

Universitätsfrauenklinik Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Bernd Gerber)

**Einfluss von Allium porrum - Extrakt (Lauch) im Vergleich
zu synthetischem Quercetin und Rutin auf benigne und
normale hormonrezeptorpositive und -negative
Mammazellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Julian Voß
geb. am 01.11.1991 in Salzkotten

Rostock, Juli 2020

Dekan: Herr Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, Universität Rostock

Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Dagmar-Ulrike Richter, Universitätsfrauenklinik Rostock,
Gynäkologisches Forschungslabor

Prof. Dr. med. Karin Kraft, Universitätsklinik Rostock, Zentrum für Innere Medizin,
Lehrstuhl für Naturheilkunde

Prof. Dr. med. Isabell Witzel, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Klinik und
Poliklinik für Gynäkologie

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Brustkrebserkrankung	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Klassifikation von Brustneoplasien	3
1.1.3 Risikofaktoren	3
1.1.4 Pathologie	7
1.1.5 Diagnostik	8
1.1.6 Therapie	9
1.1.7 Prävention	9
1.2 Fibrös-zystische Mastopathie	11
1.2.1 Allgemeines	11
1.2.2 Epidemiologie	11
1.2.3 Risikofaktoren und protektive Faktoren	11
1.2.4 Pathologie	12
1.2.5 Klinik	13
1.2.6 Diagnostik	13
1.2.7 Therapie	14
1.2.8 Prognostik und Risiken	14
1.3 Hormonrezeptorstatus	15
1.4 Flavonoide	17
1.4.1 Allgemeines und Wirkung	17
1.4.2 Resorption, Metabolismus, Bioverfügbarkeit	20
1.5 Allium porrum	22
2 Zielstellung	24
3 Material und Methoden	26
3.1 Extrakterstellung	26
3.1.1 Ethanol-basierte Extrakterstellung	26
3.1.2 Wasser-basierte Extrakterstellung	27
3.2 Zellkulturlinien und Zellkultivierung	27
3.2.1 Zellkulturlinien	27
3.2.2 Zellkultivierung	28
3.3 Ermittlung der Lebendzellzahl	30
3.4 Immunhistochemie (IHC)	31
3.5 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	33
3.6 CellTiter-Glo® - Viabilitätstest	36
3.7 BrdU-Proliferationstest	37
3.8 CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest	40
3.9 Caspase-Glo® - Apoptosetest	42
3.10 Glukose-, Laktat-, pH-Messung	44
3.11 Statistische Auswertung	45

4	<i>Ergebnisse</i>	46
4.1	High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	46
4.2	Immunhistochemie (IHC)	49
4.3	CellTiter-Glo® - Viabilitätstest.....	51
4.4	BrdU-Proliferationstest	53
4.5	CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest.....	55
4.6	Caspase-Glo® - Apoptosetest.....	57
4.7	Glukose-Messung.....	59
4.8	Laktat-Messung	61
4.9	pH-Messung	63
4.10	Lichtmikroskopische Untersuchung	64
5	<i>Diskussion</i>	67
5.1	High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)	67
5.2	CellTiter-Glo® - Viabilitätstest.....	70
5.3	BrdU-Proliferationstest	72
5.4	CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest.....	73
5.5	Caspase-Glo® - Apoptosetest.....	75
5.6	Stoffwechsel-Untersuchungen (Glukose, Laktat, pH).....	77
5.7	Wirkweise Quercetin	78
5.8	Wirkweise Estradiol.....	80
5.9	Methodenkritik	81
6	<i>Zusammenfassung</i>	84
7	<i>Ausblick</i>	86
8	<i>Thesen</i>	88
9	<i>Publikation</i>	90
10	<i>Literaturverzeichnis</i>	93
11	<i>Danksagung</i>	106
12	<i>Anhang</i>	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweiter Vergleich der Inzidenz und Mortalität von Brustkrebs [61].	1
Abbildung 2: Relatives Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, in Abhängigkeit des altersspezifischen Eintritts in die Menarche bzw. Menopause [103].	5
Abbildung 3: Histologisches Präparat einer fibrös-zystischen Mastopathie Grad I [156].	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Estrogen-Rezeptors- α mit seinen einzelnen Domänen nach Sanchez et al. [132].	16
Abbildung 5: Die Flavonoide Quercetin und Rutin in ihrer chemischen Strukturform nach Khan et al. [66].	18
Abbildung 6: Überblick über die aktuell bekannten verschiedenen antitumoralen Wirkweisen Quercetins nach Khan et al. [66].	19
Abbildung 7: Absorptionsmechanismen von Flavonoiden an Enterozyten nach Walle et al. [154].	22
Abbildung 8: Darstellung einer Bürker-Zählkammer unter mikroskopischer Sicht [167].	31
Abbildung 9: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Reaktion.	32
Abbildung 10: Schematische Darstellung einer HPLC Anlage, modifiziert nach „Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern“ von Veronika R. Meyer [105].	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung des HPLC-Gradienten der mobilen Phase.	35
Abbildung 12: Luciferase-Reaktion des CellTiter-Glo® [25].	36
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Einbaus von BrdU anstelle von Thymidin in den DNA Strang.	38
Abbildung 14: Funktionsprinzip des CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest [34].	41
Abbildung 15: Funktionsprinzip des Caspase-Glo® 3/7 - Apoptosetests [23].	43
Abbildung 16: Chromatogramm des wasserbasierenden Lauch-Extrakts.	47
Abbildung 17: Chromatogramm des 70 %-ethanolbasierenden Lauch-Extrakts.	47
Abbildung 18: Chromatogramm des 70 %-ethanolbasierenden Extrakts vom „grünen“, oberen Pflanzenbestandteil mit Kontroll-Lösungen.	48
Abbildung 19: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-10a-Zelllinie auf die Expression der Estrogenrezeptoren- α , - β und des Progesteronrezeptors mit Negativkontrolle. Es zeigte sich keine Farbreaktion, sodass ein negativer Rezeptorstatus für die Estrogenrezeptoren- α , - β und den Progesteronrezeptor vorliegt.	49
Abbildung 20: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-12a-Zelllinie auf die Expression der Estrogenrezeptoren- α , - β und des Progesteronrezeptors mit Negativkontrolle.	50
Abbildung 21: Zellviabilitätstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Extrakte.	52
Abbildung 22: Zellviabilitätstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Referenzen.	52
Abbildung 23: Proliferationstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Extrakte.	54
Abbildung 24: Proliferationstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Referenzen.	54
Abbildung 25: Zytotoxizitätstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Extrakte.	56

Abbildung 26: Zytotoxizitätstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Referenzen.	56
Abbildung 27: Apoptosetest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Extrakte.	58
Abbildung 28: Apoptosetest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Referenzen.	58
Abbildung 29: Glukose-Messung der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Extrakte.	60
Abbildung 30: Glukose-Messung der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Referenzen.	60
Abbildung 31: Laktat-Messung der Zellreihen MCF-10a und MCF-12a - Extrakte. .	62
Abbildung 32: Laktat-Messung der Zellreihen MCF-10a und MCF-12a - Referenzen.	62
Abbildung 33: pH-Messung der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Extrakte.	63
Abbildung 34: pH-Messung der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Referenzen.	64
Abbildung 35: Mikroskopische Zellaufnahmen der MCF-10a unter Beimpfung der Extraktkonzentrationen, Referenzen und Kontrollen. Extraktkonzentration in [%], Referenzkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$].	65
Abbildung 36: Mikroskopische Zellaufnahmen der MCF-12a unter Beimpfung der Extraktkonzentrationen, Referenzen und Kontrollen. Extraktkonzentration in [%], Referenzkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$].	66
Abbildung 37: Mikroskopische Zellaufnahmen der HMEC unter Beimpfung der Extraktkonzentrationen. Extraktkonzentration in [%].	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologische Klassifikation nach Prechtel [122]	13
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	107
Tabelle 3: Verwendete Geräte	109

Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose-induzierender-Faktor
Akt	Protein Kinase B
Aquabidest.	Aqua bidestillata
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ASK1	Apoptose signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptions Units
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
bar	Bar
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (Protein)
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA	Breast cancer Gene
BrdU	5-bromo-2'-desoxyuridine
BS β G	Breitspezifische- β -Glykosidase
CBG	Glucocerebrosidase
CDK2	Cyclin-dependent Kinase 2
CIS	Carcinoma in situ
CHEK-2	Checkpoint kinase 2
CT	Computertomographie
Cylin A oder B	Proteine mit Schlüsselrolle im Zellzyklus
C6-Ceramid	N-Hexanyl-D-Sphingosine
DBD	DNA Bindungsdomäne
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym linked Immunosorbent Assay
ER	Estrogenrezeptor
ERR- α	Estrogen-related-Rezeptor- α
ERE	Estrogen response element

EZH-2	Enhancer of zeste homolog 2
E2	17 β -Estradiol
Fas	Mitglied der tumor necrosis factor-Rezeptoren (TNF-R), die nach Liganden-Bindung die Apoptose einleiten
FasL	Fas-Ligand
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HPLC	High performance liquid chromatography
JNK1	c-Jun-N-terminale Kinase
Ki-67	Markierendes Protein von sich teilenden Zellen
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HMEC	Primary Human Mammary Epithelial Cells
IHC	Immunhistochemie
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LH	Luteinisierendes Hormon
LinRed	Substratkit für Peroxidase
LPH	Lactase-Phloridzin-Hydrolase
MAPK	Mitogen-activated-protein Kinasen
MCF-10a	Estrogen-Rezeptor negative Mamma-Epithelzellen
MCF-12a	Estrogen-Rezeptor positive Mamma-Epithelzellen
MEBM	Mamma Epithel Basal Medium
MECGM	Mammary Epithelial Cell Growth Medium
MeOH	Methanol
min	Minute
MRP2	Multi-drug-resistance-associated Protein 2
MRT	Magnetresonanztomographie
mTor	mechanistic Target of Rapamycin
NF κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphat Buffered Saline
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PR	Progesteronrezeptor
P21	Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen (auch: CDK-Inhibitor 1)
P53	Tumor protein p53
P57	Tumor protein p57 (auch: CDK-Inhibitor 1C)
RAD	Rekombinase
RPA	Replication protein A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SERM	Selektive-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren
SGLT1	Natrium/Glukose-Cotransporter 1
SULT	Sulfotransferase
UDP	Uridine-5'-diphospho-glucuronosyltransferase
UGT	UDP-Glukuronosyltransferase
UICC	Union for international cancer control
UV-B	Ultraviolettstrahlung B
W	Watt
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

1.1 Die Brustkrebserkrankung

1.1.1 Allgemeines

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau, sowohl in der industriellen Welt, als auch in unterentwickelten Ländern [61]. Durch die zunehmend steigende Lebenserwartung weltweit spielen Krebserkrankungen, ihre Behandlungen sowie die Prävention eine immer zentralere Rolle in der Medizin und somit auch in dem Formkreis benigner und maligner Entartungen der weiblichen Mamma. Dabei werden 56 % der statistisch erfassten Brustkrebserkrankungen weltweit der westlichen Welt zugerechnet [61].

Insbesondere West- und Nordeuropa sowie Australien weisen hohe Inzidenzen auf, hingegen zeigen sich bei asiatischen Staaten geringere Erkrankungshäufigkeiten, sodass Brustkrebs zunehmend auch als Wohlstandskrankheit diskutiert wird (Abb. 1) [61]. Beim Vergleich der risikoreichsten mit den -ärmsten Ländern hinsichtlich des Brustkrebsrisikos ergab sich 2008 ein Unterschied um den Faktor 13 [52].

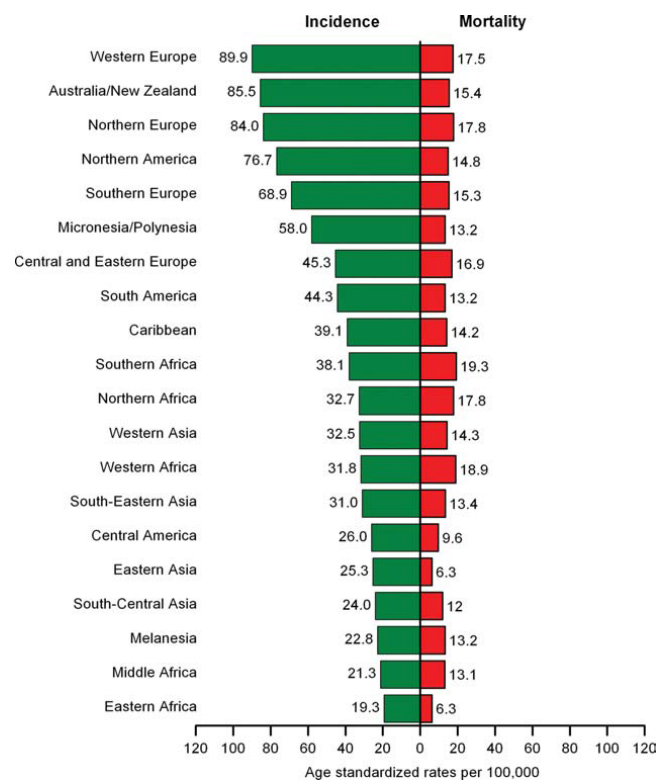


Abbildung 1: Weltweiter Vergleich der Inzidenz und Mortalität von Brustkrebs [61].

Standardisierte Früherkennungs- und Screeningverfahren, wie sie in den Industrienationen flächendeckend angeboten werden [152], existieren in vielen ärmeren Ländern nicht, sodass die Möglichkeiten einer frühen Diagnostik und Behandlung der Erkrankung in diesen Regionen stark eingeschränkt sind [61]. Auch das Bewusstsein und die Aufklärung bezüglich des reflektierten Umgangs mit karzinogenen Stoffen wie Nikotin oder Alkohol fehlt in vielen Entwicklungsländern [60]. Darüber hinaus ist häufig weniger über Krebserkrankungen und ihre Symptome bekannt, sodass oft die Information und das Wissen über bestimmte Erkrankungen fehlt. Außerdem können kulturelle Konflikte zwischen moderner und traditioneller Medizin hinderlich in der Behandlung von Krebserkrankungen sein [60].

Und dennoch sind die Erkrankungshäufigkeiten besonders in den Industrieländern erhöht, was die Frage aufwirft, warum trotz einer besseren Aufklärung und einer besseren diagnostischen und therapeutischen Infrastruktur die Belastung durch Brustkrebs signifikant höher ist [60].

Wegen dieses Widerspruchs haben sich weitere Untersuchungen angeschlossen, die neben der Aufklärung, der Vorsorge und den Therapieschemata auch die Lebensumstände, die Ernährung und den Lifestyle verschiedenster Kulturen beleuchten sollen. Die Einbeziehung dieser Faktoren erbrachte interessante Unterschiede, welche mittlerweile eine wichtige Rolle in der Forschung und dem Verständnis der Pathogenese vielfältiger Neoplasien der Brust einnehmen.

Beispielsweise wurde beobachtet, dass sich das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, bei Immigranten, die aus risikoärmeren in risikoreichere Regionen zogen, angeglichen hat [141, 169]. Diese Studien legen nahe, dass der Lifestyle und die Ernährung einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Krankheitsrisiko haben [141].

In Deutschland beziehen sich 25 % der Malignome der Frau auf die Brust und es werden etwa 110 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen jedes Jahr erfasst. Insgesamt wird im Laufe ihres Lebens jede 8. bis 10. Frau mit der Erkrankung von Brustkrebs konfrontiert [156]. Allein 2014 starben 18.000 Frauen in Deutschland an Brustkrebs [146], womit das Mammakarzinom an fünfter Stelle der häufigsten Todesursachen der Frau rangiert [148]. Es lässt sich ein signifikant erhöhtes Erkrankungsalter um das 40. Lebensjahr sowie postmenopausal beobachten [19].

Während die Inzidenz weiter zunimmt, sinkt aufgrund immer besser werdender Diagnostik und moderner Therapiekonzepte die Mortalität [19].

1.1.2 Klassifikation von Brustneoplasien

Grundsätzlich lassen sich die tumorartigen Läsionen und Tumore der Frau in benigne, semimaligne und maligne Tumore unterteilen. Während zu den benignen Erkrankungen insbesondere das Fibroadenom, Lipom, Papillom, Hamartom und die fibrös-zystische Mastopathie zählen, ist der Phylloides-Tumor als semimaligner Tumor bekannt. Zu den bösartigen Tumoren gehört das Mammakarzinom [149].

Eine besondere Stellung in dieser Arbeit soll die fibrös-zystische Mastopathie einnehmen, die die häufigste benigne Brusterkrankung darstellt und unter bestimmten Voraussetzungen zum bösartigen Mammakarzinom entarten kann.

1.1.3 Risikofaktoren

Es konnten diverse Risikofaktoren ausgemacht werden, die mit Brustkrebs assoziiert sind. Neben endogenen Faktoren, wie genetischen und hormonellen Einflüssen und dem Alter, existieren auch exogene Faktoren: z.B. Ernährung und Lifestyle [102, 156].

1.1.3.1 Endogene Risikofaktoren

Wie auch bei vielen anderen Krebserkrankungen stellt eine genetische Prädisposition auch bei Brustkrebs ein erhöhtes Krankheitsrisiko dar.

Während bis zu 50 % der genetisch determinierten familiären Prädispositionen aktuell noch nicht geklärt sind [31], gelten zwei Gene als sicher karzinogen: die *BRCA-1* und *BRCA-2* Gene, welche sich auf dem Chromosom 17q bzw. 13q befinden. Diese sind für 20 % – 40 % der familiären Brustkrebsanhäufungen verantwortlich [112, 127]. Im Hinblick auf die Gesamtzahl aller Brustkrebsfälle sollen sie für etwa 5 % aller Erkrankungen verantwortlich sein. Bei Vorliegen einer Keimbahnmutation der genannten Gene wird aktuell von einer Erkrankungswahrscheinlichkeit von 60 % – 85 % zeitlebens ausgegangen. Damit bilden die *BRCA-1* und *-2* Gene die bekanntesten brustkrebsassoziierten genetischen Risikofaktoren [9]. Bei Männern liegt die Wahrscheinlichkeit, im Falle eines mutierten *BRCA-2* Gens im Laufe des Lebens an Brustkrebs zu erkranken, bei etwa 6 % und ist damit um den Faktor 100 erhöht [29].

Sowohl *BRCA-1* als auch *BRCA-2* besitzen eine wichtige Funktion in der DNA-Reparaturmaschinerie und der Chromosomensegregation [112]. Besonders bei

Doppelstrangbrüchen nehmen *BRCA-1* und *-2* eine bestimmende Rolle ein. Kommt es zu einem solchen Bruch, kann in einer diploiden Zelle das homologe Chromosomen als Matrize für nachfolgende Reparaturen verwendet werden. Dies wird als homologe Rekombination bezeichnet [1]. Zunächst wird dabei der Doppelstrang in Einzelstränge gespalten und durch Bindeproteine (RPA) stabilisiert. Später werden diese Bindeproteine durch die Rekombinase RAD51 ausgetauscht. RAD51 interagiert mit weiteren Proteinen, zu denen neben RAD52 und RAD54 auch *BRCA*-Proteine zählen [31, 112]. *BRCA-1* koordiniert die Wiederherstellung der gebrochenen Strangenden, sodass diese bei der homologen Rekombination richtig zusammengefügt werden können. Währenddessen steht *BRCA-2* in einer Wechselwirkung mit RAD51, unterstützt dessen zügigen Transport zur Schadstelle und verhindert dessen Polymerisation auf der DNA. RAD51 bleibt so lange inaktiv, bis es gebraucht wird [1].

Liegen Mutationen in den Genen *BRCA-1* und *-2* vor, ist dieser Reparaturmechanismus gestört, sodass ein Doppelstrangbruch bestehen bleibt und die Entartungswahrscheinlichkeit steigt. Neben Brustkrebs werden die *BRCA*-Gene außerdem auch mit Ovarialkarzinomen in Verbindung gebracht [12].

Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an benignen und malignen Entartungen der Brust zu erkranken, wird auch verschiedenen Syndromen zugeschrieben. Krankmachende Eigenschaften werden dem Li-Fraumeni-Syndrom [127], dem Cowden-Syndrom [84] und dem Peutz-Jeghers-Syndrom [127] zugeschrieben, bei denen insbesondere Zellzyklus regulierende Gene und Tumorsuppressor-Gene geschädigt sind.

Zu den endogenen Risikofaktoren gehört auch die Regulation des Körpers durch das eigene Hormonsystem. Die Adenohypophysen-Hormone LH und FSH stehen in einer permanenten Wechselwirkung mit den Sexualhormonen Estrogen und Progesteron, die hauptsächlich von den Ovarien beziehungsweise durch den Corpus Luteum synthetisiert werden.

Es wurde festgestellt, dass der Zeitpunkt der Menarche sowie der Menopause, die den Beginn bzw. das Ende der ovariellen Tätigkeit festlegen, signifikanten Einfluss auf das Brustkrebsrisiko besitzen (Abb. 2) [103]. Dabei wird das Risiko aufgrund eines längeren Estrogeneinflusses sowohl durch eine frühe Menarche als auch eine späte Menopause erhöht (Abb. 2) [149]. Interessanterweise ist das Risiko der

Erkrankung bei einer frühen Menarche ungleich höher als bei einer späten Menopause. Demzufolge scheint nicht ausschließlich die Dauer der Estrogenwirkung zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko zu führen. Der Estrogeneinfluss wirkt sich außerdem stärker auf ER-positive Erkrankungen als auf ER-negative aus [103].

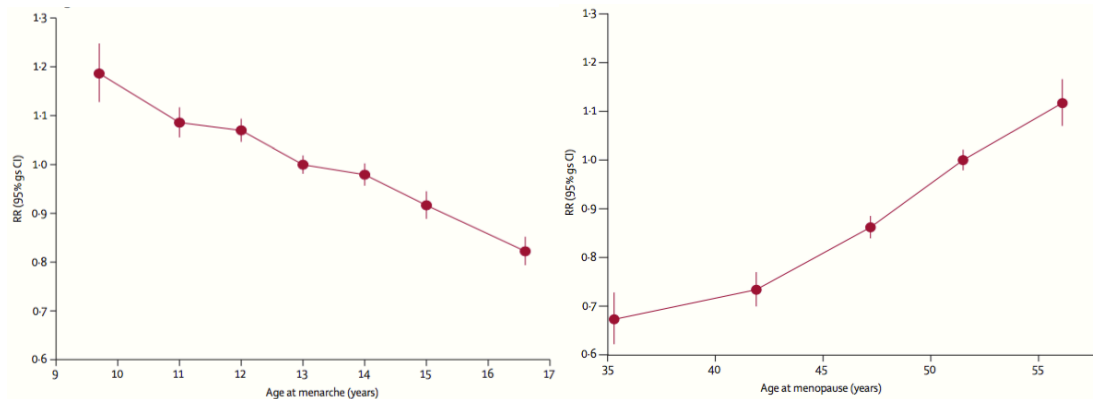


Abbildung 2: Relatives Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, in Abhängigkeit des altersspezifischen Eintritts in die Menarche bzw. Menopause [103].

Seit Jahren wird der Einfluss durch hormonelle Kontrazeptiva auf die Entstehung benigner und maligner Entartungen der Mamma diskutiert. Als bekannte, durch orale Kontrazeptiva hervorgerufene, protektive Effekte werden für Dysmenorrhagien, Ovarialzysten und Akne beschrieben. Aber auch das Risiko an Endometrium- und Ovarialkrebs zu erkranken, wird durch ihre Einnahme gesenkt [54, 156].

Widersprüchlicher wird die Studienlage zur Bewertung des Risikos von Brustkrebs unter Behandlung hormoneller Kontrazeptiva. Nach wie vor wird eine sehr kontroverse Debatte über deren Konsequenzen geführt.

Unter anderem werden die Auswirkung der Applikationsdauer, das Alter der Patientinnen sowie die Dosierung kontrovers in der medizinischen Literatur diskutiert [44, 157].

Einigkeit scheint in dem Punkt zu bestehen, dass die Kontrazeption benignen Tumoren der Brust, wie beispielsweise der fibrös-zystischen Mastopathie, protektiv entgegensteht [19, 54].

Während einerseits eine Reduktion des Brustkrebsrisikos beschrieben wird [54], postulieren andere Studien keine oder minimale Erhöhungen des Risikos [96], allerdings in Abhängigkeit des Alters und der Dauer der Einnahme. Frühe Einnahmen wirkten sich risikoerhöhend aus [157].

Aktuelle Studien belegen einen zum Teil signifikanten Anstieg des Risikos unter der Einnahme hormoneller Kontrazeptiva [59, 108]. In einer skandinavischen Studie von

Mørch et al. konnte 2017 eine um 20 % erhöhte Inzidenz an Brustkrebserkrankungen nachgewiesen werden, die bei einer über zehn Jahre langen Anwendungsdauer sogar auf 38 % ansteigt. Das Risiko zu erkranken nimmt beim Absetzen der Pille wieder ab und das Krankheitsrisiko unterscheidet sich nach fünf Jahren der Nichteinnahme nicht mehr von dem der Frauen, die keine orale Kontrazeption einnahmen [108].

Für junge Frauen bis 35 Jahre steigt aufgrund der niedrigen Inzidenz das absolute Risiko kaum an. Deutlich wird der Einfluss aber bei Frauen jenseits des 40. Lebensjahres, die mehr als zehn Jahre mit oralen Kontrazeptiva verhütet haben [108].

Insgesamt ist die Studienlage in der Bewertung des Risikos einer oralen, hormonellen Kontrazeption in Bezug auf die Genese eines Mammakarzinoms nicht eindeutig.

1.1.3.2 Exogene Risikofaktoren

Bei Risikofaktoren exogener Natur wird von Beeinflussungen gesprochen, die von außen auf den Körper einwirken. Es handelt sich dabei um Einflussfaktoren, denen wir uns durch unseren Lifestyle, unserer Ernährung und zum Teil durch schlechte Gewohnheiten ausgesetzt sind. Zu einem nicht unbeträchtlichen Teil kann durch eine gesunde Lebensführung das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, gesenkt werden.

Beispielsweise hat Adipositas großen Einfluss auf die Entstehung von Brustkrebs. Zahlreiche Lehrbücher nennen Fettleibigkeit als Risikofaktor [156]. In-vitro durchgeführte Versuche konnten zeigen, dass Adipozyten in Wechselwirkung zu benignen und malignen Brustkrebszellen stehen und Einfluss auf deren Phänotyp, die Motilität und das Proliferationsverhalten haben [22].

In Versuchen mit einer Co-Kultivierung von Adipozyten und Brustkrebszellen konnte nachgewiesen werden, dass im Zusammenspiel dieser Zellen mehr inflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden und ein invasiveres Wachstum stattfand. Adipöse Patienten haben vor diesem Hintergrund ein erhöhtes Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken und werden auch häufiger mit einem progressiveren Wachstumsprozess konfrontiert [38].

Auch Alkohol stellt einen schädlichen Faktor für die Genese von Brustkrebs dar. Es zeigte sich, dass insbesondere die Alkoholdosis eine wichtige Rolle spielt, weniger

die Kontinuität des Trinkens [26]. Ein Konsum von mehr als 20 g Ethanol/Tag steigert das Risiko zu erkranken um den Faktor 1,5 bis 2 [156].

Regelmäßiger Zigarettenkonsum bildet einen weiteren Risikofaktor, an Krebs zu erkranken. In einer von 2003 bis 2013 durchgeführten Studie wurden mehr als 100.000 Frauen in Hinblick auf den Einfluss von Tabakkonsum auf das Brustkrebsrisiko untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass ein besonders signifikanter Risikoanstieg bei Frauen zu beobachten war, die bereits in ihrer Jugend oder während der Menarche mit dem Rauchen anfangen [64]. Auch bei Passivraucherinnen wurde in den letzten Jahren ein moderater Risikoanstieg für Mammakarzinome evident [90].

Aktuellen Erkenntnissen zufolge induziert Nikotin durch eine Kombination genetischer und epigenetischer Mechanismen das Krebswachstum. Es konnten erhöhte Expressionen des *EZH2*-Gens (Enhancer of zeste homolog 2) festgestellt werden [73]. *EZH2* trägt durch die Unterdrückung von Tumorsuppressor-Genen zur Tumorgenese bei und fördert das Wachstum entarteter Zellen [165].

1.1.4 Pathologie

Brustkrebs entsteht aus präinvasiven Stadien (Carcinoma in situ, CIS), die sich in duktales und lobuläres CIS unterscheiden lassen.

Das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS) ist eine Neubildung monomorpher Tumorzellen ausgehend von Brustdrüsenepithelien der Drüsenläppchen und -gänge [15]. Dieses LCIS wird durch eine Basalmembran abgegrenzt und besteht in Frühphasen histologisch aus atypischen, lobulären Hyperplasien. Typisch für das LCIS ist ein multifokales Wachstum, sodass in etwa 30 % – 40 % der Fälle beide Brustdrüsen betroffen sind. Mammographisch können Mikroverkalkungen auffallen [15].

Demgegenüber steht das duktales Carcinoma in situ (DCIS), auf das etwa 5 % – 30 % aller Mammakarzinome zurückzuführen sind. Das DCIS entsteht segmental aus Drüsenzellen, die mutieren und in die Architektur des Drüsenbaums einwachsen. Auch das DCIS ist zunächst durch eine Basalmembran begrenzt, allerdings ist das Spektrum der Krankheitsbilder vor histologischen und molekulargenetischen Gesichtspunkten vielfältiger, sodass eine unterschiedliche klinische Relevanz entsteht und das DCIS in drei Malignitätsgrade eingeteilt werden kann [15].

Beide Carcinoma in situ können in ein invasives Mammakarzinom übergehen, welches dann infiltrativ wachsen und metastasieren kann.

Therapeutisch von Bedeutung ist der Rezeptorstatus der Estrogenrezeptoren – α und – β sowie der Progesteronrezeptor. Bei rund 80 % der diagnostizierten Mammakarzinome liegt ein positiver Status vor, der ein endokrines Therapieregime ermöglicht. Können immunhistochemisch keine Estrogen- und Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden, wird von einem Triple-Negativen-Mammakarzinom gesprochen. Wichtig ist auch der Her2/neu-Status, von dem der Erfolg einer Antikörperbehandlung und ein Ansprechen auf Zytostatika wie Taxanen und Anthracyklinen abhängen. Das Proliferationsverhalten eines Mammakarzinoms kann anhand des Ki-67-Index abgeschätzt werden.

1.1.5 Diagnostik

Die zur Verfügung stehenden diagnostischen Möglichkeiten, die Mamma hinsichtlich Neoplasien oder Tumoren zu untersuchen, sind vielfältig. Neben basisdiagnostischer Maßnahmen stehen auch apparative Möglichkeiten zur Verfügung bis hin zu interventionellen Eingriffen, die hauptsächlich der Diagnosesicherung vorbehalten sind.

Zu Beginn einer jeden Untersuchung sollte neben einer ausführlichen Anamnese eine Basisdiagnostik stehen, die eine Inspektion und Palpation der Mamma beinhaltet. Verschiedene Tests, wie zum Beispiel der Jackson-Test, lassen bereits eine grobe Einschätzung der Dignität zu.

Bei anhaltendem Verdacht sollte dann auf bildgebene Verfahren zurückgegriffen werden, wobei das Alter der Patientin entscheidend ist. Während Patientinnen ab dem 40. Lebensjahr eine Mammographie empfohlen wird, sollten die jüngeren Patientinnen zunächst sonografiert werden [74]. Bei spezifischen Fragestellungen stellt die Kontrastmittel unterstützte MRT-Untersuchung eine Option dar.

Zur Diagnosesicherung sind interventionelle Maßnahmen oft unverzichtbar. Dazu gehören sonographisch- oder MRT-gesteuerte Mamma- oder Lymphknotenbiopsien, die eine pathologische Einschätzung ermöglichen.

Ab bestimmten Stadien (UICC II/III) mit erhöhter Metastasierungsgefahr wird ein Staging vorgenommen. Dazu gehört ein Thorax- und Abdomen-CT sowie eine Skelettszintigraphie. Im Einzelfall kann das Staging ausgeweitet werden [74].

1.1.6 Therapie

Nach abgeschlossenem Staging wird unter Berücksichtigung des Stadiums und der Ausbreitung der Krankheit zwischen kurativer und palliativer Therapie unterschieden. Zu den kurativen Therapiemaßnahmen gehören neben operativen Interventionen Strahlen- und Systembehandlungen. Bei palliativen Ansätzen stehen Systemtherapien im Vordergrund.

Die operativen Therapien können je nach Befund entweder brusterhaltend (BET) oder als totale Mastektomie durchgeführt werden. Bei allen invasiven Karzinomen sollte diese durch eine Lymphknotendissektion ergänzt werden [74].

Zu den Systemtherapien zählen bei Mammakarzinomen die Chemotherapie, die Antikörpertherapie und die Hormontherapie. Auch hier ist der Befund wegweisend. Voraussetzung für eine Antikörpertherapie ist ein positiver HER2/neu Status, der den Einsatz von Antikörpern wie Trastuzumab oder Pertuzumab ermöglicht [74]. Die Wirkung von Hormontherapien mit Aromatase-Hemmern oder SERM, wie Tamoxifen, ist wiederum vom Hormonrezeptorstatus abhängig. Tamoxifen wirkt am Brustdrüsengewebe als Estrogen-Rezeptorantagonist und senkt Wachstums- und angiogene Faktoren.

1.1.7 Prävention

Neben den klassischen diagnostischen und therapeutischen Konzepten kommt in der Medizin seit Jahren auch der Prävention von Krankheiten eine immer wichtigere Rolle zu. Seit 2005 wird in Deutschland auf Beschluss des Bundestages ein sekundär-präventives Mammografie-Screening für Frauen zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr als Ergänzung zu den konventionellen gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen angeboten [74].

Zur Prävention gehört auch die Aufklärung darüber, was zur Genese von Brustkrankungen beiträgt und welche Risikofaktoren gemieden werden können bzw. sollten. Dazu gehört neben weiteren exogenen Risikofaktoren auch der übermäßige Konsum von Zigaretten und Alkohol sowie Adipositas.

Einen immer größeren Stellenwert in die Diskussion hinsichtlich der Prävention von Brustkrebserkrankungen nehmen aktive, protektive Strategien ein, zu denen beispielsweise eine gesunde Ernährungsumstellung, körperliche Fitness und das Vermeiden von Übergewicht zählen [135].

Diskutiert wird auch der Einfluss des Verhältnisses von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren auf die Entstehung maligner Erkrankungen. Während es fraglich ist, ob der Genuss gesättigter Fettsäuren zu negativen Effekten führt [161], wird mehrfach ungesättigten Fettsäuren ein protektiver Faktor in der Krebsentstehung zugesprochen [43]. Eine generelle Empfehlung zur Supplementation ist der aktuellen Studienlage nicht zu abzuleiten.

Positive Effekte zeigten sich auch durch mediterrane Diäten, wobei insbesondere Obst, Gemüse und Vollkornprodukte der Entstehung von Krebserkrankungen protektiv gegenüber standen [138]. Den größten Effekt erbrachte eine solche Diät bei Darmkrebserkrankungen, allerdings konnte erstmals durch Kumulation mehrerer Kohortenstudien auch eine Risikoreduktion bei Brustkrebserkrankungen belegt werden [138].

Bemerkenswerte Ergebnisse werden darüber hinaus durch körperliche Aktivität erzielt. Zahlreiche Studien belegen mit einer konsistenten Evidenz eine bis zu 25%ige Reduktion des Risikos, an Brustkrebs zu erkranken. Dieses unterliegt einer Dosis-Wirkungs-Beziehung [48]. Den Studienergebnissen zufolge wird eine moderate körperliche Aktivität von 30-60 Minuten fünfmal in der Woche empfohlen, um einen möglichst großen protektiven Effekt zu erzielen [49]. Auch der Hormonrezeptorstatus scheint einen Einfluss auf die durch körperliche Aktivität bedingten Effekte zu haben. Besonders ausgeprägt ist die Wirkung bei Estrogenrezeptor negativen Mammakarzinomen [107].

Erklärungen führen von protektiven Wirkungen im Insulinsystem mit einer geringeren peripheren Insulinresistenz über regulierende Effekte auf das Hormonsystem bis hin zu modulierenden Auswirkungen auf das Immunsystem [48].

Ferner wird auch dem Stillen eines Neugeborenen ein günstiger Einfluss auf die Tumorgenese zugeschrieben. Während manche Studien dem Stillen, auch in Abhängigkeit zur Stillzeit, einen generellen, vorsorgenden Effekt in der Risikobewertung der Brustkrebserkrankung einräumen [30], rechnen andere Studien die protektive Wirkung eher genetisch vorbelasteten Patientinnen zu [135] oder knüpfen ihn an den Rezeptorstatus [6].

1.2 Fibrös-zystische Mastopathie

1.2.1 Allgemeines

Eine Mastopathie fasst im Rahmen einer hormonellen Dysregulation Veränderungen zusammen, welche zu einem proliferativen oder regressiven Umbau des weiblichen Brustdrüsenparenchyms führen. Sie ist grundsätzlich nicht neoplastischer Natur, sondern eine abnorme Veränderung [156].

Die fibrös-zystische Mastopathie ist eine benigne tumoröse Veränderung, die meist beide Brüste betrifft. Dabei kommt es aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen den Sexualhormonen Estrogen und Progesteron zu Gunsten des Estrogens zu einer proliferativen Umwandlung des Brustdrüsenepithels und -mesenchyms. Weitere ätiologische Ursachen können ein Progesteronmangel, eine Hyperprolaktinämie, eine Hyperandrogenämie oder eine thyroideale Fehlsteuerung sein [156].

1.2.2 Epidemiologie

Diese Erkrankung betrifft etwa 50 % aller Frauen zeitlebens und ist damit die häufigste benigne, tumoröse Veränderung der Mamma, die meist während der Geschlechtsreife mit einem Gipfel zwischen der dritten und vierten Dekade imponiert [91]. Während die meisten Frauen in der prämenopausalen Zeit von einer Erkrankung betroffen sind und häufig erst eine Besserung ab der Menopause einsetzt, können die Beschwerden auch peri- und postmenopausal persistieren.

1.2.3 Risikofaktoren und protektive Faktoren

Von der fibrös-zystischen Mastopathie sind besonders Frauen im Alter von 30 – 50 Jahren betroffen. Auch Veränderungen des Hormonhaushalts können die Krankheit beeinflussen. Dies können hormonelle Schwankungen im Rahmen des Zyklus oder der Wechseljahre sein sowie in der Schwangerschaft [111].

In der Literatur wird auch die Meinung über eine positive Korrelation des Kaffee- und Methylxanthin-Konsums zu einer möglichen Erkrankung vertreten. Boyle et al. berichteten von einem besonders starken Zusammenhang mit atypischen Hyperplasien, Papillomatosen und Adenosen [16], wohingegen Heyden et al. keine wissenschaftliche Grundlage dafür sehen, von einer Korrelation zu sprechen [57]. Vor dem Hintergrund dieser Kontroverse untersuchten auch Bullough et al. die Kausalität und verifizierten eine positive Korrelation [20].

Auch psychischer Stress und Rauchen sind mit einer Verstärkung der Krankheit assoziiert [111].

Berkowitz et al. beobachteten in einer Fall-Kontroll-Studie, dass ein hoher sozioökonomischer Status, geringe Parität sowie benigne und maligne Brustkrankungen in der Familienanamnese Risikofaktoren darstellen können [13]. Diese Punkte heben auch Li et al. in ihren Untersuchungen hervor [82].

Wu und Li stellten fest, dass eine hohe Parität, gemüse- und obstreiche Ernährung mit insbesondere proliferativen und atypischen Läsionen, weniger mit nicht-proliferativen Läsionen, der fibrös-zystischen Mastopathie invers korrelieren und einen präventiven Charakter aufweisen [82, 160]. Diese Annahme wird bestärkt durch die protektiven Wirkung von Isoflavonen in Sojaprodukten auf die Erkrankung, welche Lampe et al. beschrieben [76]. Auch Weu-Domschke konnte einen tumorregressiven Effekt durch Flavonoid-haltige Leinwurzel-Extrakte an Zellen der fibrös-zystischen Mastopathie aufzeigen [133]. Darüber hinaus wird der oralen, hormonellen Kontrazeption durch deren regulierenden Effekt auf den Hormonhaushalts eine krankheitsvorbeugende Wirkung zugesprochen [19].

1.2.4 Pathologie

Charakteristika der Mastitis fibrosa cystica sind eine zunehmende epithelisierte Zystenbildung, apokrine Metaplasie und eine Fibrosierung der Mamma. Das Ausmaß der Zystenbildung und Fibrosierung ist individuell sehr variabel und kann einzelne Quadranten oder das gesamte Organ betreffen [91, 156]. Das Estrogenungleichgewicht führt zu gesteigerten proliferativen Reizen an den Drüsen und dem Bindegewebe, sodass es zur vermehrten Stroma- und Kollagenfaserbildung kommt. In Abhängigkeit davon, ob es zur Proliferation von Gangsegmenten, Drüsenkörperchen, Gangepithelien oder intraduktalen Tumoren kommt, wird von Adenosen, Hyalinosen, Epithelosen oder Papillomatosen gesprochen. In der Folge können Duktectasien, Zysten und Metaplasien entstehen [156].

Histologisch klassifiziert Prechtel die fibrös-zystische Mastopathie in drei Grade (Tab. 1 und Abb. 3).

Diese Klassifikation gibt neben der histologischen Einordnung auch prognostischen Aufschluss über die Entartungswahrscheinlichkeit von der einfachen Mastopathie bis zu dem gefürchteten Mammakarzinom.

Tabelle 1: Histologische Klassifikation nach Prechtel [122]

	Histologie	Karzinomrisiko
Grad I: Einfache Mastopathie	Keine Proliferation des Epithels	Nicht erhöht
Grad II: Einfach proliferative Mastopathie	Epithelproliferation ohne Zellatypien	Leicht erhöht: Faktor 1-1,5
Grad III: Proliferative Mastopathie	Epithelproliferation mit Zellatypien, ohne Kriterien eines CIS	Stark erhöht: Faktor 4-5

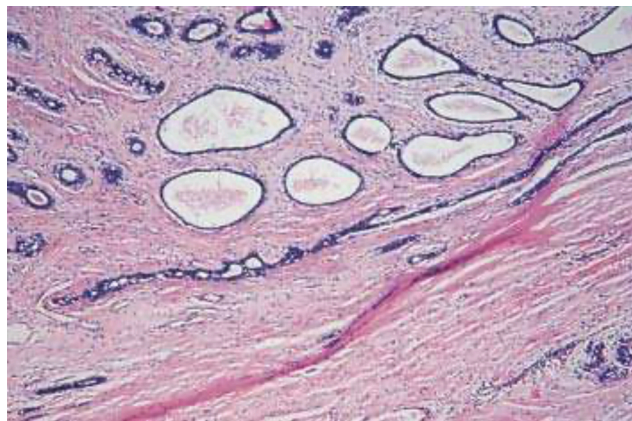


Abbildung 3: Histologisches Präparat einer fibrös-zystischen Mastopathie Grad I [156]. Es sind einfache, mastopathisch-zystische Veränderungen ohne Proliferationen eines Gewebeschnitts einer an fibrös-zystischer Mastopathie erkrankten Mamma erkennbar.

1.2.5 Klinik

Klinisch imponiert die Mastopathie abhängig vom Schweregrad durch zyklusabhängige, prämenstruelle Mastodynie (meistens in der 2. Zyklushälfte) und einer Knotenbildungen, der klassische Schrotkugelbrust. Es können Teile der Brust oder die gesamte Mamma betroffen sein. Seltener kommt es zu einer Sekretion aus der Mamille [156]. Palpatorisch imponieren deshalb diffuse, druckdolente Verdichtungen, die vorrangig im oberen, äußeren Quadranten liegen.

1.2.6 Diagnostik

Diagnostisch gilt es, insbesondere intrazystische Proliferationen und maligne Entartungen auszuschließen, da das Mammakarzinom die wichtigste und gefürchtetste Differenzialdiagnose ist. Dazu eignet sich die sonographische und mammographische Untersuchung [134, 156]. Unklare Herdbefunde und Mikrokalk gelten als wichtige Alarmsignale. Sonographisch lassen sich diese soliden Prozesse

gut von zystischen differenzieren. Während intrazystische Prozesse nicht oder nur in Ausnahmefällen punktiert werden sollten, ist die Biopsie bei mammographisch detektiertem Mikrokalk oder unklaren Herdbefunden indiziert. Insbesondere bei Grad III Erkrankungen sind engmaschige Kontrollen essentiell [91, 156].

1.2.7 Therapie

Therapeutisch kann unter Berücksichtigung des Krankheitsgrads und des subjektiven Leidensdrucks auf einfache physikalische Mittel wie einer Kryotherapie, einem Verzicht Methylxanthin-haltiger Lebensmittel (Tee, Kaffee, Schokolade) oder einer hormonellen Anwendung zurückgegriffen werden. Diese Gestagen-haltigen oder anti-estrogenen Medikamente können lokal als Gele aufgetragen oder oral appliziert werden [156]. Danazol, Bromocriptin, Aromatasehemmer und Tamoxifen haben sich als wirksame Medikamente erwiesen. Frauen mit einem Risiko $>1,67$ kann auch die Einnahme von Tamoxifen als Brustkrebsprofilaxe angeboten werden.

Auch GnRH-Analoga führten über eine Senkung des LH- und FSH-Spiegels zu niedrigeren Estrogenwerten und wirkten krankheitsmildernd [134].

In 70 % der Fälle können phytotherapeutische Extrakte auf Alkoholbasis zu einer Beschwerdebesserung beitragen. Dabei werden insbesondere Nachtkerzenextrakte erwähnt, wobei genaue Wirkmechanismen noch geklärt werden müssen [45, 156].

In schweren Fällen kann eine operative Knotenentfernung bis hin zur Mastektomie nötig werden.

1.2.8 Prognostik und Risiken

Viele Frauen mit fibrös-zystischer Mastopathie stellen sich die Frage, ob sie einem erhöhten Risiko einer malignen Entartung ausgesetzt sind.

Grundsätzlich ist die fibrös-zystische Mastopathie keine neoplastische Erkrankung mit erhöhtem Malignitätsrisiko. Unter bestimmten histo-pathologischen und klinischen Voraussetzungen kann sich diese Krankheit allerdings mit einem bis zu 50%igen Risiko zu einer malignen Brustkrebserkrankung entwickeln [101].

In einer Autopsie-Studie von Nizze et al. zeigten sich bei 39 von 54 Frauen zwischen 29 und 84 Jahren, bei denen ein Mammakarzinom histologisch verifiziert wurde, eine fibrös-zystische Mastopathie mit Fibrose, Duktektasien und Zysten [115].

Prognostisch wegweisend ist die histo-pathologische Einordnung des Krankheitsbefunds. Liegen proliferative Veränderungen vor, einschließlich duktalem und

lobulären Hyperplasien, aber ohne Atypien, Adenose und Papillomatose, ist das Risiko um den Faktor 1,5 bis 2 erhöht [122, 134]. Dieses Risiko nimmt laut Prechtel et al. den Faktor 4-5 an, sobald neben den Epithelproliferationen auch Atypien vorliegen [122]. Prechtels Erkenntnisse werden durch Dyrstad et al. bestärkt, die in einer Metaanalyse Studienergebnisse über benigne Brustkrankheiten zwischen 1972 und 2010 kumulierten und nicht-proliferativen Erkrankungen ein signifikantes, relatives Risiko von 1,17 zuschrieben. Proliferative Erkrankungen ohne Atypien entwickeln mit einem relativen Risiko von 1,76 Malignitäten, während atypische Hyperplasien ein relatives Risiko von 3,93 mit sich bringen [39]. Byrne et al. berichteten, dass mammographisch-verdichtetes Brustdrüsengewebe in Zusammenhang mit einer benignen Brustkrankheit keine negativen Einflüsse auf das Krebsrisiko ausübt [21].

1.3 Hormonrezeptorstatus

Eine wesentliche Rolle bei der Genese und Therapie tumoröser Erkrankungen der Frau nehmen die weiblichen Geschlechtshormone Estrogen und Progesteron mit ihren jeweiligen Rezeptoren ein. Insbesondere der Rezeptorstatus eines Tumors ist für das therapeutische Konzept entscheidend.

Estrogene werden größtenteils im Ovar ausgehend vom Cholesterin synthetisiert und sind verantwortlich für die Ausbildung des weiblichen Geschlechts [12]. Neben der Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale, wie beispielsweise der weiblichen Mamma, nehmen Sexualhormone auch im Zyklus der Frau eine zentrale Rolle ein.

Estrogene sind hydrophobe Moleküle, die sehr leicht Zellwände überwinden und im Zellinneren ihre Wirkung durch Bindung an lösliche Rezeptoren entfalten. Über die beiden Estrogenrezeptoren – α und – β wird der Einfluss des Estrogens reguliert [132]. Diese Rezeptoren gehören der Kern-Rezeptor-Superfamilie an und wirken mittels des passenden Liganden als Transkriptionsmodulatoren im Nukleus [95].

Bindet Estrogen als Ligand einen Rezeptor, kann sich dieser anschließend mit einem weiteren Liganden-Rezeptor-Komplex als Dimer zusammenlagern, über sogenannte Estrogen-Response-Elemente (ERE) an die DNA anlegen und spezifische DNA-Expressionen initiieren [12].

Bei der Wirkungsentfaltung des Estrogen-Rezeptorkomplexes an den ERE's sind darüber hinaus weitere Co-Faktoren beteiligt, welche zusätzlichen Einfluss auf die DNA-Expression nehmen [56, 100]. Es wurde beispielsweise festgestellt, dass

Aktivitätsunterschiede zwischen den Estrogenrezeptoren – α und – β auf unterschiedliche Fähigkeiten zurückzuführen sind, Wechselwirkungen mit Co-Aktivatoren einzugehen [155]. Durch Modifikationen von Chromatinstrukturen mittels Co-Faktoren kann die Genexpression erleichtert werden [132].

Grundsätzlich bestehen die Estrogenrezeptoren aus sechs Domänen A-F, die funktionell miteinander agieren. Der ER- α umfasst eine Länge von 595 Aminosäuren (AS), während der ER- β nur aus 530 AS besteht [55]. Die Rezeptoren werden auf insgesamt acht Exons kodiert, die durch sieben Introns voneinander getrennt liegen [10]. Die Domänen A und B bilden zusammen die Aktivierungs-Funktion-1, während C und D als DNA-Bindungsdomäne (DBD) fungieren (Abb. 4). Außerdem ist ein Teil der Domäne D sowie Domäne E und F an der Struktur der Aktivierungs-Funktion-2 beziehungsweise der Liganden-Bindungsdomäne (LBD) beteiligt [132]. Die LBD liegt in Richtung des Carboxylendes, während die DBD eher zentral angeordnet ist und mit zinkhaltigen Elementen versehen ist, die an der DNA-Bindung beteiligt sind (Abb. 4) [12].

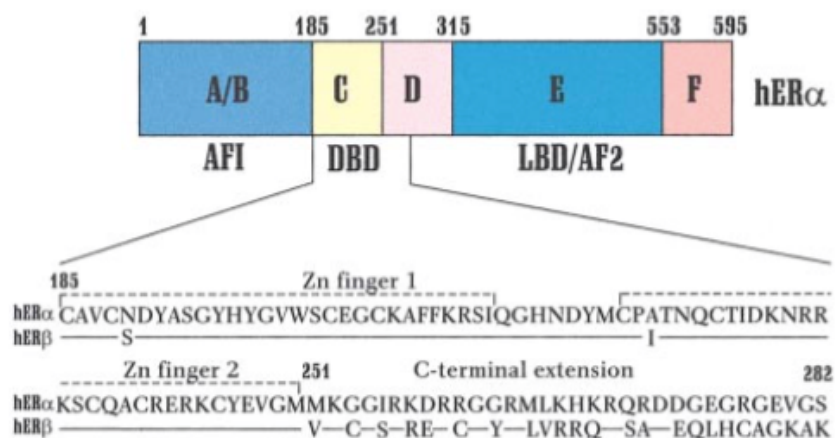


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Estrogen-Rezeptors- α mit seinen einzelnen Domänen nach Sanchez et al. [132].

AF1=Aktivierungs-Funktion 1; AF2=Aktivierungs-Funktion 2; DBD=DNA-Bindungsdomäne; LBD=Liganden-Bindungsdomäne; Zn finger1=Zinkfinger 1; Zn finger 2=Zinkfinger 2; hER α =humaner Estrogen-Rezeptor α ; hER β =humaner Estrogen-Rezeptor β .

Die beiden Estrogenrezeptoren sind ähnlich strukturiert, weisen aber Unterschiede in AS-Länge und -Sequenz ihrer Liganden- und DNA-Bindungsdomänen auf [10]. Dies führt dazu, dass unterschiedliche Liganden verschiedene Effekte auf den jeweiligen Rezeptor haben. Beispielsweise wirken Selektive-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren

(SERM), wie Tamoxifen oder Raloxifen, unterschiedlich an den Rezeptoren, was agonistische und antagonistische Effekte hervorrufen kann [10]. Auch durch die unterschiedlich starke Expression von ER- α und ER- β können gewebespezifische Effekte erzielt werden. Während ER- β insbesondere in Granulosazellen, Knochen, Endothelzellen und der Darmmukosa exprimiert wird, ist der ER- α eher in Endothelzellen, Stromazellen des Ovars und in Mammakarzinomzellen aufzufinden [55].

Es ist auch bekannt, dass Estrogene nicht nur als Transkriptionsmodulatoren im Nukleus langanhaltend wirken können, sondern auch kurzfristig über membranständige Rezeptoren. Dazu gehören Signalwege, welche direkt oder indirekt mit G-Proteinen gekoppelt sind oder solche, die durch Tyrosinkinase vermittelt werden [79]. Die genauen zellulären Signalwege sind aber noch Gegenstand aktueller Forschung.

Im Hinblick auf die Entstehung von Mammakarzinomen ist insbesondere der ER- α interessant, der unter anderem für die Proliferation des Brustdrüsengewebes verantwortlich ist, allerdings in normalem Brustgewebe auf einem niedrigen Level exprimiert wird [46]. Studien zufolge liegen bei rund 70 % aller Brustkrebspatienten ER- α positive Karzinomzellen vor [140].

1.4 Flavonoide

1.4.1 Allgemeines und Wirkung

Flavonoide gehören zur Gruppe der Phytoestrogene und sind sekundäre Pflanzenstoffe, die eine strukturelle Ähnlichkeit zum menschlichen Estrogen aufweisen. Es handelt sich um phenolische Grundverbindungen, die an unterschiedlichen Stellen mit Hydroxylgruppen besetzt sind [104] und im Rahmen des Shikimat-Pathway synthetisiert werden [2].

Phytoestrogene lassen sich in verschiedene Untergruppen aufteilen, zu den neben den Flavonoiden auch Isoflavonoide, Lignane, Coumestane und Stilbene zählen [14]. In der Natur sind Flavonoide an diversen ökologischen Wechselwirkungen beteiligt. Neben der Farbgestaltung von Pflanzenblüten beeinflussen sie als Lockstoffe für Insekten die Bestäubungsvorgänge und bestimmte Flavonoid-Untergruppen können darüber hinaus auch dem UV-B Schutz dienen [18].

Im Fokus dieser Arbeit sollen die Flavonoide Quercetin und Rutin stehen (Abb. 5).

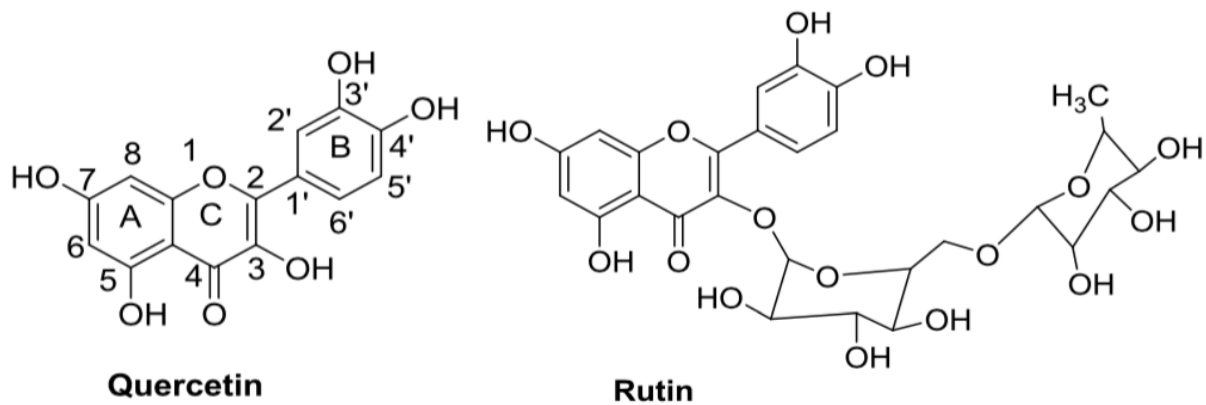


Abbildung 5: Die Flavonoide Quercetin und Rutin in ihrer chemischen Strukturform nach Khan et al. [66].

Quercetin ist ein Pentahydroxyflavon ($C_{15}H_{10}O_7$), das meist in Bindung an verschiedene Zucker als Glykosid in vielen Obst- und Gemüsesorten sowie Hülsenfrüchten zu finden ist [124]. Besonders in Zwiebeln, rotem Blattsalat, Spargel und grünem Tee konnten beträchtliche Mengen Quercetin nachgewiesen werden [114]. Für die Medizin ist Quercetin von besonderem Interesse, da es anti-inflammatorische, antioxidative und immunmodulierende Eigenschaften gezeigt hat [37]. Studien belegen auch protektive Effekte bei Osteoporose und kardiovaskulären Erkrankungsbildern [66]. Zum Beispiel kann durch die Verminderung der Oxidation des LDL in den Gefäßwänden atherosklerotischen Ereignissen vorgebeugt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Flavonoide, besonders Quercetin, einen chemopräventiven Effekt bei der Tumorgenese verschiedenster Krebsarten besitzen [62].

Es wurde festgestellt, dass Quercetin in entarteten Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase der Mitose beiträgt und das zellinterne Apoptose-System stimuliert, indem durch kleine DNA-Schäden Tumorsuppressor-Gene, wie die *Checkpoint Kinase 2* (CHEK2) aktiviert werden und *p21* induziert wird [37, 62]. In einer Studie von Shrivastava et al. wird berichtet, dass durch Quercetin die Tumorsuppressor-Gene *p53* und *BAX*, welche an einer Beschleunigung der Apoptose beteiligt sind, hochreguliert werden. Des Weiteren wird Cytochrom C freigesetzt und die Caspasen 3 und 9 werden gespalten, was auf eine mitochondriale Beteiligung hinweist. Gleichzeitig kommt es zu einer Herunterregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 [145].

Ferner wird in der Literatur ein regulierender antitumoraler Einfluss durch Quercetin auf den MAPK-Signalweg [66] und den mTOR-Signalweg [129] beschrieben.

Folglich verwundert es nicht, dass durch epidemiologische Studien belegt werden konnte, dass ein Verzehr von Quercetin-haltigen Nahrungsmitteln mit niedrigeren Krebsinzidenzen vergesellschaftet ist [62, 66].

Mittlerweile ist bekannt, dass Quercetin im Darm absorbiert und in entsprechende Metaboliten umgewandelt wird und unter anderem das Lymphsystem am Transport beteiligt ist. Erkenntnisse legen nahe, dass Quercetin in Organen gespeichert werden kann (Abb. 6) [66].

Die in-vitro wirksamen Dosen werden in der Literatur mit 3-50 mM beschrieben [77].

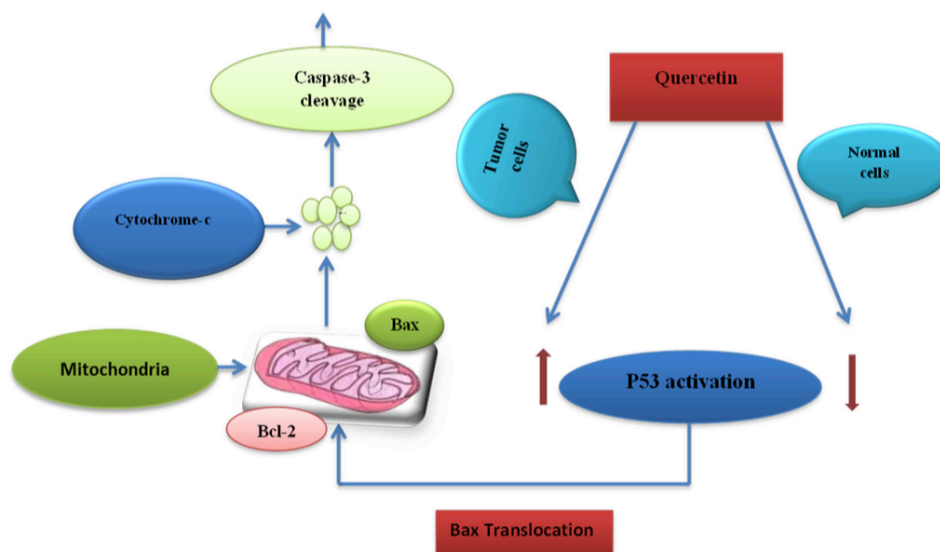


Abbildung 6: Überblick über die aktuell bekannten verschiedenen antitumoralen Wirkweisen Quercetins nach Khan et al. [66].

Beim Rutin, auch als Vitamin P bekannt, handelt es sich um eine glykosierte Form des Quercetins mit dem Disaccharid Rutinose [93].

Rutin ist eine unpolare Verbindung, welche ebenfalls in verschiedensten alltäglichen Lebensmittel wie Äpfeln, Kirschen, Trauben, Grapefruits, Buchweizen oder grünem Tee enthalten ist [41, 51].

In der Literatur werden diverse pharmakologische Potentiale des Rutin diskutiert, zu denen neben antioxidativen, auch antitumorale, vaso- und kardio-protective sowie neuro-protective Eigenschaften gehören [51].

Besonders häufig wird der neuro-protective Effekt beschrieben. So zeigten Khan et al. an einem Rattenmodell, dass durch eine über drei Wochen verabreichte orale Gabe von Rutin vor einem zerebral-ischämischen Ereignis, das Outcome hinsichtlich der Infarktgröße und neuronaler Defizite unter vorheriger Rutin-Behandlung deutlich

gesenkt werden konnte. Zugerechnet wird dieser Effekt einer Rutin bedingten herunterregulierten p53-Expression und der Aufrechterhaltung endogener, antioxidativer Enzym-Aktivitäten [67].

Auch gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit, Parkinson und Huntington zeigte Rutin positive Wirkungen auf den Krankheitsverlauf. Antitumorale Effekte wurden bisher bei Leukämie, Dickdarmkrebs, Lungen- und Hautkrebs und auch bei Leberkrebsmetastasen beobachtet [51].

1.4.2 Resorption, Metabolismus, Bioverfügbarkeit

Viele in-vitro Studien belegten bemerkenswerte Effekte der Flavonoide bei diversen Erkrankungsbildern. Um ihre Potenz vor dem Hintergrund der alltäglichen Ernährung zu verstehen, spielt aber auch das Verständnis über ihre Resorption, Metabolisierung und Bioverfügbarkeit eine wichtige Rolle.

Flavonoide liegen in der Natur zum großen Teil als Glykoside vor. Ihre Resorptionsfähigkeit hängt nicht zuletzt davon ab, welche Zucker und an welcher Stelle des Flavonoid-Moleküls diese gebunden sind. Die Deglykosylierung ist zentraler Bestandteil in der Aufnahme dieser Phytoestrogene [153].

Dafür stehen drei verschiedene Glykosidasen zur Verfügung: die breit-spezifische- β -Glykosidase (BS β G), die Lactase-Phloridzin-Hydrolase (LPH) und die Glucocerebrosidase (CBG) [58, 153, 154].

Aufgrund zum Teil hoher Substratspezifitäten werden die Glykoside unterschiedlich erfolgreich hydrolysiert, sodass bestimmte Moleküle erst im Dickdarm durch die dort ansässige mikrobakterielle Flora verstoffwechselt werden können, was unmittelbaren Einfluss auf ihre Bioverfügbarkeit hat [36, 58].

Studien wie die von Manach et al. zeigen, dass Rutin erst nach erfolgter Hydrolyse im Dickdarm resorbiert wird, während das Aglycon Quercetin bereits im Dünndarm vom Epithel aufgenommen werden kann [93, 153].

Berichtet wird auch, dass Quercetin in Bindung einer Rutinose wesentlich schlechter und langsamer absorbiert wird als das Quercetin-Aglycon [42]. Liegt Quercetin in Bindung einer Glucose vor, ist die Bioverfügbarkeit im Vergleich zur Bindung einer Rutinose fünfmal höher [53].

Rutin wird teilweise nach Deglykosylierung sogar lediglich als Quercetinlieferant beurteilt [68]. Unterstützt wird dies durch eine Studie, die nach sechswöchiger Rutin-

Supplementierung einen Plasmaanstieg der Flavonoide Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin nachweisen konnte [17].

Diskutiert wird auch, inwieweit die Lebensmittelmatrix, die Flavonoidverbindung und weitere Nahrungsbestandteile Einfluss auf die Absorption haben [58].

Die Bioverfügbarkeit von Apfel-Quercetin-Glykosiden lag beispielsweise lediglich bei 30 % im Vergleich zu Zwiebel-Quercetin-Glykosiden [151].

Die Absorptionsmechanismen im Darmepithel sind multipel. Flavonoid-Aglycone können die Darmwand aufgrund ihres hydrophoben Charakters eigenständig überwinden, während die hydrophileren Glykoside auf Transporter angewiesen sind [58].

Neben dem Na⁺-Glukose-Transporter SGLT1, der als Co-Transporter Flavonoid-Glukoside nach intrazellulär transportiert, wird dieser Einstrom parallel durch das Multi-drug-resistance-associated Protein 2 (MRP2) gedrosselt. Intrazellulär kann das Glykosid dann mittels BS β G (broad-specific- β -Glykosidase) hydrolysiert werden und am basalen Zellpol dem Organismus zu Verfügung gestellt werden [154].

Nach Aufnahme werden die meisten Flavonoide im Darmepithel und in der Leber metabolisch transformiert. Flavonoide können hydrolysiert, oxidiert oder reduziert werden, am häufigsten werden sie allerdings mit Sulfat-, Glukuronsäure- oder Methylresten konjugiert [153]. Diese Schritte werden durch Sulfotransferasen (SULT) und UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT) katalysiert [153, 154], sodass im Plasma kaum Aglycone aufzufinden sind (Abb. 7) [151].

Durch diese Transformationen werden Bioverfügbarkeit und Wirkung maßgeblich beeinflusst. Auch Eigenschaften wie Größe, Ladung, Löslichkeit und die Potenz, biologische Membranen überwinden zu können, werden durch Konjugationen geprägt und beeinflussen die Wirkung am Zielorgan [88, 153]. Beispielsweise wird beschrieben, dass durch Konjugationen Hydroxylgruppen verloren gehen können, die den antioxidativen Charakter bestimmen [153].

Resorbiertes Quercetin wurde in über 95 % in methylierter, sulfatierter und insbesondere in glukuronierter Form im Plasma und anderen Organsystemen detektiert [153].

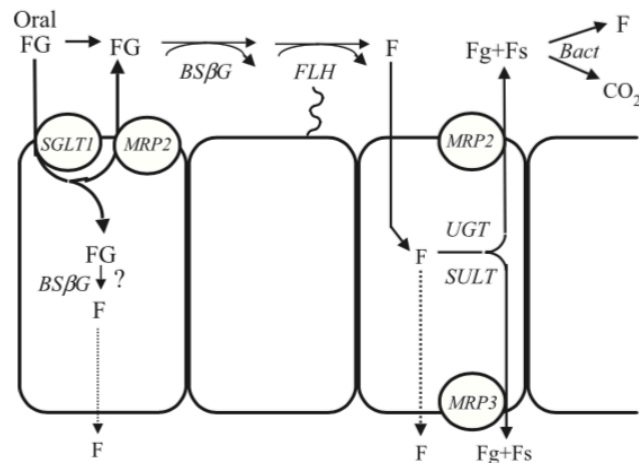


Abbildung 7: Absorptionsmechanismen von Flavonoiden an Enterozyten nach Walle et al. [154].
 F=Flavonoid; FG=Flavonoid-Glykosid; BSβG=broad-specific-β-Glykosidase; SGLT1=Sodium-dependent-glucose-transporter-1; MRP2/3=multi-resistance-associated protein 2/3; UGT=UDP-Glukuronosyltransferase; SULT=Sulfotransferasen, Bact=bakterielle Enzyme, Fg=Flavonoid-Glukuronat, Fs=Flavonoid-Sulfat.

1.5 Allium porrum

Allium porrum, umgangssprachlich als Lauch oder Porree bekannt, gehört zur Familie der Amaryllidgewächse (Amaryllidaceae) und zur Gattung der Allium [128]. Es ist verwandt mit anderen Zwiebelgewächsen, wie der klassischen Küchenzwiebel (*Allium cepa*) oder dem Knoblauch (*Allium sativum*).

Allium porrum wird bis zu 60 cm groß und bildet im Gegensatz zur Wildform nur eine angedeutete Zwiebel am Wurzelwerk. Es wird beim Anbau zwischen Lauch unterschieden, welcher im Sommer, Herbst oder Winter geerntet werden soll, sodass die Anbauzeiten variieren.

Während es in unserer heimischen Küche insbesondere als Suppengemüse bekannt ist, geht die Tradition des Lauchs auf eine jahrtausendalte Erfolgsgeschichte zurück, die ihren Ursprung im Mittelmeerraum nahm.

Schon die Ägypter ernährten sich vom Lauch und schätzten dessen gesundheitsbringende Wirkung. Den Einzug in die Küchen Mitteleuropas erhielt das Zwiebelgewächs wahrscheinlich schon in der Antike [128, 170].

Die gesunden Wirkungen des Lauchs konnten in Untersuchungen bestätigt werden, bei denen ein beträchtlicher Gehalt an Vitaminen und Spurenelementen nachgewiesen wurde. Neben den Vitaminen A, B1, B2, B3, B6, C, E, K und Folsäure sind viele Mineralstoffe wie Natrium, Kalium, Calcium, sowie die Spurenelemente Eisen und Mangan in dem Gemüse enthalten. Darüber hinaus beinhaltet Lauch

ätherische Öle und soll durch schwefelhaltige Inhaltsstoffe entzündungshemmend und antiallergen wirken [11, 128].

In Studien wurden auch antioxidative und antibakterielle Wirkungen festgestellt, wobei interessanterweise die Art der Zubereitung einen nicht unerheblichen Einfluss auf eben diese Effekte haben soll [106]. Roy et al. zeigten, dass die thermische Erhitzung das antioxidative Potenzial erhöhen kann [131].

Daher ist es nicht verwunderlich, dass Pflanzen aus der Allium-Gattung schon lange Einzug in die Naturheilkunde genommen haben und in dieser sehr geschätzt werden [131]. Welches weitere Potenzial im *Allium porrum* steckt und welche Effekte damit verbunden sind, soll unter anderem Gegenstand dieser Arbeit sein.

2 Zielstellung

Das Gefälle der Inzidenzen brustkrebserkrankter Frauen in der Welt verdeutlicht, wie bereits durch Studien belegt, dass unser Lifestyle einen wesentlich größeren Einfluss auf die Genese maligner Neoplasien hat, als es den meisten Menschen in unserer Gesellschaft bewusst ist. Neben dem Definieren von Risikofaktoren und Verhaltensweisen, die gemieden werden sollten, um das individuelle Risiko zu senken, wird protektiven Mechanismen häufig zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Zahlreiche Studien zeigten, dass in manchen Kulturen vermehrt Nahrungsmittel verzehrt werden, die einen großen Anteil an eben diesen protektiven Mechanismen vereinen. Während die malignen Entartungen der Brust bereits sehr gut untersucht wurden und insbesondere das Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock unterschiedlichste Lebensmittel auf Phytoestrogene und deren Auswirkungen auf Krebszellen untersuchte, standen benigne tumoröse Krankheitsbilder bisher weniger im Fokus dieser Forschung.

Die fibrös-zystische Mastopathie ist die häufigste benigne tumoröse Erkrankung der weiblichen Mamma, geht mit einem zum Teil erheblichen persönlichen Leidensdruck einher und kann unter bestimmten histo-pathologischen Voraussetzungen mit einem deutlich gesteigerten Risiko zu einem Mammakarzinom entarten.

Mit dieser Arbeit möchte ich dazu beitragen, alltägliche Lebensmittel und darin enthaltene Flavonoide zu untersuchen, um deren therapeutischen und präventiven Wert in der Pathologie und Genese von benignen, entarteten Brustepithelzellen auch vor dem Hintergrund komplementärmedizinischer Therapieansätze zu veranschaulichen. Das Gesamtverständnis über die Wirkung von Phytoestrogenen an Zelllinien variierender Brustpathologien soll erweitert werden.

Auf Basis unterschiedlicher Lösungsmittel sollen Extrakte aus *Allium porrum* hergestellt und die Inhaltstoffe chromatographisch (HPLC) definiert werden.

Flavonoide sind bereits lange als antitumoral wirkende Substanzen bekannt.

Während bereits viele Studien einen hohen Flavonoidgehalt und antikarzinogenen Effekt der verwandten *Allium cepa* (Küchenzwiebel) und *Allium sativum* (Knoblauch) belegten, ist die derzeitige Studienlage über die Inhaltstoffe und Wirkung der *Allium porrum*-Pflanze unzureichend.

Daher soll die Wirkung des *Allium porrum*-Extraktes an zwei benignen Brustzelllinien, die aus der Mamma einer an fibrös-zystischen Mastopathie erkrankten Frau

gewonnen wurden und im Hormonrezeptorstatus variieren (MCF-10a, MCF-12a) sowie einer physiologischen Mamma-Zell-Linie (HMEC) getestet werden.

Untersucht werden soll, welche konzentrationsabhängigen Wirkungen die Allium Porrum-Extrakte einerseits im Vergleich zu separat hergestellten reinen Flavonoid-Extrakten mit synthetischem Quercetin und Rutin, andererseits aber auch zu Folsäure und stimulierendem Estradiol sowie hemmendem Tamoxifen auf die Zelllinien haben.

Dazu wird die Zellviabilität, Zytotoxizität, Proliferation und Apoptose sowie der Stoffwechsel in vitro nach Behandlung mit entsprechenden Lösungen untersucht.

Auch der Estrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus soll vor diesem Hintergrund als möglicher Faktor im Wirkungsprofil der Phytoestrogene diskutiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Extraktherstellung

Zu Beginn meiner Versuchsreihe wurden insgesamt sechs Lauch-Extrakte hergestellt. Dabei ließ sich die Lauchstange in drei Abschnitte unterteilen: in einen weißen, wurzelnahen, in einen grünen, wurzelfernen Abschnitt sowie in einen Übergangabschnitt in der Mitte der Lauchstange. Diese bildeten die Grundlage für die Zubereitung von jeweils drei ethanolbasierten und drei wasserbasierten, separaten Extrakten. Die in etwa 5x5 mm große Stücke geschnittene Lauchstange wurde je nach Abschnitt getrennt und weiterverarbeitet. Nach einer nächtlichen Lagerung bei -18 °C erfolgte die Extraktherstellung.

3.1.1 Ethanol-basierte Extraktherstellung

Die Lauchbestandteile konnten nun abgewogen, in 5 Gramm-Portionen aufgeteilt und jeweils mit 10 ml 70%igem Ethanol gemischt werden. Im Anschluss erfolgte eine Erwärmung dieser Portionen bei 80 W und 60 °C für 20 min in einer CEM Discover® SP Mikrowelle.

Der flüssige Anteil der dabei entstandenen Suspension ließ sich vorsichtig mit einer Pipette abziehen und in einen 50 ml Tube überführen. Die festen Bestandteile des Lauchs konnten verworfen werden.

Anschließend wurde der flüssige, abgetragene Anteil bei 4030 U/min 15 min zentrifugiert (Hettich Universal 320 R). Danach war es möglich den Überstand vorsichtig mit einer Pipette abzuziehen und auf Eppendorf-Tubes aufzuteilen. Nach einer weiteren fünfminütigen Zentrifugation bei 5000 U/min (Heraeus BIOFUGE pico) konnte der Überstand in ein Sammelgefäß überführt werden.

Die Prozedur wurde insgesamt viermal wiederholt. Nach einer Filtration (0,45 µm Porengröße) der gesammelten Suspension ließ sich das Extraktvolumen bei 45 °C in einer Verdampfungs-Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) auf 1 ml einengen.

3.1.2 Wasser-basierte Extraktherstellung

Dieses Verfahren ähnelt der ethanolbasierten Extraktherstellung. Die ebenfalls in 5 g portionierten Lauchbestandteile wurden mit 10 ml Wasser aufgefüllt und bei 100 W und 80 °C 20 min in der CEM Discover® SP Mikrowelle erwärmt.

Der flüssige Suspensionsanteil ließ sich mittels Pipette in einen 50 ml Tube überführen und der feste Bestandteil konnte verworfen werden. Im nächsten Schritt folgte die Zentrifugation bei 4030 U/min für 15 min mit der Hettich-Universal-320 R-Zentrifuge. Der Überstand konnte äquivalent der ethanolbasierten Extraktherstellung in Eppendorf-Tubes gegeben und diese anschließend über 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert werden (Heraeus-BIOFUGE-pico). Nach viermaliger Wiederholung des Vorgangs konnte die gesammelte Suspension ebenfalls filtriert (0,45 µm Porengröße) werden. Anschließend wurde die Suspension mittels Verdampfungs-Vakuum-Zentrifuge (Eppendorf Concentrator 5301) bei 60 °C auf 1 ml eingeeengt.

Die Extrakte waren im Anschluss und während aller Testverfahren bei -24 °C eingelagert worden. Für die sich anschließenden Versuche wurde der Extrakt mit seinem jeweiligen Lösungsmittel auf 50 %, 20 % und 10 % verdünnt. Dies ermöglichte eine Arbeit mit vier verschiedenen Konzentrationen.

3.2 Zellkulturlinien und Zellkultivierung

3.2.1 Zellkulturlinien

Für die durchgeführten Untersuchungen der Extrakte und Kontrollsubstanzen standen drei verschiedene Zelllinien der weiblichen Mamma zur Verfügung. Alle drei Zelllinien ließen sich durch das Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock kommerziell erwerben und bei -180 °C in flüssigem Stickstoff einlagern.

Um das Risiko von Mutationen zu minimieren, die den Hormonrezeptorstatus verändern könnten, wurde darauf geachtet keine Zellkulturen jenseits der 30. Passage zu verwenden.

3.2.1.1 MCF-10a

Die MCF-10a-Zellen sind benigne, prä-neoplastische, immortalisierte Mamma-Epithelzellen, die einer 36 Jahre alten, an einer fibrös-zystischen Mastopathie

erkrankten kaukasischen Frau entnommen wurden. Die Zelllinie MCF-10a konnte von adhärennten Zellen abgeleitet werden [97, 98, 144, 150].

3.2.1.2 MCF-12a

Bei den MCF-12a-Zellen handelt es sich um benigne, spontan immortalisierte Mamma-Epithelzellen einer 60 Jahre alten, Nullipara betreffenden, kaukasischen Frau, die an einer fibrös-zystischen Mastopathie erkrankte. Es handelt sich um eine von adhärennten Zellen abgeleitete Zelllinie. Diese konnten im Rahmen einer Reduktions-Mammoplastik entnommen und kultiviert werden. Die Kultur enthielt auch fokale Anteile intraduktaler Hyperplasien [99, 119].

3.2.1.3 HMEC

Die HMEC (Primary Human Mammary Epithelial Cells) ist eine physiologische, nicht immortalisierte weibliche Mamma-Epithelzelllinie. Dementsprechend haben diese Zellen nur eine geringe Lebensspanne [65, 123].

3.2.2 Zellkultivierung

Für die Zellkultivierung konnte auf ein Zellkulturmedium zurückgegriffen werden, das im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik eigens angesetzt worden war. Dabei unterscheiden sich die Medien für die Zelllinien MCF-10a und MCF-12a gegenüber den HMEC.

Die Basis für das Zellkulturmedium der MCF-10a- und MCF-12a-Zelllinien lieferte das Verhältnis 1:1 von 250 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sowie 250 ml Ham's F12. 25 ml Horseserum (5 %), 100 µl Cholera Toxin (Cholera Toxin from *Vibrio Cholerae*) und 10 ml des Supplements des MECGM (Mammary Epithelial Cell Growth Medium) wurden hinzugegeben. Dieses Supplement enthielt spezielle Inhaltstoffe, die für das Wachstum von Mamma-Epithelzellen essentiell sind. Die Endkonzentration dieser Inhaltstoffe im Zellkulturmedium betrug 0,004 ml/ml eines Rinderhypophysenextrakts, 10 ng/ml Epidermal Growth Factor, 5 µg/ml Insulin und 0,5 µg/ml Hydrocortison [92].

Um einer bakteriellen und mykotischen Infektion vorzubeugen, erfolgte eine Beimischung von 1,0 ml Penizillin-Streptomycin (10,000 U Penizillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml) und 2,5 ml Amphotericin B (250 µg/ml).

Für das Zellkulturmedium der HMEC wurde das MEBM® (Mamma Epithel Basal Medium) benötigt, das keine Wachstumsfaktoren beinhaltet und sich darüber hinaus mit einem Mamma-Epithel-Zell-Supplement versetzten ließ. Das Zellkulturmedium besaß nach Zugabe des Supplements zum MEBM® folgende Inhaltstoffe und Konzentrationen: 2 ml/500 ml Rinderhypophysenextrakt, 0,5 ml/500 ml Epidermal Growth Factor, 0,5 ml/500 ml Insulin, 0,5 ml/500 ml Hydrokortison, 0,5 ml/500 ml Gentamycin- Sulfat/ Amphotericin B. Zusätzlich fand eine Beimischung von 2,5 ml Amphotericin B und 1,0 ml Penicillin statt.

3.2.2.1 Ansetzen der Zellkulturen

Alle drei Zelllinien waren bei -180 °C unter Verwendung von Stickstoff gekühlt worden und mussten vor der ersten Aussaat zunächst aufgetaut werden. Die Zellen wurden mit dem Frostschutzmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelt, um sie während des Gefriervorgangs vor Beschädigungen zu schützen. Da dieses Lösungsmittel aber ebenfalls als Zellgift wirkt, erfolgte zunächst eine Mischung der ca. 1,5 ml großen Zellsuspension mit 26 ml des Zellkulturmediums in einem 50 ml Tube, bevor es bei 1200 U/min 6 min ohne Bremse zentrifugiert wurde. Nach Beendigung der Zentrifugation konnte der Überstand verworfen und das Pellet mit 7 ml des entsprechenden Zellkulturmediums resuspendiert werden. Anschließend erfolgte die Überführung der Zellsuspension in eine 25 ml Zellkulturflasche, die mit einem Bakterienfilter im Flaschendeckel versehen war. Nach einer Begutachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop kamen diese im Zellkulturschrank bei 37 °C, einer 5%igen CO₂-Begasung und einer mit Wasserdampf gesättigten Luft unter. Alle Arbeiten fanden unter sterilen Kautelen statt.

3.2.2.2 Passagieren der Zellen

Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel der Zellen. Nach 90%iger Konfluenz sind die Zellen im Rahmen steriler Kautelen unter einer Zellkulturbank passagiert worden.

Das bisherige Zellkulturmedium konnte den Zellkulturflaschen mit einer Pipette entnommen und verworfen werden. Es folgte eine kurze Spülung der adhärenen Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (1:10 mit PBS verdünnt), die anschließend ebenfalls verworfen wurde. Das folgende Auftragen der Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte so, dass der gesamte Boden der Zellkulturflasche gut benetzt war. Die Protease sorgte für das Ablösen der adhärenen Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen. Nach einer fünfminütigen Inkubationsphase im Brutschrank war es möglich, frisches Zellkulturmedium hinzuzugeben, um eine weitere proteolytische Reaktion des Trypsins zu inhibieren. Die Zellsuspension ließ sich mit einer Pipette vorsichtig entnehmen und in ein 50 ml Tube überführen. In einem weiteren Schritt erfolgte die Zentrifugation der Lösung bei 1200 U/min für 6 min ohne Bremse. Anschließend konnte der Überstand dekantiert und das entstandene Pellet mit neuem Zellkulturmedium versehen werden. Nach gründlicher Auflösung des Pellets im Zellmedium durch den Vortex wurde dieses in eine neue Zellkulturfläche überführt. Nach jedem Passagieren fand eine Begutachtung der Zellen unter einem Lichtmikroskop statt, bevor diese wieder in den Brutschrank überführt wurden.

3.3 Ermittlung der Lebendzellzahl

Um alle anschließenden Tests zu standardisieren und möglichst vergleichbar darzustellen, ist die einzusetzende Lebendzellzahl von großer Bedeutung. Diese ließ sich vor jedem Test aus der entsprechenden Zellkulturflasche mit einer Bürker-Zählkammer bestimmen (Abb. 8).

Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und mit 360 µl des jeweiligen Nährmediums sowie 20 µl Trypanblau in einem Eppendorf-Tube vermengt. Es entstand also eine 1:20 verdünnte Zellsuspension. Daraufhin folgte die Überführung von jeweils 10 µl der angesetzten Suspension in die beiden Bürker-Zählkammern und eine Ermittlung der Zellzahl unter einem Lichtmikroskop bei 100x-Vergrößerung. Insgesamt ist eine Auszählung von 2x25 Quadranten nötig, um die Lebendzellzahl zu bestimmen.

Das Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff und eignet sich sehr gut, um eine Aussage über die Zellviabilität zu treffen. Es wird daher häufig beispielsweise im Bereich der Mikrobiologie für die Bestimmung der Lebenszellzahl einer Zellkultur verwendet. Das Prinzip basiert darauf, dass das Trypanblau nicht in der Lage ist,

durch eine intakte, physiologische Zellmembran zu diffundieren und lediglich im Falle einer perforierten, geschädigten Zellmembran in das Innere der Zelle eindringt. Auf diese Weise imponieren vitale Zellen als nicht gefärbt, letale Zellen hingegen haben den Farbstoff aufgenommen.

Es ergibt sich folgende Rechnung:

$$\text{Zellzahl/ ml} = Z \times V \times KF$$

Z = Summe der Zellzahl die in 2x25 Quadranten gezählt wurden

V = Verdünnung

KF = Kammerfaktor (10^4)

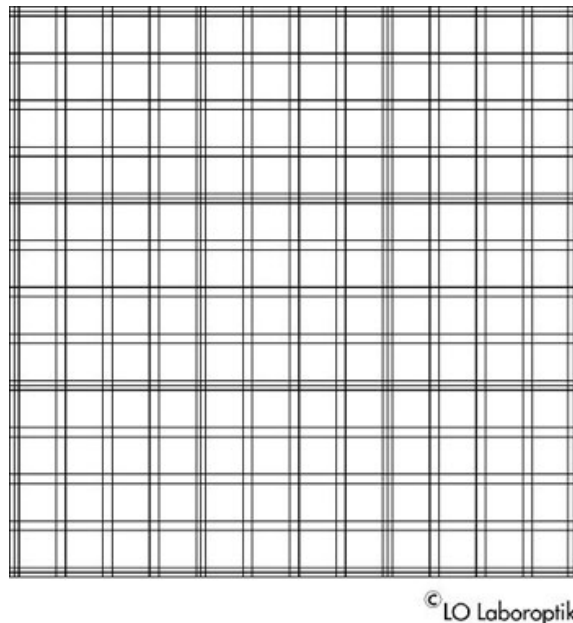


Abbildung 8: Darstellung einer Bürker-Zählkammer unter mikroskopischer Sicht [167].

3.4 Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemische Untersuchung sollte der Sicherung des Hormonrezeptorstatus der untersuchten Zelllinien dienen. Von Interesse sollte dabei der Estrogen- α , Estrogen- β sowie der Progesteron-Rezeptor sein, um mögliche Zusammenhänge nachfolgender Testergebnisse in Bezug auf das Vorhandensein der Rezeptoren analysieren zu können.

Dabei bindet sich ein Primärantikörper an ein Antigen, das in diesem Fall der Hormonrezeptor ist. Nun kann sich in einer weiteren Reaktion ein Enzym-

gekoppelter Sekundär-Antikörper an den erstplatzierten Antikörper binden. Durch die Zugabe eines Substrats, welches durch das am zweiten Antikörper gebundene Peroxidase-Enzym gespalten werden kann, ergibt sich ein Farbumschlag, der unter dem Lichtmikroskop zu beobachten ist (Abb. 9).

Im Falle einer positiven Farbreaktion imponieren die Zellen rötlich. Die Negativkontrolle darf keine Farbreaktion zeigen.

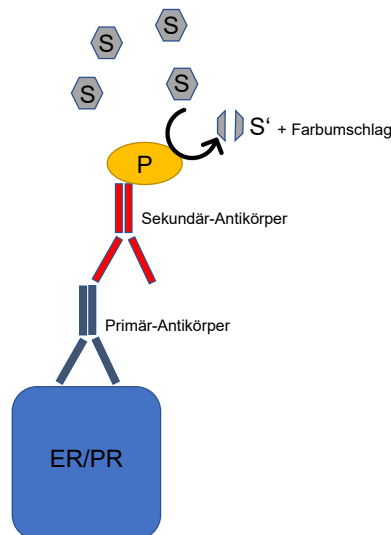


Abbildung 9: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Reaktion. ER=Estrogenrezeptor, PR=Progesteronrezeptor, P=Peroxidase, S=Substrat.

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 200.000 Zellen/ml auf einer 24-Well-Platte. Die Zellsuspension beträgt 300 μ l/ Well
- Schritt 2: 48 h Inkubationsphase im Brutschrank bei 37 °C, 5%iger CO₂-Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre
- Schritt 3: Vorsichtiges Entfernen des Mediums und dreimaliges Spülen der Wells mit PBS
- Schritt 4: Fixierung der Zellen durch 1 ml/Well Formafix (4 % Formalin in PBS gepuffert) über 30 min, danach dreimaliges Spülen mit PBS
- Schritt 5: Zugabe von 1 ml/Well 0,3 % H₂O₂ und Inkubation für 30 min, um eine endogene Peroxidase-Reaktion zu hemmen, danach dreimaliges Spülen mit PBS

- Schritt 6: Zugabe von Pferdeserum, bis der Well-Boden vollständig benetzt ist, um unspezifische Reaktionen zu blockieren; Inkubation für 20 min bei RT
- Schritt 7: Pferdeserum außer bei Negativkontrolle entfernen und 200 µl (ca. vier Tropfen) Primär-Antikörper hinzugeben (ER- α -Antikörper 1:100 mit PBS verdünnt, Monoklonaler Antikörper der Firma Biorbyt, USA; ER- β -Antikörper 1:40 mit PBS verdünnt, Monoklonaler Antikörper der Firma Gene-Tex, USA; PR-Antikörper 1:100 mit PBS verdünnt, Monoklonaler Antikörper der Firma Biorbyt, USA), Inkubation für 24 h bei 4 °C im Kühlschrank
- Schritt 8: Primärantikörper entfernen und dreimaliges Spülen mit PBS
- Schritt 9: Zugabe von 200 µl (ca. vier Tropfen) des Sekundärantikörpers (Universal Anti-Mouse/Rabbit IgG Antikörper der Firma Vector Laboratories, USA); Inkubation für 30 min bei RT
- Schritt 10: Dreimaliges Spülen mit PBS und Zugabe von 0,5 ml/Well LinRed IHC (Substrat); Inkubation für 15 min im Dunkeln
- Schritt 11: LinRed IHC entfernen und die Reaktion mit Leitungswasser stoppen
- Schritt 12: Zellen mit PBS bedecken, um einer Austrocknung vorzubeugen
- Schritt 13: Begutachtung unter dem Lichtmikroskop

3.5 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die einzelnen Komponenten eines Extrakts anhand ihrer Polarität aufgetrennt werden und mittels eines Detektors sowohl qualitativ als auch quantitativ vermessen werden können.

Im Fokus meiner wissenschaftlichen Arbeit steht der qualitative Nachweis von Flavonoiden der *Allium porrum* – Extrakte, insbesondere im Hinblick auf Rutin und Quercetin.

Bereits in früheren Versuchen des qualitativen und quantitativen Nachweises von Flavonoiden hat sich die HPLC-Methode bewährt, weshalb auch hier auf sie zurückgegriffen wurde [7, 113, 139].

Eine HPLC-Apparatur setzt sich grundsätzlich aus mindestens fünf Einzelkomponenten zusammen. Sie besitzt eine Pumpe, die in der Lage ist, einen Druck von bis zu 350 bar zu erzeugen und einen Injektor, über den die zu analysierende

Probe (hier 20 µl) injiziert werden kann. Der Injektor ist dabei kurz vor der Pumpe installiert (Abb. 10). Von dort wird die Probe von der Pumpe in eine Säule befördert, in der die eigentliche Trennung stattfindet. Anschließend werden mit Hilfe eines UV-Detektors die vorhandenen Inhaltstoffe analysiert. Gesteuert wird die gesamte HPLC-Anlage über einen angeschlossenen Rechner mit dem Programm Clarity-Chrome (Abb.10) [105].

Das zugrunde liegende Trennprinzip basiert auf zwei Phasen mit unterschiedlicher Polarität, die dazu führen, dass Bestandteile des Extrakts zeitverzögert durch die Trennsäule fließen und einzeln vermessen werden können. Zum einen gibt es die mobile, flüssige Phase - den Eluenten. Bei dieser Untersuchung wurde ein sich mit der Zeit ändernder Gradient aus DMSO (Dimethylsulfoxid) mit 10 % Aquabidestilata und Aquabidestilata, gemischt mit 10 % MeOH, verwendet. Es handelt sich bei beiden Eluenten um polare Flüssigkeiten. Zum anderen ist eine stationäre Phase am Inneren einer rostfreien Stahlsäule installiert und besteht aus einer Kohlenstoffsäule (C18-Säule), die unpolar ist. Mit einer Laufzeit von 1 ml pro Minute laufen die zu trennenden Stoffe mit der mobilen Phase durch die Säule und binden sich temporär an der stationären Phase. Über den Injektor werden dem Eluenten 20 µl Probenmaterial hinzugegeben.

Der Gradient wird mit der Zeit verändert, um dadurch variierende Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase abbilden zu können. Die Justierung des Gradienten hat zur Folge, dass sich die temporär bindenden Stoffe zu unterschiedlichen Zeiten lösen und so aufeinanderfolgend alle Bestandteile des Extrakts isoliert detektiert werden können [70].

Auf diese Weise ist es möglich, Stoffe zu differenzieren, die sich zum Teil nur sehr gering in ihren physikalischen Bindungseigenschaften unterscheiden. Aus den erhobenen Messdaten ergibt sich ein Chromatogramm, das mit Hilfe des Programms Clarity-Chrome dargestellt wird.

Die Abszisse gibt die Zeit (Retentionszeit) an, während über die Ordinate die Absorbanz aufgeführt wird (Abb. 11). Jeder zu trennende Stoff äußert sich in einem separaten Peak auf dem Chromatogramm, wobei die Fläche proportional zur Menge des analysierten Stoffs in der Probe steht [70].

Es wurden sowohl Kontrolllösungen für Quercetin, Rutin und Folsäure angesetzt, um anhand der zeitlichen Interferenz ausschlagender Peaks Stoffe zu identifizieren und

zuordnen zu können. Alle Untersuchungen erfolgten mindestens zweimal, um auch die Reproduzierbarkeit zu belegen.

Bei den Messungen wurde in Absprache mit dem Chemiker Prof. Dr. Jeschke eine Wellenlänge von 254 nm gewählt, die sich auch schon zuvor bei der chromatographischen Messung von Flavonoiden bewährt hat.

Im Anschluss an die Versuchsreihe hat Herr Prof. Jeschke von der Ludwig-Maximilians-Universität München die Ergebnisse gesichtet und diese verifiziert.

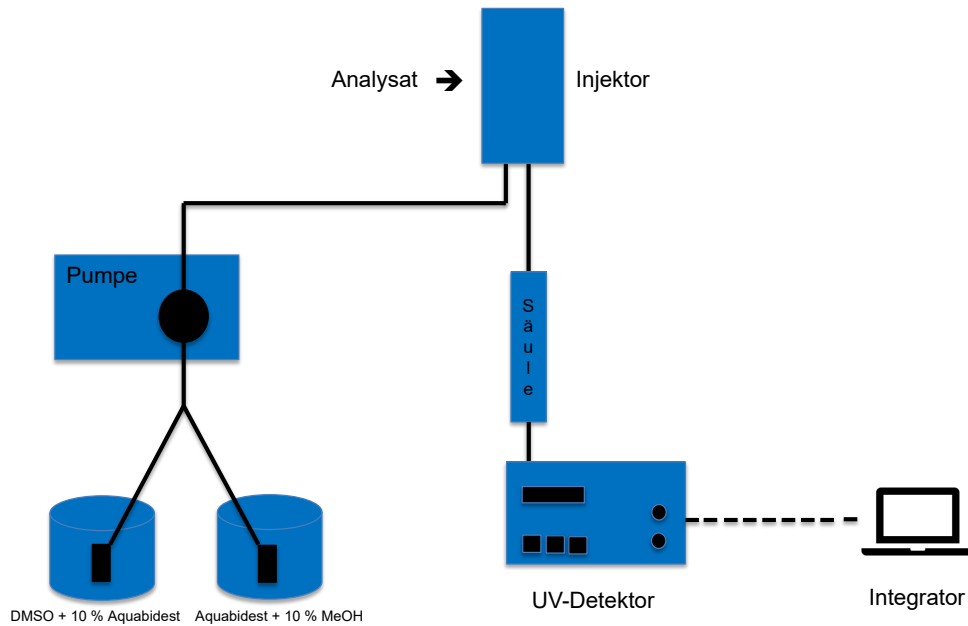


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer HPLC Anlage, modifiziert nach „Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern“ von Veronika R. Meyer [105].

Diese Abbildung zeigt den generellen Aufbau einer HPLC mit ihren fünf wesentlichen Einzelkomponenten: Pumpe, Injektor, Säule, UV-Detektor, Integrator.

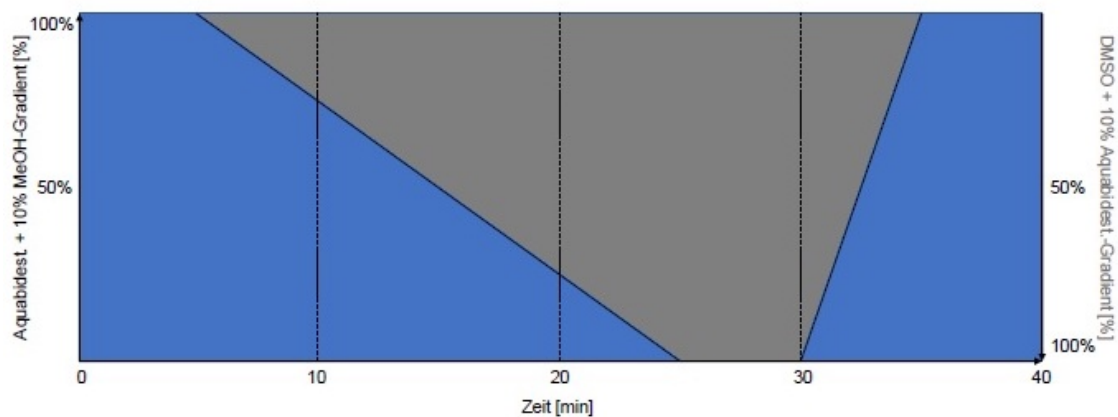


Abbildung 11: Schematische Darstellung des HPLC-Gradienten der mobilen Phase. Blau=Aquabidest. + 10 % MeOH, Grau=DMSO + 10 % Aquabidest.

3.6 CellTiter-Glo® - Viabilitätstest

Der CellTiter-Glo® - Vitalitätstest kann durch das Quantifizieren des ATP-Gehalts auf Grundlage einer Lumineszenz-Messung die metabolisch aktiven Zellen ermitteln. Die Lumineszenz bildet sich proportional zu der ATP-Konzentration in den Zellen aus. Besteht also eine hohe Vitalität, die mit einer entsprechend hohen zytosolischen ATP-Konzentration einhergeht, kann eine dementsprechend starke Lumineszenz gemessen werden [25].

Grundlage dieses Prinzips ist das Luciferase-Enzym, das aus dem *Photuris pennsylvanica*, einem Leuchtkäfer aus Nordamerika, abgeleitet werden konnte. Dieses Enzym ist in der Lage, das Substrat Luciferin unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP in Oxyluciferin umzusetzen. Die dabei freiwerdende Lumineszenz kann mittels Luminometer detektiert und quantifiziert werden (Abb. 12) [25].

Eine Besonderheit besteht darin, dass das Luciferase-Enzym thermostabil und bei normaler Raumtemperatur aktiv ist, während das Temperaturoptimum der Mamma-Epithelzellen bei 37 °C liegt und endogene Enzyme damit inaktiviert werden. Dadurch kann zum einen ein stabiles Lumineszenz-Signal gewährleistet werden, zum anderen können aber auch zelleigene ATP verbrauchende Aktivitäten blockiert werden, die zu einer Verfälschung führen könnten [25].

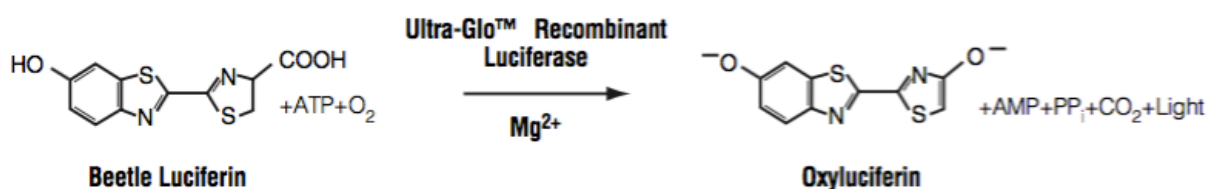


Abbildung 12: Luciferase-Reaktion des CellTiter-Glo® [25].

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 µl Zellsuspension pro Well mit einer Konzentration von 300.000 Zellen/ml
- Schritt 2: Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5%iger CO₂-Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre
- Schritt 3: Auftragen von 1 µl der Extrakte und Kontrollen, Inkubation für 24 h im Brutschrank

- Schritt 4: Entnahme der Zellen aus dem Brutschrank und 30-minütige Lagerung bei RT, um die Zellsuspensionen abzukühlen
- Schritt 5: 100 µl CellTiter-Glo® - Reagenz (Verhältnis 1:1) hinzugeben und 2 min auf dem Orbital Shaker bei RT inkubieren lassen, damit eine Zelllyse eintreten kann
- Schritt 6: Inkubation für 30 min bei RT, Ausbildung der Lumineszenz
- Schritt 7: Übertragung auf ein Luminometer-kompatibles Well und Messung der Lumineszenz durch den GloMax® Luminometer (Promega)

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch die Bildung eines Mittelwerts der Lumineszenz-Messung für die jeweilige Vierfachbestimmung der Untersuchungsmedien. Von diesem ist der Mittelwert der ebenfalls vierfach bestimmten Medium-Lumineszenz subtrahiert worden, um einen Einfluss durch das jeweilige Nährmedium auszugleichen. Die Zell-Medium-Suspension wurde auf 100 % festgelegt und alle weiteren Zellsuspensionen, denen Extrakte, Kontrollen oder Referenzen zugesetzt worden waren, wurden in Relation der jeweiligen Lösungsmittel aufgeführt.

Beispielrechnung:

Für die beispielhafte Errechnung der Zellviabilität für die Zell-Medium-Extrakt [100 %] – Suspension kann folgende Rechnung angenommen werden:

Zell-Medium-Extrakt [100 %] =

$$\frac{\left(\frac{\text{Messwert (Ex.)1} + \text{Messwert (Ex.)2} + \dots + 4}{4}\right) - \left(\frac{\text{Messwert (Medium) 1} + \text{Messwert (Medium) 2} + \dots + 4}{4}\right)}{\text{Zellen} + \text{Medium} + \text{Ethanol 70 \%}} \times 100$$

3.7 BrdU-Proliferationstest

Der BrdU-Test (5-bromo-2'-desoxyuridine-Test) ist ein photometrisch messbarer Proliferationstest. Dieser Test ermöglicht es, das Proliferationsverhalten der Zellkulturen in Abhängigkeit von den ihnen zugesetzten Extrakten kolorimetrisch dazustellen.

Bromdesoxyuridin ist ein Pyrimidin-Analogon, welches in den DNA-Strang eingebaut werden kann.

Grundlage dieses Prinzips ist, dass der Zellkultur Bromdesoxyuridin zugesetzt wird, das während der Replikation der DNA anstelle des Pyrimidins Thymidin in den DNA-Strang der Zellen eingebaut wird (Abb. 13) [24]. Je häufiger sich die Zellen teilen, desto vermehrt kommt es zum Einbau des Pyrimidin-Analogons. In einem weiteren Schritt werden Antikörper eingesetzt, die sich innerhalb einer festgelegten Inkubationszeit an das Bromdesoxyuridin binden. Diese Antikörper sind mit einer Peroxidase gekoppelt [24]. Durch Zusetzen des Substrats Tetramethylbenzidin, das von der Peroxidase gespalten wird, entsteht ein Farbumschlag. Dieser kann durch einen ELISA-Reader (Enzym linked Immunosorbent Assay) proportional zum eingebauten Bromdesoxyuridin und den daran gebundenen Antikörpern quantitativ dargestellt werden [24].

Verhalten sich die Zellkulturen also proliferativ hoch aktiv, kann dies durch einen intensiveren Farbumschlag dargestellt werden. Findet hingegen kaum ein Wachstum statt, fällt die photometrisch messbare Absorbanz nur gering aus.

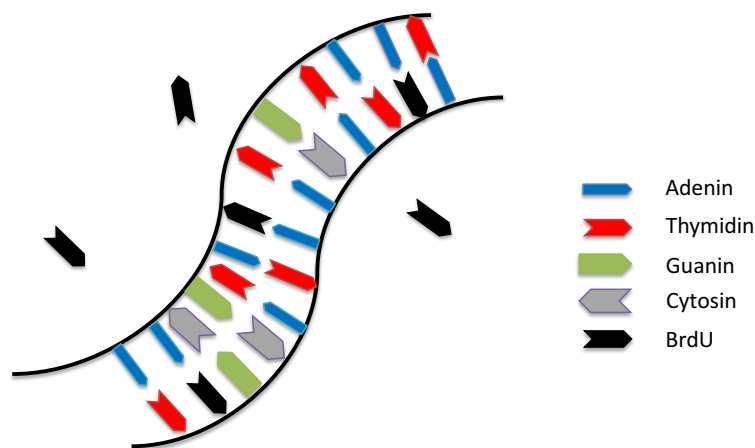


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Einbaus von BrdU anstelle von Thymidin in den DNA Strang.

Durchführung:

Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 µl Zellsuspension pro Well mit einer Konzentration von 400.000 Zellen/ml

Schritt 2: Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5%iger CO₂-Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre

- Schritt 3: Auftragen von 1 µl der Extrakte und Kontrollen, Inkubation für 24 h im Brutschrank
- Schritt 4: Zugabe von 10 µl BrdU-Lösung (1:100 mit entsprechendem Kulturmedium verdünnt) unter Ausschluss der Background Kontrolle, Inkubation für 4 h im Brutschrank
- Schritt 5: Entnahme des Mediums und Zugabe von 200 µl/Well Fix-Denat-Lösung, um die Zellen zu fixieren, Inkubation für 30 min bei RT
- Schritt 6: Fix-Denat-Lösung durch „herausklopfen“ entfernen und 100 µl/Well Anti-BrdU-POD Arbeits-Lösung hinzugeben, Inkubation für 60 min bei RT
- Schritt 7: Arbeits-Lösung durch „herausklopfen“ entfernen und dreimaliges Spülen mit 200 µl/Well Wasch-Lösung (1:10 mit Aquabidest. verdünnt)
- Schritt 8: Wasch-Lösung „herausklopfen“ und Zugabe von 100 µl/Well Substrat-Lösung; Inkubation für 10 min bei RT
- Schritt 9: Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 25 µl/Well 1-molarer Schwefelsäure
- Schritt 10: Photometrische Messung des Farbumschlags durch einen ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzlänge von 620 nm

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch die Bildung eines Mittelwerts der Absorbanz für die jeweilige Vierfachbestimmung der Untersuchungsmedien. Von diesem wurde der Mittelwert der ebenfalls vierfach bestimmten Medium-Absorbanz subtrahiert, um einen Einfluss durch das jeweilige Nährmedium auszugleichen.

Die Zell-Medium-Suspension ist auf 100 % festgelegt worden und alle weiteren Zellsuspensionen, denen Extrakte, Kontrollen oder Referenzen zugesetzt worden waren, wurden in Relation der jeweiligen Lösungsmittel aufgeführt.

Zum Ausschluss unspezifischer Reaktion der Anti-BrdU-Antikörper mit den Zellen, ohne dass BrdU zugesetzt worden ist, erfolgte zusätzlich eine Background-Kontrolle. Diese sollte negativ ausfallen, also keine beziehungsweise eine marginale Absorbanz abbilden.

Beispielrechnung:

Für die beispielhafte Errechnung der Zellproliferation für die Zell-Medium-Extrakt [100 %] – Suspension kann folgende Rechnung angenommen werden:

Zell-Medium-Extrakt [100 %] =

$$\frac{\left(\frac{\text{Messwert (Ex.)1} + \text{Messwert (Ex.)2} + \dots + 4}{4}\right) - \left(\frac{\text{Messwert (Medium) 1} + \text{Messwert (Medium) 2} + \dots + 4}{4}\right)}{\text{Zellen} + \text{Medium} + \text{Ethanol 70 \%}} \times 100$$

3.8 CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest

Der Promega CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest kann durch die kolorimetrische Messung der „Dead-Cell-Protease-Aktivität“ die Zytotoxizität der Zellen ermitteln.

Grundlage dabei ist, dass die „Dead-Cell-Protease“ lediglich bei beschädigten, perforierten Zellmembranen aus dem Zellinneren in das Kulturmedium übertreten kann. Das Alanin-Alanin-Phenylalanin-Aminoluciferin wird durch die Protease gespalten und das dabei entstehende Aminoluciferin durch eine thermostabile Luciferase unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP verstoffwechselt. Dabei entsteht ein Lichtsignal, das durch ein Luminometer detektiert werden kann (Abb. 14) [34].

Da die „Dead-Cell-Protease“ die intakte Membran lebender Zellen nicht überwinden kann, werden spezifisch die zytotoxischen Zellen erfasst.

In einem weiteren Schritt können die restlichen Zellen durch Zugabe eines Lyse-Reagenz zur Freisetzung der Protease aus den eigentlich vitalen Zellen bewegt werden, um auf diese Weise indirekt auch die Zellviabilität zu explorieren. Dazu wird lediglich das Lumineszenz-Signal der zytotoxischen Zellen von dem Signal subtrahiert, welches nach Lyse der verbliebenden Zellen entstanden ist [34].

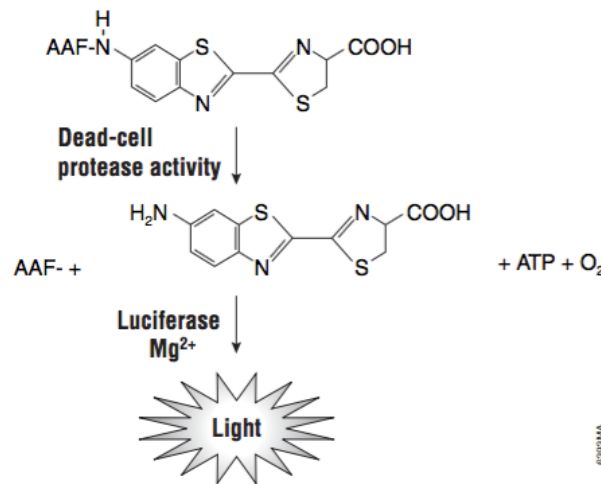


Abbildung 14: Funktionsprinzip des CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest [34].

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 µl Zellsuspension pro Well mit einer Konzentration von 200.000 Zellen/ml
- Schritt 2: Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5%iger CO₂-Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre
- Schritt 3: Auftragen von 1 µl der Extrakte und Kontrollen, Inkubation für 24 h im Brutschrank
- Schritt 4: Zugabe von 50 µl/Well Zytotoxizitäts-Reagenz, Inkubation für 15 min bei RT, davon 2 min auf dem Orbital Shaker
- Schritt 5: Übertragung auf ein Luminometer-kompatibles Well und Messung durch den GloMax® Luminometer (Promega)
- Schritt 6: Zugabe von 50 µl/Well Lyse-Reagenz und Inkubation für 15 min bei RT
- Schritt 7: Messung der Lumineszenz durch den GloMax® Luminometer (Promega)

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte in zwei Schritten.

Die erste Lumineszenz-Messung wurde nach Zugabe des Zytotoxizitäts-Reagenzes gemessen.

Die Auswertung erfolgte durch die Bildung eines Mittelwerts der Lumineszenz-Messung für die jeweilige Vierfachbestimmung der Untersuchungsmedien. Von

diesem wurde der Mittelwert der ebenfalls vierfach bestimmten Medium-Lumineszenz subtrahiert, um einen Einfluss durch das jeweilige Nährmedium auszugleichen.

Beispielrechnung:

Für die beispielhafte Errechnung der Zellviabilität für die Zell-Medium-Extrakt [100 %] – Suspension kann folgende Rechnung angenommen werden:

Zell-Medium-Extrakt [100 %] =

$$\frac{\left(\frac{\text{Messwert (Ex.)}1 + \text{Messwert (Ex.)}2 + \dots + 4}{4}\right) - \left(\frac{\text{Messwert (Medium)}1 + \text{Messwert (Medium)}2 + \dots + 4}{4}\right)}{\text{Zellen} + \text{Medium} + \text{Ethanol } 70 \%} \times 100$$

Im zweiten Schritt wurde nach Zugabe der Lyse-Reagenz die Lumineszenz erneut gemessen, die im Weiteren als totale Lumineszenz bezeichnet wird. Es erfolgten die gleichen Rechenschritte, wie sie bereits bei Schritt eins aufgeführt sind. Nun wurde von der totalen Lumineszenz die im ersten Schritt ermittelte Lumineszenz subtrahiert. Daraus ergab sich die indirekte Zellviabilität.

Die Zell-Medium-Suspension wurde auf 100 % festgelegt und alle weiteren Zellsuspensionen, denen Extrakte, Kontrollen oder Referenzen zugesetzt worden waren, werden in Relation der jeweiligen Lösungsmittel aufgeführt.

Die Zytotoxizität ermittelte sich nun durch die Subtraktion der Zellviabilität von 100 %:

$$\text{Zytotoxizität} = 100 \% - \text{Zellviabilität} [\%]$$

3.9 Caspase-Glo® - Apoptosetest

Durch den Caspase-Glo® 3/7 Assay wird die Aktivität des endogenen Caspase-Systems, also dem zelleigenen Apoptose-System, gemessen. Diese Messung erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten.

Zuerst wird durch Zugabe des Caspase-Reagenzes ein Substrat (Z-DEVD-Aminoluciferin) geliefert, das durch die endogenen Caspasen drei und sieben gespalten wird. Das dabei entstehende Aminoluciferin kann im zweiten Schritt durch

eine thermostabile, robuste Luciferase unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff oxidiert werden, wodurch eine messbare Lumineszenz entsteht, die anschließend durch einen Luminometer quantifiziert wird (Abb. 15) [23].

In der Auswertung werden die mit C6-Ceramid (N-Hexanyl-D-Sphingosine) behandelten Zellen als Positivkontrolle verwendet. C6-Ceramide haben einen beträchtlichen Einfluss auf den Zellmetabolismus. Unter anderem wirken sie stimulierend auf die Caspase drei, haben Einfluss auf den NF κ B-Spiegel und interagieren mit der DNA und dem Zellzyklus [125].

Promega empfiehlt eigentlich Staurosporine als Positivkontrolle, die einen analogen Effekt im Hinblick auf die Aktivitätssteigerung der Caspase drei besitzen [23]. Aus Kostengründen wurde aber auf C6-Ceramid zurückgegriffen.

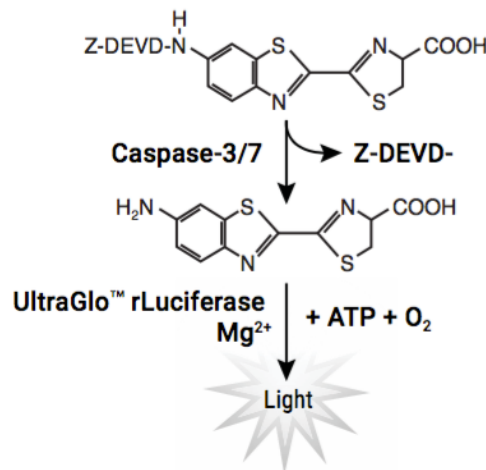


Abbildung 15: Funktionsprinzip des Caspase-Glo® 3/7 - Apoptosetests [23].

Durchführung:

- Schritt 1: Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat von 100 μ l Zellsuspension pro Well mit einer Konzentration von 200.000 Zellen/ml
- Schritt 2: Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5%iger CO₂-Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre
- Schritt 3: Auftragen von 1 μ l der Extrakte und Kontrollen, Inkubation für 24 h im Brutschrank
- Schritt 4: Zugabe von 100 μ l/Well Caspase-Glo® 3/7-Reagenz (Verhältnis zur Zellsuspension 1:1); Inkubation für 60 min bei RT, davon 30 s auf dem Orbital Shaker

Schritt 5: Übertragung auf ein Luminometer-kompatibles Well und Messung durch den GloMax® Luminometer (Promega)

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch die Bildung eines Mittelwerts der Lumineszenz-Messung für die jeweilige Vierfachbestimmung der Untersuchungsmedien. Von diesem wurde der Mittelwert der ebenfalls vierfach bestimmten Medium-Lumineszenz subtrahiert, um einen Einfluss durch das jeweilige Nährmedium auszugleichen. Die Zell-Medium-C6-Ceramid-Suspension wurde als Positivkontrolle auf 100 % festgelegt und alle weiteren Zellsuspensionen, denen Extrakte, Kontrollen oder Referenzen zugesetzt worden waren, werden in Relation der jeweiligen Lösungsmittel aufgeführt.

Beispielrechnung:

Für die beispielhafte Errechnung der Zellviabilität für die Zell-Medium-Extrakt [100 %] – Suspension kann folgende Rechnung angenommen werden:

Zell-Medium-Extrakt [100 %] =

$$\frac{\left(\frac{\text{Messwert (Ex.)}1 + \text{Messwert (Ex.)}2 + \dots 4}{4}\right) - \left(\frac{\text{Messwert (Medium) }1 + \text{Messwert (Medium) }2 + \dots 4}{4}\right)}{\text{Zellen + Medium + Ethanol 70 \%}} \times 100$$

3.10 Glukose-, Laktat-, pH-Messung

Um einen Überblick über die Stoffwechsellleistung unter Einfluss der Extrakte, Referenzen und Kontrollen der zu untersuchenden Mammaepithelzelllinien zu bekommen, wurde einmalig in einer Vierfachbestimmung der Glukose-, Laktat- und pH-Wert gemessen.

Grundsätzlich besteht bei entarteten Zellen ein gesteigerter Energiebedarf, der durch eine erhöhte Aufnahme an Glukose und dessen Umwandlung zu ATP gedeckt werden muss [55]. Die ATP-Synthese kann auf aerobem Weg über die Glykolyse und anschließender Atmungskette in den Mitochondrien erfolgen oder auf anaerobem Weg, indem Pyrovat in Laktat umgewandelt wird. Bei vermehrter,

anaerober Energiegewinnung steigt folglich der Laktatspiegel, was gleichzeitig zu einem Ansäuern der Suspension mit vermindertem pH-Wert führt [55].

Auf diesem Wege kann anhand der drei Parameter Glukose, Laktat und pH-Wert ein Rückschluss auf den Zellmetabolismus und indirekt auch auf die Vitalität gezogen werden, da bekanntlich nur lebende Zellen zu diesen Stoffwechsellleistungen fähig sind.

Durchführung:

- Schritt 1: Aussaat von 100 µl Zellsuspension/Well auf einer 96-Wellplatte
- Schritt 2: Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 5%iger CO₂-Begasung und wasserdampfgesättigter Atmosphäre
- Schritt 3: Auftragen von 1 µl der Extraktkonzentrationen, Referenzen und Kontrollen, Inkubation für 24 h im Brutschrank
- Schritt 4: 20 µl Überstand wurden in 1 ml Systemlösung gegeben und im Glukose-Analysegerät (eco Twenty) im ansässigen Labor vermessen.

20 µl Überstand wurden in 1 ml Systemlösung gegeben und im Laktat-Analysegerät (Beckman Coulter AU 480) im ansässigen Labor vermessen.

- Schritt 5: Die restliche Probe (jeweils 60 µl) wurde aus den Wells gesammelt und mit dem pH-Messgerät (Orion 3 Star pH Benchtop Elektrode) analysiert

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm Microsoft Office Excel 2018. Mit Ausnahme der Apoptose-Tests, der HMEC-Tests und der Stoffwechseluntersuchungen (Glukose-, Laktat-, pH-Tests), die aus Kostengründen lediglich solitär durchgeführt wurden, erfolgte jede Untersuchung in vierfacher Ausführung, um möglichst valide Ergebnisse zu erhalten. Von den gebildeten Mittelwerten wurde die Standardabweichung errechnet und angegeben. Die Signifikanz der Versuchsergebnisse wurde nach Absprache mit dem Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universitätsmedizin Rostock mit dem Student's T-Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$) durchgeführt und in allen Diagrammen durch einen Stern veranschaulicht.

4 Ergebnisse

4.1 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Mit der HPLC-Methode gelang die Untersuchung der angesetzten Extrakte hinsichtlich ihrer Inhaltstoffe, die sich anhand ihrer Polarität auftrennen ließen.

Damit der ergiebigste Extrakt, in dem die meisten Flavonoide enthalten sind, für anschließende Zelltests verwendet werden kann, war es wichtig sowohl Extrakte in Abhängigkeit vom Pflanzenbestandteil, als auch in Abhängigkeit vom Lösungsmittel zu bewerten.

Zunächst wurden die wasser- bzw. ethanolbasierten Extrakte miteinander verglichen und schließlich der Pflanzenabschnitt des Lauchs berücksichtigt.

Auf der Abszisse ist die Zeit in Minuten dargestellt, auf der Ordinate die UV-Absorption in AU (Absorption Units).

Insgesamt fällt in Abb. 16 und 17 auf, dass insbesondere im polaren Laufbereich (bis 12 min) viele Substanzen mit geringer Affinität zur Säule unterschieden werden konnten, unabhängig vom Lösungsmittel der Extrakterstellung und des Pflanzenabschnitts. Bei sich ändernden Gradienten ließen sich dann erst bei sehr apolaren Verhältnissen (18-28 min) weitere deutliche Peaks messen.

Es zeigte sich, dass die Lauch-Ethanol-Extrakte eine geringfügig stärkere Intensität im Vergleich zu den Lauch-Wasser-Extrakten aufwiesen, trotz Ähnlichkeit im Verlauf des Chromatogramms (Abb. 16 und 17).

Dagegen hat der Pflanzenbestandteil, aus dem das Extraktmaterial gewonnen wurde, einen deutlicheren Einfluss auf die Anzahl der detektierbaren Inhaltstoffe. Der „grüne“, obere Teil der Pflanze beinhaltet qualitativ und quantitativ mehr Stoffe, als die unteren wurzelnahen Pflanzenmaterialien. Dabei ist ein Gefälle zu erkennen, vom grünen, der Sonne zugewandten Teil, über das grün-weiße Mittelstück der Pflanze bis hin zum weißen Wurzelabschnitt. Dieses Ergebnis ließ sich unabhängig vom Lösungsmittel bei beiden Extraktvarianten erkennen.

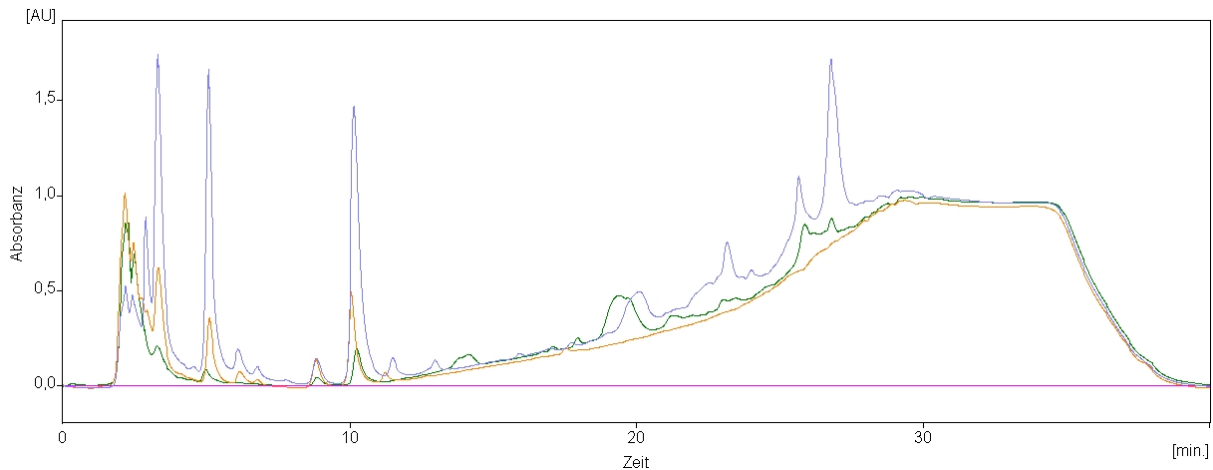


Abbildung 16: Chromatogramm des wasserbasierenden Lauch-Extrakts. Unterschieden wurde der „grüne“ Pflanzenbestandteil (blau), der „weiße“, wurzelnahe Pflanzenbestandteil (gelb) und der gemischte Pflanzenbestandteil (grün). Zeit in [min], Absorbanz in [AU].

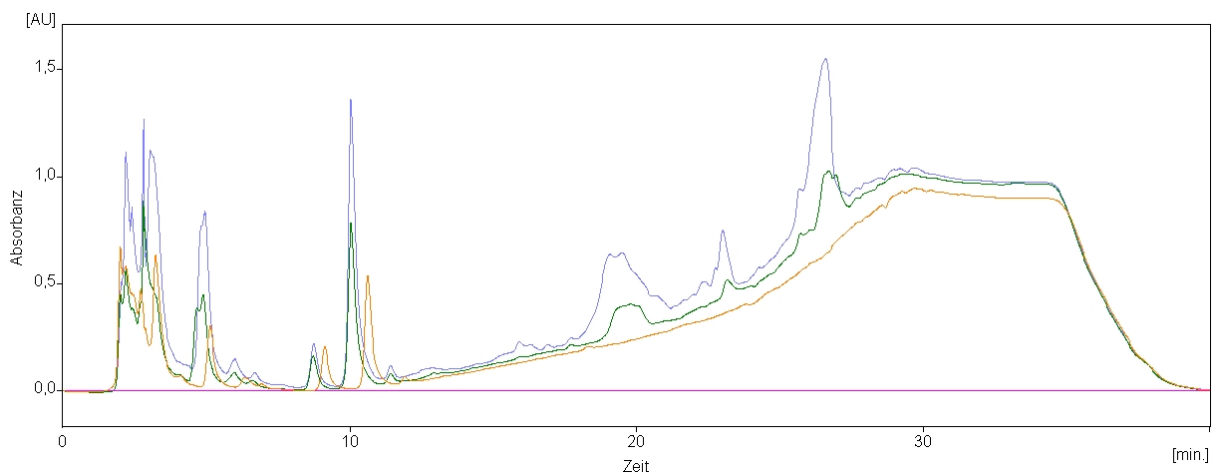


Abbildung 17: Chromatogramm des 70 %-ethanolbasierenden Lauch-Extrakts. Unterschieden wurde der „grüne“ Pflanzenbestandteil (blau), der „weiße“, wurzelnahe Pflanzenbestandteil (gelb) und der gemischte Pflanzenbestandteil (grün). Zeit in [min], Absorbanz in [AU].

Um Flavonoide qualitativ in den Extrakten nachzuweisen, wurden Referenzanalysen mit den Flavonoiden Rutin und Quercetin sowie Folsäure durchgeführt. Liegen zwei Peaks im Chromatogramm übereinander, d.h. stimmt die zeitliche Interferenz überein bedeutet das, dass diese beiden Stoffe die gleiche Polarität besitzen [105].

In dem für alle weiteren Untersuchungen verwendeten Extrakt, dem 70 %-ethanolbasierten des „grünen“ Pflanzenbestandteils, konnte Quercetin nachgewiesen werden. Der gelbe Peak in Abb. 18 bei 26,4 min liegt exakt über dem des Extrakts. Rutin (grüne Kurve), bei 24,7 min, konnte hingegen nicht ermittelt werden.

Darüber hinaus wird die zeitliche Interferenz des schwarzen mit dem blauen Peak, die sich bei 10 min befindet, in Absprache mit Herrn Prof. Jeschke als Folsäure gewertet (Abb. 18).

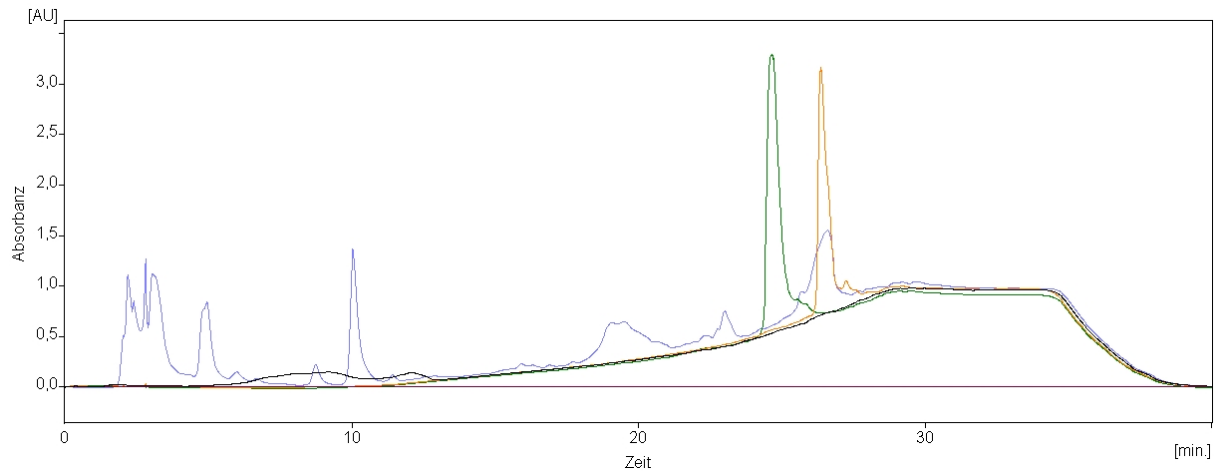


Abbildung 18: Chromatogramm des 70 %-ethanolbasierenden Extrakts vom „grünen“, oberen Pflanzenbestandteil mit Kontroll-Lösungen.
Extrakt = blau; Quercetin = gelb; Rutin = grün; Folsäure = schwarz. Zeit in [min], Absorbanz in [AU].

4.2 Immunhistochemie (IHC)

Durch die immunhistochemische Untersuchung wurde der Hormonrezeptorstatus der Zellreihen MCF-10a und MCF-12a hinsichtlich der Estrogenrezeptoren- α , - β sowie des Progesteronrezeptors gesichert.

Es ist zu erkennen, dass es bei der Untersuchung der Zelllinie MCF-10a zu keiner Farbreaktion an den Steroidrezeptoren kam und die getesteten Zellen der Negativkontrolle gleichen. Diese Zellreihe ist also für alle drei Rezeptoren negativ getestet (Abb. 19).

MCF-10a Zelllinie

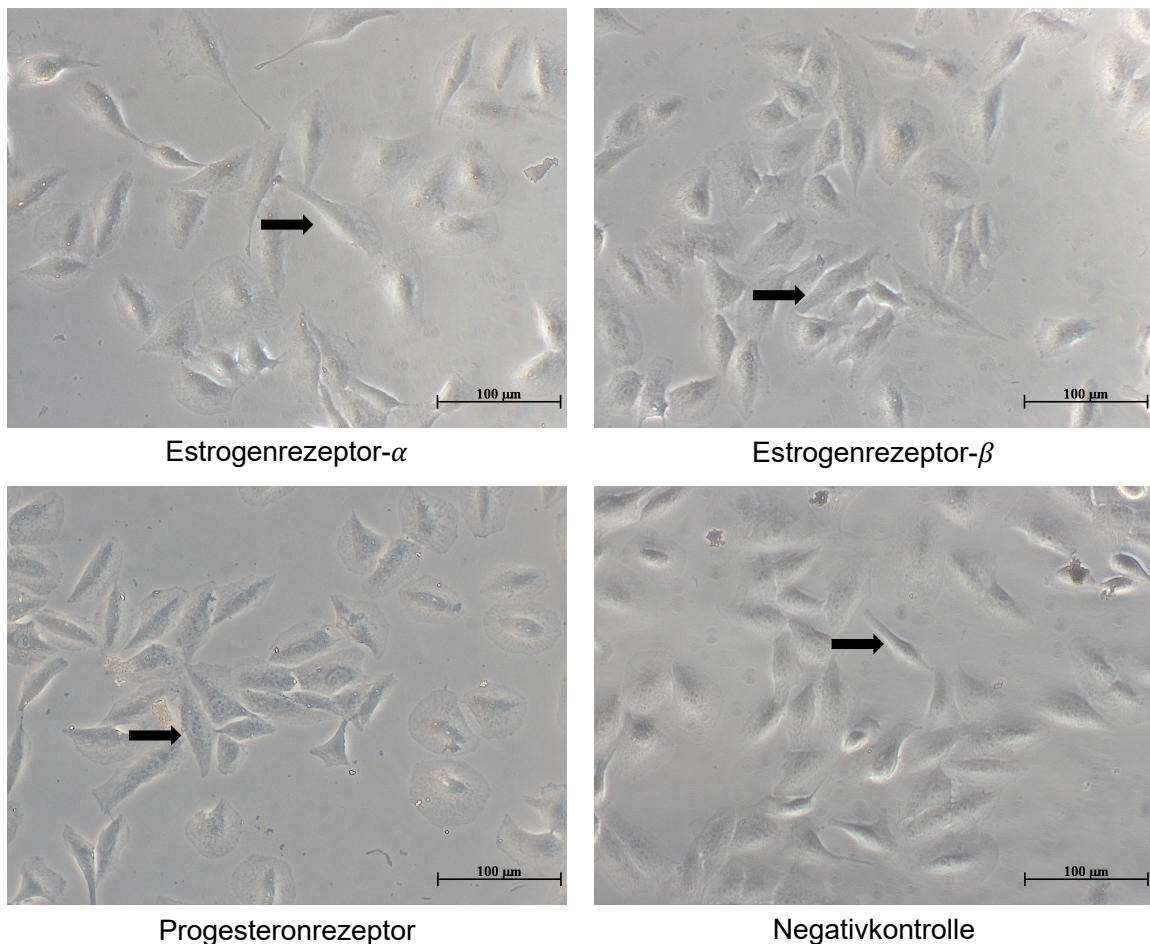


Abbildung 19: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-10a-Zelllinie auf die Expression der Estrogenrezeptoren- α , - β und des Progesteronrezeptors mit Negativkontrolle. Es zeigte sich keine Farbreaktion, sodass ein negativer Rezeptorstatus für die Estrogenrezeptoren- α , - β und den Progesteronrezeptor vorliegt.

Bei der Untersuchung der Zelllinie MCF-12a hat die Testung aller drei Rezeptoren zu einer roten Farbreaktion geführt, sodass diese als Hormonrezeptor positiv verifiziert wurden. Die Negativkontrolle dient der Differenzierung zwischen rezeptorvermittelten Farbreaktionen und Farbpigmenten, die sich lediglich im Medium abgesetzt haben (Abb. 20).

MCF-12a Zelllinie

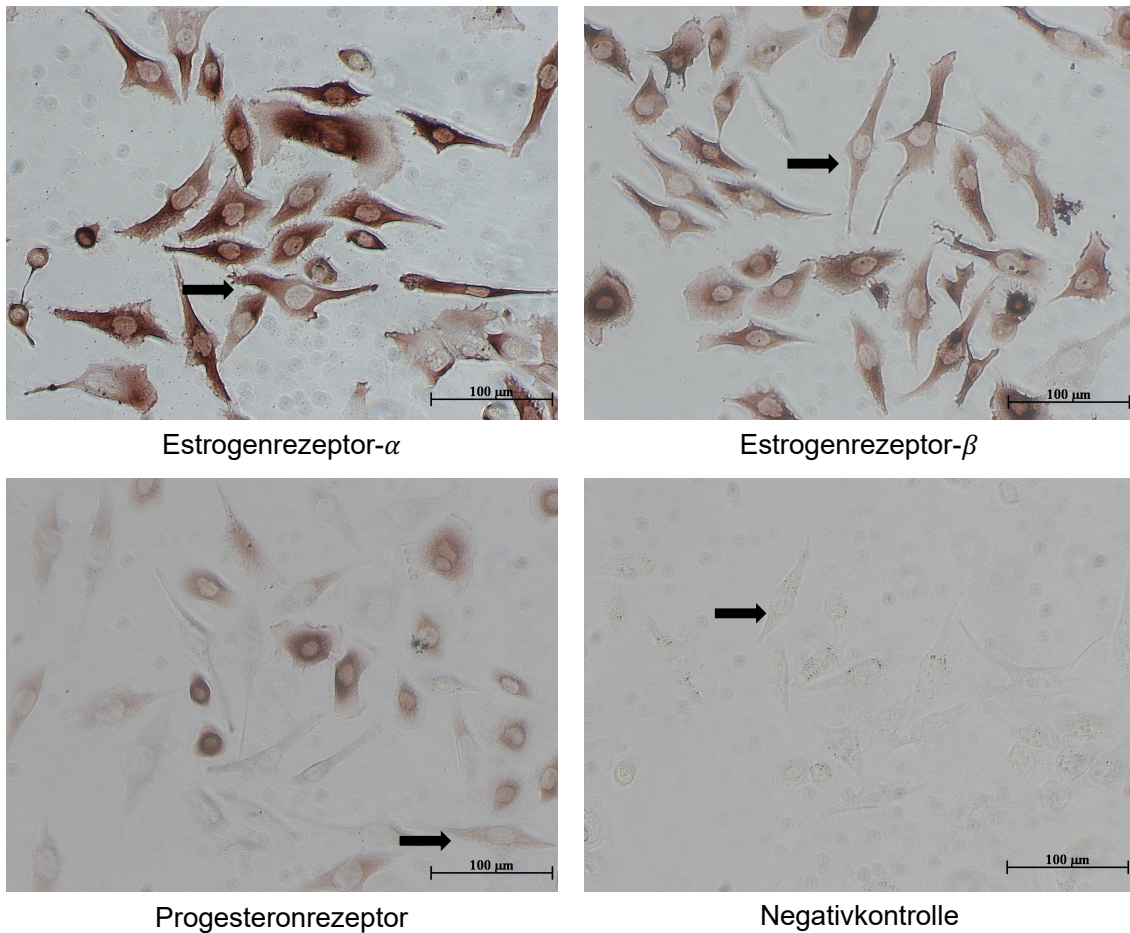


Abbildung 20: Immunhistochemische Untersuchung der MCF-12a-Zelllinie auf die Expression der Estrogenrezeptoren- α , - β und des Progesteronrezeptors mit Negativkontrolle. Die rote Farbreaktion (siehe Pfeile) demonstriert die Expression des jeweiligen Rezeptors. Bei der Negativkontrolle ließ sich keine Farbreaktion feststellen.

4.3 CellTiter-Glo® - Viabilitätstest

Mit dem CellTiter-Test wurde die Zellviabilität durch Lumineszenz-Messungen anhand des ATP-Gehalts bestimmt.

Auf der Abszisse sind die Untersuchungsmedien aufgeführt, während die Ordinate die Zellviabilität in Prozent wiedergibt. Für jedes untersuchte Medium wird neben der Standardabweichung auch die Signifikanz mit $p < 0,05$ durch einen Stern angegeben.

Die Zellviabilität der MCF-10a-Zelllinie reduzierte sich nach Hinzugabe des Extraktes in unverdünnter, 50 %- und 20 %-verdünnter Form signifikant. Nur 0,49 % bzw. 1,61 % Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation lebten nach Anwendung des unverdünnten und 50%igen Extrakts, das 20%ige Extrakt bewirkte eine Reduzierung auf 82 % (Abb. 21). Die Positivkontrolle Tamoxifen reduzierte die Zellzahl ebenfalls signifikant auf 0,23 %, Quercetin auf 59 %. Estradiol und Folsäure zeigten keinen Einfluss auf die Viabilität (Abb. 22).

Die Zellreihe MCF-12a reagierte ebenfalls sensibel auf zugeführte Extrakte. Das 100%ige Extrakt reduzierte die Zellzahl signifikant auf 0,05 %, während beim 50 % verdünnten Extrakt eine Reduktion auf 21,07 % beobachtet werden konnte. Die 20%ige Verdünnung senkte die Zahl auf 85,43 %, während die stärkste Verdünnung einen geringfügig positiven Effekt (102,48 %) demonstrierte (Abb. 21). Im Unterschied zu den MCF-10a-Zellen wirkte sich Quercetin bei MCF-12a-Zellen mit 97,65 % weniger stark aus. Estradiol und Folsäure zeigten keine imposanten Effekte, währenddessen Tamoxifen signifikant zytotoxisch wirkte (Abb. 22).

Die Viabilitätsmessung der primären, humanen Mammaepithelzellen (HMEC) erfolgte im Unterschied zu den Zellreihen MCF-12a und MCF-10a aufgrund des Kostendrucks lediglich einmal. Die Standardabweichung und Signifikanz sind daher nicht zu eruieren. Nach Anwendung des 100%igen und 50%igen Extrakts waren keine lebenden Zellen mehr zu ermitteln. Das 20%ige Extrakt senkte die Zellzahl auf 73,15 %, während sie unter 10%iger Verdünnung auf 115,32 % anstieg (Abb. 21). Nach Zugabe der Positivkontrolle Tamoxifen waren ebenfalls keine Zellen mehr messbar (Abb. 22). Estradiol beeinflusste die Zellviabilität nur geringfügig (98,49 %).

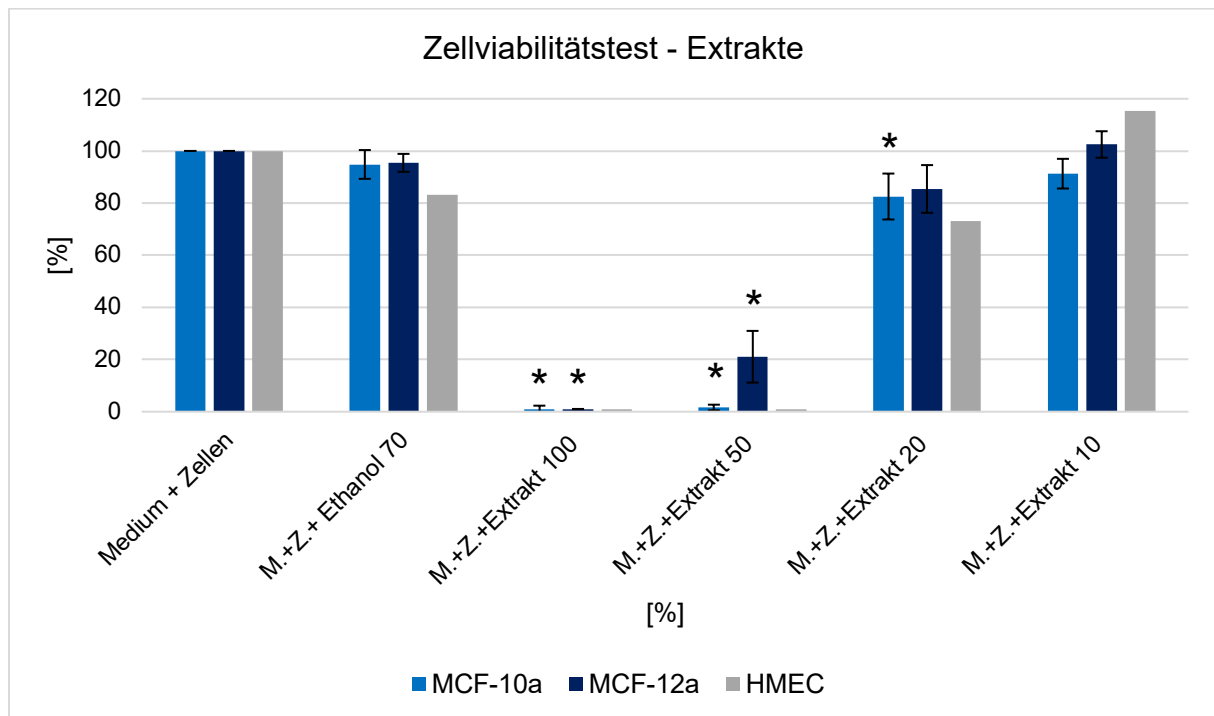


Abbildung 21: Zellviabilitätstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Extrakte. Zellviabilität in [%], Extraktkonzentration in [%]. Standardabweichungen und Signifikanz (Signifikanzniveau $p < 0,05$) sind aufgeführt. M.=Medium, Z.=Zellen.

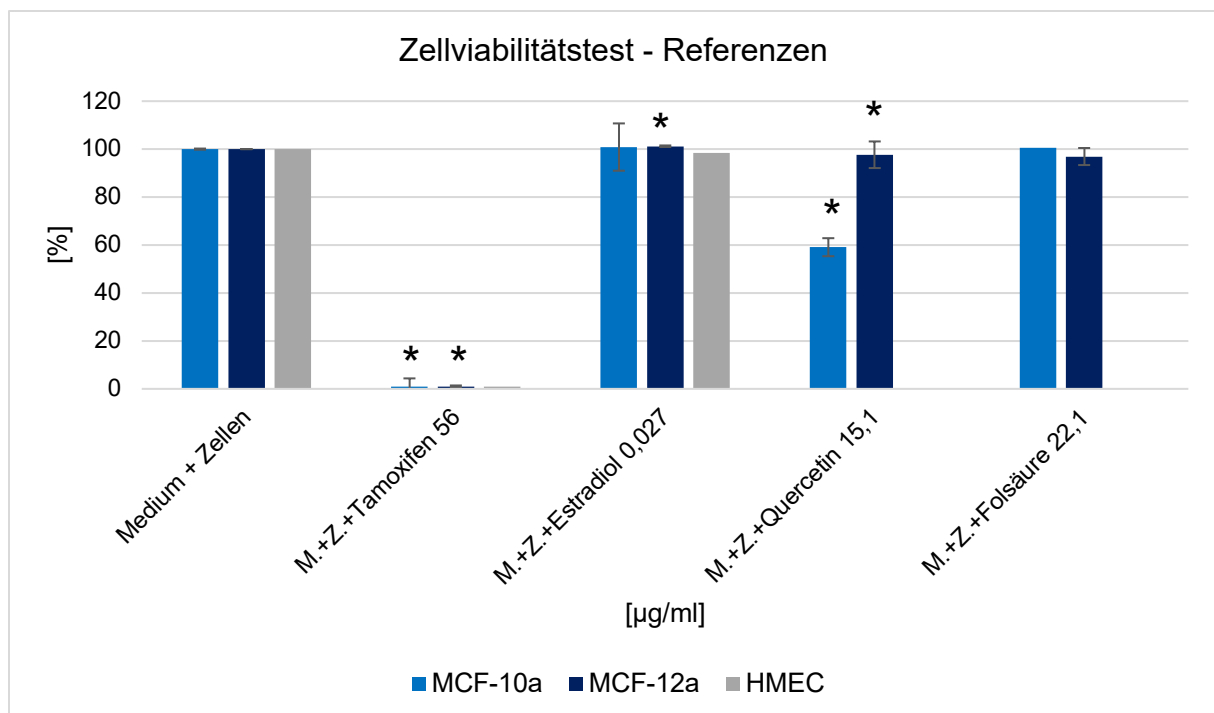


Abbildung 22: Zellviabilitätstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Referenzen. Zellviabilität in [%], Referenzkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. Standardabweichungen und Signifikanz (Signifikanzniveau $p < 0,05$) sind aufgeführt. M.=Medium, Z.=Zellen.

4.4 BrdU-Proliferationstest

Der BrdU-Test ist ein Proliferationstest, mit dem das Wachstumsverhalten der Zellen photometrisch messbar ermittelt werden kann.

Äquivalent zu vorherigen Untersuchungen wird auf der Ordinate die Proliferation in Prozent der analysierten Medien dargestellt. Außerdem wird die Standardabweichung und Signifikanz (Signifikanzniveau $p < 0,05$) aufgeführt.

Bei diesem Test zeigte sich analog zum Konzentrationsgefälle des Extrakts eine unterschiedlich starke Beeinflussung der Zellproliferation. Während bei der MCF-10a-Zellreihe durch den 100%igen Extrakt ein signifikantes Wachstum von 1,07 % gegenüber der Referenz (M.+Z.+70 % Ethanol) gemessen wurde, liegt es bei den 50- und 20%igen Extrakten bei 22,26 %, 85,98 % und sogar auf 107,09 % nach Beimpfung mit der niedrigsten Verdünnung (Abb. 23). Bei Tamoxifen konnte kein Zellwachstum ermittelt werden, während Quercetin einen drosselnden Effekt auf das Wachstum entfaltete (46,28 %). Estradiol wirkte sich kaum aus (Abb. 24).

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung der MCF-12a gemessen. Bei 100%igem Extrakt war kaum Wachstum erkennbar (2,11 %). Die Medien, die den folgenden Extraktkonzentrationen ausgesetzt wurden, zeigten einen treppenartigen Anstieg der Zellvermehrung von 44,18 % (50 %-Konzentration), 92,66 % (20 %-Konzentration) und 98,80 % (10 %-Konzentration) (Abb. 23). Bei der Anwendung von Tamoxifen ließ sich keine Zellproliferation messen. Estradiol dämpfte das Wachstum auf 91,80 %, Quercetin auf 88,77 %. Folsäure wirkte moderat proliferativ (105,14 %).

Der einmalig durchgeführte Test an den HMEC zeigt ebenfalls einen starken antiproliferativen Effekt bei 100 % Extrakt- (3,85 %) und 50 % Extraktkonzentrationen (43,91 %). Moderate Wachstumshemmungen sind bei 20%iger Extraktverdünnung mit 67,14 % und bei niedrigster Verdünnung mit 84,53 % messbar (Abb. 23). Tamoxifen konnte die Proliferation auf 11,45 % begrenzen, während das Steroidhormon Estradiol ein Wachstum von 61,87 % zuließ (Abb. 24).

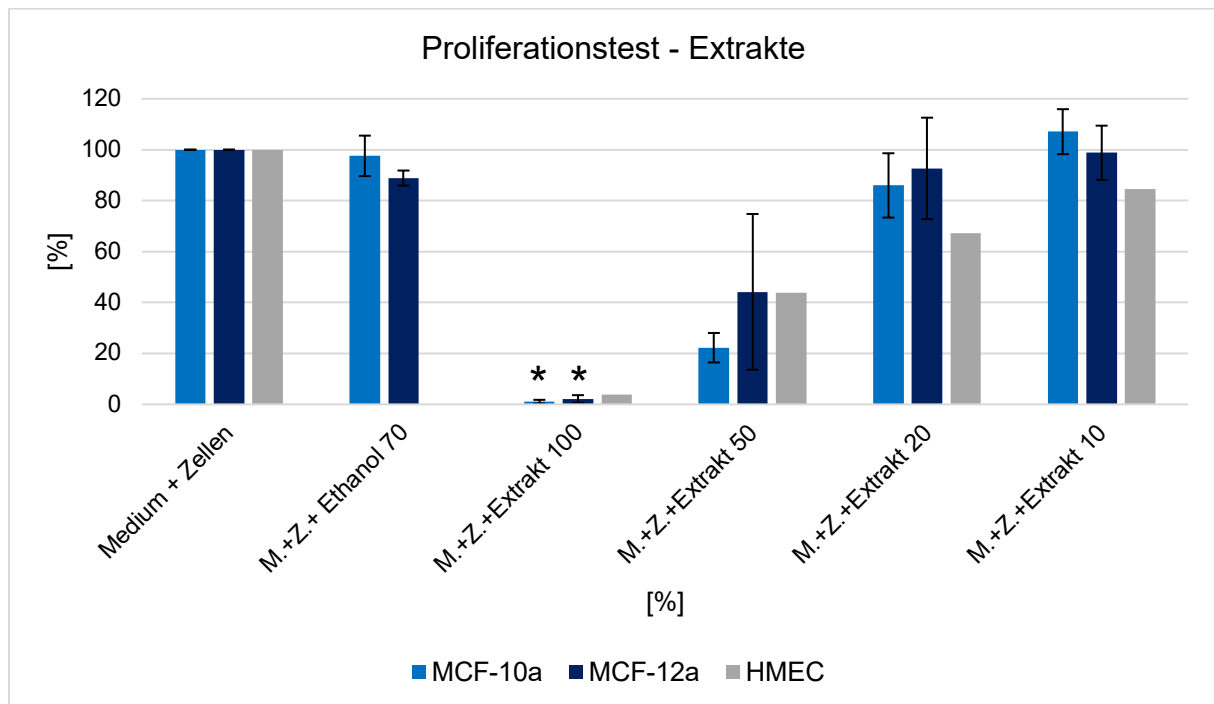


Abbildung 23: Proliferationstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Extrakte. Proliferation in [%], Extraktkonzentration in [%]. Standardabweichungen und Signifikanz (Signifikanzniveau $p < 0,05$) sind aufgeführt. M.=Medium, Z.=Zellen.

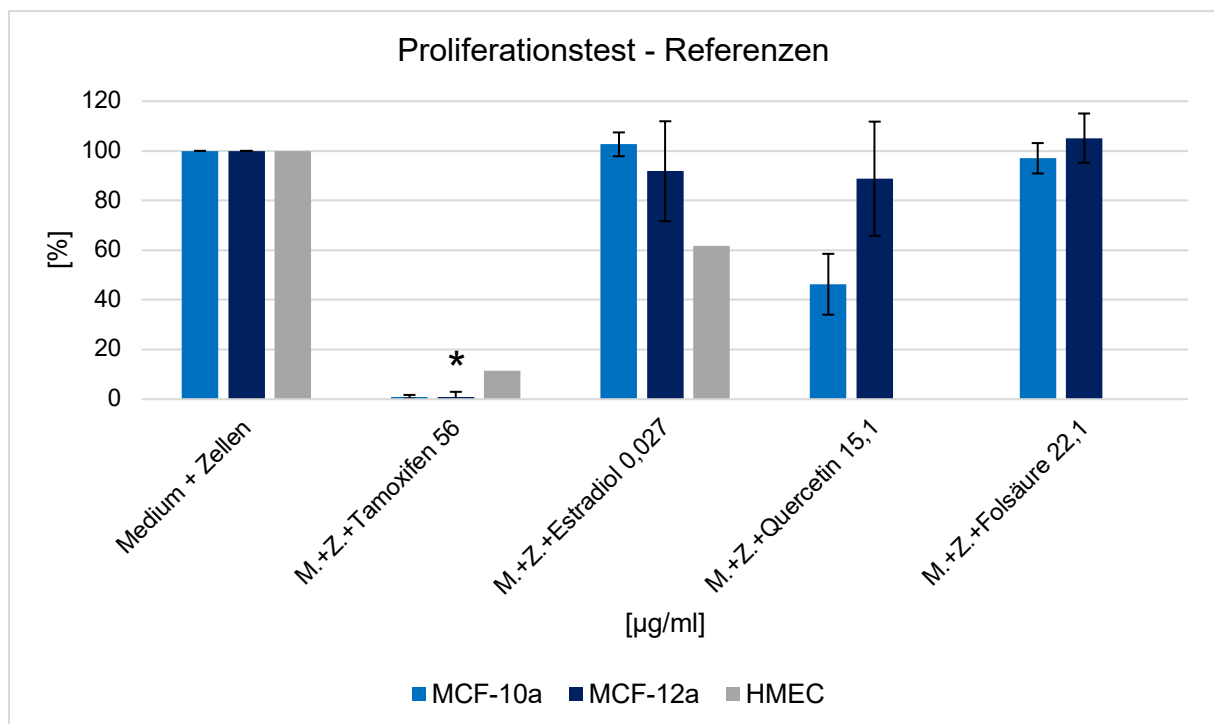


Abbildung 24: Proliferationstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Referenzen. Proliferation in [%], Referenzkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. Standardabweichungen und Signifikanz (Signifikanzniveau $p < 0,05$) sind aufgeführt. M.=Medium, Z.=Zellen.

4.5 CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest

Mit dem Zytotoxizitätstest wurde anhand der „Dead-Cell-Protease“-Aktivität der Anteil toter Zellen kolorimetrisch bestimmt. Auch in den folgenden Abbildungen wird auf der Ordinate die Zytotoxizität in Prozent veranschaulicht und auf der Abszisse werden die untersuchten Medien aufgeführt. Das Signifikanzniveau liegt bei $p < 0,05$, die Standardabweichung ist aufgeführt.

Bei allen Medien, denen Extrakt zugesetzt wurde, konnten signifikante Auswirkungen in Abhängigkeit zur Konzentration gemessen werden. Der unverdünnte Extrakt wirkte bei den MCF-10a Zellen mit 84,40 % letaler Zellen am deutlichsten zytotoxisch, gefolgt von dem 50 % verdünnten Extrakt, welcher 51,35 % der Zellen abtötete. Bei den Extrakten in 20%iger und 10%iger Konzentration kam es zu einer negativen Zytotoxizität, also im Umkehrschluss zu einer moderaten Zellvermehrung von 14,91 % bzw. 14,28 % (Abb. 25).

Tamoxifen imponierte bei der Zellreihe MCF-10a mit 87,12 % signifikant zytotoxisch, das Flavonoid Quercetin tötete 39,29 % Zellen ab. Estradiol hatte ebenfalls einen mäßig proliferativen Effekt, wohingegen Folsäure kaum messbare Ergebnisse zeigte (Abb. 26).

Die Zellen der Linie MCF-12a reagierten ebenfalls sehr konzentrationsabhängig auf die zugesetzten Extrakte. Mit 98,85 % tötete der unverdünnte Extrakt die Zellen signifikant fast vollständig ab, der Extrakt von 50 % reduzierte die Zellzahl um 62,43 %, der 20%ige und 10%ige Extrakt verringerte die Zellen um 20,12 % bzw. 12,34 % (Abb. 25).

Die Positivkontrolle Tamoxifen wirkte mit 99,43 % signifikant stark letal, auch Quercetin verminderte die Zellzahl um 76,93 %. Estradiol bestach ähnlich zur Zelllinie MCF-10a mit moderat proliferativen Effekten (-11,78 %), Folsäure zeigte auch hier kaum Effekte (Abb. 26).

Sehr sensibel reagierten die primären humanen Mammaepithelzellen. Unter Anwendung der Extrakte in 100%iger, 50%iger und 20%iger Konzentration wurden fast alle Zellen abgetötet. Die Verdünnung mit 10 % Extrakt reduzierte die Zahl um 89,27 %. Auch die Positivkontrolle Tamoxifen wirkte deutlich letal mit einem Zelluntergang von 98,70 %, Estradiol zeigte auch hier einen proliferativen Effekt (-36,69 %).

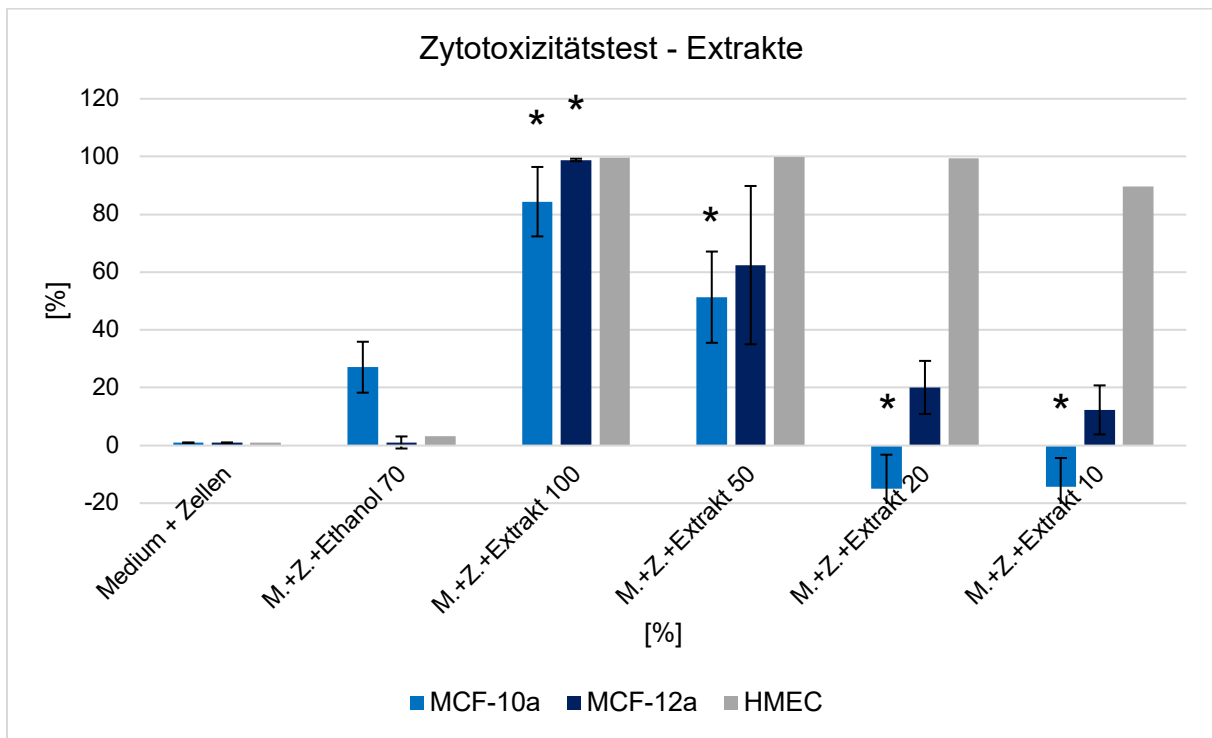


Abbildung 25: Zytotoxizitätstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Extrakte. Zytotoxizität in [%], Extraktkonzentration in [%]. Standardabweichungen und Signifikanz (Signifikanzniveau $p < 0,05$) sind aufgeführt. M.=Medium, Z.=Zellen.

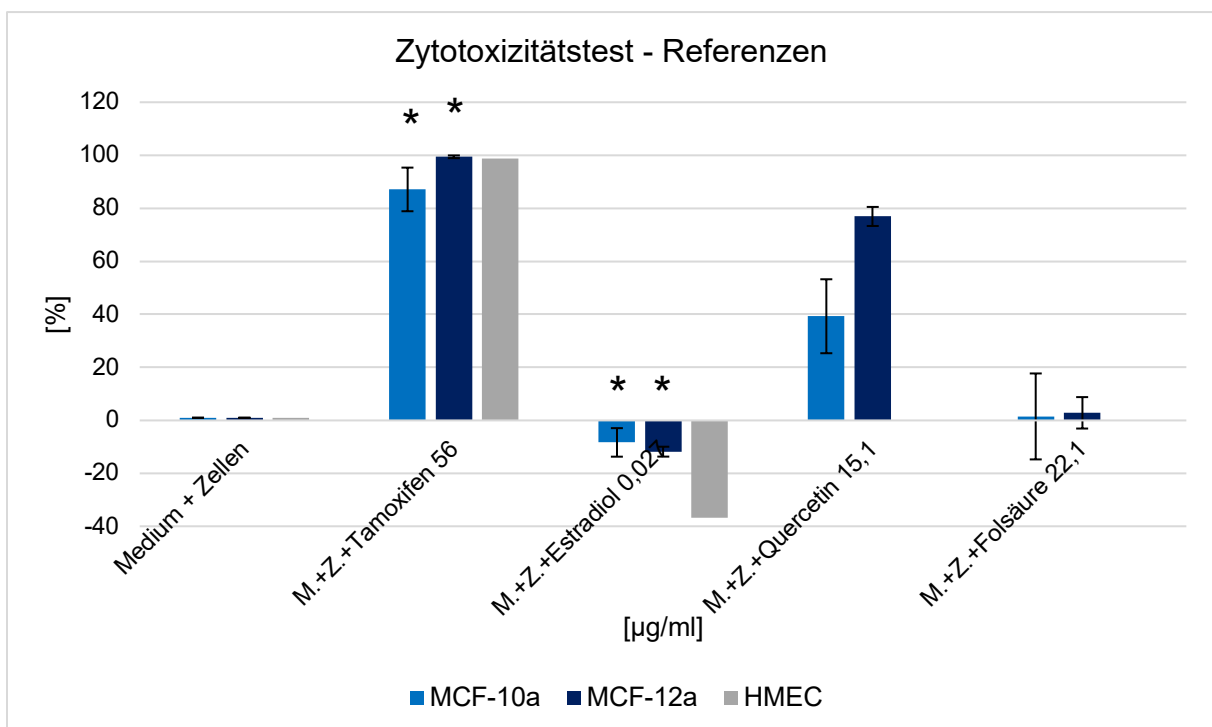


Abbildung 26: Zytotoxizitätstest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Referenzen. Zytotoxizität in [%], Referenzkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. Standardabweichungen und Signifikanz (Signifikanzniveau $p < 0,05$) sind aufgeführt. M.=Medium, Z.=Zellen.

4.6 Caspase-Glo® - Apoptosetest

Die Caspaseaktivität wurde ermittelt, um ein Verständnis über die Beteiligung des zelleigenen Apoptosesystems an den aufgeführten Ergebnissen zu erlangen.

Dazu werden die Caspaseaktivitäten in Prozent auf der Ordinate und die Testsubstanzen auf der Abszisse angegeben.

Bei der Zelllinie MCF-10a wurden insbesondere bei den hohen Konzentrationen (100 %, 50 %) nur minimale Aktivitäten gemessen. Diese waren deutlich intensiver bei den niedrigeren Extraktkonzentrationen von 20 % und 10 %. Es wurden Werte in Höhe von 101,10 % und 96,88 % gemessen (Abb. 27).

Der selektive Estrogen-Rezeptor-Modulator Tamoxifen imponierte durch eine sehr auffallende Caspaseaktivität von 227,11 %, die sogar noch durch Quercetin (335,84 %) übertroffen wurde. Auch Estradiol und Folsäure bestachen durch eine Caspaseaktivität in Höhe von 99,84 % bzw. 107,03 % (Abb. 28).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei der Zellreihe MCF-12a, bei der es ebenfalls nur bei den niedrigeren Extraktkonzentrationen zu eindrucksvollen Caspaseaktivitäten kam (Abb. 27). Unterschiede konnten insbesondere unter der Anwendung von Tamoxifen und Quercetin festgestellt werden. Während Tamoxifen eine Aktivität von 129,18 % aufwies, wirkte Quercetin wesentlich abgemilderter (39,43 %) im Vergleich zu den hormonrezeptornegativen MCF-10a-Zellen (Abb. 28).

Gleichartige Ergebnisse waren bei der Untersuchung der HMEC festzustellen. Auch hier konnte mit Zunahme der Verdünnung eine immer deutlichere Apoptoseaktivität gemessen werden, die ihren Höhepunkt bei der 20%igen Extraktverdünnung mit 173,24 % hatte (Abb. 27). Tamoxifen wirkte sich mit 72,61 % etwas moderater als bei den Zellreihen zuvor aus.

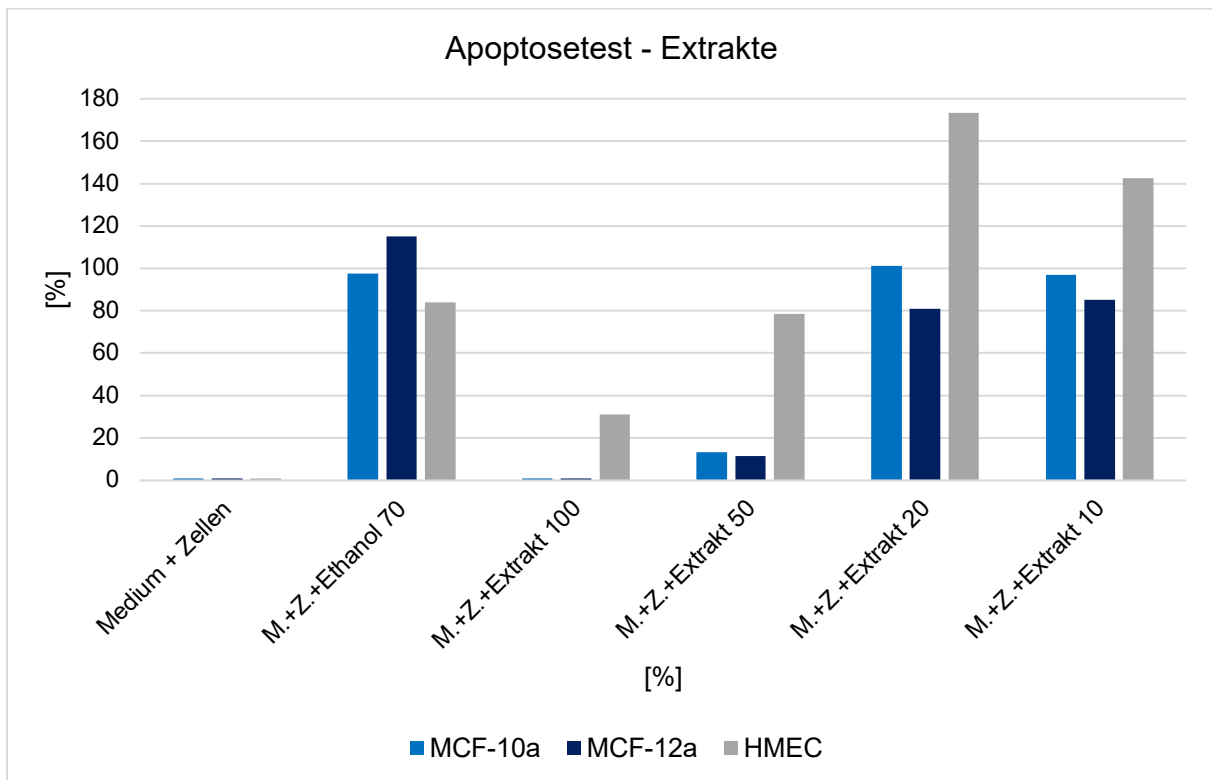


Abbildung 27: Apoptosetest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Extrakte. Apoptoseaktivität in [%], Extraktkonzentration in [%]. M.=Medium, Z.=Zellen.

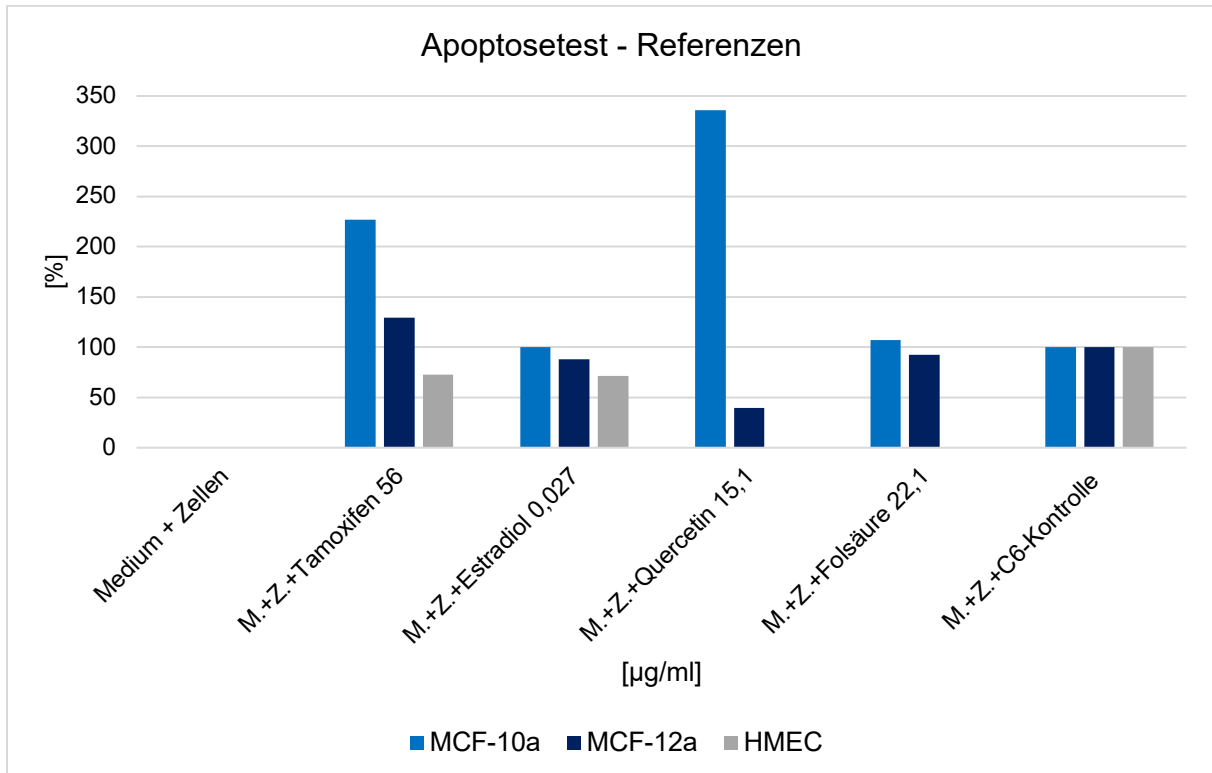


Abbildung 28: Apoptosetest der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Referenzen. Apoptoseaktivität in [%], Referenzkonzentration in [µg/ml]. M.=Medium, Z.=Zellen.

4.7 Glukose-Messung

Um Rückschlüsse auf den Stoffwechsel der Zelllinien unter Behandlung mit den Testsubstanzen ziehen zu können, wurde auch der Glukosegehalt im Medium einmalig für alle drei Zelllinien bestimmt. Grundsätzlich können nur vitale Zellen Glukose durch die Glykolyse verstoffwechseln, was den Glukosegehalt im Medium senken würde.

Prinzipiell liegen die Glukosewerte bis auf die Medien, die mit hohen Extraktkonzentrationen (100 %, 50 %) behandelt wurden, bei den Zelllinien MCF-10a und MCF-12a relativ konstant bei 15 mmol/l. Eine Behandlung mit unverdünntem Extrakt und 50%iger Verdünnung ergab für MCF-10a einen Wert von 23,23 mmol/l bzw. 19,06 mmol/l und für die MCF-12a einen Wert von 31,40 mmol/l sowie 19,21 mmol/l (Abb. 29). Keinen Einfluss auf den Zuckergehalt konnte für Tamoxifen, Estradiol und Quercetin festgestellt werden (Abb. 30).

Eine ähnliche Entwicklungstendenz zeigte sich auch bei den HMEC's, die allerdings mit einem anderem Nährmedium behandelt wurden. Erhöhte Werte wurden bei den hochkonzentrierten Extraktbehandlungen gemessen (Extrakt 100 %: 8,36 mmol/l; Extrakt 50 %: 7,79 mmol/l; Extrakt 20 %: 6,95 mmol/l), bei Tamoxifen und Estradiol zeigte sich eine moderate Veränderung (Abb. 29 und 30). Folsäure und Quercetin wurden aus Kostengründen nicht mitbestimmt.

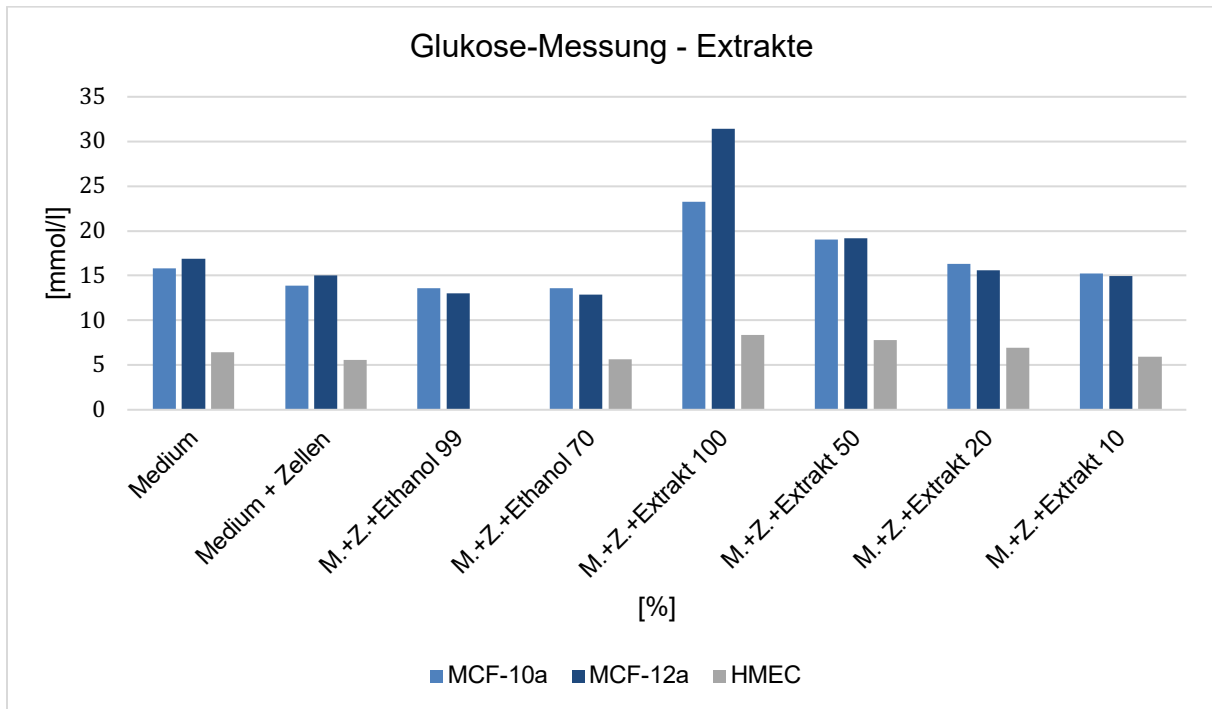


Abbildung 29: Glukose-Messung der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Extrakte. Glukosekonzentration in [mmol/l], Extraktkonzentration in [%]. M.=Medium, Z.=Zellen.

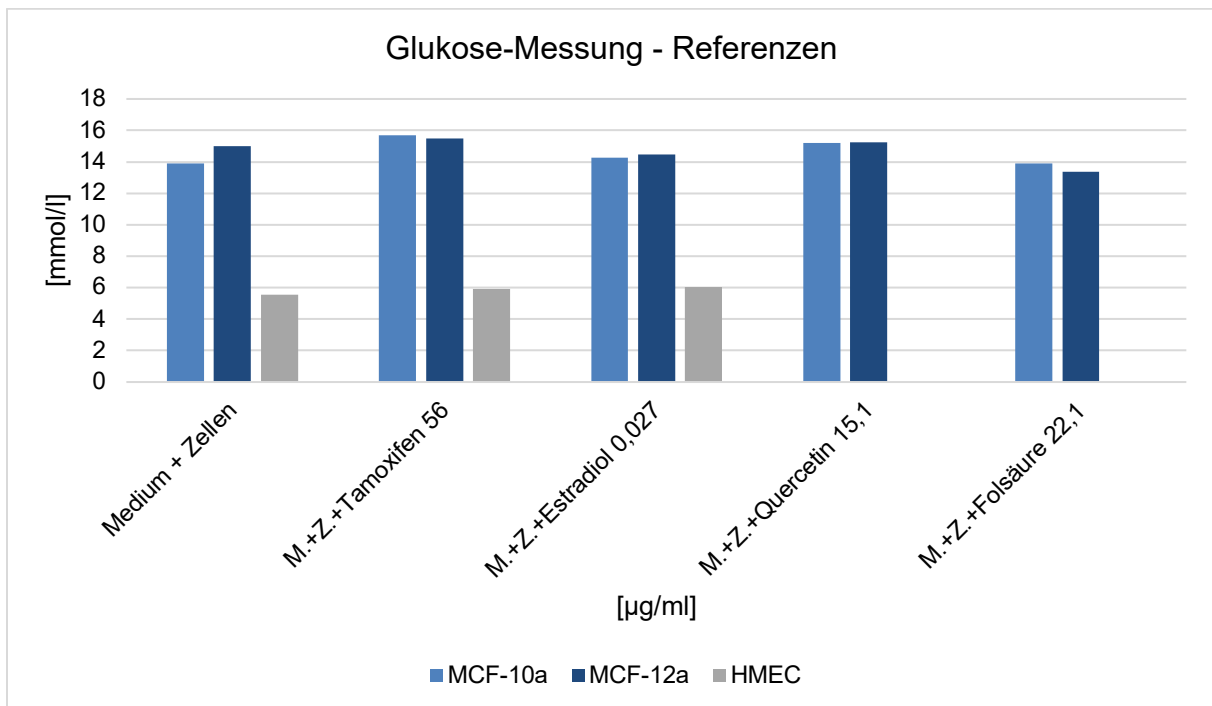


Abbildung 30: Glukose-Messung der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC – Referenzen. Glukosekonzentration in [mmol/l], Referenzkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. M.=Medium; Z.=Zellen.

4.8 Laktat-Messung

Der Laktatspiegel gibt Aufschluss darüber, wieviel Pyruvat im Anschluss an die Glykolyse in Laktat umgewandelt wird. Voraussetzung für einen hohen Laktatspiegel ist demzufolge ein hoher Zellmetabolismus.

Bei den unbehandelten und mit Estradiol beimpften Zellsuspensionen der MCF-10a-Zelllinie wurde ein Wert von 5,8 bzw. 5,3 mmol/l gemessen. Die mit Extrakten behandelten Zellen zeigten einen ansteigenden Laktatwert ausgehend von 2,0 mmol/l bei Extrakt 100 %, über 2,4 mmol/l bei Extrakt 50 % und 4,0 mmol/l bei Extrakt 20 % und 10 % (Abb. 31). Die Suspension mit Tamoxifen versetzten Zellen zeigte einen Laktatwert von 2,4 mmol/l auf (Abb. 32).

Ähnliche Analyseergebnisse ließen sich bei der MCF-12a-Zelllinie beobachten. Auch hier lagen die Laktatwerte der unbehandelten und mit Estradiol behandelten Zellsuspensionen bei 5,8 und 5,3 mmol/l, die mit Tamoxifen behandelten Zellen ergaben einen Wert von 2,4 mmol/l. Höhere Spiegel wurden bei den mit Extrakt versetzten Zellen gemessen, wobei mit Abnahme der Extraktkonzentration ansteigende Messergebnisse bestimmt wurden. Nach Behandlung mit dem Extrakt 100 % wurde ein Wert von 3,4 mmol/l gemessen, der beim Extrakt 50 % bereits bei 5,6 mmol/l lag. Bei Vermessung der Zellen, die mit Extrakt 20 % und 10 % beimpft wurden, konnte sogar 11,0 mmol/l bzw. 11,2 mmol/l Laktat bestimmt werden (Abb. 31).

Die Laktatmessungen der HMEC schlugen leider fehl und wurden aus Kostengründen nicht wiederholt.

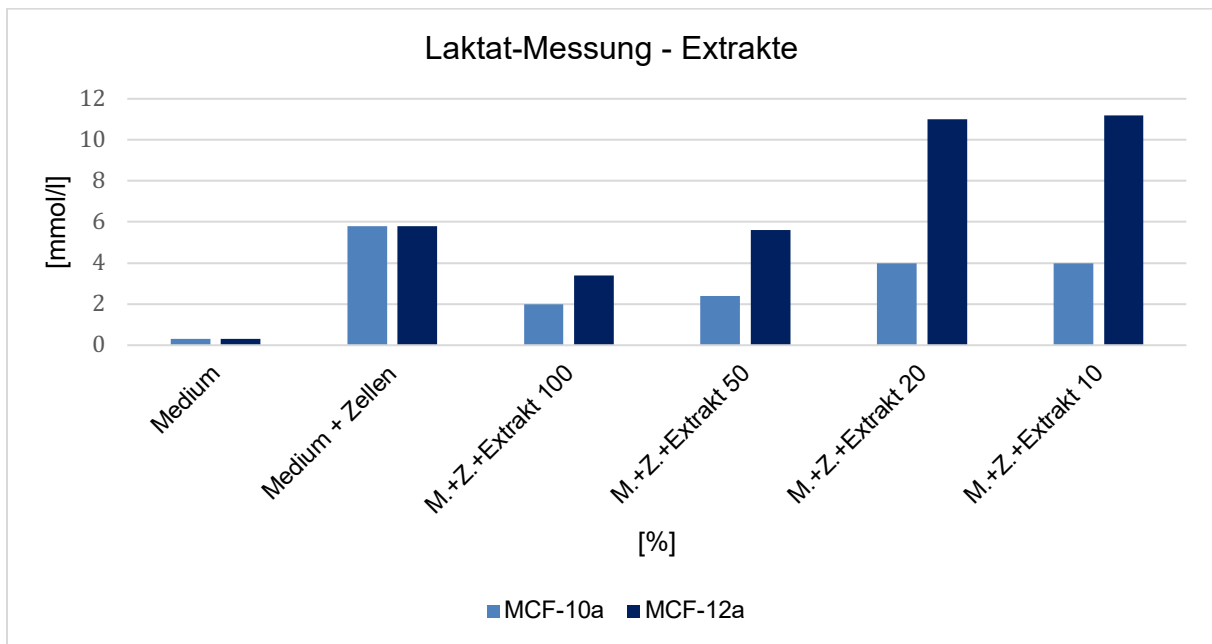


Abbildung 31: Laktat-Messung der Zellreihen MCF-10a und MCF-12a - Extrakte. Laktatkonzentration in [mmol/l], Extraktkonzentration in [%]. M.=Medium; Z.=Zellen.

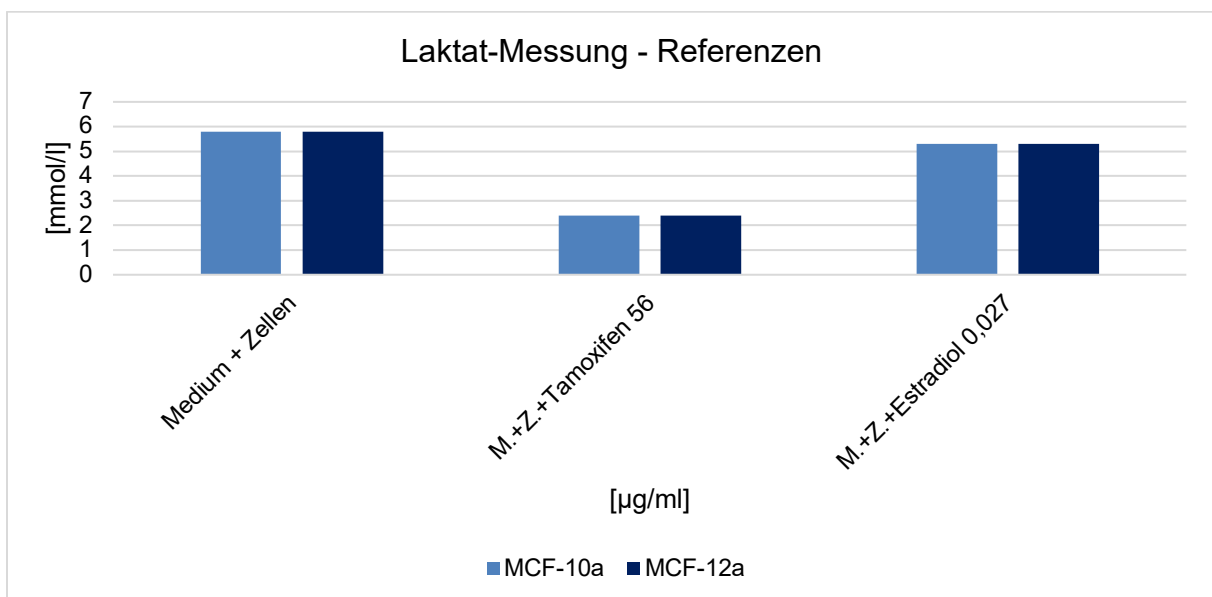


Abbildung 32: Laktat-Messung der Zellreihen MCF-10a und MCF-12a - Referenzen. Laktatkonzentration in [mmol/l], Referenzkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. M.=Medium; Z.=Zellen.

4.9 pH-Messung

Mit der pH-Messung wurde eine weitere Facette der Zellstoffwechsellage geprüft. Es sollte untersucht werden, ob eine aerobe oder anaerobe Stoffwechsellage vorliegt. Ein anaerober Zellmetabolismus wäre mit einem niedrigeren pH-Wert assoziiert. Allerdings ergab sich zwischen den MCF-10a- und MCF-12a-Zellen kein gravierender Unterschied im Hinblick auf die Testsubstanzen. Die Messwerte rangieren substanzübergreifend zwischen einem pH-Wert von 7,7 und 8,1 (Abb. 33 und 34). Es fällt auf, dass der pH-Wert bei den HMEC's insgesamt niedriger ist und bei allen Suspensionen um den Wert von 7,3 liegt. Dabei muss allerdings auch ein anderes Nährmedium berücksichtigt werden.

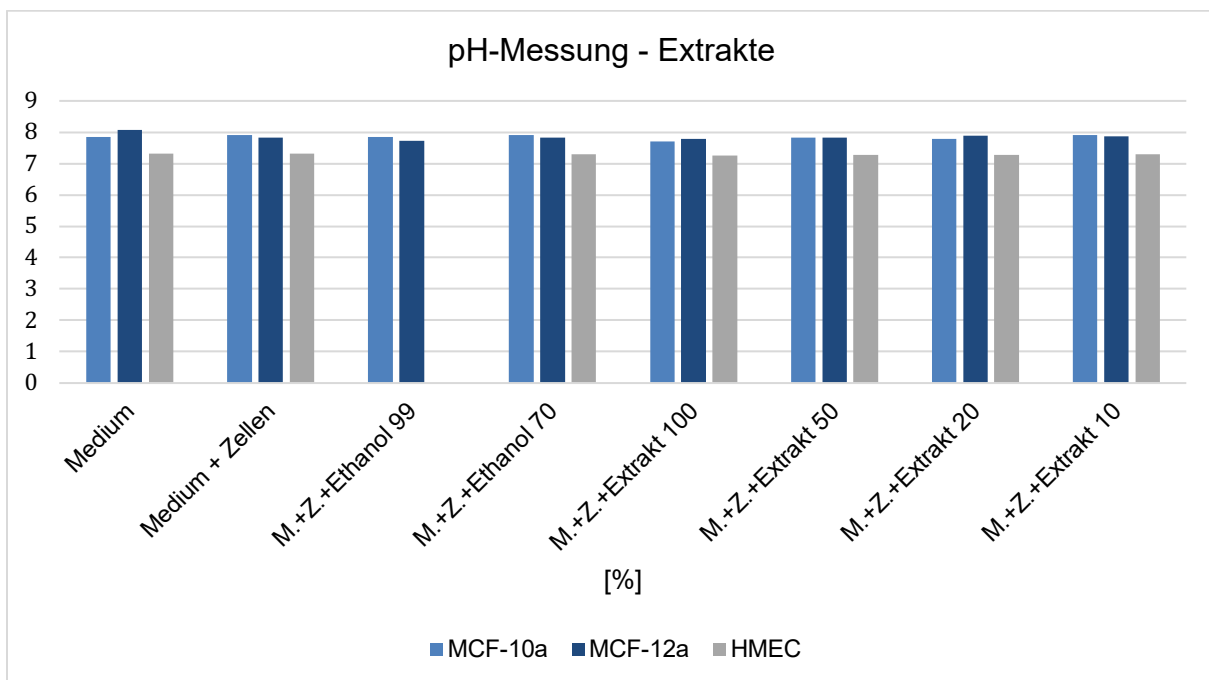


Abbildung 33: pH-Messung der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Extrakte. Extraktkonzentration in [%]. M.=Medium; Z.=Zellen.

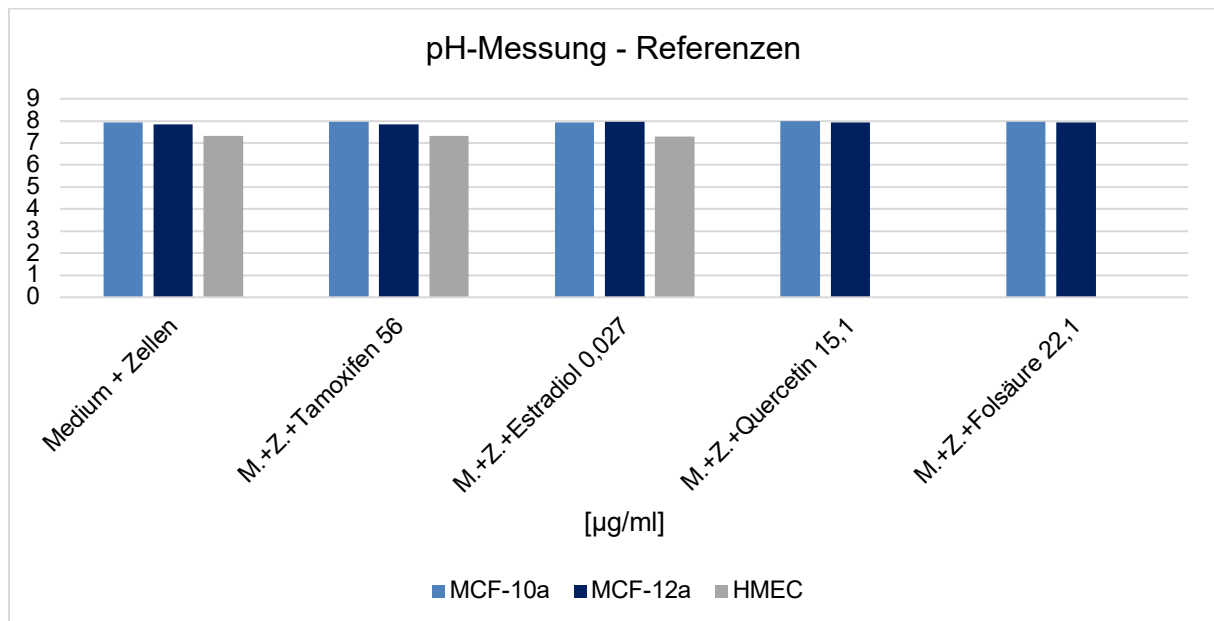


Abbildung 34: pH-Messung der Zellreihen MCF-10a, MCF-12a, HMEC - Referenzen. Referenzkonzentration in [$\mu\text{g/ml}$]. M.=Medium; Z.=Zellen.

4.10 Lichtmikroskopische Untersuchung

Begleitend zu den Zelltests wurden mikroskopische Aufnahmen angefertigt, um die Zellmorphologie im Zusammenhang mit den getesteten Extrakten bzw. Referenzen beurteilen zu können.

Mammaepithelzellen sind Zellen, die an der Oberfläche von Drüsen der Glandula mammaria oder in deren Milchgängen liegen. Morphologisch können diese in Abhängigkeit zur histologischen Lage in ihrer Gestalt variieren.

Mit Zunahme der Extraktkonzentrationen zeigten die Zellen der Linie MCF-10a und MCF-12a morphologische Veränderungen. Es ließ sich erkennen, dass sich die Membranstruktur änderte und eine porige, raue Oberfläche mit vielen kleineren Zellmembranausstülpungen und vergrößerten Organellen annahm. Insgesamt verkleinerten sich die Zellen und rundeten sich bei zunehmend verdichtetem Zytoplasma ab (Abb. 35 und 36). Unter dem Mikroskop imponierte besonders der Nukleus, der größer wurde und sich in der Oberflächengestalt aufgetriebener und poriger darstellte. Bei einigen Zellen ließ sich die Zellstruktur zunehmend schwieriger von der Umgebung differenzieren, sodass ein Verlust der Membranintegrität denkbar erschien.

Die Zahl der Zellkörper im mikroskopischen Fenster schien dabei relativ stabil zu sein, allerdings ließ sich angesichts der avitalen Morphologie vieler Zellen eine geringe Vitalität vermuten.

Ähnliche Beobachtungen konnten auch nach Beimpfung der Zellsuspensionen mit Tamoxifen festgestellt werden. Vermutlich befinden sich hier kondensierte Kerne, was sich allerdings aufgrund der Auflösung abschließend nicht mit Bestimmtheit sagen lässt.

Differierende Ergebnisse zeigten sich nach Zugabe von Folsäure. Die MCF-10a-Zellen wiesen eine integre Zellmembran auf, die bei den MCF-12a-Zellen rupturiert wirkte. Die Nuklei erschienen darüber hinaus vergrößert (Abb. 35 und 36).

Glattberandete Zellenmembranen ließen sich bei beiden Zelllinien nach Versetzung mit Estradiol beobachten.

Quercetin bewirkte eine leicht aufgetriebene Zellmembranstruktur. Insgesamt stellten sich die Zellen vergrößert und geschwollen dar, während die Kernstruktur unverändert erschien.

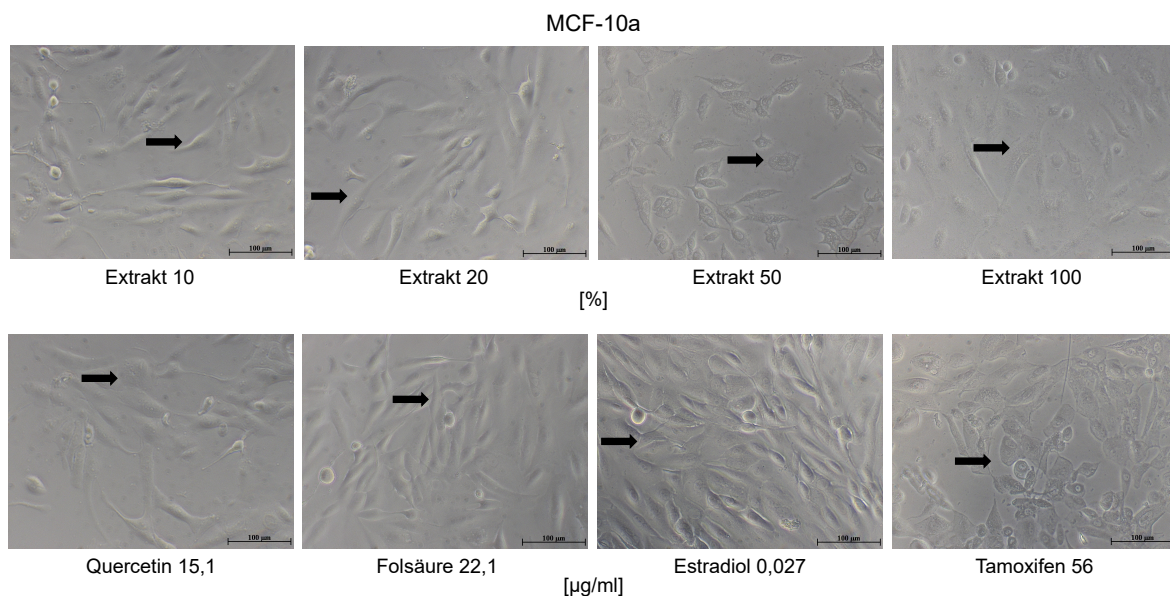


Abbildung 35: Mikroskopische Zellaufnahmen der MCF-10a unter Beimpfung der Extraktkonzentrationen, Referenzen und Kontrollen. Extraktkonzentration in [%], Referenzkonzentration in [µg/ml].

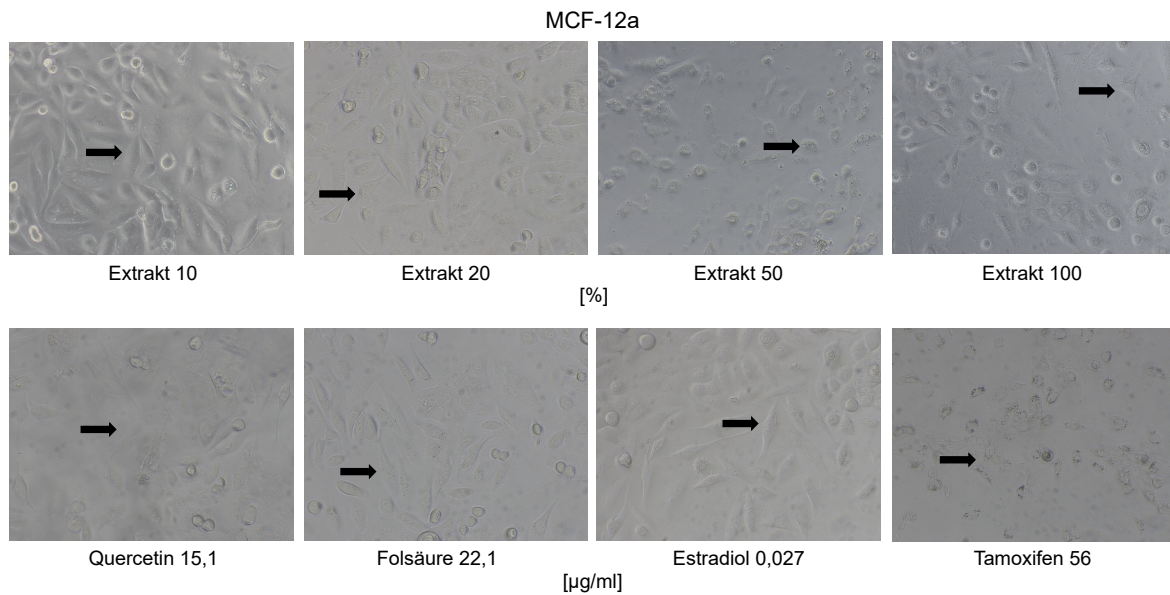


Abbildung 36: Mikroskopische Zellaufnahmen der MCF-12a unter Beimpfung der Extraktkonzentrationen, Referenzen und Kontrollen. Extraktkonzentration in [%], Referenzkonzentration in [µg/ml].

Morphologisch klar abgrenzen ließen sich die HMEC von den beschriebenen Zelllinien. Die HMEC stellten sich insgesamt runder und gedrungener dar. Bei einer Extraktkonzentration von 10 % ließ sich eine unebene, aufgetriebene Membranstruktur mit vermehrten Ausläufern erkennen (Abb. 37). Ebenfalls porig und aufgeschwemmt erschien der Nukleus. Mit Zunahme der Extraktkonzentrationen rundeten sich die Zellen weiter ab, wurden kleiner und stellten sich mit verdichtetem Zytoplasma dar. Auch die Anzahl der Zellen im mikroskopischen Fenster nahm ab.

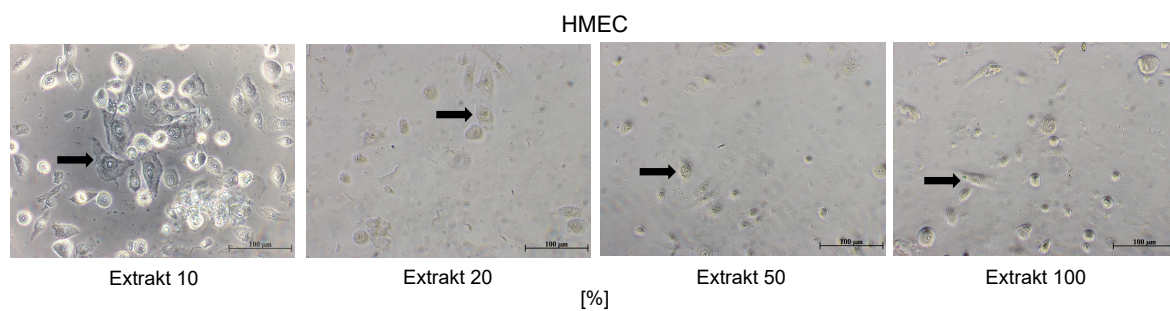


Abbildung 37: Mikroskopische Zellaufnahmen der HMEC unter Beimpfung der Extraktkonzentrationen. Extraktkonzentration in [%].

5 Diskussion

Im Anschluss an die Präsentation der Ergebnisse sollen diese im Kontext aktueller Literatur diskutiert werden. Orientiert am zeitlichen Ablauf der Versuchsreihe folgt ein Vergleich der Zelltests, um Parallelen und Widersprüche herauszustellen.

5.1 High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Ziel der chromatographischen Untersuchung war es, die unterschiedlichen Pflanzenbestandteile des Lauchs hinsichtlich einiger enthaltener Flavonoide zu untersuchen und zu explorieren, durch welche Lösungsmittel sich diese bei der Extrakterstellung am besten isolieren ließen. Die in einschlägiger Literatur anerkannte HPLC-Methode, mit der Flavonoide in der Vergangenheit bereits erfolgreich isoliert werden konnten, wurde auch in dieser Versuchsreihe als Trennverfahren verwendet [7, 71, 113, 117, 139].

Sehr deutlich fiel der Unterschied in den Chromatogrammen bei der Wahl des Pflanzenbestandteils aus. Es konnte gezeigt werden, dass sich im wurzelfernen, der Sonne zugewandten Teil des Lauchs qualitativ und quantitativ mehr chromatographisch detektierte Stoffe unterscheiden ließen. Anhand der Chromatogramme in Abb. 16 und 17 ist erkennbar, dass die ausfallenden Peaks des grünen Pflanzenabschnitts nicht nur nummerisch, sondern auch in der Intensität deutlicher ausfielen als die des weißen, wurzelnahen Abschnitts. Auffällig war, dass der Kurvenverlauf bei allen drei Pflanzenabschnitten bis etwa zwölf Minuten im Zeitverlauf der Chromatogramme sehr ähnlich war, wenn auch unterschiedlich in der Intensität. Je mehr der DMSO-Gradient des Eluenten zunahm, desto deutlicher unterschieden sich die Chromatogramme in ihrem Peak-Profil. Die Flavonidkontrollen mit Quercetin und Rutin ließen sich beide erst bei einem 100%igen DMSO + 10 % Aquabidest.-Eluenten detektieren. Dies spricht für ein apolares Bindungsverhalten. Erst durch die Verwendung des starken organischen Lösungsmittels DMSO gelang es, die Flavonoide von der apolaren Säule zu lösen. Rutin wurde durch einen Peak nach 24,7 min und Quercetin nach 26,4 min (Abb. 18) in den Kontrollen identifiziert. Unabhängig vom Lösungsmittel und Pflanzenabschnitt konnte Rutin in allen vermessenen Extrakten nicht isoliert werden. Dagegen ist Quercetin intensiv in dem Extrakt des grünen, wurzelfernen Pflanzenabschnitts

trennbar und nur noch moderat in den restlichen Pflanzenabschnitten messbar. Diese Erkenntnisse werden durch die aktuelle Literatur bestätigt, die zur chromatographischen Trennung von Flavonoiden der *Allium porrum* Pflanze kaum vorhanden ist, hingegen wurde die verwandte *Allium cepa* (Küchenzwiebel) neben anderen Pflanzen umfassend untersucht. Analysen haben ergeben, dass die meisten Flavonoide mit besonders hoher Ausbeute von Quercetin in der Pflanzenspitze bzw. den äußeren Bestandteilen gemessen wurden und der Gehalt wurzelwärts weiter abnahm [75]. Diese Erkenntnisse decken sich mit dem natürlichen Funktionsgefüge der Flavonoide in der Pflanzenflora, in der sie unter anderem als UV-Schutz, im Rahmen der Farbgestaltung und als Lockstoff für Insekten dienen und dementsprechend in sonnenexponierten Pflanzenanteilen synthetisiert und eingelagert werden [18]. Diskutiert wird auch, in welchen Derivaten Flavonoide in den Pflanzen vorliegen. Hauptsächlich sind diese als Glykoside vorzufinden [58, 153]. Kwak et al. haben vier verschiedene glykosierte Derivate des Quercetins am Beispiel der *Allium cepa* auftrennen können und unterschiedliche Gradienten innerhalb der Pflanzenabschnitte festgestellt [75]. Insbesondere vor dem Hintergrund der Bioverfügbarkeit und pharmakologischen Aktivität haben diese Derivate einen wichtigen Stellenwert [58, 75]. Im Rahmen meiner Untersuchungen lag der Fokus auf dem generellen Nachweis von Quercetin und Rutin.

Bei der Wahl des Lösungsmittels wurde eine wasser- und eine ethanolbasierte Extrakterstellung gewählt. Beim Vergleich dieser Extrakte fällt lediglich ein moderater Unterschied auf. Die Extrakte der beispielsweise grünen, wurzelfernen Pflanzenabschnitte auf Wasser- und Ethanolbasis (Abb. 16, 17) unterscheiden sich im Chromatogramm nur geringfügig. Diese Chromatogramme sind im Verlauf sehr ähnlich und die Peaks verlaufen bis auf geringe Abweichungen in der gleichen Interferenz. Auch hinsichtlich der Intensität gibt es nur marginale Unterschiede. In Absprache mit Frau Priv.-Doz. Dr. Richter und Herrn Prof. Jeschke wurde, auch vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur und der Erkenntnisse des Forschungslabors, entschieden, die ethanolbasierten Extrakte für nachfolgenden Zelltests weiter zu verwenden. Zum einen war die Intensität in Bezug auf das nachgewiesene Flavonoid Quercetin geringfügig höher, zum anderen ließ dies eine bessere Vergleichbarkeit zu anderen Projekten innerhalb des Labors zu. Diese Entscheidung wird durch die aktuelle Literatur bestärkt. Numonov et al. haben die Extraktionsergiebigkeit von

Flavonoiden in Abhängigkeit zum Ethanolgradienten des Lösungsmittels untersucht und stellten fest, dass bei 70 % und 80 % Ethanol Flavonoide am besten aus der Pflanzenmatrix isoliert und chromatographisch gemessen werden können [116].

Weitere in Publikationen diskutierte Faktoren, die die Flavonoid-Ergiebigkeit der Extrakte beeinflussen, sind die Temperatur, der pH-Wert, die Extraktionszeit und die Laufzeit der HPLC [4, 40, 75].

Interessanter Weise konnte in den Extrakten kein Rutin nachgewiesen werden. Bei einem parallelen Projekt des Forschungslabors, in dem der gleiche Extrakt hergestellt wurde, konnte in der HPLC-Messung lediglich Rutin, aber kein Quercetin gemessen werden. In meiner Versuchsreihe wurde der verwendete Lauch im Unterschied zu anderen Versuchen vor Extrakterstellung bei -18° Celsius über Nacht tiefgefroren. Das lässt vermuten, dass Rutin beziehungsweise Quercetin-3-rutosid entweder frost- oder zeitbedingt zu einem Quercetin-Derivat zerfiel oder enzymatisch abgebaut wurde. Die möglichen Erklärungsansätze sind vielfältig.

Lukšič et al. haben bereits in der Verarbeitung von Buchweizen, der ebenfalls sehr rutinhalbig ist, während der Fermentation des Teigs den Abbau von Rutin beschrieben [89]. Es konnte durch Cui und Wang gezeigt werden, dass dafür ein spezifisches Rutin-hydrolysierendes-Enzym verantwortlich ist [33].

In anderen Studien wurde festgestellt, dass durch die Lösung von Rutin in Ethanol und zusätzliches Titrieren einer Säure die Hydrolyse von Rutin zu Quercetin deutlich beschleunigt wurde [164]. Interessant ist auch, dass mit der Umwandlungsrate von Rutin zu Quercetin sowohl die Radikalfängeraktivität, als auch die entzündungshemmende und antiproliferative Wirkung korreliert [164, 166].

Schneider et al. beschreiben den bakteriellen Abbau des Rutins zu Quercetin unter anaeroben Bedingungen durch *Eubacterium ramulus* und *Enterococcus casseliflavus* im menschlichen Darm [136]. Auch das aus dem menschlichen Gastrointestinaltrakt isolierte Bakterium *Enterococcus avium* ist am Abbau von Rutin über Isoquercetin zu Quercetin beteiligt [142]. Die Deglykosylierungswege sind also multipel und spielen für die Bioverfügbarkeit und nutrazeutische Wirkung eine zentrale Rolle. Auf welchem Wege die Hydrolysierung in diesem Fall stattfand, bleibt unklar.

Bei 10,0 min konnte im Chromatogramm Abb. 18 zusätzlich Folsäure nachgewiesen werden. Auch in vorherigen Analysen von Gemüse- oder Getreidesorten konnte mittels HPLC Folsäure nachgewiesen werden [109, 110]. Der Peak ist in seiner

Intensität eher schwach, sodass die Menge der nachgewiesenen Folsäure nur abgeschätzt werden kann, wahrscheinlich aber eher gering ist.

5.2 CellTiter-Glo® - Viabilitätstest

Durch den CellTiter-Test ist es gelungen, anhand des ATP-Gehalts die Wirkungen der Extrakte und Kontrollen im Hinblick auf die Viabilität zu bewerten.

Die rezeptornegativen MCF-10a-Zellen reagierten sehr sensibel auf die zugeführten Extrakte. Signifikante Viabilitäts-Einschränkungen konnten bei 100 %-, 50 %- und 20%igem Extrakt festgestellt werden. Es lässt sich eine Dosis-Wirkung-Beziehung vermuten, denn je höher der Extrakt konzentriert war, desto geringer war die Viabilität. Dieser Effekt imponiert dabei allerdings nicht linear, zwischen dem 50 %- und 20 %-Extrakt ist ein deutlicher Umbruch zu eruieren. Darüber hinaus haben auch Tamoxifen und Quercetin einen signifikanten Einbruch der Zellviabilität bewirkt, bei Estradiol konnte dies nicht beobachtet werden. Wachstumsfördernde Wirkungen des Estradiols blieben erwartungsgemäß aus, da keine Estrogenrezeptoren vorhanden sind.

Trotz der negativen Estrogen- und Progesteronrezeptoren wurden durch die Flavonoid-haltigen Extrakte sowie durch Tamoxifen- und Quercetin-Kontrollen eindrucksvolle Beeinträchtigungen der Viabilität verursacht. Dieser Effekt wird durch Liu et al. zum Teil unterstützt, die selbst nur von moderaten zytotoxischen Effekten durch Quercetin-Derivate auf die MCF-10a-Zelllinie berichteten [86].

Die Erkenntnisse lassen vermuten, dass in den Extrakten entweder weitere biologisch wirksame Substanzen enthalten sind, welche die Viabilität einschränken, oder, dass Flavonoide neben den Estrogen- und Progesteronrezeptoren auch über andere Signalkaskaden Einfluss auf den Lebendzellanteil ausüben. Letztere Annahme wird dadurch bestätigt, dass auch die Quercetin-Kontrolle und Tamoxifen als SERM dämpfende Wirkungen entfalteten. Denn die durch Tamoxifen entfaltete Wirkung an Brustzellen beruht insbesondere auf einer anti-estrogenen Wirkung am ER- α , die bei MCF-10a nachweislich nicht vorhanden ist [47].

Ähnliche Ergebnisse ließen sich bei den Viabilitätstests der rezeptorpositiven MCF-12a-Zellen beobachten. Extrakt 100 % und 50 % konnten zu einer signifikanten Reduzierung der Viabilität führen. Die Vermutung liegt nahe, dass ebenfalls eine Dosis-Wirkung-Beziehung der Extraktkonzentrationen besteht, bei der der

Säulenverlauf des Diagramms einen lineareren Verlauf im Vergleich zu den MCF-10a-Zellen nahm. Auffällig ist, dass zwar Tamoxifen einen deutlich zytotoxischen Einfluss hatte, die Quercetin-Kontrolle hingegen kaum Effekte auf die Viabilität zeigte. Aufgrund des positiven Rezeptorstatus ist der Effekt von Tamoxifen zu erklären, die Estrogen-antagonistische Wirkung könnte zu einer starken Viabilitäts-einschränkung geführt haben [94]. Unklar bleibt die Frage, welche Signalwege denselben Effekt bei den MCF-10a-Zellen induzierten. Verblüffend ist außerdem, dass das Phytoestrogen Quercetin keinerlei Einfluss auf die Zelllinie vermittelte. Unterstützt wird diese Erkenntnis durch Yadegarynia et al., die diverse Flavonoide an unterschiedlichen Mamma-Zelllinien mittels CellTiter testeten und herleiteten, dass Quercetin eine lediglich schwach zytotoxische Wirkung hat [162]. Bei den beschriebenen antikarzinogenen Effekten durch Flavonoide [62] wäre zu erwarten gewesen, dass gerade bei ER-positiven Zelllinien einschlägige Viabilitäts-regressionen eingetreten wären. Dieser Widerspruch gibt Anlass zu vermuten, dass auch ein ER-unabhängiger Einfluss über Zellstoffwechsel interferierende Signal-kaskaden besteht, um somit die Wirkung an der rezeptornegativen Zellreihe zu erklären. Außerdem lässt sich angesichts der Effekte der Extrakte eine Wirkungs-beziehung mit weiteren biologisch aktiven Extraktkomponenten vermuten, denn diese imponierten als potent zytotoxisch und führten schließlich zu einer verminderten Viabilität.

Die mit Estradiol beimpften Zellen zeigten kein auffälliges Viabilitätsprofil. Es zeigten sich weder Einschränkungen, noch ließ sich eine erhöhte Zellviabilität messen, was aufgrund wachstumsstimulierender Estradiol-Wirkungen denkbar gewesen wäre.

Die HMEC reagierten auf die Extrakte hinsichtlich der Zellviabilität ähnlich. Eindrucksvolle viabilitätsregressive Ergebnisse wurden bei hohen Extrakt-konzentrationen beobachtet, hingegen entstand ein proliferativer Effekt bei der 10 %-Extraktkonzentration. In der Literatur wird zwischen stark zytotoxischen und Nicht-zytotoxischen Flavonoiden unterschieden. Deren Wirkungen auf die Zelllinie hängt auch von der biologischen und genetischen Beschaffenheit der Zelle ab [163]. Ein Cocktail biologisch wirkender Substanzen könnte die Viabilität ansteigen lassen, die in der entsprechenden Verdünnung des Extrakts von zytotoxischer Wirksamkeit zu nicht-zytotoxischen Effekten umschlägt. Dieser Wirkmechanismus wurde bereits anhand des Quercetins beschrieben [158].

Die Ergebnisse sind allerdings im Rahmen der Einmaltestung zu sehen und lassen daher nur eine vorsichtige Einschätzung zu.

5.3 BrdU-Proliferationstest

Der BrdU-Assay basiert auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogons Bromodesoxyuridin in die DNA der sich teilenden Zellen, der anschließend photometrisch quantifiziert werden kann.

Der in-vitro Proliferationstest an der MCF-10a-Zelllinie zeigte eine signifikante Proliferationsminderung bei Extrakt 100 %, die bis auf 1,07 % stark sank. Alle weiteren Extraktreaktionen reichten sich in Abhängigkeit zu den Konzentrationen in eine Dosis-Wirkung-Beziehung ein und verhielten sich damit entsprechend der Erkenntnisse, die aus den Viabilitätsuntersuchungen gewonnen werden konnten.

Auch die Wachstumseinschränkungen hinsichtlich der Wirkung von Tamoxifen und Quercetin präsentierten sich äquivalent zur vorher gemessenen Viabilität, wobei Quercetin das Wachstum des Zellassays sogar auf 46,28 % beschränken konnte.

Es ist festgestellt worden, dass die Extrakte konzentrationsabhängig die Proliferation der rezeptornegativen benignen Mammazellen bremste. Da dieser Effekt auch bei der reinen Quercetinkontrolle aufgezeigt werden konnte, lässt dies vermuten, dass Quercetin selbst und als Extraktkomponente einen anti-proliferativen Effekt hat. Diese Entwicklung konnte bereits bei anderen Brustkrebszelllinien gezeigt werden [145].

Meine Untersuchungsergebnisse bestätigten durch die einschlägigen Wirkungen an rezeptornegativen Zellen die breiten Wirkungsspektren des Phytoestrogens jenseits des Rezeptorstatus. Auch in der aktuellen Literatur konnten vom Rezeptorstatus abweichende Signalwege eruiert werden [66, 145].

Tamoxifen als SERM wirkte unabhängig vom Rezeptorstatus antiproliferativ und lässt differierende Wirkungswege vermuten. Frühere Untersuchungen, bei denen durch Tamoxifen antiproliferative und zytotoxische Effekte bei benignen und malignen rezeptorpositiven wie -negativen Brustkrebszelllinien festgestellt wurden, unterstützen diese Ergebnisse [8, 32, 133, 137]. Bei Estradiol ließen sich in Anbetracht der Rezeptornegativität erwartungsgemäß keine proliferativen Effekte beobachten.

Der Proliferationstest der MCF-12a-Zellen konstatierte die Erkenntnisse der Viabilitätsmessungen. Das proliferationshemmende Wirkungsprofil der Extrakte

korrelierte auch hier mit der Konzentration. Tamoxifen zeigte äquivalente Ergebnisse und verhinderte das Wachstum der Zelllinie nahezu gänzlich. Ähnliche Tendenzen hinsichtlich der Quercetin-Wirkung zeigten sich auch bei Testung der MCF-12a-Linie. Die Quercetinkontrolle bremste die Proliferation bei dieser Versuchsreihe aus, blieb aber hinter der Wirkung der selben Kontrolllösung der MCF-10a-Zelllinie zurück. Ungeklärt bleibt die Frage, ob und wie der Rezeptorstatus Einfluss auf die Wirkung von Quercetin bei benignen rezeptorpositiven Mammaepithelzellen nimmt. Studien belegen, dass Quercetin unterschiedlich starken Einfluss auf ER- α und ER- β ausübt, wonach ER- α -vermittelte proliferative Effekte den stärker aktivierten, wachstumshemmenden ER- β -Wirkungen unterliegen [159]. Andere Studien beschreiben wiederum ER- α -induzierte antikarzinogene Signalkaskaden [50].

Die HMEC zeigten ebenfalls eine dosisabhängige Extraktwirkung, bei der die höchste Konzentration die deutlichsten Effekte vermittelte. Diese waren bei meinen Untersuchungen sogar stärker als die antiproliferative Wirkung der Tamoxifen-Kontrolle. Die Extrakte zeigten unabhängig von der Dignität wachstumshemmende Potenziale. Estradiol ließ die Proliferation ebenfalls auf knapp 62 % sinken, womit angesichts der wachstumsfördernden Effekte nicht zu rechnen war.

5.4 CytoTox-Glo® - Zytotoxizitätstest

Grundlage des Zytotoxizitätstests ist die Quantifizierung der „Dead-Cell-Protease-Aktivität“, die nur durch perforierte Zellmembranen ins Medium gelangen kann.

Analog zu vorher beschriebenen Tests ist auch hier eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der Untersuchung der MCF-10a-Zellen zu erkennen. Während Extrakt 100 % eine signifikante zytotoxische Wirkung von über 80 % erzielte und damit einen ähnlichen Effekt wie ihn die Positivkontrolle Tamoxifen hatte, nahm die Aggressivität des Extrakts mit weiterer Verdünnung ab. Imposant ist der Umschlag von Extrakt 20 % und 10 %, der einen antizytotoxischen, also proliferativen, Effekt zeigte. Auch hier scheint die Dosis Einfluss auf das Resultat zu haben. Van der Woude et al. zeigten, dass die Dosis an Flavonoiden und die unterschiedlich starke Aktivierung der Estrogenrezeptoren- α und - β eine entscheidende Rolle spielt, ob der zytotoxische oder proliferative Reiz dominiert [158, 159]. Grundsätzlich denkbar wäre ein Flavonoid- bzw. Quercetin- vermittelter, dualistischer Reiz der Extrakte, der einen solchen Wirkungsswitch generiert haben könnte. Angesichts des negativen

Rezeptorstatus wäre hier allerdings nur ein ER-unabhängiger Wachstumsreiz möglich. Die Quercetin-Kontrolle selbst zeigte einen zytotoxischen Effekt von etwa 40%. Estradiol rief ebenfalls eine signifikante, proliferative Wirkung hervor.

Übereinstimmend mit den Untersuchungen der vorherigen Zellreihe reagierten auch die rezeptorpositiven MCF-12a-Zellen auf die Beimischung der Extraktkonzentrationen entsprechend der Dosis. Während das Extrakt 100 %, wie auch Tamoxifen, signifikant fast 100 % des Zellmediums abtötete, nahm die zytotoxische Potenz der weiteren Extraktkonzentrationen in Abhängigkeit zur Verdünnung ab. Auch Quercetin zeichnete sich als empfindlich zytotoxisch aus und vernichtete knapp 80 % aller Zellen. Im Vergleich zu den rezeptornegativen MCF-10a-Zellen scheint sich hier ein positiver Rezeptorstatus günstig auf die zytotoxische Potenz des Phytoöstrogens ausgewirkt zu haben. Auch Ranganathan et al. dokumentierten in ihren Forschungsergebnissen über maligne Brustkrebszelllinien, dass ein positiver Rezeptorstatus mit einem erhöhten Zelluntergang unter Quercetin-Behandlung einhergeht [126].

Nach Estradiol-Behandlung ging gleichzeitig bei den MCF-12a-Zellen ein signifikant stärker stimulierender Reiz aus. Es präsentierte sich bei beiden Zelllinien trotz der Variation im Rezeptorstatus ein wachstumsanregender Reiz, der zwar bei der ER-positiven Zelllinie deutlicher ausfiel, dennoch aber die Frage aufwirft, ob ein solcher Reiz jenseits des Steroidrezeptors über andere Signalkaskaden übermittelt wird. Li et al. fanden an ER-negativen Brustkrebszellen heraus, dass 17β -Estradiol (E2) auch bei Abwesenheit der klassischen intrazellulären Estrogenrezeptoren über G-Proteingekoppelte Signaltransduktion Einfluss auf die Expression von Genen, zum Beispiel dem Estrogen-related-Rezeptor- α (ERR- α), genommen hat [83]. Dies kann dann ebenfalls E2-vermittelnde wachstumsstimulierende Einflüsse generieren.

Die primären Mammaepithelzellen sind unter Extrakteinwirkungen bei allen Verdünnungsreihen nahezu komplett abgetötet worden. Auch hier zeigte sich, dass die Extrakte unabhängig von der Dignität einen stark zytotoxischen Charakter besitzen, im Gegensatz zu Estradiol, das sogar stärkere proliferative Wirkungen entfaltet als an den rezeptorpositiven benignen Mammazellen MCF-12a.

5.5 Caspase-Glo® - Apoptosetest

Die Apoptoseaktivität kann anhand der Substratumsetzung der Effektorcaspasen 3 und 7 gemessen und durch einen Luminometer quantifiziert werden.

Die zytotoxische Potenz der Extrakte wurde bereits deutlich, allerdings ist die Art und Weise des Zelluntergangs noch ungeklärt. Inwieweit der endogene, programmierte Zelltod dabei eine Rolle spielt, soll mit dieser Untersuchung exploriert werden.

Konträr zu vorherigen Untersuchungen, bei denen die höchsten Extraktkonzentrationen die deutlichsten Effekte zeigten, wurde das zellinterne Caspasesystem sowohl bei MCF-10a- als auch MCF-12a-Zellen eher bei den Extraktverdünnungen 20 % und 10 % aktiviert und zwar so stark, wie die C6-Positivkontrolle. Gleichzeitig wurde bei Extrakt 100 % und 50 % kaum eine Aktivität gemessen. Die Zellen schienen bei hohen Konzentrationen abgetötet zu werden, ohne dass die zellinterne Caspases-bedingte Apoptose beteiligt war. Quercetin als reine Kontrolllösung hingegen offenbarte insbesondere bei den ER-negativen MCF-10a-Zellen einen sehr imposanten Effekt, der bei den rezeptorpositiven MCF-12a-Zellen wesentlich geringer ausfiel. Erkenntnisse aus der Fachliteratur über maligne ER-negative Brustkrebszellen dokumentieren, dass Quercetin in der Lage ist, die Caspasen 3, 8 und 9 zu aktivieren, das Mitochondrien-Membranpotenzial zu senken, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu steigern und so die Apoptose zu induziert [27]. Bei ER-positiven Brustkrebszellen konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Eine Aktivierung der Caspasen 6, 8 und 9 durch Quercetin sowie die Dokumentation von Zellzyklusarresten wird ausführlich beschrieben [28]. Warum zwischen diesen Zelllinien so deutliche Unterschiede in der Aktivität des Caspasesystems festgestellt wurden, lässt sich auch mit Hilfe aktueller Literatur nicht klären. Insgesamt ist die Datenlage über genaue molekularbiologische Apoptosemechanismen bei benignen Mammaepithelzellen unter Quercetineinwirkung wesentlich geringer als bei malignen.

Tamoxifen hat gezeigt, dass es ein sehr potenter Apoptoseaktivator ist. Bei beiden benignen Brustzelllinien wurden Messwerte oberhalb der durch C6-Ceramid-generierten Apoptoseaktivität gemessen. Bei MCF-10a-Zellen konnte mit weit über 200% die deutlichste Reaktion beobachtet werden. Diese Erkenntnisse könnten ein Beleg dafür sein, dass das Caspasesystem einer der Mechanismen oder der Hauptmechanismus der antitumoralen Wirkung von Tamoxifen ist. Sie belegen auch einen ER-unabhängigen Effekt, da die MCF-10a-Zellen reagierten und das sogar

empfindlicher. Eine Tamoxifen-vermittelte Apoptose wird bei ER-negativen Brustkrebszellen in zahlreichen Publikationen beschrieben. Es werden beispielsweise Signalkaskaden des Tamoxifens erklärt, durch welche die Caspase 3 und der JNK1-Weg aktiviert werden konnte [94]. JNK1-induzierte Wege dienen insbesondere der Weiterleitung von Stresssignalen und gehören zu den MAP-Kinasen [35].

Auch wurde durch die Inhibition zentraler zellstoffwechselbestimmender Signalkaskaden, zum Beispiel des Akt-Signalwegs, bei ER-negativen Brustkrebszelllinien eine apoptotische Wirkung aufgezeigt [85].

Paradox erscheint zudem die apoptotische Wirkung des Estradiols (E2), bei dem eher ein stimulierender Effekt zu erwarten gewesen wäre. Bei beiden benignen Zelllinien wird das Caspasesystem überraschend stark aktiviert. Tatsächlich werden in der Literatur sowohl ER-vermittelte und nicht ER-vermittelte Signaltransduktionswege beschrieben, die diesen Effekt erklären könnten. Song et al. konnten an malignen Brustkrebszellen illustrieren, dass mit hohen Estradiolkonzentrationen durch Estrogenrezeptoren proapoptotische Caspasen aktiviert und die zellulären NF κ B-Spiegel gesenkt werden konnten [143]. Altioik et al. berichteten über einen ER-abhängigen JNK-vermittelten proapoptotischen Effekt bei besonders hohen Estradioldosen [3].

Wie Lewis, Wambi und Jordan et al. beschreiben, könnte bei den rezeptornegativen MCF-10a-Zellen über eine extrinsische Fas/FasL-Aktivierung und eine intrinsischer Mitochondrienbeteiligung die E2-konzentrationsabhängige Apoptose eingeleitet worden sein [80].

Interessanterweise konnte auch ein durch Folsäurekontrollen induzierter apoptotischer Reiz bei beiden benignen Zelllinien gemessen werden. Bisherige Erkenntnisse belegen eher ein steigendes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken bzw. ein schnelleres Fortschreiten der Erkrankung unter Supplementation von Folsäure und stehen damit konträr zu den hier gemachten Messungen [69, 87].

Die Apoptoseaktivität der HMEC verhielten sich ähnlich zu den der MCF-10a- und MCF-12a-Zelllinien. Hier ist eine inverse Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Extraktverdünnung und Caspaseaktivität erkennbar. Während die hochdosierten Extrakte nur moderat am Caspase-induzierten Zelltod partizipierten, wirkten die Extrakte 20 % und 10 % wesentlich empfindlicher. Auch Tamoxifen induzierte den caspasegesteuerten Zelltod der HMEC, insgesamt aber schwächer im Vergleich zu

den benignen Mammazelllinien. Estradiol vermittelte diesen Effekt ebenfalls. Der Grund könnte auch hier in der Dosis-abhängigen Estradiol-Wirkungen liegen.

Da diese Apoptoseuntersuchung einmalig durchgeführt wurde, sind ggf. Messfehler nicht auszuschließen.

Obwohl es begründete Argumente gibt, dass Quercetin eine auch deutliche Apoptoseaktivität bei der MCF-10a-Zelllinie bewirkte, imponiert der Wert von mehr als 330% sehr hoch. Dennoch gewähren diese Ergebnisse eine ungefähre und wichtige Einschätzung der Frage, ob und inwiefern die Zellapoptose an den zytotoxischen Effekten der Extraktverdünnungen und Kontrollen beteiligt war.

5.6 Stoffwechsel-Untersuchungen (Glukose, Laktat, pH)

Die Stoffwechsel-Untersuchung, die anhand der Parameter Glukose-, Laktat- und pH-Gehalt der Zellsuspension erhoben wurde, diente der Einschätzung des Zellmetabolismus nach Extrakt- und Kontrolllösungsbehandlung. Generell benötigen Zellen Glukose als Energiequelle, die mittels Glykolyse aerob oder auf anaerobem Wege im Stoffwechsel metabolisiert wird.

Benigne und maligne Burstkrebszellen haben prinzipiell einen angeregten Stoffwechsel, da sie schneller und unkontrollierter wachsen. Deshalb besitzen sie eine gesteigerte Glykolyse und können sich der Autophagie bedienen [121]. Vor diesem Hintergrund wäre ein verringerter Glukosespiegel dort zu erwarten, wo unabhängig von einem aeroben oder anaeroben Metabolismus viel Glukose abgebaut wird und Wachstum stattgefunden hat. Im Umkehrschluss steigt der Laktatspiegel dort, wo durch die Glykolyse entstandenes Pyrovat in Laktat umgesetzt wurde. Nach dem Warburg-Effekt wird in Krebszellen trotz vorhandenem Sauerstoff, also unter aeroben Bedingungen, hauptsächlich Glukose sauerstoffunabhängig in Laktat abgebaut. Dies wird als aerobe Glykolyse bezeichnet [121]. Der ansteigende, saure Laktatspiegel führt zu einem fallenden pH-Wert.

Bei der Glukosemessung lässt sich bei den benignen MCF-10a- und MCF-12a-Zelllinien sowie den HMEC ein relativ konstanter Wert erkennen. Ausnahmen ließen sich lediglich nach der Behandlung mit Extrakt 100 % und 50 % bei allen drei Zelllinien beobachten.

Bereits in den Zelltests zuvor konnte eine starke zytotoxische und antiproliferative Wirkung insbesondere dieser Konzentrationen gezeigt werden, sodass davon abgeleitet werden kann, dass durch Einwirkung dieser Extrakte nicht nur der Stoffwechsel intensiv verlangsamt wurde, sondern die Zellen auch relativ schnell abgetötet wurden. Durch die toten Zellen mit permeablen Zellmembranen könnte intrazellulär gespeicherte Glukose bzw. Glykogen in die Zellsuspension gelangt sein und würde die gemessenen Werte erklären.

Erstaunlich ist, dass die unbehandelten Zellen, bei denen eher ein fallender Spiegel zu erwarten gewesen wäre, äquivalente Glukosespiegel zu den behandelten Zellen aufwiesen.

Die Laktatmessungen stützen die Ergebnisse der Glukoseuntersuchung. Hier zeigten sich bei den MCF-10a- und MCF-12a-Zellen insbesondere bei hohen Extraktkonzentrationen (100 %, 50 %) verhältnismäßig geringe Laktatwerte, die wahrscheinlich auf einen relativ schnellen Zelltod nach Extraktbehandlung hinweisen, sodass Zellstoffwechsel nur in geringem Maße stattgefunden hat. Bei den unbehandelten und mit Estradiol beimpften Zellen wurden relativ hohe Laktatwerte festgestellt. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ohne Beeinträchtigung durch Kontrollen bzw. durch stoffwechselanregende Substanzen die Glykolyse aktiv war.

Sehr hohe Werte wurden bei den mit Extrakten 20 % und 10 % versetzten Zellen der MCF-12a gemessen. Diese indizieren einen angeregteren Metabolismus der Zellen unter gering dosierter Extrakteinwirkung.

Die pH-Messwerte sind relativ unauffällig in ihrem Verlauf. Dabei halten sich die Messwerte bei allen drei Zelllinien konstant. Angesichts der unterschiedlich hohen Laktatwerte, wäre auch eine Beeinflussung des pH-Werts zu erwarten gewesen. Die Laktatspiegel-Veränderungen reichen aber offensichtlich nicht aus, um den pH-Wert merklich zu beeinflussen.

5.7 Wirkweise Quercetin

Die Wirksamkeit des Quercetins konnte gegenüber benignen Brustepithelzellen anhand der Viabilität, des Proliferationsverhaltens, der Zytotoxizität und in Apoptoseuntersuchungen gezeigt werden. Bemerkenswert dabei war die

unterschiedliche Effektivität, mit der es an den im Rezeptorstatus differierenden Zelllinien wirkte. Da Quercetin ein Phytoestrogen ist, war denkbar, dass die Wirkung an den ER-positiven MCF-12a-Zellen einschlägiger ist, als an der ER-negativen MFC-10a-Zelllinie. Bis auf den Zytotoxizitätstest konnten aber insbesondere bei den MCF-10a-Zellen stärkere, antitumorale Ergebnisse verzeichnet werden. Die Quercetin-vermittelten Wirkungen gehen also weit über die ER-induzierten Signalkaskaden hinaus. Einige dieser Signaltransduktionswege wurden bereits erwähnt und sollen nun noch einmal zusammengetragen und ergänzt werden.

Chien et al. konnten an ER-negativen Brustkrebszellen zeigen, dass Quercetin das Mitochondrien-Membranpotential senkt, den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel anhebt und den Caspase-3-abhängigen Zelltod aktiviert. Gleichzeitig konnte eine Quercetin-induzierte Hochregulationen des pro-apoptotischen Proteins BAX gemessen werden sowie herabgesetzte anti-apoptotische Protein-Spiegel von Bcl-2 [27]. Auch Srivastava et al. konnten diese Erkenntnisse an diversen Zelllinien unterschiedlichster Tumorgenese belegen [145]. Darüber hinaus konnten sowohl Chien et al. als auch Chou et al. an ER-positiven bzw. -negativen Brustkrebszelllinien eine vermehrte Freisetzung des Apoptose-induzierenden-Faktors (AIF) feststellen [27, 28]. Ferner wurden Herunterregulationen der Enzyme CDK2, Cyclin A und B beobachtet, die zentrale regulatorische Rollen im Zellzyklus und der Mitose einnehmen, während gleichzeitig die Tumorsuppressorproteine p53 und p57 vermehrt synthetisiert wurden [28]. Über den Zellzyklusarrest wird in vielen Publikationen berichtet, wobei insbesondere eine Arretierung in der G1-/S-Phase dargelegt wird [28, 37, 62].

Rivera et al. beschreiben bemerkenswerte inhibierende Potenziale, die Quercetin auf den Akt/mTOR-Signalweg ausübt [129]. Dieser ist ein wichtiger regulatorischer Signaltransduktionsweg der Zelle, der an der Steuerung des Zellzyklus und dem Proliferationsverhalten beteiligt ist.

Quercetin scheint auch Einfluss auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu haben, durch deren erhöhtes Vorkommen unter Quercetin-Behandlung die ASK1-Aktivierung (Apoptose signal-regulating kinase 1) ansteigt, die ihrerseits den Zelltod einleitet [78].

Einfluss auf die Wirkung des Quercetins nimmt auch die Dosis. Wie Van der Woude et al. zeigten, geht von Quercetin ein dosisabhängiger dualistischer Reiz aus, der bei niedriger Konzentration auch proliferative Effekte vermitteln kann [158]. Ähnliche

Erfahrungen wurden schließlich auch in dieser Arbeit gemacht. Niedrig konzentrierte Extrakte offenbarten, möglicherweise durch Quercetin-induziert, proliferative Effekte. Van der Woude et al. gehen jedoch in einer weiteren Publikation bei diesem biphasischen Reiz von ER-vermittelten Effekten aus [159]. Diese Erkenntnis würde konträr zu den hier gemachten Ergebnissen stehen, da auch rezeptornegative Zellen proliferative Effekte unter Extrakteinwirkung zeigten – möglicherweise taten sie dies aber auch Quercetin-unabhängig.

Im Widerspruch zu van der Woude et al. stehen die Erkenntnisse von Jeong et al., die für in-vitro Tests bewusst niedrige Dosen Quercetin verwendeten, um physiologisch vergleichbare Bedingungen zu schaffen und dennoch einschlägige chemopräventive Effekte erzielten [62].

Bei der Wirkung des Quercetins spielt auch die Zuckerkonjugation des Phytoöstrogens eine Rolle. Diese hat nicht nur Auswirkungen auf die antioxidative Potenz, die im Falle des Aglykons häufig größer ist, sondern auch auf die Bioverfügbarkeit, die durch einen Zuckerrest gesteigert werden konnte [72]. Eine gezieltere Auftrennung wäre für das Verständnis der Quercetin-Wirkung erforderlich.

5.8 Wirkweise Estradiol

Estradiol wurde in meiner Versuchsreihe als Kontrollsubstanz verwendet. Während bei den Viabilitäts- und Zytotoxizitätstests zu erwartende wachstumsstimulierende Ergebnisse gemessen wurden, gab es Auffälligkeiten bei den Proliferations- und Apoptosetests. Zum einen blieb die Proliferation bei rezeptorpositiven MCF-12a-Zellen und den physiologischen HMEC-Zellen unter Estradiolbehandlung hinter der Proliferationsrate der unbehandelten Zellen zurück, sodass sich eine moderate Proliferationshemmung vermuten ließ. Zum anderen wurde eine beträchtliche Aktivierung des Apoptosesystems bei allen drei verwendeten Zelllinien gemessen.

Bereits in anderen Arbeiten wurde diese wachstumshemmende Wirkung des Estradiols beobachtet [133]. Da Zelllinien unabhängig vom Rezeptorstatus betroffen sind, lässt sich ein ER-unabhängiger Signalweg vermuten, der diese anti-proliferativen und pro-apoptischen Effekte vermittelte.

Lewis-Wambi und Jordan fassten Erkenntnisse der Estradiol-induzierten Apoptose zusammen, bei denen grundsätzlich zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg unterschieden wird. Diese Resultate könnten die hier gemachten Versuchsergebnisse erklären.

Beim extrinsischen Signaltransduktionsweg wird die FasL-Expression E2-vermittelt heraufreguliert, sodass durch die Bindung von FasL an den Fas-Rezeptor die Caspasen 8 und 10 aktiviert werden, die neben der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien auch die Caspasen 3, 6 und 7 aktivieren. Durch diese kann dann die Apoptose einleitet werden [80].

Der intrinsische Weg führt über einen Anstieg der pro-apoptischen Proteine Bax, Bak, p53 und einem E2-induzierten Verlust des Mitochondrien-Membranpotenzials zu einer vermehrten Ausschüttung von Cytochrom C, das die Caspasen 7 und 9 aktiviert [80].

Es wird auch berichtet, dass E2 in der Lage sei, den PI3K/Akt-Signalweg [63, 168] und die Aktivität von NF κ B zu hemmen [118], um auf diesem Wege den Zelltod zu initiieren.

5.9 Methodenkritik

In der Literatur werden sehr unterschiedliche Varianten der Extrakterstellung beschrieben, die es ermöglichen, Flavonoide möglichst effizient zu extrahieren.

Variiert werden bei diesen Verfahren insbesondere das Lösungsmittel, die Konzentration des Lösungsmittels, sowie die Extraktionszeit.

Während Nuutila et al. eine Extrakterhitzung über zwei Stunden auf 80 °C mit 1,2 M HCL und 50 % Methanol unter Zugabe von Ascorbinsäure als Antioxidans für Zwiebeln empfehlen [117], raten Engida et al. dazu, Flavonoide am besten über eine Extraktionszeit von vier Stunden in einer Ethanollösung von 80 % bei einem Gemischverhältnis von 50 ml Lösungsmittel zu 1 g Pflanzenprobe zu extrahieren [40].

Numonov et al. untermauern die Erkenntnis, dass ein Ethanol-Anteil von 80 % die meisten Flavonoide löst, wobei nur ein geringer Vorteil gegenüber dem hier verwendeten Ethanol-Anteil von 70 % besteht [116]. Park und Ikegaki arbeiteten speziell bei der Extraktion von Quercetin mit einer 60%igen Ethanol-Konzentration [120].

Bei der anschließenden HPLC-Vermessung verwendeten sowohl Numonov et al. als auch Park und Ikegaki ebenfalls eine Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min, eine Wellenlänge von 254 nm und benutzten methanolbasierte, mobile Laufmittel, die mit Ameisen- bzw. Essigsäure angereichert wurden. Alves et al. variierten ihre Laufzeiten bei der Detektion von Quercetin und Rutin und ließen Quercetin bei einer

Laufgeschwindigkeit von 1,8 ml/min und Rutin bei 1,6 ml/min bei 350 nm, einer mobilen Phase aus Acetonitril (20 %) und einem Schwefelsäurepuffer (80 %) isolieren [4].

Um in dieser Arbeit die Flavonoide in den Extrakten ausfindig zu machen, wurden Quercetin- und Rutin-Aglycon-Kontrollen der Firma Sigma Aldrich verwendet, sodass auch nur diese in den Extrakten sicher benannt werden konnten. Da in der Natur Flavonoide in multiplen Derivaten mit vielfältigsten Zuckerkonjugationen vorliegen [72], kann nicht konkretisiert werden, welche und wie viele Quercetin- bzw. Rutin-Derivate in den vermessen Extraktkonzentraten noch vorhanden waren. Kwak et al. hatten dies an verschiedenen Zwiebelformen untersucht und vier unterschiedliche Quercetin Glykoside mit der HPLC Methode isolieren können [75]. Für weitere Zelluntersuchungen mit Extrakten verspricht dieser Ansatz ein besseres Verständnis der antitumoralen Potenz von Flavonoiden auch in Abhängigkeit unterschiedlicher Glykoside.

Eine mögliche Fehlerquelle, die zu Messungenauigkeiten der Tests geführt haben könnten, ist die ungenaue Bestimmung der Zellzahl in der Bürker-Zählkammer. Es handelt sich hier um ein grundsätzlich geeignetes Verfahren, um die Zellzahl zu detektieren. Diese Methode kann aber fehleranfällig sein, wenn die Zellen in der Zellsuspensionen nicht homogen verteilt sind. Mit moderatem ‚Auf-‘ und ‚Abpipettieren‘ der Zellsuspension wurde versucht, eine gewisse Verwirbelung und Verteilung der Zellen im Eppendorf-Tube zu gewährleisten, um die Fehlerwahrscheinlichkeit möglichst gering zu halten. Dennoch könnten Wells mit einer differierenden Zellzahl beimpft worden sein.

Bei der anschließenden Aussaat der Zellen auf die 96-Well-Platten wurde sowohl durch den Vortex als auch durch regelmäßiges Verwirbeln mit der Pipette versucht, eine homogene Verteilung zu garantieren. Trotz Bestimmung der richtigen Zellzahl können unterschiedlich viele Zellen in die Wells gelangt sein, sodass bei den photometrischen Tests im Falle eines Pipettierfehlers verfälschte Signalstärken gemessen werden.

Bei den Viabilitäts-, Zytotoxizitäts- und Apoptose-Tests wurde das Enzym Luciferase verwendet, das ATP-abhängig ist. Der ATP-Haushalt adhärenzabhängiger Zellen ist bei einer fehlenden Möglichkeit der Zellverankerung im Well instabil, sodass im Falle einer zu hohen Zelldichte/Well keine Linearität zwischen Zellzahl und gemessener Lumineszenz gewährleistet werden kann.

Ebenfalls kann die Aktivität der Luciferase durch Chemikalien beeinflusst werden, zu denen auch DMSO zählt. Laut Hersteller wurden die Assays bis zu Konzentrationen von 2%-10% getestet und interferieren mit dem Lichtsignal nur minimal [23, 25], dennoch kann dies zu Beeinflussungen, insbesondere bei Testungen mit den Referenzen Quercetin und Rutin, führen. Diese wurden in Ethanol und DMSO gelöst.

Die Apoptosetests, die nicht nur sehr interessante Ergebnisse über die Wirkweise des Quercetins und Tamoxifens, sondern insbesondere für die Estradiolwirkung ergeben haben, sollten kritisch betrachtet werden. Diese lassen im Rahmen der vierfachbestimmten Einmaltestung leider nur eine ungenaue Einschätzung des endogenen Zelltods zu und zeigten keine Signifikanz. Aus Kostengründen konnten die Tests nicht ausgeweitet werden.

Gleiches gilt für die Untersuchung der HMEC, die aufgrund hoher Kosten und beschwerlicher Zellkultivierung leider nur einmal pro Zelltest untersucht werden konnten, sodass die Ergebnisse keine Signifikanz haben und lediglich richtungsweisend eingestuft werden können. Dies hängt nicht zuletzt auch damit zusammen, dass die HMEC als physiologische Zellen wesentlich fragiler, empfindlicher und in ihrem Teilungsverhalten begrenzt sind.

Zuletzt soll auf die Rahmenbedingungen von in-vitro-Testungen hingewiesen werden. Alle durchgeführten Untersuchungen wurden in-vitro an einzelnen Zelllinien durchgeführt, sodass zelluläre Interaktionen zwischen physiologischen, organischen Zellverbänden, wie sie im Körper vorhanden sind, nicht abgebildet werden konnten.

6 Zusammenfassung

Bei den von mir durchgeführten Versuchen ist es gelungen, aus wasser- und ethanolbasierten Extrakten der *Allium porrum*-Pflanze (Lauch) das Flavonoid Quercetin und Folsäure mittels der HPLC-Methode zu isolieren. Das vermutete Rutin ließ sich nicht nachweisen.

Im Anschluss war es möglich die Wirksamkeit dieser Extrakte in in-vitro Zelltests dosisabhängig und im Vergleich zu den Referenzen Quercetin und Folsäure sowie zu den Kontrollen, bestehend aus Estradiol und Tamoxifen, auf den Zellmetabolismus hin zu untersuchen. Es konnte an benignen rezeptorpositiven MCF-12a- und rezeptornegativen MCF-10a-Zellen einer fibrös-zystischen Mastopathie, deren Rezeptorstatus in einer zuvor durchgeführten immunhistochemischen Reaktion verifiziert wurde sowie an den physiologischen Mammaepithelzellen HMEC gezeigt werden, welche Einflüsse der ethanolbasierte Extrakt auf die Zellviabilität, das Proliferationsverhalten, die Zytotoxizität und das endogene Apoptosesystem der Zellen hat. Darüber hinaus wurden die Einflüsse auf den Zellstoffwechsel durch Glukose-, Laktat- und pH-Messungen eruiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Extrakt in einer Dosis-Wirkungs-Beziehung regressive Viabilitäts- und Proliferationsergebnisse bei allen drei untersuchten Zelllinien lieferte. Dabei imponierten die hochdosierten Extraktverdünnungen als stark wachstumshemmend, wobei niedrigere Konzentrationen z.T. leicht proliferative Effekte zeigten. Entgegen der Erwartungen wirkte die Quercetin-Referenz insbesondere an den rezeptornegativen MCF-10a-Zellen viabilitäts- und proliferationshemmend und weniger stark an den rezeptorpositiven MCF-12a-Zellen. Folsäure griff kaum in das Wachstumsverhalten und das Zellüberleben ein, während Tamoxifen erwartungsgemäß wachstumshemmend und Estradiol stimulierend wirkte. Untermuert wurden diese Ergebnisse durch die im Anschluss durchgeführtem Zytotoxizitätsversuche, bei denen ebenfalls die Dosis die zytotoxische Potenz des Extrakts bestimmte. Quercetin entfaltete auch hier die deutlichsten Effekte bei den rezeptornegativen Mammazellen, die Kontrollen Tamoxifen und Estradiol bestärkten ihre zellschädigenden bzw. anregenden Effekte. Folsäure zeigte keine Wirkung.

Nachdem die zytotoxische Potenz beurteilt werden konnte, wurde untersucht, ob beim Absterben der Zellen das zelleigene Apoptosesystem beteiligt war. Meine Ergebnisse deuten auf eine partielle Beteiligung dieses Systems hin. Während der Zelltod bei hochkonzentriertem Extrakt mit nur mäßiger Beteiligung der endogenen

Apoptose und wahrscheinlich im Rahmen einer Nekrose eintrat, wurde eine deutlichere Aktivität bei geringeren Dosen gemessen. Äquivalent zu vorherigen Erkenntnissen verursachte Quercetin bei den MCF-10a-Zellen die markantesten apoptosestimulierenden Ergebnisse, bei den rezeptornegativen MCF-12a-Zellen fiel das Ergebnis moderater aus.

Auffallend war die Stimulation des programmierten Zelltods durch Estradiol, das auf dualistische Effekte hindeutet. Ebenfalls wirkte Folsäure und Tamoxifen apoptoseanregend.

Angesichts der Wirkungen an benignen fibrös-zystisch entarteten Mammaepithelzellen sollten auch die Einflüsse auf physiologische Mammazellen der Linie HMEC begutachtet werden. Im Rahmen dieser Einzelbestimmungen zeigte sich ein ähnliches Dosis-Wirkungs-Gefüge der Extrakte gegenüber den Zellen, bei denen hohe Konzentrationen viabilitäts-, wachstumshemmend und zytotoxisch wirkten.

Abschließend lässt sich resümieren, dass *Allium porrum*-Extrakte mit dem darin isolierten Quercetin starke tumorregressive Potenziale aufweisen, die sich allerdings auch bei physiologischen Mammazellen entfalteten.

Flavonoide haben positive Einflüsse auf die Genese und die Entstehung von benignen und malignen Entartungen der Mamma gezeigt [72]. Diese Erkenntnisse werden in meinen Untersuchungen belegt und stehen im Einklang mit der wissenschaftlichen Diskussion, in besonderer Hinsicht auf die benigne Entartung der Mamma zur fibrös-zystischen Mastopathie.

7 Ausblick

Auf welche Weise diese Ergebnisse einerseits in moderne Therapiekonzepte integriert werden können und sich andererseits auch in alltäglichen Lebensgewohnheiten anwenden lassen, gilt es in Zukunft zu eruieren.

Es gibt Bestrebungen etablierte Zytostatika-basierte Therapieschemata bei malignen Entartungen mit Quercetin zu kombinieren. Die Intention ist, die Dosis der Zytostatika zu reduzieren, Krebszellen gezielter anzugreifen und parallel gesunde Zellen stärker zu schützen [81, 147]. Voraussetzung dafür sind genaue Kenntnisse über die exakten Wirkmechanismen, die Quercetin vermittelt [5].

Diese Arbeit zeigt, dass Flavonoide auch ein potentes Mittel zur Behandlung und möglicherweise zur Vorsorge der benignen fibrös-zystischen Mastopathie darstellt. Da diese Krankheit nicht selten einer malignen Entartung vorausgeht, sollte dieses Wissen genutzt werden, weitere präventive und therapeutische Konzepte zu explorieren, um die fibrös-zystische Mastopathie zu behandeln und das Risiko einer malignen Entartung zu minimieren.

Das Wissen über die Wirkung flavonoidhaltiger Lebensmittel bietet die Möglichkeit, betroffenen Patientinnen im Rahmen komplementärmedizinischer Angebote, wissenschaftlich fundierte Diäten anzubieten. Eine individuelle, engagierte Partizipation der erkrankten Patientinnen in die eigene Therapie kann somit intensiviert werden. Auf diese Weise lässt sich möglicherweise auch die Compliance steigern.

Frauen können präventiv informiert werden, welche Nahrungs- und Lebensgewohnheiten einen protektiven Charakter in Bezug auf die Entstehung einer fibrös-zystischen Mastopathie aufweisen. Für genetisch prädisponierte Patientinnen könnte diese Information ein frühzeitiges Bewusstsein schaffen, wie dem Krankheitsverlauf positiv entgegen zu wirken ist.

In diesem Zusammenhang ist das Verständnis über die Wirkung von Flavonoiden *in vivo* beim Menschen, ihre Absorption im Darm, ihre Bioverfügbarkeit und in welche Metaboliten sie umgewandelt werden, wichtig. Diskutiert werden muss zukünftig, in welchen Derivaten Flavonoide im Lauch vorliegen und welchen Einfluss diese auf die Bioverfügbarkeit haben.

Eine differenziertere chromatographische Auftrennung, wie sie bereits Kwak et al. bei der Zwiebel gelungen ist, wäre auch vor dem Hintergrund der intestinalen Absorption

notwendig [75]. Denn wie Hollman et al. bereits beschrieben haben, beeinflusst die Zuckerkonjugation die Aufnahme von Flavonoiden an der Darmschleimhaut [58].

Untersucht werden muss neben der Absorption die gastrointestinale und hepatische Metabolisierung der Flavonoide. Zudem muss exploriert werden, in welcher Form diese letztendlich dem Kreislauf über das Blut zur Verfügung gestellt werden und welchen Einfluss Pharmakokinetik und -dynamik haben.

Zu erörtern wäre die Frage, ob in Ergänzung eine alltägliche Supplementation protektiven Wert besitzt. Ross und Kasum schreiben, dass „die Summe der Teile für die Erzielung gesundheitlicher Vorteile wichtiger ist als nur ein Pflanzenbestandteil“ [130] und weisen damit auf die Wichtigkeit der Komplexität der Pflanzenmatrix und ihren enthaltenen, sekundären Metaboliten gegenüber Einzelpräparaten hin.

Die in dieser Arbeit gemachten Ergebnisse müssen auch im Zusammenhang mit der in-vitro Testung gesehen werden. In-vivo-Studien sollten sich in diesem Kontext anschließen.

Interessante Untersuchungsfragen könnten lauten:

1. Welche langfristigen, physiologischen Blutkonzentrationen nehmen Flavonoide bei forcierten, *Allium porrum*-inbegriffenen Diäten oder Einnahmen der Extrakte ein?
2. Welche genauen Effekte können diese vermitteln?
3. Wie reagieren Zellen im Rahmen von Zellgefügen und Organen und der damit einhergehenden interzellulären Kommunikation auf Flavonoide?

Es bleiben noch viele Fragen offen und sollten begründeten Anlass für weitere Forschungen zu diesem Thema geben.

8 Thesen

Thema: Einfluss von *Allium porrum* - Extrakt (Lauch) im Vergleich zu synthetischem Quercetin und Rutin auf benigne und normale hormonrezeptorpositive und -negative Mammazellen

1. Epidemiologische Daten belegen gravierende Unterschiede der Inzidenz und Mortalität bei Brustkrebserkrankungen weltweit mit besonders ausgeprägtem Gefälle der asiatischen gegenüber der westlichen Welt. Erkenntnisse belegen die Beteiligung unterschiedlicher Ernährungsgewohnheiten an dieser Diskrepanz.
2. Der häufigste benigne Brusttumor der Frau ist die fibrös-zystische Mastopathie, die ein z.T. deutlich erhöhtes Risiko aufweist, ein Mammakarzinom zu entwickeln.
3. In vielen Obst- und Gemüsesorten enthaltene Phytoestrogene, z.B. Flavonoide, haben unter Beweis gestellt, dass sie einen positiven Einfluss auf die Genese, den Verlauf und die Behandlung von tumorösen Brust-erkrankungen ausüben.
4. In wasser- und ethanolbasierten Extrakten der *Allium porrum* Pflanze (Lauch) kann das Flavonoid-Aglycon Quercetin und Folsäure im Gegensatz zu vermutetem Rutin mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) isoliert werden.
5. Im ethanolbasierten Extrakt aus dem grünem Pflanzenbestandteil können am meisten Inhaltstoffe gelöst werden.
6. Der Hormonrezeptorstatus der MCF-10a- und MCF-12a-Zellen kann in einer immunhistochemischen Untersuchung verifiziert werden.
7. In in-vitro Zelltests werden dosisabhängige, inhibierende Wirkungen des Ethanolextrakts auf die Zellviabilität, Zytotoxizität, Proliferation sowie stimulierende Effekte des Apoptosesystems unabhängig vom Hormon-

rezeptorstatus an Zellen der fibrös-zystischen Mastopathie (MCF-12a, MCF-10a) und physiologischen Mammazellen (HMEC) gemessen.

8. Die Referenz Quercetin wirkt ebenfalls inhibierend auf Zellviabilität, Zytotoxizität, Proliferation und anregend auf die Apoptose, während Folsäure nur geringe Auswirkungen zeigt.
9. Die Kontrollen Estradiol und Tamoxifen wirken auf die Zelllinien MCF-10a, MCF-12a und HMEC substanzspezifisch, wobei Estradiol dualistische Wirkungsweisen zeigt.
10. Weitere Untersuchungen zum Differenzieren von Quercetinderivaten in *Allium porrum* und dessen Wirkungen sind indiziert.
11. Um die präventiven und therapeutischen Potenziale von *Allium porrum*-Extrakten und flavonoidhaltigen Diäten auf den menschlichen Körper und möglichen benignen und malignen Entartungen zu verstehen, sind weitere in-vivo Studien dringend nötig.

9 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Abstracts veröffentlicht:

J Voß, T Reimer, B Gerber, DU Richter. Einfluss von *Allium porrum* – Extrakt (Lauch) im Vergleich zu synthetischem Quercetin und Rutin auf benigne und normale hormonrezeptorpositive und -negative Mammazellen, *Senologie – Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 2018; 15 (02): e50.

DOI: 10.1055/s-0038-1651814

F Häbler, T Mayser, J Burgard, J Voß, U Jeschke, B Gerber, T Reimer, DU Richter. Einfluss von *Allium porrum*-Extrakt im Vergleich zu synthetischem Rutin und Folsäure auf maligne hormonrezeptorpositive und -negative Mammakarzinomzelllinien, sowie auf humane Mammaepithelzellen (MCF-7, Hs578T, HMEpC), *Geburtshilfe und Frauenheilkd* 2018; 78(10): 93

DOI: 10.1055/s-0038-1671026



Einfluss von *Allium porrum* – Extrakt (Lauch) im Vergleich zu synthetischem Quercetin und Rutin auf benigne und normale hormonrezeptorpositive und –negative Mammazellen

Voß J¹, Häbler F, Reimer T, Gerber B¹, Richter D-U¹.

¹Universitätsmedizin Rostock, Universitätsfrauenklinik, Südring 81, 18059 Rostock

Einleitung

Brustkrebs ist sowohl in Deutschland und der industriellen, westlichen Welt, als auch in Entwicklungsländern die häufigste Krebserkrankung der Frau¹. Seit Jahrzehnten werden verschiedene Risikofaktoren diskutiert und wie man diese vermeiden kann. Zunehmend spielt auch die bewusste Ernährung im Rahmen der Prävention von Brustkrebs eine wichtige Rolle. In vielen heimischen Pflanzen konnten Flavonoide nachgewiesen werden, die eine antiinflammatorische und antiproliferative Wirkung gegenüber Brustkrebszellen gezeigt haben². Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss von *Allium porrum* – Extrakten (Lauch) im Vergleich zu synthetischem Quercetin und Rutin (Fa. Sigma-Aldrich) auf benigne und normale hormonrezeptorpositive und –negative Mammaepithelzellen *in-vitro* zu untersuchen, um vor diesem Hintergrund eine mögliche Rolle von flavinoidhaltigen Lebensmitteln in der Prävention, Therapie und Rezidivprophylaxe von Brustkrebs zu explorieren.

Quercetin-mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Involving Activation of a Caspase Cascade through the Mitochondrial Pathway in Human Breast Cancer MCF-7 Cells

Chu-Chung Chou^{1,2}, Jai-Sing Yang³, Hsu-Feng Lu⁴, Siu-Wan Ip⁵, Chyi Lu⁶, Chih-Chung Wu¹, Jing-Pin Lin¹, Nou-Ying Tang¹, Jing-Gung Chung¹, Ming-Jen Chou⁷, Ying-Hock Teng⁸, and Dar-Ren Chen⁹

Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action
Sarah M. Mense¹, Tom K. Heil¹, Ramesh K. Ganju² and Hari K. Bhat¹

The potential health effects of dietary phytoestrogens

Correspondence: Professor Ivonne M. C. M. Rietjens, Division of Toxicology, Wageningen University, PO Box 8000, 6700 EA Wageningen, The Netherlands. E-mail: ivonne.rietsjens@wur.nl
Received 6 May 2016; Revised 4 August 2016; Accepted 3 September 2016
Ivonne M C M Rietjens, Jochem Louise and Karsten Beckmann

Material und Methoden

Zu Beginn wurden zwei Extrakte auf 70%iger-Ethanol- bzw. auf Wasserbasis hergestellt und durch eine Hochleistungschromatografie (HPLC) auf Inhaltsstoffe analysiert, im besonderen Hinblick auf die Flavonoide Rutin und Quercetin. Durch eine immunhistochemische Untersuchung (BisZol) gelang der Rezeptorstatus der Zellen. In verschiedenen Extraktkonzentrationen (100%, 50%, 20%, 10%) wurden die Wirkungen auf die Zellproliferation (CellTiter-Glo®, Promega), die Zytotoxizität (CytoTox-Glo®, Promega), das Proliferationsverhalten (BrdU®, Roche) und die Apoptose-Aktivität (Caspase-Glo®, Promega) gemessen. Estradiol- und Tamoxifenkonzentrate dienten dabei als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

Ergebnisse

Das Ergebnis der HPLC ergab die positiven Nachweise von Quercetin. Zusätzlich konnte Folsäure in den Extrakten analysiert werden. Rutin war in beiden Extrakten nicht nachweisbar. Die benignen Zelllinien MCF-12a und MCF-10a reagierten sehr sensitiv auf den Ethanolextrakt. Es konnte analog zu den Extraktkonzentrationen eine dementsprechende zytotoxische und antiproliferative Wirkung festgestellt werden. Der Apoptose-Test zeigte, dass die Extrakte nur in niedrigen Konzentrationen Auswirkungen auf das Caspase-System haben. Die Ergebnisse der physiologischen Mammaepithelzellen verhielten sich moderat. Die Positiv- und Negativkontrollen durch Estradiol und Tamoxifen lieferten die zu erwartenden Ergebnisse.

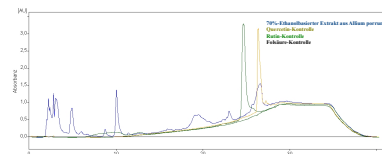


Abb.1: HPLC-Chromatogram: Ethanolbasierter *Allium porrum* Extrakt (blau), Quercetin-Kontrolle (gelb), Rutin-Kontrolle (grün), Folsäure-Kontrolle (schwarz).

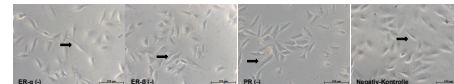


Abb.2: IHC der MCF-10a Zelllinie: ER-α neg, ER-β neg, PR neg, Negativ-Kontrolle in 20x Vergrößerung.

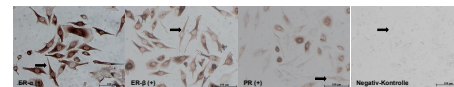


Abb.3: IHC der MCF-12a Zelllinie: ER-α pos, ER-β pos, PR pos, Negativ-Kontrolle in 20x Vergrößerung.

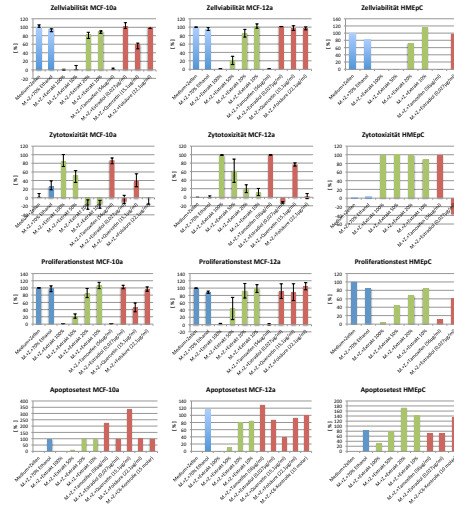


Abb.4: *In-vitro* Untersuchungen der Zelllinien MCF-10a, MCF-12a und der physiologischen Mammaepithelzellen HMEpC im Hinblick auf Viabilität, Zytotoxizität, Proliferation und Apoptoseverhalten.

Schlussfolgerung

Es konnte *in-vitro* eine starke Wirkung der Lauch-Extrakte sowohl auf estrogenrezeptorpositive als auch –negative benigne Mammazellen im Hinblick auf die Zellviabilität, das Proliferationsverhalten und die Zytotoxizität aufgezeigt werden. Allerdings entfalten sich diese Effekte ebenfalls auf die physiologischen Mammaepithelzellen. Interessant wäre es weiter zu untersuchen ob bzw. inwiefern diese Effekte in physiologischen Konzentrationen *in-vitro* und *in-vivo* reproduzierbar sind, um vor diesem Hintergrund die ernährungsbedingten, präventiven Auswirkungen einer bewussten flavinoidhaltigen Ernährung gegenüber Brustkrebs besser einschätzen zu können.

1. Jemal, Ahmedin, Freddie Bray, Melissa M. Center, Jacques Ferlay, Elizabeth Ward, and David Forman. „Global Cancer Statistics“. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61, Nr. 2 (1. März 2011): 69–90.
2. DENG, XIAO-HUI, HAI-YAN SONG, YING-FENG ZHOU, GUO-YAN YUAN, and FENG-JIN ZHENG. „Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin *in vitro*“. *Experimental and Therapeutic Medicine* 6, Nr. 5 (November 2013): 1155–58.

Einfluss von Allium porrum-Extrakt im Vergleich zum synthetischen Rutin und Folsäure auf maligne hormonrezeptorpositive und -negative Mammakarzinomzelllinien, sowie auf humane Mammaepithelzellen (MCF-7, Hs578T, HMEpC)

Häbler F¹, Maysen T¹, Burgard J¹, Voss J¹, Jeschke U², Gerber B¹, Reimer T¹, Richter D-U¹.

¹ Universitätsmedizin Rostock, Universitätsfrauenklinik, Südring 81, 18059 Rostock

²Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Maistrasse 11, 80337 München

Zielsetzung

Sekundäre Pflanzenstoffe sind in der Diskussion, potentiell hilfreich in der Krebsbehandlung zu sein. In dieser Studie sollte die antiproliferative, viabilitätshemmende und zytotoxische Wirkung von Allium porrum-Extrakt (Lauch) auf zwei maligne Mammakarzinomzelllinien in-vitro untersucht werden. Als Vergleich dienten normale Mammaepithelzellen.

Material und Methoden

Für diese Studie wurde aus handelsüblichem, biologisch angebautem Lauch im Mikrowellenverfahren ein Methanolextrakt hergestellt. Eine Analyse des Extraktes gelang mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Durch Immunhistochemie konnte der Rezeptorstatus der Zellen geprüft werden (Biozol). Zur Testung des Zellmetabolismus während der Extrakt-einwirkung wurden pH-Wert-, Glukose- und Laktatmessungen durchgeführt. Mit den Zellviabilitäts- (CellTiter-Glo®, Promega), Zytotoxizitäts- (CytoTox-Glo™, Promega), Neutralrot-Test (Sigma-Aldrich) und Zellproliferationsanalysen (BrdU-Test, Roche) konnten die Wirkungen des Extraktes und der Referenzen getestet werden. Für die Ansätze galt: Extraktlösung in vier verschiedenen Konzentrationen, synthetische Rutin- und Folsäurelösungen jeweils in zwei Konzentrationen (Referenz) und die Kontrollen: Estradiol und Tamoxifen. Alle Untersuchungen erfolgten mindestens in Vierfachbestimmung.



Abb. 1: Aus zerleinerten Lauchstangen (l. und m.) wurde ein Extrakt (r.) unter der Verwendung von Methanol im Mikrowellenextraktionsverfahren hergestellt.

Ergebnisse

Rutin und Folsäure konnten im Extrakt nachgewiesen werden. Dieser weist in allen drei Zelllinien eine deutlich negative Wirkung auf die Zellviabilität auf. In den Zytotoxizitäts- und Zellproliferationsstestungen wird eine klar erkennbare toxische, beziehungsweise antiproliferative Wirkung auf alle Zelllinien aufgezeigt. Die Reinstoffe (Referenzlösungen) zeigten keine entsprechende Wirkung auf die oben genannten Zelllinien.

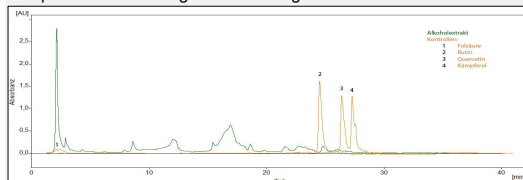


Abb. 2: Chromatogramm der HPLC des alkoholischen Extraktes (grün) und der Referenzlösungen (orange).

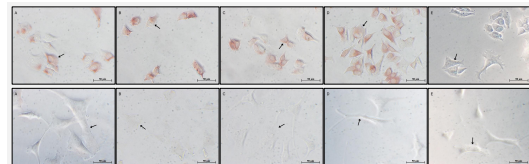


Abb. 3: Die obere Reihe zeigt die Immunhistochemie der MCF-7 Zellen, die untere Reihe die Ergebnisse der Hs578T Zellen. MCF-7: A: -ER pos., B: β-ER pos., C: c-erbB2 pos., D: Progesteron-Rezeptor pos., Bild E zeigt keine Färbung (Negativkontrolle). Hs578T: A: α-ER neg., B: β-ER neg., C: c-erbB2 neg., D: Progesteron-Rezeptor neg., Bild E ist die Negativkontrolle. Die Pfeile markieren exemplarisch Zellen.

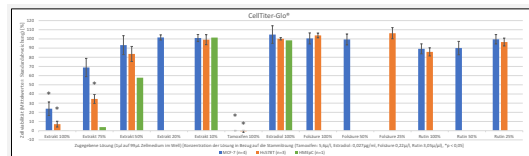


Abb. 4: CellTiter-Glo®

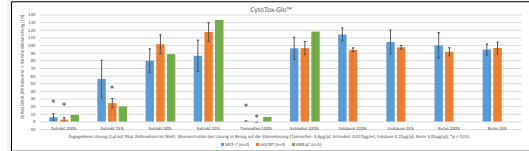


Abb. 5: CytoTox-Glo™

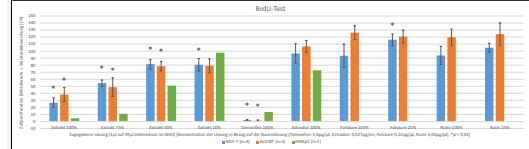


Abb. 6: BrdU

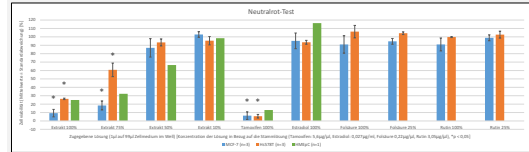


Abb. 7: Neutralrot-Test

Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass aus den bisherigen Ergebnissen eine eindeutige Wirkung des Allium porrum-Extraktes auf die Zelllinien ersichtlich ist. In weiteren Studien bleibt zu prüfen, ob ein nicht in dieser Studie untersuchter Pflanzeninhaltsstoff oder eine Kombination von Stoffen für die Wirkung des Extraktes verantwortlich ist.

Literatur

- Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. Hui C, Qi X, Qianyong Z, Xiaoli P, Jundong Z, et al. (2013) Flavonoids, Flavonoid Subclasses and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. PLOS ONE 8(1): e54318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054318>.
- Folic acid modulates cancer-associated micro RNAs and inflammatory mediators in neoplastic and non-neoplastic colonic cells in a different way. B. Niemann, A. Nemitz, J. Werner, H. D. Mai, P. Steinberg, A. Lampen, A. Ehlers, Mol. Nutr. Food Res. 2017, 61, 1700260. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700260>.
- Rutin, a Quercetin Glycoside, Restores Chemosensitivity in Human Breast Cancer Cells. Iriti, M., Kubina, R., Cochis, A., Sorrentino, R., Varoni, E. M., Kabala-Dzik, A., Azzimonti, B., Dziedzic, A., Rimondini, L., and Wojtyczka, R. D. (2017). Phytother. Res., 31: 1529–1538. doi: 10.1002/ptr.5878.

10 Literaturverzeichnis

- [1] ALBERTS, BRUCE ; JOHNSON, ALEXANDER ; LEWIS, JULIAN ; MORGAN, DAVID ; RAFF, MARTIN ; ROBERTS, KEITH ; WALTER, PETER ; SCHÄFER, U. (Hrsg.) ; HÄCKER, B. ; HORSTMANN, C. ; PROWALD, A. ; ARNDT, O. ; BÖRSCH-HAUBOLD, A. ; BÖRSCH-SUPAN, M. (Übers.): *Molekularbiologie der Zelle*. 6. Auflage. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017 — ISBN 978-3-527-34072-9
- [2] ALI GHASEMZADEH: Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. In: *Journal of Medicinal Plants Research* Bd. 5 (2011), Nr. 31
- [3] ALTIOK, NEDRET ; KOYUTURK, MERAL ; ALTIOK, SONER: JNK pathway regulates estradiol-induced apoptosis in hormone-dependent human breast cancer cells. In: *Breast Cancer Research and Treatment* Bd. 105 (2007), Nr. 3, S. 247–254
- [4] ALVES, DANIELA RIBEIRO ; MAIA DE MORAIS, SELENE ; TOMIOTTO-PELLISSIER, FERNANDA ; MIRANDA-SAPLA, MILENA MENEGAZZO ; VASCONCELOS, FÁBIO ROGER ; SILVA, ISAAC NETO GOES DA ; ARAUJO DE SOUSA, HALISSON ; ASSOLINI, JOÃO PAULO ; U. A.: *Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of Caryocar coriaceum Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome*. URL <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/6834218/>. - abgerufen am 2020-03-27. — Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. — DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/6834218>
- [5] AMAWI, HANEEN ; ASHBY, CHARLES R. ; TIWARI, AMIT K.: Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting? In: *Chinese Journal of Cancer* Bd. 36 (2017)
- [6] AMBROSONE, CHRISTINE B. ; ZIRPOLI, GARY ; RUSZCZYK, MELANIE ; SHANKAR, JYOTI ; HONG, CHI-CHEN ; MCILWAIN, DEMETRA ; ROBERTS, MICHELLE ; YAO, SONG ; U. A.: Parity and breastfeeding among African-American women: differential effects on breast cancer risk by estrogen receptor status in the Women's Circle of Health Study. In: *Cancer causes & control: CCC* Bd. 25 (2014), Nr. 2, S. 259–265
- [7] ANG, LEE FUNG ; YAM, MUN FEI ; FUNG, YVONNE TAN TZE ; KIANG, PEH KOK ; DARWIN, YUSRIDA: HPLC Method for Simultaneous Quantitative Detection of Quercetin and Curcuminoids in Traditional Chinese Medicines. In: *Journal of Pharmacopuncture* Bd. 17 (2014), Nr. 4, S. 36–49
- [8] ANNE DÜNOW: *Die kumulative Wirkung von Leinwurzelextrakt der Pflanze Linum usitatissimum und Tamoxifen auf o⁺strogenpositive Mammakarzinomzellen*, Rostock, 2012
- [9] ANTONIOU, A. ; PHAROAH, P. D. P. ; NAROD, S. ; RISCH, H. A. ; EYFJORD, J. E. ; HOPPER, J. L. ; LOMAN, N. ; OLSSON, H. ; U. A.: Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. In: *American Journal of Human Genetics* Bd. 72 (2003), Nr. 5, S. 1117–1130
- [10] ASCENZI, PAOLO ; BOCEDI, ALESSIO ; MARINO, MARIA: Structure–function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. In: *Molecular Aspects of Medicine* Bd. 27 (2006), Nr. 4, S. 299–402
- [11] BENEDÉ, SARA ; GRADILLAS, ANA ; VILLALBA, MAYTE ; BATANERO, EVA: Allium porrum Extract Decreases Effector Cell Degranulation and Modulates Airway Epithelial Cell Function. In: *Nutrients* Bd. 11 (2019), Nr. 6
- [12] BERG, JEREMY M. ; TYMOCZKO, JOHN L. ; GATTO, GREGORY J. ; STRYER, LUBERT ; HELD, A. ; HELD, M. (Übers.): *Stryer Biochemie, Lehrbuch*. 8. Auflage. Berlin : Springer Spektrum, 2018 — ISBN 978-3-662-54619-2

- [13] BERKOWITZ, G-S: Risk Factors for Fibrocystic Breast Disease and Its Histopathologic Components². In: *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* (1985)
- [14] BILAL, IQRA ; CHOWDHURY, AVIDYUTI ; DAVIDSON, JULIET ; WHITEHEAD, SAFFRON: Phytoestrogens and prevention of breast cancer: The contentious debate. In: *World Journal of Clinical Oncology* Bd. 5 (2014), Nr. 4, S. 705–712
- [15] BÖCKER, W. ; DENK, H. ; HEITZ, P. U. ; HÖFLER, G. ; KREIPE, H. H. ; MOCH, H. (Hrsg.): *Pathologie: mit rund 150 Tabellen ; [Plus im Web, mediscript]*. 5., vollständig überarbeitete Auflage. München : Elsevier, Urban & Fischer, 2012 — ISBN 978-3-437-42384-0
- [16] BOYLE, COLEEN A.: Caffeine Consumption and Fibrocystic Breast Disease: A Case-Control Epidemiologic Study². In: *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* (1984)
- [17] BOYLE, S. P. ; DOBSON, V. L. ; DUTHIE, S. J. ; HINSELWOOD, D. C. ; KYLE, J. A. ; COLLINS, A. R.: Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. In: *European Journal of Clinical Nutrition* Bd. 54 (2000), Nr. 10, S. 774–782
- [18] BUCHANAN, B. B. ; GRUISSEM, W. ; JONES, R. L. ; BUCHANAN-GRUISSEM-JONES (Hrsg.): *Biochemistry & molecular biology of plants*. 7. Reprint. Rockville, Md : American Soc. of Plant Physiologists, 2009 — ISBN 978-0-943088-39-6
- [19] BÜHLING, K. J. ; FRIEDMANN, W. (Hrsg.): *Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinik*. 2. Aufl. München : Elsevier, Urban & Fischer, 2009 — ISBN 978-3-437-42401-4
- [20] BULLOUGH, B. ; HINDI-ALEXANDER, M. ; FETOUH, S.: Methylxanthines and fibrocystic breast disease: a study of correlations. In: *The Nurse Practitioner* Bd. 15 (1990), Nr. 3, S. 36–38, 43–44
- [21] BYRNE, CELIA ; SCHAIRER, CATHERINE ; BRINTON, LOUISE A. ; WOLFE, JOHN ; PAREKH, NAVIN ; SALANE, MARTINE ; CARTER, CHRISTINE ; HOOVER, ROBERT: Effects of mammographic density and benign breast disease on breast cancer risk (United States). In: *Cancer Causes and Control* Bd. 12 (2001), Nr. 2, S. 103–110
- [22] CARTER, JENNIFER C. ; CHURCH, FRANK C.: Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility. In: *Experimental and Molecular Pathology* Bd. 92 (2012), Nr. 3, S. 312–317
- [23] *Caspase-Glo® 3/7 Assay System | Caspase 3 Activity Assay | Apoptosis Detection*. URL https://ch.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis-assays/caspase_glo-3_7-assay-systems/. - abgerufen am 2020-03-26
- [24] *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetic) Version 17*. URL <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf>. - abgerufen am 2020-07-05
- [25] *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. URL https://ch.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/. - abgerufen am 2020-03-26
- [26] CHEN, WENDY Y. ; ROSNER, BERNARD ; HANKINSON, SUSAN E. ; COLDITZ, GRAHAM A. ; WILLETT, WALTER C.: Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk. In: *JAMA* Bd. 306 (2011), Nr. 17, S. 1884–1890
- [27] CHIEN, SU-YU ; WU, YAO-CHUNG ; CHUNG, JING-GUNG ; YANG, JAI-SING ; LU, HSU-FENG ; TSOU, MEI-FEN ; WOOD, WG ; KUO, SHOU-JEN ; U. A.: Quercetin-induced apoptosis acts through mitochondrial- and caspase-3-dependent pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells. In: *Human & Experimental Toxicology* Bd. 28 (2009), Nr. 8, S. 493–503

- [28] CHOU, CHU-CHUNG ; YANG, JAI-SING ; LU, HSU-FENG ; IP, SIU-WAN ; LO, CHYI ; WU, CHIH-CHUNG ; LIN, JING-PIN ; TANG, NOU-YING ; U. A.: Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells. In: *Archives of Pharmacol Research* Bd. 33 (2010), Nr. 8, S. 1181–1191
- [29] COLDITZ, GRAHAM A. ; BOHLKE, KARI: Priorities for the primary prevention of breast cancer. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* Bd. 64 (2014), Nr. 3, S. 186–194
- [30] COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER: Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. In: *Lancet (London, England)* Bd. 360 (2002), Nr. 9328, S. 187–195
- [31] Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. In: *International Journal of Cancer* Bd. 97, Nr. 4, S. 472–480
- [32] CONRAD ALEXANDER THEIL: *Untersuchungen zum Einflusseines Linum usitatissimum-Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Secoisolariciresinol, Tamoxifen und 17 β -Estradiol*, Rostock, 2010
- [33] CUI, XIAO-DONG ; WANG, ZHUAN-HUA: Preparation and properties of rutin-hydrolyzing enzyme from tartary buckwheat seeds. In: *Food Chemistry* Bd. 132 (2012), Nr. 1, S. 60–66
- [34] *CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay*. URL https://ch.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox_glo-cytotoxicity-assay/. - abgerufen am 2020-03-26
- [35] DAVIES, CLARE ; TOURNIER, CATHY: Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies. In: *Biochemical Society Transactions* Bd. 40 (2012), Nr. 1, S. 85–89
- [36] DEL RIO, DANIELE ; CALANI, LUCA ; SCAZZINA, FRANCESCA ; JECHIU, LUCIA ; CORDERO, CHIARA ; BRIGHENTI, FURIO: Bioavailability of catechins from ready-to-drink tea. In: *Nutrition* Bd. 26 (2010), Nr. 5, S. 528–533
- [37] DENG, XIAO-HUI ; SONG, HAI-YAN ; ZHOU, YING-FENG ; YUAN, GUO-YAN ; ZHENG, FENG-JIN: Effects of quercetin on the proliferation of breast cancer cells and expression of survivin in vitro. In: *Experimental and Therapeutic Medicine* Bd. 6 (2013), Nr. 5, S. 1155–1158
- [38] DIRAT, BÉATRICE ; BOCHET, LUDIVINE ; DABEK, MARTA ; DAVIAUD, DANIELÈ ; DAUVILLIER, STÉPHANIE ; MAJED, BILAL ; WANG, YUAN YUAN ; MEULLE, ALINE ; U. A.: Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. In: *Cancer Research* Bd. 71 (2011), Nr. 7, S. 2455–2465
- [39] DYRSTAD, SARA W. ; YAN, YAN ; FOWLER, AMY M. ; COLDITZ, GRAHAM A.: Breast cancer risk associated with benign breast disease: systematic review and meta-analysis. In: *Breast Cancer Research and Treatment* Bd. 149 (2015), Nr. 3, S. 569–575
- [40] ENGIDA, ADAM MEKONNEN ; KASIM, NOVY S. ; TSGIE, YESHITILA ASTERAYE ; ISMADJI, SURYADI ; HUYNH, LIEN HUONG ; JU, YI-HSU: Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). In: *Industrial Crops and Products* Bd. 41 (2013), S. 392–396

- [41] ENOGIERU, ADAZE BIJOU ; HAYLETT, WILLIAM ; HISS, DONAVON CHARLES ; BARDIEN, SORAYA ; EKPO, OKOBI EKO: Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Bd. 2018 (2018)
- [42] ERLUND, I. ; KOSONEN, T. ; ALFTHAN, G. ; MÄENPÄÄ, J. ; PERTTUNEN, K. ; KENRAALI, J. ; PARANTAINEN, J. ; ARO, A.: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. In: *European Journal of Clinical Pharmacology* Bd. 56 (2000), Nr. 8, S. 545–553
- [43] FABIAN, CAROL J. ; KIMLER, BRUCE F. ; HURSTING, STEPHEN D.: Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. In: *Breast cancer research: BCR* Bd. 17 (2015), S. 62
- [44] FELBERBAUM, R ; DIEDRICH, K: Orale Kontrazeptiva – Vorteile und Risiken, S. 9
- [45] VON FOURNIER, D. ; JUNKERMANN, H. ; WARENDORF, U. ; WEBER, E. ; KRAPFL, E. ; ABEL, U.: Hormonal and Non-Hormonal Medical Therapy of Benign Breast Disease. In: KUBLI, F. ; BAUER, M. ; KAUFMANN, M. ; VON FOURNIER, D. ; JUNKERMANN, H. (Hrsg.): *Breast Diseases*. Berlin, Heidelberg : Springer, 1989 — ISBN 978-3-642-73523-3, S. 499–506
- [46] FOWLER, AMY M ; ALARID, ELAINE T: Amping up estrogen receptors in breast cancer. In: *Breast cancer research : BCR* Bd. 9 (2007), Nr. 4, S. 305
- [47] FOWLER, AMY M ; ALARID, ELAINE T: Amping up estrogen receptors in breast cancer. In: *Breast cancer research : BCR* Bd. 9 (2007), Nr. 4, S. 305
- [48] FRIEDENREICH, C. M. ; CUST, A. E.: Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. In: *British Journal of Sports Medicine* Bd. 42 (2008), Nr. 8, S. 636–647
- [49] FRIEDENREICH, CHRISTINE M. ; NEILSON, HEATHER K. ; LYNCH, BRIGID M.: State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. In: *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* Bd. 46 (2010), Nr. 14, S. 2593–2604
- [50] GALLUZZO, PAOLA ; MARTINI, CHIARA ; BULZOMI, PAMELA ; LEONE, STEFANO ; BOLLI, ALESSANDRO ; PALLOTTINI, VALENTINA ; MARINO, MARIA: Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: Antioxidant versus estrogen receptor α -dependent mechanisms. In: *Molecular Nutrition & Food Research* Bd. 53 (2009), Nr. 6, S. 699–708
- [51] GANESHPURKAR, ADITYA ; SALUJA, AJAY K.: The Pharmacological Potential of Rutin. In: *Saudi Pharmaceutical Journal* Bd. 25 (2017), Nr. 2, S. 149–164
- [52] Global Cancer Facts & Figures - 2nd Edition, S. 60
- [53] GRAEFE, EVA U. ; WITTIG, JOERG ; MUELLER, SILKE ; RIETHLING, ANNE-KATHRIN ; UEHLEKE, BERNHARD ; DREWELow, BERND ; PFORTE, HOLGER ; JACOBASCH, GISELA ; U. A.: Pharmacokinetics and Bioavailability of Quercetin Glycosides in Humans. In: *The Journal of Clinical Pharmacology* Bd. 41 (2001), Nr. 5, S. 492–499
- [54] HEINEMANN, L. A. J. ; LEWIS, M. A. ; KÄHL-HABICH, D. ; BRAENDLE, W. ; MOEHNER, S. ; (ON BEHALF OF THE GERMAN COHORT STUDY ON WOMEN'S HEALTH ; GROUP), RESEARCH: The Risk of Breast Tumours and Lifetime History of Oral Contraceptive Use. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* Bd. 62 (2002), Nr. 8, S. 750–757
- [55] HEINRICH, P. C. ; MÜLLER, M. ; GRAEVE, L. ; LÖFFLER, G. ; PETRIDES, P. E. (Hrsg.): *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Lehrbuch*. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin Heidelberg : Springer, 2014 — ISBN 978-3-642-17971-6

- [56] HERMANSON, OLA ; GLASS, CHRISTOPHER K. ; ROSENFELD, MICHAEL G.: Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* Bd. 13 (2002), Nr. 2, S. 55–60
- [57] HEYDEN, S. ; FODOR, J. G.: Coffee consumption and fibrocystic breasts: an unlikely association. In: *Canadian Journal of Surgery. Journal Canadien De Chirurgie* Bd. 29 (1986), Nr. 3, S. 208–211
- [58] HOLLMAN, PETER C.H.: Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. In: *Pharmaceutical Biology* Bd. 42 (2004), Nr. sup1, S. 74–83
- [59] HUNTER, DAVID J. ; COLDITZ, GRAHAM A. ; HANKINSON, SUSAN E. ; MALSPEIS, SUSAN ; SPIEGELMAN, DONNA ; CHEN, WENDY ; STAMPFER, MEIR J. ; WILLETT, WALTER C.: Oral contraceptive use and breast cancer: A prospective study of young women. In: *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* (2010), S. cebp.0747.2010
- [60] ISLAMI, FARHAD ; TORRE, LINDSEY A. ; DROPE, JEFFREY M. ; WARD, ELIZABETH M. ; JEMAL, AHMEDIN: Global Cancer in Women: Cancer Control Priorities. In: *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* Bd. 26 (2017), Nr. 4, S. 458–470
- [61] JEMAL, AHMEDIN ; BRAY, FREDDIE ; CENTER, MELISSA M. ; FERLAY, JACQUES ; WARD, ELIZABETH ; FORMAN, DAVID: Global cancer statistics. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* Bd. 61 (2011), Nr. 2, S. 69–90
- [62] JEONG, JAE-HOON ; AN, JEE YOUNG ; KWON, YONG TAE ; RHEE, JUONG G. ; LEE, YONG J.: Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. In: *Journal of Cellular Biochemistry* Bd. 106 (2009), Nr. 1, S. 73–82
- [63] JOHN, SHALI ; NAYVELT, IRINA ; HSU, HUI-CHEN ; YANG, PINGAR ; LIU, WENSHENG ; DAS, GOKUL M. ; THOMAS, THRESIA ; THOMAS, T. J.: Regulation of estrogenic effects by beclin 1 in breast cancer cells. In: *Cancer Research* Bd. 68 (2008), Nr. 19, S. 7855–7863
- [64] JONES, MICHAEL E. ; SCHOEMAKER, MINOUK J. ; WRIGHT, LAUREN B. ; ASHWORTH, ALAN ; SWERDLOW, ANTHONY J.: Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. In: *Breast Cancer Research : BCR* Bd. 19 (2017)
- [65] JOSHI, POOJA S. ; MODUR, VISHNU ; CHENG, JIMING ; ROBINSON, KATHY ; RAO, KRISHNA: Characterization of immortalized human mammary epithelial cell line HMEC 2.6. In: *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* Bd. 39 (2017), Nr. 10, S. 1010428317724283
- [66] KHAN, FAZLULLAH ; NIAZ, KAMAL ; MAQBOOL, FAHEEM ; ISMAIL HASSAN, FATIMA ; ABDOLLAHI, MOHAMMAD ; NAGULAPALLI VENKATA, KALYAN C. ; NABAVI, SEYED MOHAMMAD ; BISHAYEE, ANUPAM: Molecular Targets Underlying the Anticancer Effects of Quercetin: An Update. In: *Nutrients* Bd. 8 (2016), Nr. 9
- [67] KHAN, MOHD. MOSHAHID ; AHMAD, AJMAL ; ISHRAT, TAUHEED ; KHUWAJA, GULRANA ; SRIVASTAWA, PALLAVI ; KHAN, M. BADRUZZAMAN ; RAZA, SYED SHADAB ; JAVED, HAYATE ; U. A.: Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. In: *Brain Research* Bd. 1292 (2009), S. 123–135
- [68] KIM, HEEJUNG ; KONG, HYESIK ; CHOI, BOIM ; YANG, YOUNGWOOK ; KIM, YOUNGMI ; LIM, MI JUNG ; NECKERS, LEN ; JUNG, YUNJIN: Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. In: *Pharmaceutical Research* Bd. 22 (2005), Nr. 9, S. 1499–1509
- [69] KIM, YOUNG-IN: Does a High Folate Intake Increase the Risk of Breast Cancer? In: *Nutrition Reviews* Bd. 64, Oxford Academic (2006), Nr. 10, S. 468–475
- [70] KROMIDAS, STAVROS: *HPLC-Tipps: die schnelle Hilfe für jeden Anwender. Bd. 2: ... Darmstadt : Hoppenstedt Bonnier Zeitschriften GmbH, 2003 — ISBN 978-3-935772-07-5*

- [71] KUMAR, B. RAMESH: Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). In: *Journal of Pharmaceutical Analysis* Bd. 7 (2017), Nr. 6, S. 349–364
- [72] KUMAR, SHASHANK ; PANDEY, ABHAY K.: Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. In: *The Scientific World Journal* Bd. 2013 (2013)
- [73] KUMARI, KANCHAN ; DAS, BISWAJIT ; ADHYA, AMIT ; CHAUDHARY, SANJIB ; SENAPATI, SHANTIBHUSAN ; MISHRA, SANDIP K.: Nicotine associated breast cancer in smokers is mediated through high level of EZH2 expression which can be reversed by methyltransferase inhibitor DZNepA. In: *Cell Death & Disease* Bd. 9 (2018), Nr. 2, S. 152
- [74] Kurzversion S3-Leitlinie Mammakarzinom (2018), S. 192
- [75] KWAK, JUNG-HO ; SEO, JEONG MIN ; KIM, NA-HYUNG ; ARASU, MARIADHAS VALAN ; KIM, SUNGGIL ; YOON, MOO KYOUNG ; KIM, SUN-JU: Variation of quercetin glycoside derivatives in three onion (*Allium cepa* L.) varieties. In: *Saudi Journal of Biological Sciences* Bd. 24 (2017), Nr. 6, S. 1387–1391
- [76] LAMPE, J. W. ; NISHINO, Y. ; RAY, R. M. ; WU, C. ; LI, W. ; LIN, M.-G. ; GAO, D. L. ; HU, Y. ; U. A.: Plasma Isoflavones and Fibrocystic Breast Conditions and Breast Cancer Among Women in Shanghai, China. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* Bd. 16 (2007), Nr. 12, S. 2579–2586
- [77] LAMSON, DAVIS W: Antioxidants and Cancer III: Quercetin. In: *Alternative Medicine Review* Bd. 5 (2000), Nr. 3, S. 13
- [78] LEE, YUN-KYOUNG: Induction of apoptosis by quercetin is mediated through AMPK α 1/ASK1/p38 pathway. In: *Cancer Letters* Bd. 292, Elsevier (2010), Nr. 2, S. 228–236
- [79] LEVIN, ELLIS R.: Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. In: *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* Bd. 19 (2005), Nr. 8, S. 1951–1959
- [80] LEWIS-WAMBI, JOAN S. ; JORDAN, V. CRAIG: Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? In: *Breast Cancer Research* Bd. 11 (2009), Nr. 3, S. 206
- [81] LI, SHIZHENG ; YUAN, SONG ; ZHAO, QIAN ; WANG, BO ; WANG, XIUYAN ; LI, KUN: Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* Bd. 100 (2018), S. 441–447
- [82] LI, WENJIN ; RAY, ROBERTA M. ; LAMPE, JOHANNA W. ; LIN, MING-GANG ; GAO, DAO LI ; WU, CHUNYUAN ; NELSON, ZAKIA C. ; FITZGIBBONS, E. DAWN ; U. A.: Dietary and other risk factors in women having fibrocystic breast conditions with and without concurrent breast cancer: A nested case-control study in Shanghai, China. In: *International Journal of Cancer* Bd. 115 (2005), Nr. 6, S. 981–993
- [83] LI, YIN ; BIRNBAUMER, LUTZ ; TENG, CHRISTINA T.: Regulation of ERR α Gene Expression by Estrogen Receptor Agonists and Antagonists in SKBR3 Breast Cancer Cells: Differential Molecular Mechanisms Mediated by G Protein-Coupled Receptor GPR30/GPER-1. In: *Molecular Endocrinology* Bd. 24 (2010), Nr. 5, S. 969–980
- [84] LIAW, DANNY ; MARSH, DEBBIE J. ; LI, JING ; DAHIA, PATRICIA L. M. ; WANG, STEVEN I. ; ZHENG, ZIMU ; BOSE, SHIKHA ; CALL, KATHERINE M. ; U. A.: Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. In: *Nature Genetics* Bd. 16 (1997), S. 64

- [85] LIU, CHUN-YU ; HUNG, MAN-HSIN ; WANG, DUEN-SHIAN ; CHU, PEI-YI ; SU, JUNG-CHEN ; TENG, TSUNG-HAN ; HUANG, CHUN-TENG ; CHAO, TING-TING ; U. A.: Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. In: *Breast cancer research: BCR* Bd. 16 (2014), Nr. 5, S. 431
- [86] LIU, HUI-JUAN ; JIANG, XIAO-XIAO ; GUO, YI-ZHEN ; SUN, FANG-HUI ; KOU, XIN-HUI ; BAO, YONG ; ZHANG, ZHU-QING ; LIN, ZHAO-HU ; U. A.: The flavonoid TL-2-8 induces cell death and immature mitophagy in breast cancer cells via abrogating the function of the AHA1/Hsp90 complex. In: *Acta Pharmacologica Sinica* Bd. 38 (2017), Nr. 10, S. 1381–1393
- [87] LUBECKA-PIETRUSZEWSKA, KATARZYNA ; KAUFMAN-SZYMOCZYK, AGNIESZKA ; STEFANSKA, BARBARA ; FABIANOWSKA-MAJEWSKA, KRYSZYNA: Folic acid enforces DNA methylation-mediated transcriptional silencing of PTEN, APC and RARbeta2 tumour suppressor genes in breast cancer. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* Bd. 430 (2013), Nr. 2, S. 623–628
- [88] LUCA, SIMON VLAD ; MACOVEI, IRINA ; BUJOR, ALEXANDRA ; MIRON, ANCA ; SKALICKA-WOŹNIAK, KRYSZYNA ; APROTOSOAI, ANA CLARA ; TRIFAN, ADRIANA: Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (2019), S. 1–34
- [89] LUKŠIČ, LEA ; BONAFACCIA, GIOVANNI ; TIMORACKA, MARIA ; VOLLMANNOVA, ALENA ; TRČEK, JANJA ; NYAMBE, TINA KOŽELJ ; MELINI, VALENTINA ; ACQUISTUCCI, RITA ; U. A.: Rutin and quercetin transformation during preparation of buckwheat sourdough bread. In: *Journal of Cereal Science* Bd. 69 (2016), S. 71–76
- [90] MACACU, ALINA ; AUTIER, PHILIPPE ; BONIOL, MATHIEU ; BOYLE, PETER: Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. In: *Breast Cancer Research and Treatment* Bd. 154 (2015), Nr. 2, S. 213–224
- [91] MALHERBE, KATHRYN ; FATIMA, SAIRA: Fibrocystic Breast Disease. In: *StatPearls. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2020*
- [92] *Mammary Epithelial Cell Growth Medium*. URL <https://www.promocell.com/product/mammary-epithelial-cell-growth-medium/>. - abgerufen am 2020-03-26. — PromoCell
- [93] MANACH, CLAUDINE ; MORAND, CHRISTINE ; DEMIGNÉ, CHRISTIAN ; TEXIER, ODILE ; RÉGÉRAT, FRANÇOISE ; RÉMÉSY, CHRISTIAN: Bioavailability of rutin and quercetin in rats. In: *FEBS Letters* Bd. 409 (1997), Nr. 1, S. 12–16
- [94] MANDLEKAR, SANDHYA ; YU, RONG ; TAN, TSE-HUA ; KONG, AH-NG TONY: Activation of Caspase-3 and c-Jun NH2-terminal Kinase-1 Signaling Pathways in Tamoxifen-induced Apoptosis of Human Breast Cancer Cells. In: *Cancer Research* Bd. 60, American Association for Cancer Research (2000), Nr. 21, S. 5995–6000
- [95] MANGELSDORF, DAVID J. ; THUMMEL, CARL ; BEATO, MIGUEL ; HERRLICH, PETER ; SCHÜTZ, GÜNTHER ; UMESONO, KAZUHIKO ; BLUMBERG, BRUCE ; KASTNER, PHILIPPE ; U. A.: The nuclear receptor superfamily: The second decade. In: *Cell* Bd. 83 (1995), Nr. 6, S. 835–839
- [96] MARCHBANKS, POLLY A. ; CURTIS, KATHRYN M. ; MANDEL, MICHELE G. ; WILSON, HOYT G. ; JENG, GARY ; FOLGER, SUZANNE G. ; McDONALD, JILL A. ; DALING, JANET R. ; U. A.: Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. In: *Contraception* Bd. 85 (2012), Nr. 4, S. 342–350
- [97] *MCF 10A ATCC® CRL-10317™ Homo sapiens mammary gland; breast*. URL https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10317.aspx?geo_country=de. - abgerufen am 2020-03-26

- [98] MCF10A CELLS APC (-/-) CLLS1069. URL <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ccls1069>. - abgerufen am 2020-03-26. — Sigma-Aldrich
- [99] MCF-12A ATCC® CRL-10782™ *Homo sapiens mammary gland; breas*. URL https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10782.aspx?geo_country=de#generalinformation. - abgerufen am 2020-03-26
- [100] MCKENNA, NEIL J. ; O'MALLEY, BERT W.: Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. In: *Cell* Bd. 108 (2002), Nr. 4, S. 465–474
- [101] MCMULLEN, EMILY R. ; ZOUMBEROS, NICHOLAS A. ; KLEER, CELINA G.: Metaplastic Breast Carcinoma: Update on Histopathology and Molecular Alterations. In: *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* Bd. 143 (2019), Nr. 12, S. 1492–1496
- [102] MCPHERSON, K: ABC of breast diseases: Breast cancer---epidemiology, risk factors, and genetics. In: *BMJ* Bd. 321 (2000), Nr. 7261, S. 624–628
- [103] Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. In: *The Lancet Oncology* Bd. 13 (2012), Nr. 11, S. 1141–1151
- [104] MENSE, SARAH M. ; HEI, TOM K. ; GANJU, RAMESH K. ; BHAT, HARI K.: Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action. In: *Environmental Health Perspectives* Bd. 116 (2008), Nr. 4, S. 426–433
- [105] MEYER, VERONIKA R.: *Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern: mit 13 neuen Themen*. 3., überarb. und erw. Aufl. Weinheim : WILEY-VCH, 2006 — ISBN 978-3-527-31268-9
- [106] MNAYER, DIMA ; FABIANO-TIXIER, ANNE-SYLVIE ; PETITCOLAS, EMMANUEL ; HAMIEH, TAYSSIR ; NEHME, NANCY ; FERRANT, CHRISTINE ; FERNANDEZ, XAVIER ; CHEMAT, FARID: Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Six Essentials Oils from the Alliaceae Family. In: *Molecules* Bd. 19 (2014), Nr. 12, S. 20034–20053
- [107] MOORE, STEVEN C. ; LEE, I.-MIN ; WEIDERPASS, ELISABETE ; CAMPBELL, PETER T. ; SAMPSON, JOSHUA N. ; KITAHARA, CARI M. ; KEADLE, SARAH K. ; AREM, HANNAH ; U. A.: Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. In: *JAMA internal medicine* Bd. 176 (2016), Nr. 6, S. 816–825
- [108] MØRCH, LINA S. ; SKOVLUND, CHARLOTTE W. ; HANNAFORD, PHILIP C. ; IVERSEN, LISA ; FIELDING, SHONA ; LIDEGAARD, ØJVIND: Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. In: *New England Journal of Medicine* Bd. 377 (2017), Nr. 23, S. 2228–2239
- [109] MÜLLER, HARALD: Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Gemüse und Obst mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* Bd. 196 (1993), Nr. 2, S. 137–141
- [110] MÜLLER, HARALD: Bestimmung der Folsäure-Gehalte von Getreide, Getreideprodukten, Backwaren und Hülsenfrüchten mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). In: *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* Bd. 197 (1993), Nr. 6, S. 573–577
- [111] MURSHID, KHALID RIDA: A Review of Mastalgia in Patients with Fibrocystic Breast Changes and the Non-Surgical Treatment Options. In: *Journal of Taibah University Medical Sciences* Bd. 6 (2011), Nr. 1, S. 1–18
- [112] NATHANSON, KATHERINE N. ; WOOSTER, RICHARD ; WEBER, BARBARA L.: Breast cancer genetics: What we know and what we need. In: *Nature Medicine* Bd. 7 (2001), Nr. 5, S. 552–556

- [113] NAVEEN, P. ; LINGARAJU, H. B. ; ANITHA ; PRASAD, K. SHYAM: Simultaneous determination of rutin, isoquercetin, and quercetin flavonoids in *Nelumbo nucifera* by high-performance liquid chromatography method. In: *International Journal of Pharmaceutical Investigation* Bd. 7 (2017), Nr. 2, S. 94–100
- [114] NISHIMURO, HARUNO ; OHNISHI, HIROFUMI ; SATO, MIDORI ; OHNISHI-KAMEYAMA, MAYUMI ; MATSUNAGA, IZUMI ; NAITO, SHIGEHIRO ; IPPUSHI, KATSUNARI ; OIKE, HIDEAKI ; U. A.: Estimated Daily Intake and Seasonal Food Sources of Quercetin in Japan. In: *Nutrients* Bd. 7 (2015), Nr. 4, S. 2345–2358
- [115] NIZZE H.: *Fibrous Cystic Mastopathy and Epitheliosis in the Opposite Breast of Mammary Carcinoma Patients - Abstract - Oncology 1973, Vol. 28, No. 4 - Karger Publishers*. URL <https://www.karger.com/Article/Abstract/224833>. - abgerufen am 2020-04-19
- [116] NUMONOV, SODIK RAKHMONOVICH ; QURESHI, MUHAMMAD NASIMULLAH ; AISA, HAJI AKBER: *Development of HPLC Protocol and Simultaneous Quantification of Four Free Flavonoids from Dracocephalum heterophyllum Benth.* URL https://www.hindawi.com/journals/ijac/2015/503139/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=HDW_MRKT_GBL_SUB_ADWO_PAID_DYNA_JOUR_X&gclid=Cj0KCQjwPfhzBRCiARIsAHHzyZoc77oa0LtOefDW0Fj342ncd4cm9L_wTQ3B5SY0OpEqE9Xt9JDWLN0aAtuzEALw_wcB. - abgerufen am 2020-03-27. — *International Journal of Analytical Chemistry*. — DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/503139>
- [117] NUUTILA, A. M ; KAMMIOVIRTA, K ; OKSMAN-CALDENTY, K. -M: Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. In: *Food Chemistry* Bd. 76 (2002), Nr. 4, S. 519–525
- [118] OSIPO, CLODIA ; GAJDOS, CSABA ; LIU, HONG ; CHEN, BIN ; JORDAN, V. CRAIG: Paradoxical action of fulvestrant in estradiol-induced regression of tamoxifen-stimulated breast cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* Bd. 95 (2003), Nr. 21, S. 1597–1608
- [119] PAINE, T. M. ; SOULE, H. D. ; PAULEY, R. J. ; DAWSON, P. J.: Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells. In: *International Journal of Cancer* Bd. 50 (1992), Nr. 3, S. 463–473
- [120] PARK, YONG KUN ; IKEGAKI, MASAHARU: Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* Bd. 62 (1998), Nr. 11, S. 2230–2232
- [121] PAVLIDES, STEPHANOS ; VERA, ISET ; GANDARA, RICARDO ; SNEDDON, SHARON ; PESTELL, RICHARD G. ; MERCIER, ISABELLE ; MARTINEZ-OUTSCHOORN, UBALDO E. ; WHITAKER-MENEZES, DIANA ; U. A.: Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis. In: *Antioxidants & Redox Signaling* Bd. 16, Mary Ann Liebert, Inc., publishers (2011), Nr. 11, S. 1264–1284
- [122] PRECHTEL, K.: [Mastopathy. Histological forms and long-term observations]. In: *Zentralblatt Fur Pathologie* Bd. 137 (1991), Nr. 3, S. 210–219
- [123] *Primary Mammary Epithelial Cells; Normal, Human (HMEC) ATCC® PCS-010*. URL https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/PCS-600-010.aspx?geo_country=de#generalinformation. - abgerufen am 2020-03-26
- [124] *Quercetin*. URL <https://www.chemie.de/lexikon/Quercetin.html>. - abgerufen am 2019-05-14

- [125] QUILLET-MARY, ANNE ; JAFFRÉZOU, JEAN-PIERRE ; MANSAT, VÉRONIQUE ; BORDIER, CHRISTINE ; NAVAL, JAVIER ; LAURENT, GUY: Implication of Mitochondrial Hydrogen Peroxide Generation in Ceramide-induced Apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* Bd. 272, American Society for Biochemistry and Molecular Biology (1997), Nr. 34, S. 21388–21395
- [126] RANGANATHAN, SANTHALAKSHMI ; HALAGOWDER, DEVARAJ ; SIVASITHAMBARAM, NIRANJALI DEVARAJ: Quercetin Suppresses Twist to Induce Apoptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. In: *PLOS ONE* Bd. 10, Public Library of Science (2015), Nr. 10, S. e0141370
- [127] RIPPERGER, TIM ; GADZICKI, DOROTHEA ; MEINDL, ALFONS ; SCHLEGELBERGER, BRIGITTE: Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. In: *European Journal of Human Genetics* Bd. 17 (2009), Nr. 6, S. 722–731
- [128] RITTER, CLAUDIA: *Heimische Nahrungspflanzen als Heilmittel: Gemüse, Früchte und Getreide - von Ackerbohne bis Zwiebel ; Pflanzenkunde Heilanwendungen und Rezepte*. Aarau : AT-Verl, 2013 — ISBN 978-3-03800-758-6
- [129] RIVERA RIVERA, AMILCAR ; CASTILLO-PICHARDO, LINETTE ; GERENA, YAMIL ; DHARMAWARDHANE, SURANGANIE: Anti-Breast Cancer Potential of Quercetin via the Akt/AMPK/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade. In: *PLoS ONE* Bd. 11 (2016), Nr. 6
- [130] ROSS, JULIE A. ; KASUM, CHRISTINE M.: Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. In: *Annual Review of Nutrition* Bd. 22 (2002), S. 19–34
- [131] ROY, MOLAY KUMAR ; TAKENAKA, MAKIKO ; ISOBE, SEIICHIRO: Thermal processing enhances anti-radical activity and reduces pro-oxidant activity in water-soluble fraction of selected Allium vegetables. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* Bd. 87 (2007), Nr. 12, S. 2259–2265
- [132] SANCHEZ, ROCIO ; NGUYEN, DENIS ; ROCHA, WALTER ; WHITE, JOHN H. ; MADER, SYLVIE: Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. In: *BioEssays* Bd. 24 (2002), Nr. 3, S. 244–254
- [133] SANDRA WEU- DOMSCHKE: *Wirkung phytoestrogenhaltiger Leinwurzelextrakte (Linum usitatissimum) auf maligne und benigne Zelllinien der Mamma*, Rostock, 2018
- [134] SANTEN, RICHARD J.: Benign Breast Disease in Women. In: FEINGOLD, K. R. ; ANAWALT, B. ; BOYCE, A. ; CHROUSOS, G. ; DUNGAN, K. ; GROSSMAN, A. ; HERSHMAN, J. M. ; KALTSAS, G. ; U. A. (Hrsg.): *Endotext*. South Dartmouth (MA) : MDText.com, Inc., 2000
- [135] SAUTER, EDWARD R.: Breast Cancer Prevention: Current Approaches and Future Directions. In: *European Journal of Breast Health* Bd. 14 (2018), Nr. 2, S. 64–71
- [136] SCHNEIDER, HEIKO ; SCHWIERTZ, ANDREAS ; COLLINS, MATTHEW DAVID ; BLAUT, M.: Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. In: *Archives of Microbiology* Bd. 171 (1999), Nr. 2, S. 81–91
- [137] SCHRÖDER, LENNARD ; MARAHRENS, PHILIP ; KOCH, JULIAN G. ; HEIDEGGER, HELENE ; VILSMEIER, THERESA ; PHAN-BREHM, THUY ; HOFMANN, SIMONE ; MAHNER, SVEN ; U. A.: Effects of green tea, matcha tea and their components epigallocatechin gallate and quercetin on MCF-7 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells. In: *Oncology Reports* Bd. 41 (2019), Nr. 1, S. 387–396
- [138] SCHWINGSHACKL, LUKAS ; SCHWEDHELM, CAROLINA ; GALBETE, CECILIA ; HOFFMANN, GEORG: Adherence to Mediterranean Diet and Risk of Cancer: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Nutrients* Bd. 9 (2017), Nr. 10

- [139] SEAL, TAPAN: Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India. In: *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (2016), S. 157–166
- [140] SELLI, CIGDEM ; DIXON, J. MICHAEL ; SIMS, ANDREW H.: Accurate prediction of response to endocrine therapy in breast cancer patients: current and future biomarkers. In: *Breast Cancer Research : BCR* Bd. 18 (2016)
- [141] SHIN, HAI-RIM ; JOUBERT, CLEMENTINE ; BONIOL, MATHIEU ; HERY, CLARISSE ; AHN, SEI HYUN ; WON, YOUNG-JOO ; NISHINO, YOSHIKAZU ; SOBUE, TOMOTAKA ; U. A.: Recent trends and patterns in breast cancer incidence among Eastern and Southeastern Asian women. In: *Cancer causes & control: CCC* Bd. 21 (2010), Nr. 11, S. 1777–1785
- [142] SHIN, N. R. ; MOON, J. S. ; SHIN, S.-Y. ; LI, L. ; LEE, Y. B. ; KIM, T.-J. ; HAN, N. S.: Isolation and characterization of human intestinal *Enterococcus avium* EFEL009 converting rutin to quercetin. In: *Letters in Applied Microbiology* Bd. 62 (2016), Nr. 1, S. 68–74
- [143] SONG, R. X.-D ; ZHANG, Z. ; MOR, G. ; SANTEN, R. J.: Down-regulation of Bcl-2 enhances estrogen apoptotic action in long-term estradiol-depleted ER+ breast cancer cells. In: *Apoptosis* Bd. 10 (2005), Nr. 3, S. 667–678
- [144] SOULE, H. D. ; MALONEY, T. M. ; WOLMAN, S. R. ; PETERSON, W. D. ; BRENZ, R. ; MCGRATH, C. M. ; RUSSO, J. ; PAULEY, R. J. ; U. A.: Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. In: *Cancer Research* Bd. 50 (1990), Nr. 18, S. 6075–6086
- [145] SRIVASTAVA, SHIKHA ; SOMASAGARA, RANGANATHA R. ; HEGDE, MAHESH ; NISHANA, MAYILAADUMVEETIL ; TADI, SATISH KUMAR ; SRIVASTAVA, MRINAL ; CHOUDHARY, BIBHA ; RAGHAVAN, SATHEES C.: Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. In: *Scientific Reports* Bd. 6 (2016)
- [146] *Staat & Gesellschaft - Gesundheit - Weltkrebstag: 2014 starben rund 18 000 Frauen an Brustkrebs - Statistisches Bundesamt (Destatis)*. URL <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/ImFokus/Gesundheit/BrustkrebsFrauenTodesursache.html>. - abgerufen am 2018-05-28
- [147] STAEDLER, DAVIDE ; IDRIZI, ELITA ; KENZAOU, BLANKA HALAMODA ; JUILLERAT-JEANNERET, LUCIENNE: Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. In: *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* Bd. 68 (2011), Nr. 5, S. 1161–1172
- [148] Statistisches Jahrbuch 2017 (2017), S. 36
- [149] STAUBER, M. ; WEYERSTAHL, T. ; BEHAM, A. (Hrsg.): *Gynäkologie und Geburtshilfe: 213 Tabellen ; [mit Video-CD-ROM: Filme zu Spontangeburt und Sectio], Duale Reihe*. 3., aktualisierte Aufl. mit Video-CD-ROM. Stuttgart : Thieme, 2007 — ISBN 978-3-13-125343-9
- [150] TAIT, L. ; SOULE, H. D. ; RUSSO, J.: Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. In: *Cancer Research* Bd. 50 (1990), Nr. 18, S. 6087–6094
- [151] THILAKARATHNA, SURANGI H. ; RUPASINGHE, H. P. VASANTHA: Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. In: *Nutrients* Bd. 5 (2013), Nr. 9, S. 3367–3387
- [152] TORRE, LINDSEY A. ; ISLAMI, FARHAD ; SIEGEL, REBECCA L. ; WARD, ELIZABETH M. ; JEMAL, AHMEDIN: Global Cancer in Women: Burden and Trends. In: *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* Bd. 26 (2017), Nr. 4, S. 444–457

- [153] VISKUPI, JANA ; ONDREJOVI, MIROSLAV ; ŠTURDÍK, ERNEST: Bioavailability and metabolism of flavonoids. In: *J. Food Nutr. Res.* (2008), S. 12
- [154] WALLE, THOMAS: Absorption and metabolism of flavonoids. In: *Free Radical Biology and Medicine* Bd. 36 (2004), Nr. 7, S. 829–837
- [155] WÄRNMARK, A. ; ALMLÖF, T. ; LEERS, J. ; GUSTAFSSON, J. A. ; TREUTER, E.: Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. In: *The Journal of Biological Chemistry* Bd. 276 (2001), Nr. 26, S. 23397–23404
- [156] WEYERSTAHL, THOMAS ; STAUBER, MANFRED: *Gynäkologie und Geburtshilfe: mit Filmen zu Spontangeburt und sectio online* ; + campus.thieme.de, *Duale Reihe*. 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart : Thieme, 2013 — ISBN 978-3-13-125344-6
- [157] WHITE, EMILY ; MALONE, KATHLEEN E ; WEISS, NOEL S ; DALING, JANET R: Breast Cancer Among Young U.S. Women in Relation to Oral Contraceptive Use. In: *Journal of the National Cancer Institute* Bd. 86 (1994), Nr. 7, S. 10
- [158] VAN DER WOUDE, HESTER ; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, ANNA ; STRUIJS, KARIN ; SMEETS, ASTRID ; ALINK, GERRIT M. ; RIETJENS, IVONNE M. C. M.: Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. In: *Cancer Letters* Bd. 200 (2003), Nr. 1, S. 41–47
- [159] WOUDE, HESTER VAN DER ; VELD, MARCEL G. R. TER ; JACOBS, NATASJA ; SAAG, PAUL T. VAN DER ; MURK, ALBERTINKA J. ; RIETJENS, IVONNE M. C. M.: The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. In: *Molecular Nutrition & Food Research* Bd. 49 (2005), Nr. 8, S. 763–771
- [160] WU, C.: A Case-Control Study of Risk Factors for Fibrocystic Breast Conditions: Shanghai Nutrition and Breast Disease Study, China, 1995-2000. In: *American Journal of Epidemiology* Bd. 160 (2004), Nr. 10, S. 945–960
- [161] XIA, HUI ; MA, SHUSHU ; WANG, SHAO KANG ; SUN, GUIJU: Meta-Analysis of Saturated Fatty Acid Intake and Breast Cancer Risk. In: *Medicine* Bd. 94 (2015), Nr. 52, S. e2391
- [162] YADEGARYNIA, SINA ; BREMER, MARTINA ; WHITE, J BRANDON: Evaluation of flavonoids as agents to inhibit breast cancer. In: *The FASEB Journal* Bd. 23, Federation of American Societies for Experimental Biology (2009), Nr. 1_supplement, S. 712.6-712.6
- [163] YADEGARYNIA, SINA ; PHAM, ANH ; NG, ALEX ; NGUYEN, DUONG ; LIALIUTSKA, TETIANA ; BORTOLAZZO, ANTHONY ; SIVRYUK, VALENTIN ; BREMER, MARTINA ; U. A.: Profiling Flavonoid Cytotoxicity in Human Breast Cancer Cell Lines: Determination of Structure-Function Relationships. In: *Natural Product Communications* Bd. 9, SAGE Publications Inc (2014), Nr. 5, S. 1934578X1400900501
- [164] YANG, JINWOO ; LEE, HANA ; SUNG, JEEHYE ; KIM, YOUNGHWA ; JEONG, HEON SANG ; LEE, JUNSOO: Conversion of Rutin to Quercetin by Acid Treatment in Relation to Biological Activities. In: *Preventive Nutrition and Food Science* Bd. 24 (2019), Nr. 3, S. 313–320
- [165] YOO, KYUNG HYUN ; HENNIGHAUSEN, LOTHAR: EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. In: *International Journal of Biological Sciences* Bd. 8 (2012), Nr. 1, S. 59–65
- [166] YOU, HYUN JU ; AHN, HYUNG JIN ; JI, GEUN EOG: Transformation of rutin to antiproliferative quercetin-3-glucoside by *Aspergillus niger*. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Bd. 58 (2010), Nr. 20, S. 10886–10892

- [167] *Zählkammern Zählkammer Bürker*. URL
<http://www.zaehlkammer.de/deutsch/buerker.html>. - abgerufen am 2020-03-26
- [168] ZHANG, YIYUN ; ZHAO, HUIPING ; ASZTALOS, SZILARD ; CHISAMORE, MICHAEL ; SITABKHAN, YASMIN ; TONETTI, DEBRA A.: Estradiol-induced regression in T47D:A18/PKCalpha tumors requires the estrogen receptor and interaction with the extracellular matrix. In: *Molecular cancer research: MCR* Bd. 7 (2009), Nr. 4, S. 498–510
- [169] ZIEGLER, R. G. ; HOOVER, R. N. ; PIKE, M. C. ; HILDESHEIM, A. ; NOMURA, A. M. ; WEST, D. W. ; WU-WILLIAMS, A. H. ; KOLONEL, L. N. ; U. A.: Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. In: *Journal of the National Cancer Institute* Bd. 85 (1993), Nr. 22, S. 1819–1827
- [170] ZOHARY, DANIEL ; HOPF, MARIA ; WEISS, EHUD: *Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*. 4th ed. Oxford : Oxford University Press, 2012 — ISBN 978-0-19-954906-1

11 Danksagung

Folgenden Personen möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen, die mich während der Labortätigkeit und während meiner wissenschaftlichen Arbeit stets unterstützt haben:

Meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. Dagmar-Ulrike Richter für die Vergabe des interessanten Themas und die immer hervorragende Unterstützung, die ich während des wissenschaftlichen Arbeitens im Labor und des Schreibens der Dissertation erhalten habe.

Dem Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock für die Unterstützung insbesondere während meiner Labortätigkeit und für das schöne Arbeitsklima, in dem ich mich immer sehr wohl gefühlt habe.

Professor Dr. Udo Jeschke für die Unterstützung und Beratung im Umgang mit der HPLC.

Professor Dr. Bernd Gerber für die Möglichkeit der Teilnahme am Senologie-Kongress 2018 in Stuttgart auf dem ich meine wissenschaftlichen Ergebnisse präsentieren konnte.

Dem Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung für die Beratung in der statischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meinen Eltern, die mich während der gesamten Zeit mit Verständnis, Geduld und kreativen Vorschlägen unterstützt haben.

12 Anhang

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Land
Quercetin	Sigma-Aldrich	USA
Rutin hydrate	Sigma-Aldrich	USA
Folsäure	Sigma-Aldrich	USA
β-Estradiol	Sigma-Aldrich	USA
Tamoxifen citrate salt	Sigma-Aldrich	USA
Dimethylsulfoxid p.a. (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co.KG	Deutschland
Methanol p.a.	Carl Roth GmbH & Co.KG	Deutschland
Ethanol ($\geq 99,8\%$)	Carl Roth GmbH & Co.KG	Deutschland
PBS (phosphate buffered saline); pH 7,4 (8,0 g NaCl, 2,9 Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 0,2 g NaH₂PO₄ + 0,2 KCl in 1,0 Liter Aquabidest.)	Biochrom GmbH	Deutschland
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich	USA
Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 35 %	Carl Roth GmbH & Co.KG	Deutschland
Trypsin-EDTA	C.C.pro GmbH	Deutschland
1 M Schwefelsäure (H₂SO₄)	Carl Roth GmbH & Co.KG	Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	C.C.pro GmbH	Deutschland
Ham's F-12	C.C.pro GmbH	Deutschland
Cholera Toxin from Vibrio cholerae	Sigma-Aldrich	USA
Penicillin-Streptomycin	Pan-Biotech GmbH	Deutschland
Amphotericin B	C.C.pro GmbH	Deutschland

Horseserum (5 %)	C.C.pro GmbH	Deutschland
Supplement MECGM (Mammary epithelial Cell Growth Medium)	PromoCell GmbH	Deutschland
MEBM® (Mamma Epithel Basal Medium)	PromoCell GmbH	Deutschland
Mamma Epithel Zell Supplement	PromoCell GmbH	Deutschland
LinRed IHC (Substratkit für Peroxidase)	Linaris Biologische Produkte GmbH	Deutschland
Impress Reagent Kit Peroxidase (IHC); Universal Anti Mouse/Rabbit IgG MP-7500	Vector Laboratories	USA
FormaFix 4 %	Carl Roth GmbH & Co.KG	Deutschland
Estrogen Receptor beta antibody; Monoklonaler Antikörper	Gene-Tex	USA
Estrogen Receptor alpha antibody; Monoklonaler Antikörper	Biorbyt	USA
Progesteron antibody; Monoklonaler Antikörper	Biorbyt	USA
BrdU-Kit	Roche GmbH	Schweiz
CellTiter-Glo®- Luminescent Cell Viability Assay - Kit	Promega	USA
CytoTox-Glo™- Cytotoxicity Assay - Kit	Promega	USA
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega	USA

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Gerät/ Software	Hersteller	Land
Discover SP Mikrowelle	CEM GmbH	Deutschland
Biofuge pico	Heraeus GmbH	Deutschland
Concentrator 5310	Eppendorf AG	Deutschland
Universal 320 R	Hettich GmbH & Co.KG.	Deutschland
Sartorius Basic	Sartorius AG	Deutschland
Sartorius BP 210 S	Sartorius AG	Deutschland
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments	Deutschland
HPLC Smartline	Knauer GmbH	Deutschland
HPLC-Säule: Reprospher 100 C18 5µm 250 x 4 mm	Dr. Maisch GmbH	Deutschland
Injektionsspritze 100 µl	Knauer GmbH	Deutschland
HPLC Software Clarity- Chrome V 2.6.	Knauer GmbH	Deutschland
Brutschrank Function line	Heraeus GmbH	Deutschland
Sicherheitswerkbank Hera safe	Heraeus GmbH	Deutschland
Axiovert 40 C Mikroskop	Carl Zeiss AG	Deutschland
AxioCam MRc Kamera	Carl Zeiss AG	Deutschland
Software AxioVision Release 4.7.1	Carl Zeiss AG	Deutschland
Eppendorf Reaserch Pipette 5000 µl	Eppendorf AG	Deutschland
Eppendorf Reaserch Pipette 1000 µl	Eppendorf AG	Deutschland
Eppendorf Reaserch Pipette 200 µl	Eppendorf AG	Deutschland
Eppendorf Reaserch Pipette 100 µl	Eppendorf AG	Deutschland
Eppendorf Reaserch Pipette 20 µl	Eppendorf AG	Deutschland

Eppendorf Reaserch Pipette 10 µl	Eppendorf AG	Deutschland
Eppendorf Multipipette Plus	Eppendorf AG	Deutschland
Eppendorf Pipetten- Spitzen 5000 µl, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf AG	Deutschland
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG.	Deutschland
Pipetten-Spitze 10 ml, 5 ml	Greiner Bio-One	Österreich
Emmi®-H22 Ultraschallbad	EMAG AG	Deutschland
TPM-2 Orbital Shaker	Sarstedt	Deutschland
GloMax Explorer	Promega	USA
RM5 Mischgerät	Karl Hecht GmbH & Co.KG.	Deutschland
Microplate Reader Model 680	Bio-Rad Laboratories, Inc.	USA
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr AG	Schweiz
Bürker-Zählkammer		
pH-Messelektrode: Orion 3 Star pH Benchtop	Thermo Fisher Scientific Inc.	USA
50 ml Tubes	Greiner Bio-One	Österreich
1,5 ml Tubes	Greiner Bio-One	Österreich
1,5 ml Kryotubes	TPP®	Schweiz
24-Well Platte, transparent	TPP®	Schweiz
96-Well Platte, transparent	Greiner Bio-One	Österreich
Zellkulturflasche 50 ml	Greiner Bio-One	Österreich
Zellkulturflasche 75 cm²	TPP®	Schweiz
Zellkulturflasche 155 cm²	Greiner Bio-One	Österreich
Zelllinie MCF-10A	ATCC LGC Standards GmbH	Deutschland

Zelllinie MCF-12A	ATCC LGC Standards GmbH	Deutschland
Zelllinie HMEC	PromoCell GmbH	Deutschland
Parafilm®	Carl Roth GmbH & Co.KG	Deutschland
Flächendesinfektionsmittel Bacillol® AF	Paul Hartmann AG	Deutschland
Händedesinfektionsmittel Sterillium® classic pure	BODE Chemie GmbH	Deutschland
Beckman Coulter AU 480	Sysmex Europe GmbH	Deutschland
Eco Twenty	CARE diagnostica Laborreagenzien GmbH	Deutschland
Filter (45 µm)	Sigma-Aldrich	USA
Excel 2011 und 2018	Microsoft Corporation	USA