63	
75 µM	12	22,21	

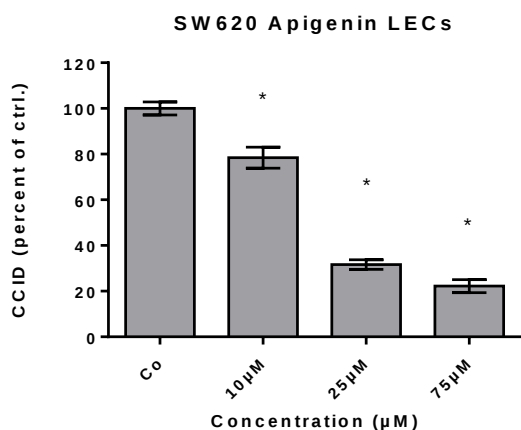


Abb. 8.: Dosis-Wirkungs- Verlauf von Apigenin mit SW620-Sphäroiden auf LECs.

Ähnlich wie bei Hispidulin in diesem Testsystem wurde auch hier bereits bei niedrigen Konzentrationen eine gute Wirkung erzielt. Bei der höchsten getesteten Konzentration betrug die Größe der CCIDs nur mehr etwa ein Fünftel im Vergleich zu unbehandelten Sphäroiden. Die Abnahme der Defekte im Monolayer ist in Abb. 9. zu sehen.

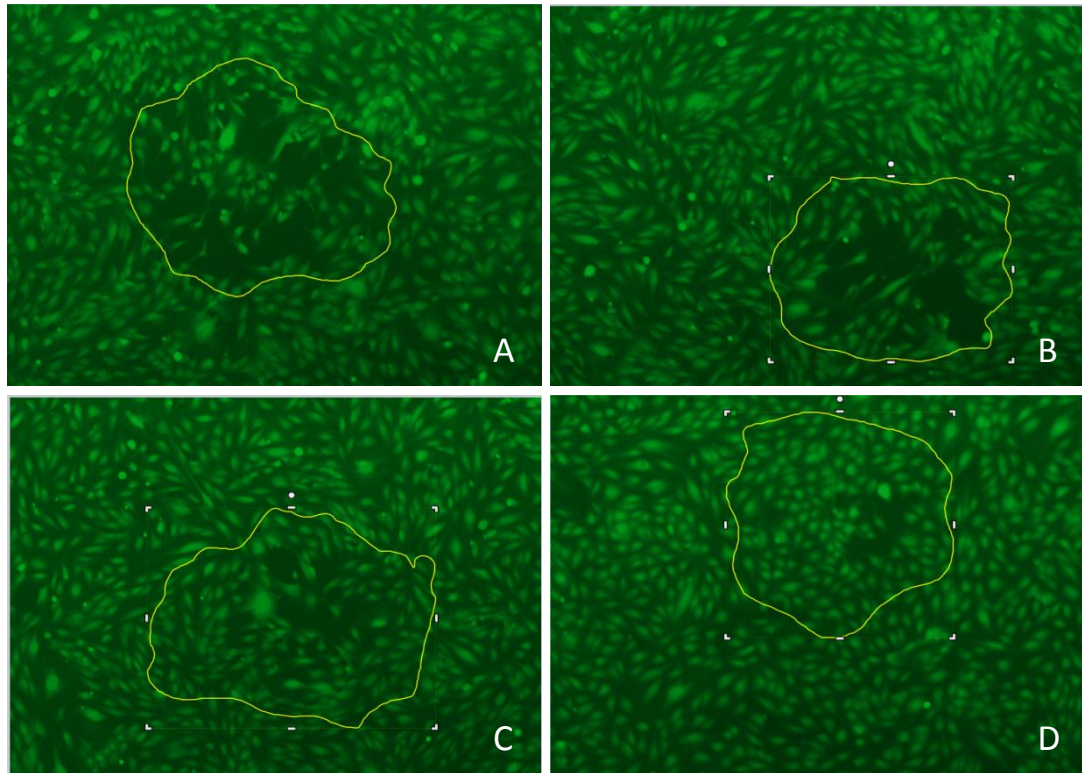


Abb. 9: Abnahme der CCIDs durch die Behandlung mit steigenden Konzentrationen Apigenin (A: Kontrolle; B: 10 µM; C: 25 µM, D: 75 µM). Die gelben Konturen zeigen die Umrissse der darüberliegenden Sphäroide.

5.1.2.3 Wirkung von Apigenin auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tab 11: Parameter Apigenin mit MCF7 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	16	100	34,11 µM
10 µM	16	88,77	
25 µM	13	55,37	
75 µM	14	25,90	

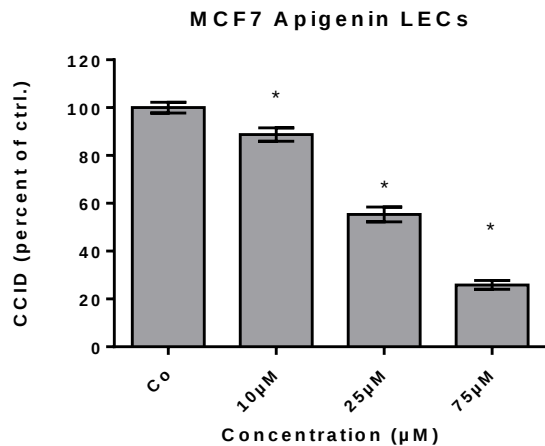


Abb. 10: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Apigenin für MCF7-Sphäroide auf LECs.

Auch bei der Inkubation von behandelten MCF7-Sphäroiden und LECs zeigte Apigenin eine deutliche Verkleinerung der CCIDs. Der Effekt war vergleichbar mit dem des Testsystems Darmkrebssphäroide auf Blutendothelzellen.

Apigenin reduzierte die Fläche der CCIDs im Monolayer in allen drei Testsystemen annähernd gleich gut. Die intravasativen Eigenschaften von Colonkarzinom-Sphäroiden ins Lymphsystem wurden besonders effektiv unterbunden, da hier schon bei einer Substanzkonzentration von 25 µM eine Reduktion der CCIDs um mehr als zwei Drittel im Vergleich zur Kontrolle erzielt wurde. Insgesamt dürfte die Substanz - sofern sie am Wirkort verfügbar gemacht werden kann - eine gute Eignung für die Inhibierung einer Intravasation von Krebszellen sowohl in Blut- als auch in Lymphgefäße besitzen.

5.1.3 Wirkung von NARINGENIN

Naringenin ist das dem Flavon Apigenin entsprechende Flavanon mit dem selben Substitutionsmuster. Die Substanz ist durch die fehlende Doppelbindung nicht gelb gefärbt wie die anderen Testsubstanzen, sondern farblos.

5.1.3.1 Wirkung von Naringenin auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tab. 12: Parameter Naringenin mit SW620 + BECs (0,15 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC50
Control	13	100	nicht extrapoliert
10 μ M	13	97,87	
25 μ M	14	97,64	
75 μ M	12	92,58	

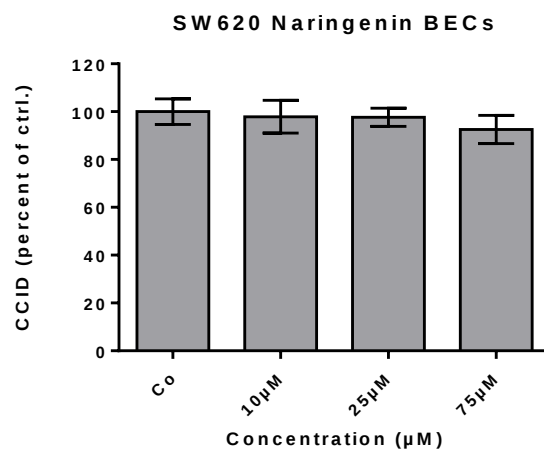


Abb. 11: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Naringenin für SW620-Sphäroide auf BECs.

Naringenin zeigte bei keiner der eingesetzten Substanzkonzentrationen einen Effekt auf die CCID-Bildung, die Veränderungen in der CCID-Fläche waren marginal. Eine Extrapolation der IC₅₀ war daher nicht sinnvoll.

5.1.3.2 Wirkung von Naringenin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tab. 13: Parameter Naringenin mit SW620-Sphäroiden + LECs (0,15 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	12	100	nicht extrapoliert
10 µM	14	89,52	
25 µM	13	89,27	
75 µM	13	79,17	

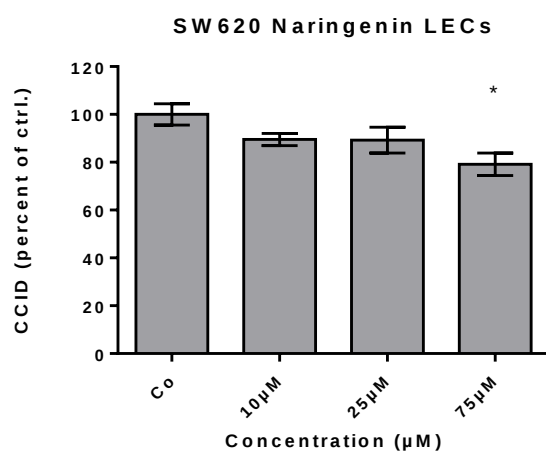


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Naringenin für SW620-Sphäroide auf LECs.

Lediglich bei Behandlung mit 75 µM Naringenin war eine signifikante Reduktion der CCID-Fläche zu beobachten. Der Effekt war jedoch zu gering, um eine antiintrasative Wirkung abzuleiten.

5.1.3.3 Wirkung von Naringenin auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tab. 14: Parameter Naringenin mit MCF7 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	16	100	nicht extrapoliert
10 µM	16	95,03	
25 µM	16	94,37	
75 µM	15	88,82	

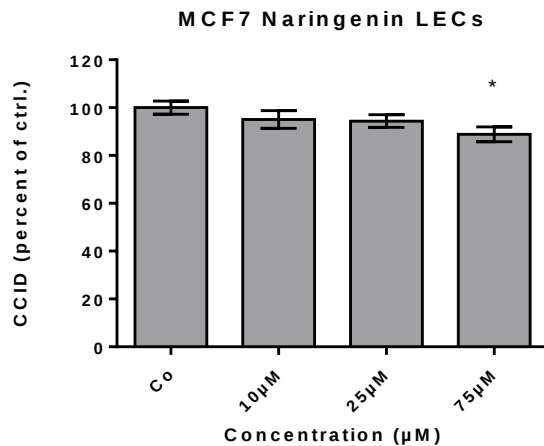


Abb. 13: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Naringenin für MCF-7-Sphäroide auf LECs.

Auch hier war ein signifikanter Effekt nach Behandlung mit 75 µM zu sehen. Dieser war jedoch noch geringer als im vorangegangenen Versuch, weshalb auch in diesem Experiment die Substanz als unwirksam betrachtet werden musste.

Insgesamt zeigte Naringenin in keiner Versuchsanordnung eine Wirkung. Da der einzige strukturelle Unterschied zu Apigenin das Fehlen der Doppelbindung in Position 2-3 ist, liegt die Vermutung nahe, dass die Doppelbindung essentiell für die Hemmung der CCID-Formation ist.

5.1.4 Wirkung von ACACETIN

Acacetin unterscheidet sich von Apigenin durch die Methylierung der Hydroxylgruppe in Position 4'. Die Lipophilie dieses Flavonoids ist dadurch erhöht, was eine Verschlechterung der Löslichkeit im hydrophilen Medium bewirkte.

Bei der Testung von Acacetin musste die höchste Konzentration von 75 µM auf 50 µM herabgesetzt werden, da bei der höheren Konzentration keine ausreichende Löslichkeit mehr gegeben war.

5.1.4.1 Wirkung von Acacetin auf SW620-Sphäroide auf BECS

Tab.15: Parameter Acacetin mit SW620 + BECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	16	100	35,96 µM
10 µM	18	98,89	
25 µM	17	84,78	
50 µM	13	5,48	

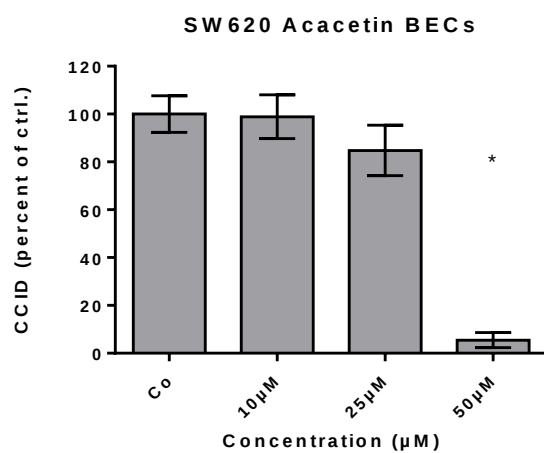


Abb. 14: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Acacetin für SW620-Sphäroide auf BECs.

Die signifikante Wirkung von 50 µM Acacetin war hauptsächlich auf ein Interferieren der Substanz mit dem Attachment der Sphäroide am Monolayer zurückzuführen. Bei dieser Konzentration waren nur mehr 3 Sphäroide gut an den Blutendothelzellen angelagert, die 10 anderen Sphäroide zeigten keine CCID-Bildung. Aber auch bei niedrigeren Konzentrationen waren das Attachment und damit auch die Formation von CCIDs bei einigen Sphäroiden herabgesetzt, womit die hohen Standardabweichungen erklärt werden können.

Die Richtigkeit des berechneten IC₅₀-Werts ist fraglich, da die Hemmung der CCID-Bildung hauptsächlich auf eine fehlende Interaktion der Sphäroide mit dem Monolayer begründet ist.

5.4.1.2 Wirkung von Acacetin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tab. 16: Parameter Acacetin mit SW620 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	16	100	32,87 µM
10 µM	16	89,38	
25 µM	17	72,62	
50 µM	16	16,34	

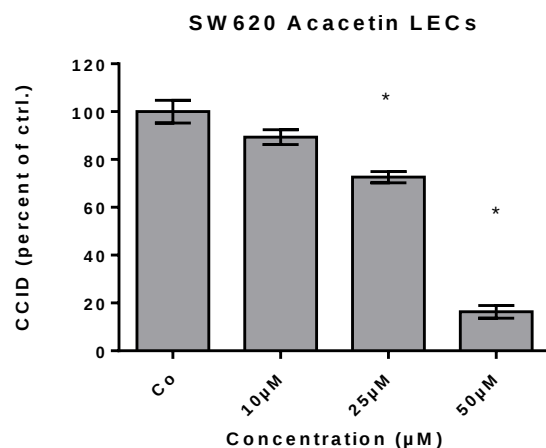


Abb. 15: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Acacetin für SW620-Sphäroide auf LECs.

In diesem Experiment beeinflusste die Substanz die Anhaftung der Sphäroide am Monolayer kaum. Nur in der höchsten Konzentration war bei 3 Sphäroiden kein Attachment gegeben. In diesem Versuch wurde eine gute Wirkung von Acacetin nachgewiesen, wobei ein gutes Attachments fast aller Sphäroide beobachtet wurde.

5.1.4.3 Wirkung von Acacetin auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tab. 17: Parameter Acacetin mit MCF7 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	16	100	36,92 µM
10 µM	17	90,68	
25 µM	18	67,55	
50 µM	18	30,62	

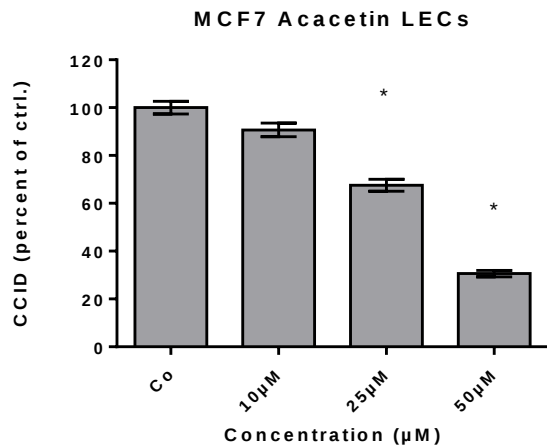


Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Acacetin für MCF7-Sphäroide auf LECs.

An Lymphendothelzellen wurde die CCID-Bildung durch Behandlung von MCF7-Sphäroiden mit Acacetin deutlich und dosisabhängig vermindert. Der IC_{50} -Wert (36,92 µM) entsprach in etwa dem von Apigenin im gleichen Testsystem (34,11 µM).

Der Effekt war bei allen getesteten Konzentrationen sehr konstant, was an den geringen Standardabweichungen erkennbar ist.

Acacetin zeigte in-vitro Potential gegen die Intravasation von Darm- oder Brustkrebszellaggregaten vor allem ins Lymphgewebssystem. Über die Wirkung bei BECs kann aufgrund des zu geringen Attachments der Sphäroide keine Aussage gemacht werden.

Da die Höchstkonzentration von 75µM Acacetin im Medium nicht mehr löslich war und die durch Ausfällung gebildeten Kristalle einen toxischen Effekt auf die Endothelzellen hatten, muss auf alle Fälle abgeklärt werden, ob die Substanz bereits in geringeren Konzentrationen einen cytotoxischen Effekt aufweist.

5.1.5 Wirkung von SCUTELLAREIN

Scutellarein weist im Vergleich mit Apigenin eine zusätzliche Hydroxylgruppe in Position 6 auf. Das Flavonoid ist dadurch hydrophiler.

5.1.5.1 Wirkung von Scutellarein auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tab. 18: Parameter Scutellarein mit SW620 + BECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	15	100	71,68 µM
10 µM	14	79,53	
25 µM	13	67,17	
75 µM	13	48,78	

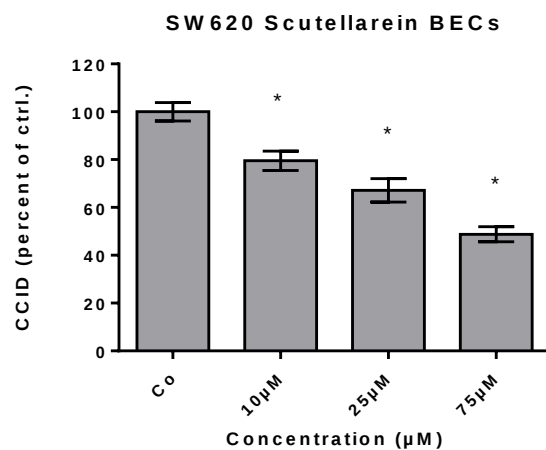


Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Scutellarein für SW620-Sphäroide auf BECs.

Die Größe der CCID-Flächen nahm bei zunehmender Konzentration von Scutellarein kontinuierlich ab, bei der höchsten Konzentration wurde sie in etwa auf die Hälfte reduziert.

5.1.5.2 Wirkung von Scutellarein auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tab. 19: Parameter Scutellarein mit SW620 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	15	100	nicht extrapoliert
10 µM	16	92,00	
25 µM	16	93,29	
75 µM	16	81,38	

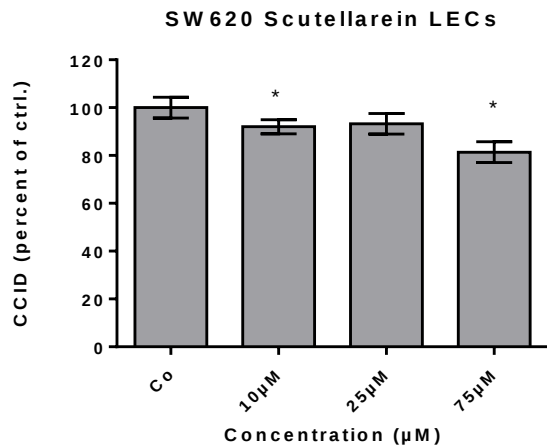


Abb. 18: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Scutellarein für SW620-Sphäroide auf LECs.

In diesem Versuch war die Wirkung deutlich geringer und entsprach ungefähr derjenigen von Naringenin im gleichen Testsystem.

5.1.5.3 Wirkung von Scutellarein auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tab. 20: Parameter Scutellarein mit MCF7 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	15	100	nicht errechenbar
10 µM	13	112,42	
25 µM	14	112,82	
75 µM	16	110,12	

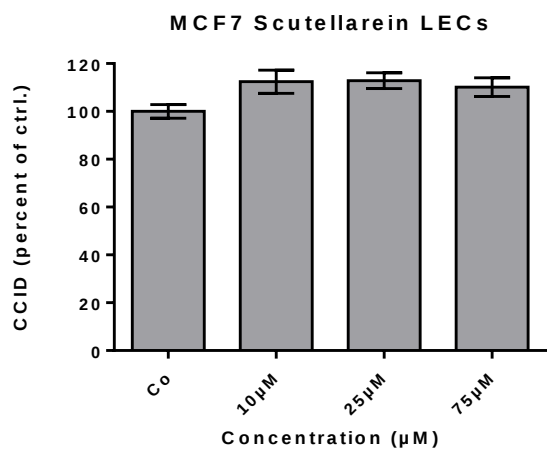


Abb. 19: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Scutellarein für MCF7-Sphäroide auf LECs.

Bei diesem Experiment wurden die CCIDs durch die Behandlung mit Scutellarein sogar geringfügig größer als in der unbehandelten Kontrolle. Ein IC_{50} -Wert war aus dem vorliegenden Datensatz nicht zu errechnen.

Da die drei Versuche mit Scutellarein längere Zeit auseinander lagen und der Effekt der Substanz immer geringer wurde, wurde vermutet, dass die Substanz in der Stammlösung trotz Aliquotierung und Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgebaut worden war.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde das Experiment an SW620-Sphäroiden auf BECs wiederholt, da im ersten Experiment mit diesem Versuchsaufbau (Kap. 5.1.5.1, Seite 37) eine gute Wirkung beobachtet worden war.

5.1.5.4 Wiederholung des Experiments mit Scutellarein auf SW620-Sphäroiden auf BECs

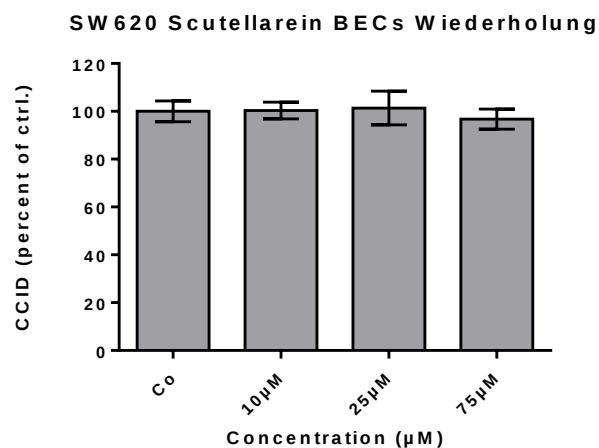


Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Scutellarein für SW620-Sphäroide auf BECs im zweiten Experiment.

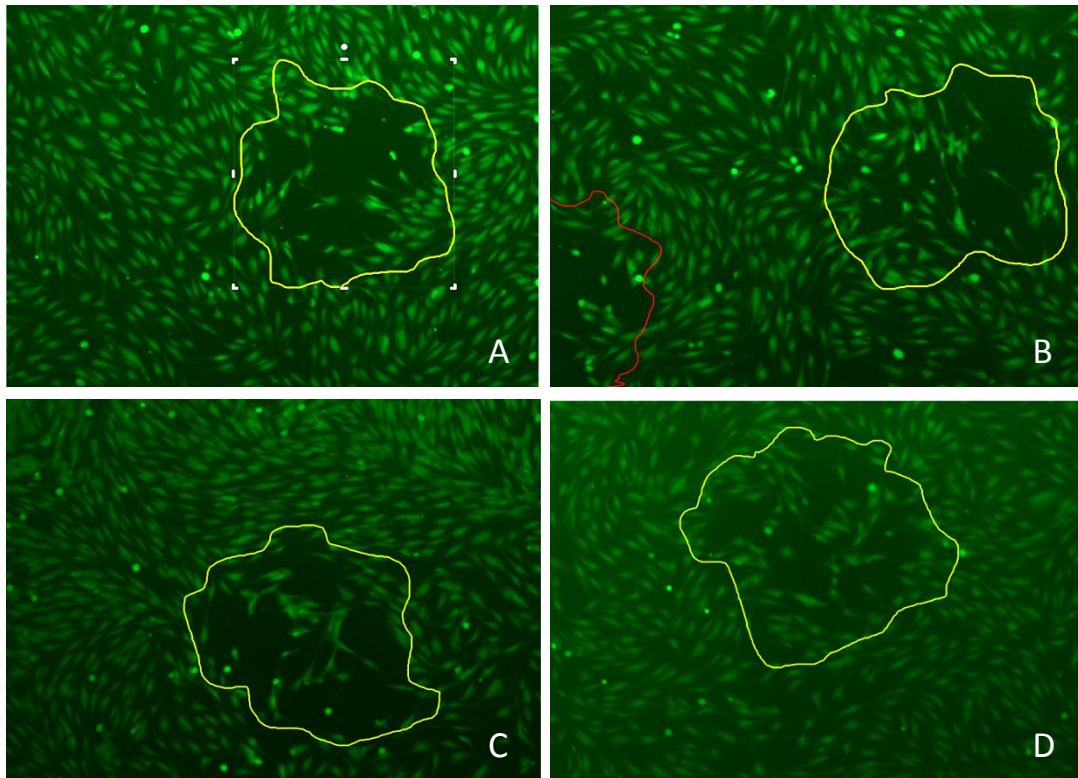


Abb. 21: CCID-Verlauf im Wiederholungs-Experiment von Scutellarein für SW620-Sphäroide auf BECs. (A: Kontrolle $\triangleq$ 100 %; B: 10 μ M, durchschnittliche CCID-Größe: 100,35 %; C: 25 μ M, durchschnittliche CCID-Größe: 101,40 %; D: 75 μ M, durchschnittliche CCID-Größe: 96,76 %). Die gelben Konturen zeigen die Umrisse der darüberliegenden Sphäroide.

Wie in den Abbildungen 20 (Seite 39) und 21 zu sehen ist, hatte Scutellarein bei der Wiederholung des Experiments 3 Monate nach dem ersten Versuch keinen Effekt mehr. Durch die signifikant unterschiedlichen Ergebnisse dieser Versuche (Kap. 5.1.5.1, Seite 37 und Kap. 5.1.5.4, Seite 39f) konnte nachgewiesen werden, dass die Substanz durch die Lagerung Veränderungen erfahren hatte.

Daher war die Auswertung für Scutellarein nicht möglich. Die Testung müsste mit einer für jedes Experiment frisch hergestellten Stammlösung wiederholt werden. Allerdings war dafür im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit nicht ausreichend Zeit vorhanden.

5.1.6 Wirkung von KÄMPFEROL

Kämpferol und Scutellarein besitzen die gleiche Anzahl an Substituenten. Die beiden Flavonoide unterscheiden sich nur durch die Position der vierten Hydroxylgruppe, die sich bei Kämpferol in Position 3 und bei Scutellarein in Position 6 befindet.

5.1.6.1 Wirkung von Kämpferol auf SW620-Sphäroide auf BECs

Tab. 21: Parameter Kämpferol mit SW620 + BECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	18	100	71,55 µM
10 µM	20	84,67	
25 µM	20	72,12	
75 µM	16	48,10	

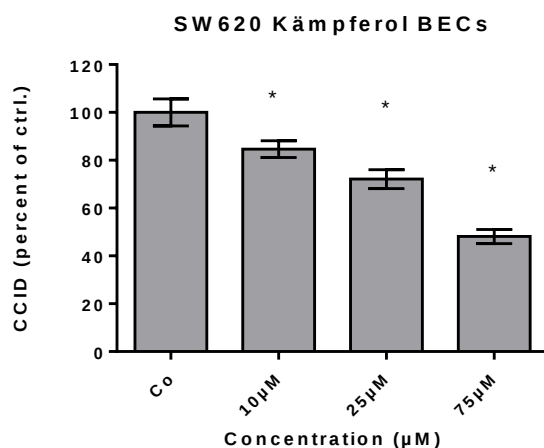


Abb.22 : Dosis-Wirkungs-Verlauf von Kämpferol für SW620-Sphäroide auf BECs.

Kämpferol führte in der höchsten Konzentration zu einer Verminderung der Größe der CCIDs von ca. 50 % und inhibierte damit die CCID-Formation ähnlich gut wie Scutellarein im gleichen Testsystem. Die beiden IC₅₀-Werte – 71,55 µM für Kämpferol und 71,68 µM für Scutellarein – sind fast ident.

5.1.6.2 Wirkung von Kämpferol auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tab. 22: Parameter Kämpferol mit SW620 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	17	100	74,96 µM
10 µM	17	81,78	
25 µM	16	75,57	
75 µM	15	49,98	

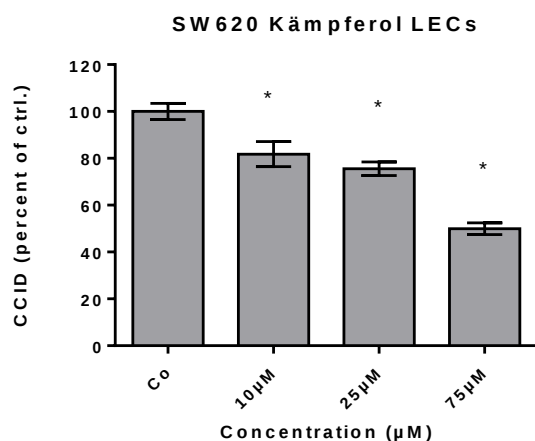


Abb. 23: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Kämpferol für SW620-Sphäroide auf LECs.

Der Einfluss von Kämpferol auf die Gapbildung durch Darmkrebssphäroide verlief auf LECs sehr ähnlich wie auf BECs, was dafür sprechen könnte, dass Mechanismen der CCID-Formation beeinflusst werden, die in beiden Endothelzelltypen eine Rolle spielen.

5.1.6.3 Wirkung von Kämpferol auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tab. 23: Parameter Kämpferol mit MCF7 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	17	100	44,67 µM
10 µM	18	85,41	
25 µM	18	64,16	
75 µM	18	32,80	

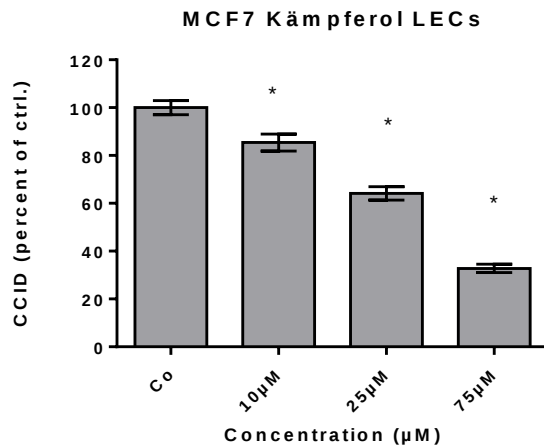


Abb. 24: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Kämpferol für MCF7-Sphäroide auf LECs.

In dieser Versuchsanordnung verlief die Dosis-Wirkungs-Kurve steiler als in den Versuchen mit Colonkarzinom-Sphäroiden und damit war die IC_{50} auch deutlich niedriger als in den Versuchen mit SW620-Sphäroiden. Auch die Standardabweichungen waren relativ gering.

Der Effekt von Kämpferol war nicht auf eine Krebszell- bzw Endothelzellart beschränkt, die CCID-Formation wurde in allen Testsystemen signifikant inhibiert. Ein Grund für die Verkleinerung der Defekte im Monolayer durch Kämpferol könnte die verstärkte Proliferation beider Endothelzelltypen sein, die nach der Inkubation beobachtet wurde (Abb. 25, Seite 44). In der Literatur konnte allerdings keine Bestätigung dieser Theorie gefunden werden.

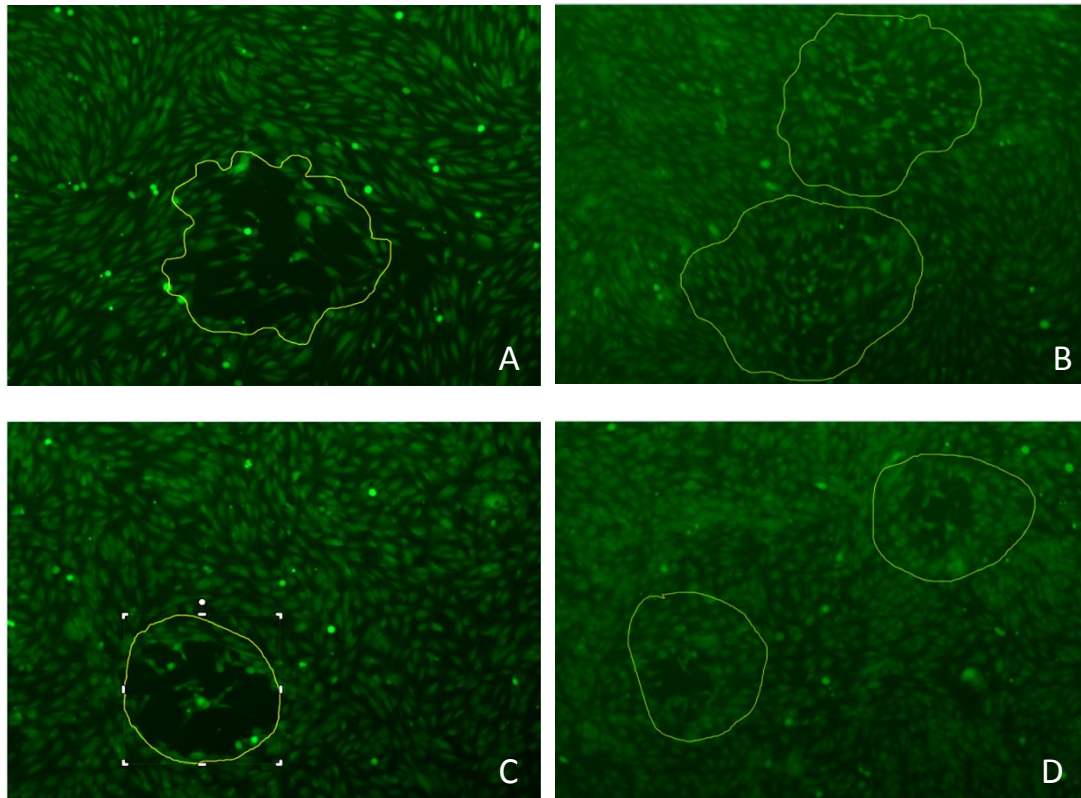


Abb. 25: Vergleich des Monolayers in den Kontrollwells (A und C) und dem bei 75 µM Kämpferol (B und D). Die Endothelzellen in den Substanzwells erscheinen kleiner, aber auch zahlenmäßig mehr, ein Effekt, der sich erst nach der Behandlung mit Kämpferol eingestellt hat. BECs (obere Reihe) und LECs (untere Reihe) sind gleichermaßen betroffen.

5.1.7 Wirkung von HERBACETIN

Herbacetin weist Hydroxylgruppen in den Positionen 3, 5, 7, 8 und 4' auf und ist damit das hydrophilste Molekül der getesteten Flavonoide.

Bei der Zugabe von Herbacetin zum Medium ergab sich ein Farbumschlag des Mediums von hellrosa nach violett. Die anderen Flavonoide - mit Ausnahme des Flavanons Naringenin, das farblos ist - verursachten eine Farbänderung von rosa nach gelb bzw. in niedrigeren Konzentrationen nach gelb-rosa.

Da das Medium Phenolrot als Indikator enthält, der bei steigendem pH-Wert nach Violett umschlägt, und die pH-Messung eine Verschiebung ins Basische nach Zugabe von Herbacetin zum Medium anzeigte (pH ohne Herbacetin 7,77, pH mit Herbacetin 8,15) wäre eine Erklärung für den Farbwechsel die Bildung eines

stabilen Phenolat-Ions. Versuche, die Substanz durch HPLC-Analysen auf Veränderungen zu untersuchen, lieferten keine Nachweise für eine solche Reaktion. Daher ist unklar, ob die Substanz durch Zugabe zum Medium einer chemischen Reaktion unterliegt oder nicht.

5.1.7.1 Wirkung von Herbacetin auf SW620-Sphäroide auf BECS

Tab. 24: Parameter Herbacetin mit SW620 + BECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	15	100	nicht extrapoliert
10 µM	15	96,40	
25 µM	13	94,75	
75 µM	16	91,90	

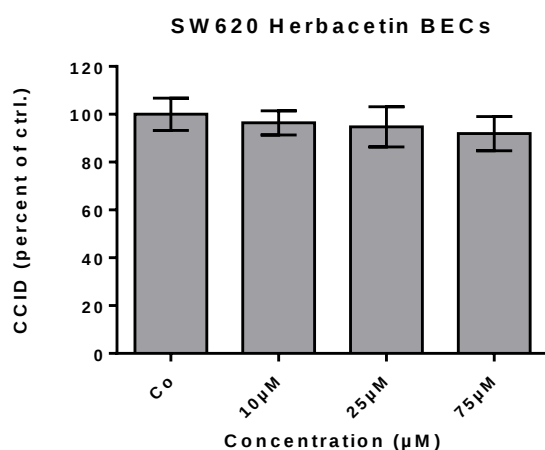


Abb. 26: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Herbacetin für SW620-Sphäroide auf BECs.

Herbacetin verringerte die CCID-Bildung um weniger als 10 %, eine signifikante Wirkung war nicht gegeben. Die IC₅₀ konnte daher wie bei Naringenin nicht extrapoliert werden.

5.1.7.2 Wirkung von Herbacetin auf SW620-Sphäroide auf LECs

Tab. 25: Parameter Herbacetin mit SW620 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	18	100	nicht extrapoliert
10 µM	15	87,75	
25 µM	15	86,32	
75 µM	15	87,38	

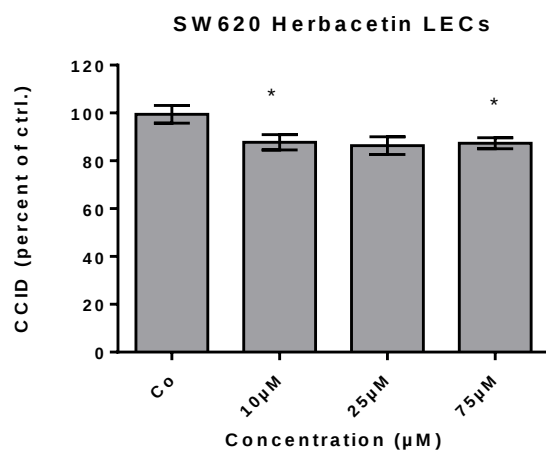


Abb. 27: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Herbacetin mit SW620-Sphäroiden auf LECs.

Der Effekt von Herbacetin auf die CCID-Bildung in LECs war geringfügig besser als bei BECs. Nur die Konzentrationen 10 µM und 75 µM wiesen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Aufgrund des minimalen Effektes wurde keine IC₅₀ errechnet.

5.1.7.3 Wirkung von Herbacetin auf MCF7-Sphäroide auf LECs

Tab. 26: Parameter Herbacetin mit SW620 + LECs (0,1 % DMSO in Kontrolle)

Konzentration	n (Sphäroidanzahl)	CCID (%)	IC ₅₀
Control	16	100	nicht extrapoliert
10 µM	17	99,07	
25 µM	15	97,52	
75 µM	14	97,23	

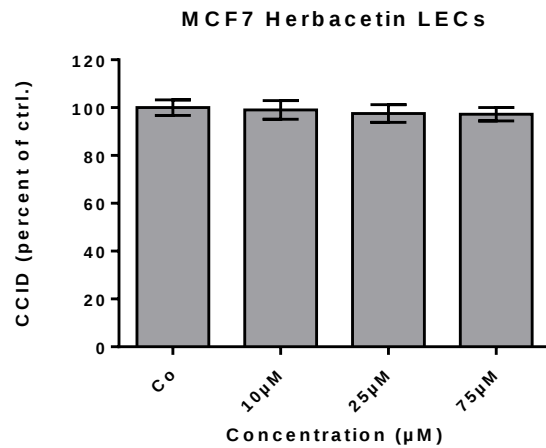


Abb. 28: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Herbacetin mit MCF7-Sphäroiden auf LECs.

In dieser Versuchsanordnung war der Effekt noch geringer als in den Versuchen mit Darmkrebs-Sphäroiden.

Ob die fehlende Wirkung von Herbacetin im Assay an möglichen Veränderungen durch die Zugabe zum Medium liegt, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

5.2. Korrelation der logP-Werte mit der Wirkung der Flavonoide

5.2.1. Hemmung der CCID-Bildung durch SW620-Sphäroide in BEC-Monolayern

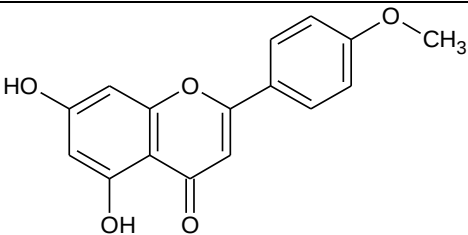
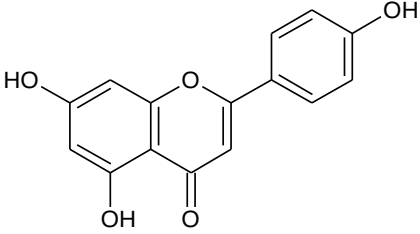
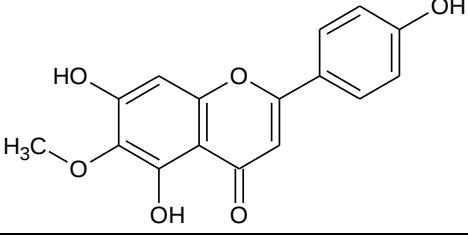
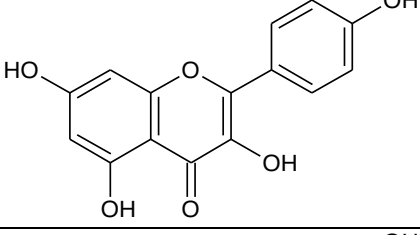
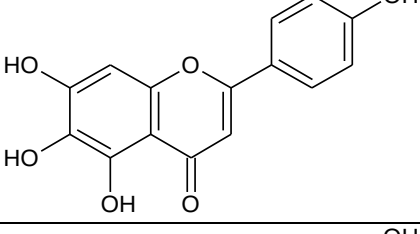
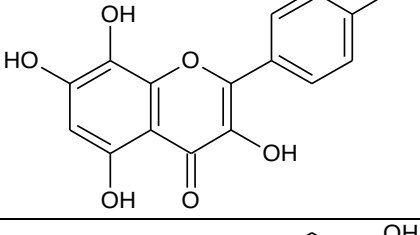
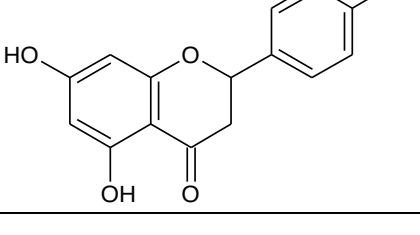
Von den getesteten Flavonoiden erwies sich in diesem Assay Acacetin mit einer IC_{50} von 35,96 μM am wirkungsvollsten. Eine ähnlich gute Wirkung ließ sich auch bei Apigenin mit einer IC_{50} von 39,88 μM beobachten. Daraus kann man ableiten, dass die Methylierung der OH-Gruppe an Position 4' zu einer Verbesserung der Wirkung führt.

Hispidulin mit einer IC_{50} von 52,93 μM zeigte eine moderate Hemmung der CCIDs.

Bei Kämpferol und Scutellarein, die sich nur durch die Position der Hydroxylgruppe am C-3 bzw. C-6 unterscheiden, konnte man einen übereinstimmenden antiintrasvasiven Effekt erkennen. Die IC_{50} lag für Kämpferol bei 71,55 μM , für Scutellarein bei 71,68 μM .

Weder Herbacetin noch Naringenin konnten die Bildung von CCIDs signifikant vermindern. IC_{50} -Werte konnten für beide Flavonoide nicht extrapoliert werden.

Tab. 27: Wirksamkeit der Flavonoide für SW620-Sphäroide auf BECs

1. Acacetin		$IC_{50} = 35,96 \mu M$
2. Apigenin		$IC_{50} = 39,88 \mu M$
3. Hispidulin		$IC_{50} = 52,93 \mu M$
4. Kämpferol		$IC_{50} = 71,55 \mu M$
4. Scutellarein		$IC_{50} = 71,68 \mu M$
5. Herbacetin		n. e.
6. Naringenin		n. e.

n. e. = nicht extrapoliert

Die Wirkung im CCID-Assay nahm mit steigender Zahl an Hydroxylgruppen ab. Kämpferol und Scutellarein, die die gleiche Anzahl an Hydroxylgruppen im Molekül besitzen, zeigten auch eine ähnliche Reduktion der CCIDs. Daraus ließ sich ableiten, dass durch Verknüpfung der OH-Gruppe in Pos. 3 bzw. in Pos. 6 ein ähnlicher Effekt erzielt wird. Ausnahme war Naringenin, wobei bei diesem Molekül vermutlich die fehlende Doppelbindung in Ring C eine größere Rolle spielte als die Anzahl der Hydroxylgruppen.

Aufgrund der Vermutung, dass die steigende Anzahl an hydrophilen Substituenten Grund für eine schwächere Wirkung ist, wurden die log-P Werte der Substanzen berechnet. Je höher dieser Wert ist, desto besser verteilt sich eine Substanz in einem apolaren Lösungsmittel.

Für die Flavonoide der Testreihe wurden folgende logP-Werte berechnet:

Tab.28: LogP-Werte der Testsubstanzen *

Substanz	logP-Wert
Acacetin	2,7980
Apigenin	2,5340
Hispidulin	2,4490
Kämpferol	2,3050
Scutellarein	2,1850
Herbacetin	1,9560
Naringenin	2,3800

Diese Werte bestätigen die Vermutung, dass die Wirkung umso besser ist, je höher die Lipophilie ist. Ausnahme bleibt das Flavanon Naringenin.

5.2.2 Hemmung der CCID-Bildung durch SW620-Sphäroide in LEC-Monolayern

Auch für SW620-Sphäroide, die auf Lymphendothelmonolayern platziert wurden, lieferten Apigenin ($IC_{50} = 18,91 \mu M$) und Acacetin ($IC_{50} = 32,87 \mu M$), die Substanzen mit den höchsten logP-Werten, die besten Ergebnisse. Hispidulin mit einer IC_{50} von $45,75 \mu M$ und Kämpferol, dessen IC_{50} -Wert bei $74,96 \mu M$ lag,

waren schwächer wirksam. Herbacetin und Naringenin hingegen ließen auch nach der Inkubation von SW620-Sphäroiden auf LECs keine deutliche Wirkung erkennen. Scutellarein zeigte ebenfalls keinen Effekt, was eventuell auf die Zersetzung der Substanz während der Lagerung der Stammlösung zurückzuführen war.

5.2.3 Hemmung der CCID-Bildung durch MCF7-Sphäroide in LEC-Monolayern

Die Bildung von CCIDs wurde auch für MCF7-Sphäroide, die mit LECs co-inkubiert wurden, durch Apigenin mit einer IC_{50} von 34,11 μM und Acacetin mit einer IC_{50} von 36,92 μM am stärksten gehemmt. Die drittbeste Wirkung erzielte im Gegensatz zu den Experimenten mit Darmkrebssphäroiden jedoch Kämpferol ($IC_{50} = 44,67 \mu M$), gefolgt von Hispidulin, dessen Effekt mit einer IC_{50} von 88,65 μM deutlich geringer ist als in den beiden Versuchsreihen mit SW620-Sphäroiden. Für Herbacetin und Naringenin war weiterhin keine signifikante Hemmung der CCID-Bildung zu beobachten, während sich die Defekte im Monolayer durch Scutellarein sogar schwach vergrößert zeigten.

Die Abhängigkeit der Wirkung von der Lipophilie ist in dieser Testreihe folglich am wenigsten deutlich ausgeprägt.

Insgesamt ist eine Tendenz in Richtung stärkere Wirkung bei erhöhter Lipophilie zu erkennen. Allerdings liegen für eine endgültige Aussage zu wenige Daten von verschiedenen Flavonoiden vor. Erst nach der Testung von weiteren Vertretern dieser Substanzklasse könnte eine Korrelation zwischen den logP-Werten und der Wirkung im CCID-Assay abzuleiten sein.

6. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war, verschiedene Flavonoide im CCID-Assay zu testen und Daten zur Erstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu generieren.

Ausgangspunkt war die Testung eines methanolischen Extrakts aus *Scrophularia lucida*, das im CCID-Assay an MCF7-Sphäroiden auf LECs eine gute Wirkung gezeigte hatte. Eine sehr gut wirkende Fraktion dieses Extrakts enthielt das Flavonoid Hispidulin als Hauptkomponente [18]. Außerdem, hatte auch das Flavonoid Baicalein eine inhibierende Wirkung im Assay [6].

Da Hispidulin in Position 4' eine Hydroxylgruppe aufweist, wurden als weitere 4'-OH-Flavonoide Apigenin, Naringenin, Kämpferol, Scutellarein und Herbacetin für die Testung herangezogen. Zusätzlich wurde Acacetin als 4'-Methoxyflavon in die Testreihe aufgenommen. Diese Testsubstanzen wurden in je 3 Versuchsreihen auf ihre Fähigkeit, die Bildung von CCIDs in Blut- und Lymphendothelmonolayern zu inhibieren, getestet.

Am Wirksamsten waren Apigenin und Acacetin, die in allen 3 Testsystemen eine IC_{50} von unter 40 μM aufwiesen.

Apigenin führte zur stärksten Hemmung der CCID-Bildung in LECs, die durch SW620-Sphäroide getriggert wurde ($IC_{50} = 18,91 \mu M$). Auch die CCID-Flächen durch Colonkarzinomsphäroide in BECs und durch Mammakarzinomsphäroide in LECs wurden durch Apigenin deutlich verkleinert.

Bei Acacetin war der gute Erfolg an SW620-Sphäroiden auf BECs vor allem auf eine Hemmung der Adhäsion der Sphäroide am Monolayer zurückzuführen. Die inhibierende Wirkung des Flavonoids auf die CCID-Bildung konnte jedoch in den Versuchsanordnungen mit SW620-Sphäroiden auf LECs und MCF7-Sphäroiden ebenfalls auf LECs ohne Interferenz mit dem Attachment reproduziert werden.

Für beide Substanzen ist eine Toxizitätsprüfung an den Endothelzellen notwendig, da die Zellen nach der Behandlung mit 50 μM Acacetin und 75 μM Apigenin im mikroskopischen Bild verändert waren.

Auch Hispidulin und Kämpferol führten in allen drei Versuchsanordnungen zu deutlichen Reduktionen der CCID-Flächen, allerdings waren die IC₅₀-Werte höher als für Apigenin und Acacetin.

Bei den Versuchen mit Hispidulin war die Wirkung weniger ausgeprägt als nach den Versuchen mit der Fraktion des Methanolextrakts erwartet worden war. Daraus könnte man schließen, dass weitere Bestandteile der Fraktion ebenfalls eine Wirkung hatten, die die Wirkung von Hispidulin potenzierten oder additiv wirkten.

Kämpferol führte in hoher Konzentration zu einer scheinbar verstärkten Proliferation der Endothelzellen (s. Abb. 25, Seite 44). Eine vermehrte Zellzahl in den Wells würde jedoch ebenfalls zu einer Verkleinerung der CCID-Flächen führen und damit ein falsch positives Resultat ergeben.

Scutellarein konnte nicht in die Auswertungen einbezogen werden, da die Substanz durch die längere Aufbewahrung der Stammlösungen bei -20 °C Veränderungen unterlag. Obwohl die IC₅₀ des Flavonoids im Experiment mit SW620-Sphäroiden und BECs bei 71,68 µM lag, konnte das Ergebnis in den folgenden Versuchen nicht reproduziert werden. Für aussagekräftige Resultate müssen die Versuche mit einer jeweils frischen Stammlösung wiederholt werden.

Naringenin und Herbacetin zeigten keinen hemmenden Effekt auf die Bildung von CCIDs.

Bei Naringenin könnte dies auf die fehlende Doppelbindung in Position 2-3 zurückzuführen sein. Diese Hypothese muss in weiterführenden Versuchen mit entsprechenden Substanzen bestätigt werden.

Bei Herbacetin könnte die fehlende Wirkung zwei Ursachen haben: Die Farbänderung der Substanz bei der Zugabe zum Medium deutete darauf hin, dass durch einen pH-Anstieg chemische Veränderungen auftraten, die Herbacetin unwirksam machten. Weiterführende Untersuchungen konnten nicht zur Klärung dieser Umsetzungen beitragen. Ein weiterer Grund könnte sein, dass Herbacetin als hydrophilste Testsubstanz mit fünf Hydroxylgruppen zu polar ist, um eine Wirkung zu entfalten.

Die Zahl der getesteten Flavonoide ist allerdings zu gering, um eine endgültige Aussage zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu treffen. Die Hypothesen müssen in weitergehenden Versuchen mit weiteren Flavonoiden überprüft werden. Erst dann können relevante Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung von Flavonoiden im CCID-Assay gefunden werden.

7. Zusammenfassung

Die Metastasierung ist eine der wichtigsten letalen Folgen bei vielen Krebserkrankungen. Daher sind Substanzen, die eine Metastasierung unterbinden, von großem Interesse als neue Therapieoption.

Heilpflanzen wie *Scrophularia lucida* werden seit langer Zeit medizinisch genutzt. In einer aktivitätsgeleiteten Untersuchung hatte eine Fraktion des methanolischen Extraktes aus den oberirdischen Teilen der Pflanze sehr gute Aktivität im CCID-Assay, einem 3D-Zellmodell zur Intravasation. Die Hauptkomponente dieser Fraktion war Hispidulin.

Aufgrund der Tatsache, dass auch andere Flavonoide wie Baicalein eine gute Wirkung im Assay gezeigt hatten, sollten Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden.

Zusätzlich zu Hispidulin wurden 6 weitere Flavonoide mit einer 4'-OH- oder 4'-OCH₃-Gruppe an SW620-Sphäroiden auf BECs und LECs und MCF7-Sphäroiden auf LECs getestet: Apigenin, Acacetin, Herbacetin, Kämpferol, Naringenin und Scutellarein.

Apigenin, Acacetin, aber auch Hispidulin und Kämpferol zeigten eine gute Wirkung in allen Testsystemen. Naringenin und Herbacetin blieben weitgehend unwirksam. Bei Scutellarein kam es im Laufe der Versuchsreihen zu Abbaureaktionen, daher konnten die Ergebnisse nicht in die Auswertung einbezogen werden.

Insgesamt zeigte sich eine Tendenz zu einer stärkeren Hemmwirkung bei erhöhter Lipophilie. Diese Hypothese konnte aufgrund von logP-Werte der einzelnen Substanzen aufgestellt werden. Zur Bestätigung dieser Annahme sind allerdings weitere Versuche mit anderen Flavonoiden notwendig.

8. Summary

Metastasis is one of the main reasons for lethality in cancer. Thus, substances inhibiting metastasis would be of great interest as new treatment options.

Medical plants such as *Scrophularia lucida* are used for long time. In activity-guided studies, a fraction of a methanolic extract of the plant's above-ground parts showed good effects in the CCID-assay, a 3D-cell model that mimics tumor intravasation. The main component of this fraction was hispidulin.

Due to the fact that other flavonoids such as baicalein had shown good results in this assay as well, structure-activity-relations should be explored.

In addition to hispidulin, 6 other flavonoids containing a 4'-OH- or a 4'-OCH₃-group were tested with SW620-spheroids on BECs and LECs and MCF7-spheroids on LECs. Those were apigenin, acacetin, herbacetin, kaempferol, naringenin and scutellarein.

Apigenin, acacetin, but also hispidulin and kaempferol showed good results in the assay. Naringenin and herbacetin were ineffective, whereas scutellarein aged during the series of experiments. Therefore, its impact cannot be evaluated.

In summary, there was a tendency towards a better effect at higher lipophily. This hypothesis was developed based on the logP values of the compounds. The confirmation of this hypothesis requires further experiments with more flavonoids.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sphäroidtypen	3
Abbildung 2: Verlauf des Sphäroidwachstums	18
Abbildung 3: Axiovert Fotos	22
Abbildung 4: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Hispidulin für SW620 auf BECs	25
Abbildung 5: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Hispidulin für SW620 auf LECs	26
Abbildung 6: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Hispidulin für MCF7 auf LECs	26
Abbildung 7: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Apigenin für SW620 auf BECs	28
Abbildung 8: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Apigenin für SW620 auf LECs	28
Abbildung 9: Abnahme der CCIDs durch Apigenin	29
Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Apigenin für MCF7 auf LECs	30
Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Naringenin für SW620 auf BECs	31
Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Naringenin für SW620 auf LECs	32
Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Naringenin für MCF7 auf LECs	33
Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Acacetin für SW620 auf BECs	34
Abbildung 15: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Acacetin für SW620 auf LECs	35
Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Acacetin für MCF7 auf LECs	36
Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Scutellarein für SW620 auf BECs ..	37
Abbildung 18: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Scutellarein für SW620 auf LECs ...	38
Abbildung 19: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Scutellarein für MCF7 auf BECs	38
Abbildung 20: Wiederholung Scutellarein mit SW620 auf BECs	39
Abbildung 21: CCID-Verlauf im Wiederholungsexperiment	40
Abbildung 22: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Kämpferol für SW620 auf BECs	41
Abbildung 23: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Kämpferol für SW620 auf LECs	42
Abbildung 24: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Kämpferol für MCF7 auf LECs	43
Abbildung 25: Vergleich des Monolayers Kontrolle vs. 75 µM Kämpferol	44
Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Herbacetin für SW620 auf BECs	45
Abbildung 27: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Herbacetin für SW620 auf LECs	46
Abbildung 28: Dosis-Wirkungs-Verlauf von Herbacetin für MCF7 auf LECs	47

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Flavonoide für die Testung	9
Tabelle 2: berechnete Substanzeinwaagen zur Bereitung der 50 mM Stammlösung	14
Tabelle 3: Bereitung der Stammlösung	14
Tabelle 4: Berechnung aus 50 mM Stocks	21
Tabelle 5: Berechnung aus 100 mM Stocks	21
Tabelle 6: Parameter Hispidulin mit SW620 + BECs	25
Tabelle 7: Parameter Hispidulin mit SW620 + LECs	25
Tabelle 8: Parameter Hispidulin mit MCF7 + LECs	26
Tabelle 9: Parameter Apigenin mit SW620 + BECs	27
Tabelle 10: Parameter Apigenin mit SW620 + LECs	28
Tabelle 11: Parameter Apigenin mit MCF7 + LECs	29
Tabelle 12: Parameter Naringenin mit SW620 + BECs	31
Tabelle 13: Parameter Naringenin mit SW620 + LECs	32
Tabelle 14: Parameter Naringenin mit MCF7 + LECs	32
Tabelle 15: Parameter Acacetin mit SW620 + BECs	34
Tabelle 16: Parameter Acacetin mit SW620 + LECs	35
Tabelle 17: Parameter Acacetin mit MCF7 + LECs	35
Tabelle 18: Parameter Scutellarein mit SW620 + BECs	37
Tabelle 19: Parameter Scutellarein mit SW620 + LECs	37
Tabelle 20: Parameter Scutellarein mit MCF7 + LECs	38
Tabelle 21: Parameter Kämpferol mit SW620 + BECs	41
Tabelle 22: Parameter Kämpferol mit SW620 + LECs	42
Tabelle 23: Parameter Kämpferol mit MCF7 + LECs	42
Tabelle 24: Parameter Herbacetin mit SW620 + BECs	45
Tabelle 25: Parameter Herbacetin mit SW620 + LECs	46
Tabelle 26: Parameter Herbacetin mit MCF7 + LECs	46
Tabelle 27: Wirksamkeit der Flavonoide für SW620-Sphäroide auf BECs	49
Tabelle 28: logP-Werte der Testsubstanzen	50

11. Literaturverzeichnis

- [1] Müller-Klieser W. (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology – Cell Physiology* 273: C1109-C1123
- [2] Kimlin L. C., Cassagrande G., Virador V. M. (2013) In vitro three-dimensional models in cancer research: an update. *Molecular Carcinogenesis* 52: 167-182
- [3] Krähenbühl T.P., Langer R., Ferreira L.S. (2011) Three-dimensional biomaterials for the study of human pluripotent stem cells. *Nature Methods* 8 (9): 731-736
- [4] Sutherland R., Carlson J., Durand R., Yuhas J. (1981) Spheroids in Cancer Research. *Cancer Research* 41: 2980-2984
- [5] Müller-Klieser W. (2000) Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical Reviews in Oncology: Hematology* 36: 123–139
- [6] Kerjaschki D., Bajo-Horvath Z., Rudas M., Sexl V., Schneckenleithner C., Wolbank S., Bartel G., Krieger S., Kalt R., Hantusch B., Keller T., Nagy-Bojarszky K., Huttary N., Raab I., Lackner K., Krautgasser K., Schachner H., Kaserer K., Rezar S., Madlener S., Vonach C., Davidovits A., Nosaka H., Hämmerle M., Viola K., Dolznig H., Schreiber M., Nader A., Mikulits W., Gnant M., Hirakawa S., Detmar M., Alitalo K., Nijman S., Offner F., Maier T. J., Steinhilber, D., Krupitza G. (2011) Lipoxygenase mediates invasion of intrametastatic lymphatic vessels and propagates lymph node metastasis of human mamma carcinoma xenografts in mouse. *Journal of Clinical Investigation* 121 (5): 2000-2012
- [7] Hunter K. W., Crawford N., Alsarraj J. (2008) Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research* 10, SUPPL. 1: S2

[8] Vonach C., Viola K., Giessrigl B., Huttary N., Raab I., Kalt R., Krieger S., Vo T. P. N., Madlener S., Bauer S., Marian B., Hämmerle M., Kretschy N., Teichmann M., Hantusch B., Stary S., Unger C., Seelinger M., Eger A., Mader R., Jäger W., Schmidt W., Grusch M., Dolznig H., Mikulits W., Krupitza G. (2011) NF- κ B mediates the 12(S)-HETE-induced endothelial to mesenchymal transition of lymphendothelial cells during the intravasation of breast carcinoma cells. *British Journal of Cancer* 105: 263–271

[9] Martin T. A., Ye L., Sanders A. J., Lane J., Jiang W. G (2013) *Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective* - Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience 2013.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/> eingesehen am 08.03.2015

[10] Thews G., Mutschler E., Vaupel P. (1999) *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 61-66

[11] Viola K., Kopf S., Huttary N., Vonach C., Kretschy N., Teichmann M., Giessrigl B., Rab I., Stary S., Krieger S., Keller T., Bauer S., Hantusch B., Szekeres T., de Martin R., Jäger W., Mikulits M., Dolznig H., Krupitza G., Grusch M. (2013) Bay11-7082 inhibits the disintegration of the lymphendothelial barrier triggered by MCF-7 breast cancer spheroids; the role of ICAM-1 and adhesion. *British Journal of Cancer* 108: 564-569

[12] Senfter, D. (2014) Drug resistance-mediated changes in exosomal microRNA transfer as driving force for tumour intravasation. Masterarbeit, FH Campus Wien

[13] Holzner S., Masterarbeit, in Vorbereitung, Universität Wien

[14] Teuscher E., Melzig M., Lindequist U. (2012) *Biogene Arzneimittel*. 7. Auflage, Wissenschaftlich Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, S. 299 - 319

- [15] Giessrigl B., Yazici G., Teichmann M., Kopf S., Ghassemi S., Atanasov A., Dirsch V., Grusch M., Jäger W., Özmen A., Krupitza G. (2012) Effects of *Scrophularia* Extracts on tumor Cell Proliferation, Death and Intravasation through Lymphoendothelial cell barriers. *International Journal of Oncology* 40, (6): 2063-2074
- [16] Lewenhofer V. (2014) Isolierung phenolischer Wirkstoffe aus *Scrophularia lucida*. Diplomarbeit, Universität Wien
- [17] Schweighofer L. (2015) Aktivitätsgeleitete Untersuchungen von *Scrophularia lucida* L. Diplomarbeit, Universität Wien
- [18] Spitznagel A., Diplomarbeit, Universität Wien, in Vorbereitung
- [19] Madlener S., Saiko P., Vonach C., Viola K., Huttary N., Stark N., Popescu R., Gridling M., Vo NT-P., Herbacek I., Davidovits A., Giessrigl B., Venkateswarlu S., Geleff S., Jager W., Grusch M., Kerjaschki D., Mikulits W., Golakoti T., Fritzer-Szekeres M., Szekeres T., Krupitza G. (2010) Multifactorial anticancer effects of digalloyl-resveratrol encompass apoptosis, cell-cycle arrest, and inhibition of lymphendothelial gap formation in vitro. *British Journal of Cancer* 102: 1361–1370

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Julia Eichsteininger
Geburtsdatum:	28.08.1991
Geburtsort:	Wien
Staatsbürgerschaft:	Österreich

Ausbildung

1997-2001	Volksschule Pamhagen
2001-2009	BG/BRG Neusiedl am See
Juni 2009	Matura
seit Oktober 2009	Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Praktika

August 2007	Apotheke der Barmherzigen Brüder, 7000 Eisenstadt
September 2009	Apotheke der Barmherzigen Brüder, 7000 Eisenstadt
August 2010	Apotheke der Barmherzigen Brüder 7000 Eisenstadt
Juli - August 2011	Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Kinderabteilung, 7000 Eisenstadt
August 2012 – Juli 2014	Haydn Apotheke, 1050 Wien
Wintersemester 2014/15	Tutorium am Department für Pharmakognosie, 1090 Wien