

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universität Rostock

**Beeinflussung des Proliferationsverhaltens
hormonaktiver Mamma- und
Endometriumkarzinomzellen unter Einwirkung eines
Pflanzenextraktes aus der Flatterulme - *Ulmus laevis***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Daniel Paschke

geb. in Kühlungsborn

Rostock

2009

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0020-6

Dekan: Prof. Dr. med. Emil.Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Volker Briesse, Universitätsfrauenklinik
Rostock am Klinikum Südstadt, Südring 81, 18059 Rostock

2. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Sibylle Abarzua, Institut für Bio-
wissenschaften, Universität Rostock, Albert-Einstein-Str. 3,
18059 Rostock

3. Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. Udo Jeschke, Klinikum der Universität
München, Campus Innenstadt, Klinik und Poliklinik für
Frauenheilkunde und Geburtshilfe Maistraße 11, 80337
München

verteidigt am: 12.01.2010

1. Einleitung.....	Seite 12
1.1. Pflanzenwirkstoffe.....	12
1.1.1. <i>Historische Entwicklung und Nutzung von Pflanzenwirkstoffen in der</i> <i>Medizin.....</i>	12
1.1.2. <i>Sekundäre Pflanzenwirkstoffe.....</i>	12
1.1.3. <i>Phytopharmaka.....</i>	14
1.1.4. <i>Phytoestrogene.....</i>	14
1.1.5. <i>Die Flatterulme- Ulmus laevis.....</i>	16
1.2. Steroidale Hormone.....	18
1.2.1. <i>Definition.....</i>	18
1.2.2. <i>Biosynthese und Klassifizierung von Steroid-Hormonen.....</i>	18
1.2.3. <i>Estrogenrezeptor α/β.....</i>	20
1.2.4. <i>Molekularer Wirkmechanismus der Estrogene.....</i>	21
1.2.5. <i>Menopause und Klimakterium.....</i>	22
1.2.6. <i>Hormonersatztherapie – HRT.....</i>	23
1.2.7. <i>selektive Estrogen Rezeptor Modulatoren - SERMs.....</i>	24
1.3. Tumoren.....	25
1.3.1. <i>Definitionen.....</i>	25
1.3.2. <i>Pathogenese und Epidemiologie von Tumoren.....</i>	26
1.3.3. <i>Demographie und Epidemiologie gynäkologischer Tumoren.....</i>	27
1.3.4. <i>Pathogenese und Risikofaktoren des Mammakarzinoms.....</i>	29
1.3.5. <i>Molekularpathologie des Mammakarzinoms.....</i>	31
1.3.6. <i>Pathogenese und Risikofaktoren des Endometriumkarzinoms.....</i>	31
2. Zielstellung der Arbeit.....	33

3. Material und Methoden.....	34
3.1. Pflanzenextrakt.....	34
3.1.1. Gewinnung des Pflanzenmaterials.....	34
3.1.2. Extraktion nach Luyengi et al., (1996).....	34
3.1.3. Aufarbeitung der Extrakte und Kontrollen.....	35
3.2. Die verwendeten Zellkulturen.....	36
3.2.1. Mammakarzinomzelllinien.....	36
3.2.2. Endometriumkarzinomzelllinien.....	37
3.2.3. Die Zellkulturmedien.....	37
3.2.4. Prinzip der Zellkultivierung.....	38
3.2.5. Zellzählung.....	38
3.3. Testverfahren.....	39
3.3.1. MTT Proliferationstest.....	39
3.3.2. BrdU Proliferationstest.....	40
3.3.3. LDH Zytotoxizitätstest.....	41
3.4. Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie.....	43
3.5. Reproduzierbarkeit der Messdaten und statistische Auswertung.....	43
3.6. Geräte und Chemikalien.....	41
4. Ergebnisse.....	46
4.1. MTT-Test Mammakarzinomzellen.....	44
4.1.1. MTT-Test MCF-7.....	44
4.1.2. MTT-Test HCC-70.....	46
4.1.3. MTT-Test BT-20	48
4.2. MTT-Test Endometriumkarzinomzellen.....	48
4.2.1. MTT-Test RL95-2.....	48
4.2.2. MTT-Test Ishikawa.....	49

4.3. BrdU-Test Mammakarzinomzellen.....	50
4.3.1. <i>BrdU-Test MCF-7.....</i>	50
4.3.2. <i>BrdU-Test HCC-70.....</i>	52
4.4. BrdU-Test Endometriumkarzinomzellen.....	53
4.4.1. <i>BrdU-Test RL95-2.....</i>	53
4.4.2. <i>BrdU-Test Ishikawa.....</i>	55
4.5. LDH-Zytotoxizitätstest Mammakarzinomzellen.....	56
4.5.1. <i>LDH-Test MCF-7.....</i>	56
4.5.2. <i>LDH-Test HCC-70.....</i>	57
4.6. LDH-Zytotoxizitätstest Endometriumkarzinomzellen.....	58
4.6.1. <i>LDH-Test RL95-2.....</i>	58
4.6.2. <i>LDH-Test Ishikawa.....</i>	59
4.7. Lichtmikroskopische Auswertung des Zellwachstums.....	60
4.8. Massenspektrometrische Auswertung des <i>Ulmus laevis</i> Extraktes.....	61
5. Diskussion.....	66
5.1. Wirkungen des Extraktes auf die Zelllinien im Vergleich.....	66
5.2. Zytotoxizität des Extraktes.....	69
5.3. Wirkungen des Estradiols und des Tamoxifens auf die Zelllinien.....	70
5.4. Wirkungsweisen der Ulmeninhaltsstoffe.....	71
5.5. Bedeutung und medizinisches Potential von <i>Ulmus laevis</i> - Die Flatterulme ein potentieller Wirkstofflieferant?.....	74
6. Ausblick.....	76
7. Zusammenfassung.....	77

8. Literaturverzeichnis.....	79
9. Thesen	88
10. Anhang.....	90
11. Danksagung.....	92
12. Selbstständigkeitserklärung.....	93
13. Lebenslauf.....	94
14. Publikationen und wissenschaftliche Arbeiten.....	95

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abb. 1: Schematische Klassifikation der natürlich vorkommenden Estrogene mit den wichtigsten Vertretern der einzelnen Substanzklassen	15
Abb. 2: Gesamtverbreitung der Ulmen	16
Abb. 3: Abbildungen der Flatterulme-Ulmus laevis	17
Abb. 4: Schematische Übersicht der Biosynthese von Steroidhormonen	20
Abb. 5: Aufbau des Estrogenrezeptors α	21
Abb. 6: Schematische Darstellung des klassischen Weges der Estrogen Signaltransduktion	22
Abb. 7: Strukturformeln von Tamoxifen und Fulvestrant	24
Abb. 8: Krebsneuerkrankungen bei Frauen in Deutschland	28
Abb. 9: Extrakterstellung	35
Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Mammakarzinomzellen	36
Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Endometriomkarzinomzellen	37
Abb. 12: Darstellung einer Bürker-Zählkammer	39
Abb. 13: Prinzip des LDH-Zytotoxizitätstestes	42
Abb. 14: MCF-7 MTT-Test; Extrakt	46
Abb. 15: MCF-7 MTT-Test; Estradiol, Tamoxifen	47
Abb. 16: HCC-70 MTT-Test; Extrakt	48
Abb. 17: HCC-70 MTT-Test; Estradiol, Tamoxifen	48
Abb. 18: BT-20 MTT-Test; Extrakt	49
Abb. 19: BT-20 MTT-Test; Estradiol, Tamoxifen	50
Abb. 20: RL95-2 MTT-Test; Extrakt	50
Abb. 21: RL95-2 MTT-Test; Estradiol, Tamoxifen	51
Abb. 22: Ishikawa MTT-Test; Extrakt	52
Abb. 23: Ishikawa MTT-Test; Estradiol, Tamoxifen	52
Abb. 24: MCF-7 BrdU-Test; Extrakt	53
Abb. 25: MCF-7 BrdU-Test; Estradiol, Tamoxifen	54
Abb. 26: HCC-70 BrdU-Test; Extrakt	55
Abb. 27: HCC-70 BrdU-Test; Estradiol, Tamoxifen	55

Abb. 28: RL95-2 BrdU-Test; Extrakt	56
Abb. 29: RL95-2 BrdU-Test; Estradiol, Tamoxifen	57
Abb. 30: Ishikawa BrdU-Test; Extrakt	58
Abb. 31: Ishikawa BrdU-Test; Estradiol, Tamoxifen	58
Abb. 32: HCC-70 LDH-Test; Extrakt	60
Abb. 33: HCC-70 LDH-Test; Estradiol, Tamoxifen	60
Abb. 34: RL95-2 LDH-Test; Extrakt	61
Abb. 35: RL95-2 LDH-Test; Estradiol, Tamoxifen	62
Abb. 36: Ishikawa LDH-Test; Extrakt	62
Abb. 37: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Endometriumkarzinomzellen RL95-2	64
Abb. 38: Hauptklassen der organischen Extraktkomponenten in der Pyrolyse- Feldionisations- Massenspektrometrie	65
Abb. 39: Vergleich der Zelllinien im MTT-Test	67
Abb. 40: Vergleich der Zelllinien im BrdU-Test	67
Abb. 41: Vergleich der Zelllinien im LDH-Test	70
Abb. 42: Darstellung der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie in Massensignalen m/z (Ulmenrinde 10° Heizstufe)	90
Abb. 43: Darstellung der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie in Massensignalen m/z (Ulmenrinde 20° Heizstufe)	90
Abb. 44: Markersignale der Ulmenrindeninhaltsstoffe in der Massenspektrometrie	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auswahl sekundärer Pflanzenwirkstoffe und deren Wirkungen im menschlichen Organismus	13
Tab. 2: Risikofaktoren des Mammakarzinoms	30
Tab. 3: Formel zur Berechnung der Zellzahl	39
Tab. 4: Formel zur Berechnung der Zytotoxizität in %	42
Tab. 5: Geräte und Chemikalien	43

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
ATM-Gen	Ataxia Teleangiectasia-Gen
BRCA 1/2	Breast Cancer 1/2 - Gen
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
BT-20	Mammakarzinomzelllinie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamtetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER α	Estrogenrezeptor α
ER β	Estrogenrezeptor β
ERE	estrogen response element
EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
HCC-70	Mammakarzinomzelllinie
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRE	hormone response element
HRT	Hormone Replacement Therapy
HSP 90	Hitzeschockprotein 90
INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MAP	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF 7	Mammakarzinomzelllinie
min	Minute(n)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NBCS	neonatales Kälberserum
NM23	murines nm23-Gen und entsprechendes Protein, das mit einem murinen metastatischen Tumorpotential in Verbindung steht
RB1	Retinoblastom-Gen
PBS	Phosphat buffered saline
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog-menschliches Tumorsuppressorgen
RL95-2	Endometriumkarzinomzelllinie
RKI	Robert Koch Institut
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
SERM	selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
SHBG	sexual hormone binding globuline
TATA	Abkürzung der Basensequenz Thymin-Adenin
TAF	TATA Box Binding Protein Associated Factor
TBP	tata-box binding protein
TF II	Transkriptionsfaktor II

1. Einleitung

1.1. Pflanzenwirkstoffe

1.1.1. Historische Entwicklung und Nutzung von Pflanzenwirkstoffen in der Medizin

Die Pflanzenheilkunde (Phytotherapie) gehört mit zu den ältesten bekannten Medizinlehren. Vor mehr als 3.000 Jahren wurden bereits in Indien und China Krankheiten mit Hilfe von Pflanzenwirkstoffen behandelt. Sie wurden in allen Hochkulturen eingesetzt und galten als die wichtigsten Heilmittel bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts. Bereits um 350 v. Chr. beschrieb der Grieche Diokles von Karytos als Erster die Zubereitung und Anwendung von Pflanzen des östlichen Mittelmeerraumes. Auch Galen (129-199 n. Chr.) machte sich verdient, indem er in seinen Werken, die vielfältigen Zubereitungsweisen bis dahin bekannter Heilpflanzen zusammentrug. Diese Erkenntnisse und Ausführungen galten bis ins späte Mittelalter als verbindlich. Mit Paracelsus (1493-1541) begann eine Systematisierung der heimischen Heilpflanzenkunde in seinem Werk "*Herbarius*" [71]. Er versuchte, durch Destillation die Essenz der Pflanze, das "*Arcanum*", von den unbrauchbaren Bestandteilen zu trennen und so den reinen Wirkstoff zu gewinnen. Auf diese Weise erhielt er die ersten alkoholischen Pflanzenauszüge. In der Folge entwickelte sich die Pflanzenheilkunde weiter in traditionell naturheilkundlicher Richtung, beispielsweise durch Sebastian Kneipp. Aber auch in phytochemischer Richtung gab es Fortschritte. Diverse Inhaltsstoffe von Pflanzen, so z.B. das Morphin aus dem Opium, dem eingetrockneten Milchsafte des Schlafmohns, konnten durch neu etablierte Verfahren isoliert werden und waren offen für pharmakologische Untersuchungen.

Isolierte Inhaltsstoffe und deren Derivate werden nicht mehr zu den Phytopharmaka gezählt, sondern sind chemische Substanzen. In den 1930er Jahren begann die pharmazeutische Industrie, Medikamente auf synthetisch-chemischem Weg herzustellen und entwickelte starke und schnell wirksame Arzneimittel, welche die pflanzlichen Medikamente in den Hintergrund drängten. Heute jedoch erlebt die Pflanzenheilkunde eine Renaissance als wertvolle Ergänzung zu chemotherapeutischen Behandlungen.

1.1.2. Sekundäre Pflanzenwirkstoffe

Grundsätzlich werden primäre- von sekundären Pflanzenstoffe unterschieden. Bei den primären Pflanzenstoffen handelt es sich um vom menschlichen Körper als Nahrungsstoffe

verwertbare, wie Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße. Für die sekundären existieren eine Vielzahl weiterer Begriffe, u.a. Vitalstoffe, nicht-nutritive Antioxidantien, Phytamine oder Phytochemicals. Nach Caragay (1992) lassen sich die sekundären Pflanzenstoffe in 14 Klassen einteilen: Sulfide, Phytate, Flavonoide, Glucosinolate, Carotinoide, Cumarin, Monoterpene, Triterpene, Lignane, phenolische Säuren, Indole, Isothiocyanate, Phtalide und Poline [12]. Die Funktion von sekundären Pflanzenstoffen für die Pflanze war lange Zeit ungeklärt. Zunächst wurde vermutet, dass diese „Nebenprodukte“ des pflanzlichen Organismus dazu dienen, unnütze oder toxische Stoffwechselprodukte des primären Stoffwechsels zu eliminieren. Heute gilt die Erkenntnis, dass sekundäre Pflanzenstoffe wichtige ökologische Aufgaben in der Interaktion mit der Umwelt erfüllen. Sie werden u. a. als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren und als Farb- und Lockstoffe von der Pflanze synthetisiert [10]. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick einiger ausgewählter sogenannter Phytamine deren Vorkommen und Wirkungen auf den menschlichen Organismus.

Phytamin	Vorkommen	Wirkung/Effekt
Reserpin	<i>Rauwolfia serpentina</i> <i>Tabernaemontana orientalis</i> (australische Bitterrinde)	Senkung des Bluthochdrucks [48,103]
Sulfide	<i>Allium sativum</i> (Knoblauch)	antithrombotische und krebs- protektive Eigenschaften [6]
Phytin	Getreide, brauner Reis	Regulierung des Blutzuckerspiegels [20,80]
Phytosterine/ Saponine	in vielen Gemüsepflanzen, wie Sojabohnen, Erbsen, Spinat, Tomaten, Kartoffeln (Solanin) aber auch Tee, Ginseng, Rinde des südamerikanischen Seifenrindenbaumes (<i>Quillaja saponaria</i>), Fingerhut (<i>Digitalis purpurea</i>)	antiinflammatorisch, antinozizeptiv, Senkung des Cholesterinspiegels [70,107,9]
Polyphenole wie Flavonoide, Anthocyane und Tannine (Gerbsäuren)	Viele Pflanzen, besonders hoher Gehalt in Aroniabeere, Himbeeren, Wein, Mangostin- baumfrucht (<i>Garcinia Mangostana</i>)	Tumorprävention [50], antiinflammatorische Aktivität [52], antithrombotische Eigen- schaften [100], Wundheilung [35], kardioprotektive Eigenschaften [47]

Tab. 1: Auswahl sekundärer Pflanzenwirkstoffe und deren Wirkungen im menschlichen Organismus

Eine häufig in Baumrinden vorkommende Substanz sind die zu den sekundären Naturstoffen zählenden Terpene und deren Abkömmlinge. Formell gehören diese Stoffe zu den Lipiden und setzen sich aus Isopreneinheiten zusammen. Insbesondere Baumharze enthalten große Anteile an Mono-, Di- und Triterpenen, welche insgesamt betrachtet eine sehr heterogene Gruppe mit weit über 8.000 Substanzen bilden. Die den Terpenen nahe verwandten Terpenoide stellen eine noch größere Gruppe mit über 30.000 Substanzen dar. Abkömmlinge der Terpene und Terpenoide finden sich u.a. in ätherischen Ölen, z.B. als Menthol, Thymol, Piperitol (Eukalyptus und Pfefferminzarten) oder Anethol in Anis und Fenchel.

1.1.3. Phytopharmaka

Als Phytopharmaka werden Arzneimittel bezeichnet, die aus Pflanzen gewonnen werden, wobei die isolierte Monosubstanz kein Phytopharmakon darstellt. In der Regel werden Phytopharmaka durch Extraktion aus frischen oder meist getrockneten Pflanzen hergestellt. Gängige Verfahren zur Gewinnung der Stoffe sind beispielsweise die Herstellung eines Extraktes durch Mazeration (Extraktion nur bis zum Extraktionsgleichgewicht) oder durch Perkolation (erschöpfende Extraktion). Eine rechtliche Besonderheit ist, dass Phytopharmaka nicht patentiert werden können, weil sie im Sinne des Patentrechts keine Erfindungen, wie z.B. synthetische Wirkstoffe, sind. Dennoch werden Arzneimittelqualität und Arzneimittelsicherheit bei den pflanzlichen Arzneimitteln ebenso hoch angesetzt, wie bei chemisch-synthetisierten Medikamenten. Durch diesen wissenschaftlichen Ansatz unterscheiden sich die Phytopharmaka von zahlreichen „alternativen Behandlungsmethoden“.

1.1.4. Phytoestrogene

Phytoestrogene sind polyphenolische, nicht-steroidale sekundäre Pflanzenstoffe, mit einer chemisch ähnlichen Struktur zu den Östrogenen. Sie sind in der Lage, an den Estrogen Rezeptor (ER) (α/β) menschlicher Zellen zu binden, wobei eine höhere Affinität zu dem β -ER besteht [75]. Hauptgruppen der Phytoestrogene sind die Isoflavonoide, Flavonoide, Stilbene, Coumestane und Lignane. Generell kommen sie in einer großen Anzahl von Pflanzen vor. Die wohl am häufigsten vorkommenden Phytoestrogene, die Isoflavonoide

sind vor allem in Soja und Sojaprodukten, aber auch in Kichererbsen, Linsen, Bohnen und Klee zu finden [84,75]. Lignane kommen hingegen in Getreide, Früchten und Gemüse vor.

Bei *in vitro*-Untersuchungen wurde beobachtet, dass Phytoestrogene antioxidatives Potential und Krebs-präventive Eigenschaften haben. Ein solches Phytoestrogen ist beispielsweise Resveratrol, ein Stilben und natürliches anti-Oxidant, welches in Rotwein (*Vitis vinifera*) gefunden wurde. Es triggert die Apoptose und inhibiert die Proliferation von Endometrium Tumorzellen [91]. Des Weiteren werden dem Genuss von rotem Wein, welcher besonders viel Resveratrol enthält, kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Als sog. „French Paradox“ konnte bei den Bewohnern des westlichen Mittelmeerraumes gezeigt werden, dass trotz fettreicher Nahrung erheblich weniger kardiovaskuläre Erkrankungen auftraten als bei Mitteleuropäern [93]. Weitere vermutete Mechanismen bei der Inhibition der Tumorzellproliferation durch Phytoestrogene sind u.a. die Hemmung der DNA-Topoisomerase I und II [78]. Dieses Enzym ist maßgeblich an der Transkription und Replikation der DNA beteiligt. Darüber hinaus sollen Phytoestrogene in der Suppression der Angiogenese [27], der Inhibition von Tyrosinkinasen [5], Induktion der Differenzierung von Tumorzellen und der Einleitung der Apoptose eine Rolle spielen [66]. Einige Phytoestrogene aus der Gruppe der Isoflavonoide und Lignane sind Aromatasehemmer [2].

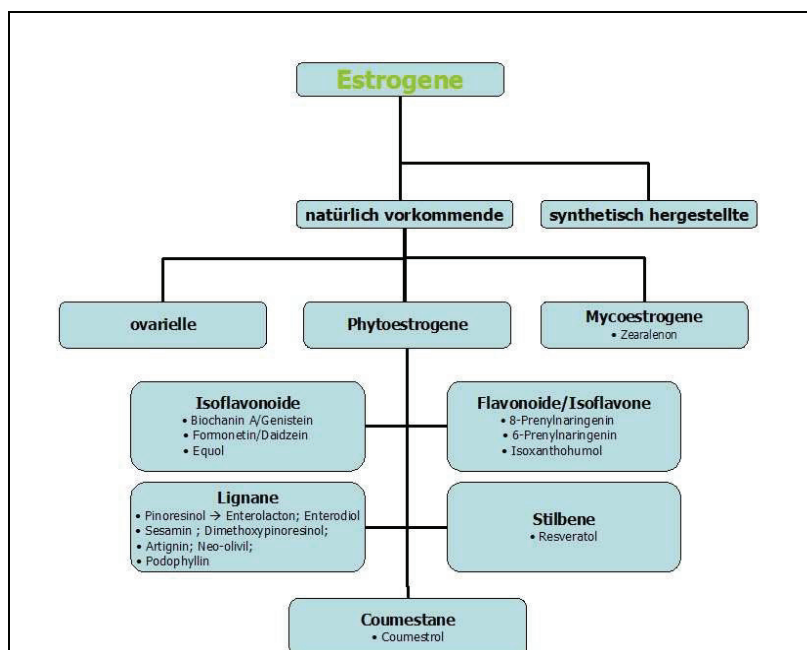


Abb. 1: Schematische Klassifikation der natürlich vorkommenden Estrogene mit den wichtigsten Vertretern der einzelnen Substanzklassen.

1.1.5. Die Flatterulme-*Ulmus laevis*

Die Flatterulme ist eine anspruchsvolle Mischbaumart aus der Gattung der Ulmen, zu der ca. 20 weitere Arten gezählt werden. In Europa und insbesondere in Deutschland sind am häufigsten, neben der Flatterulme, die Bergulme (*Ulmus glabra*) und die Feldulme (*Ulmus carpinifolia/minor*) anzutreffen. Der Schwerpunkt der Gesamtverbreitung erstreckt sich über Osteuropa zum Ural und weiter bis nach Südeuropa. Ein weiteres größeres, zusammenhängendes Gebiet befindet sich am Oberrhein und im französischen Loire-Tal. In England, Nord- und Westeuropa wachsen keine Ulmen. Die Flatterulme ist eine Baumart, die sich nach der letzten Eiszeit ihren Weg aus dem Baltikum zu uns bahnte. Sie hat sich hier seitdem unter den unterschiedlichsten Klimabedingungen "bewährt".



Abb. 2: Gesamtverbreitung der Ulmen (aus Meusel et al. 1965)

Vor allem kommt die Flatterulme in Auwäldern und auf Grundwasserböden vor. Als besondere Anpassung bildet sie Brettwurzeln aus, mit deren Hilfe sie problemlos Überflutungen von bis zu 100 Tagen im Jahr standhalten kann. Darüber hinaus ist die Flatterulme empfindlich gegen Frühfrost und resistent gegen Spätfrost, was erklärt, warum sie nicht in Nordeuropa anzutreffen ist [67, 87, 90].

Die Unterscheidung der verschiedenen Ulmenarten ist nicht immer einfach. Charakteristisch für die bis zu 30 m hoch wachsende Flatterulme, ist eine oft unregelmäßig aufgelöste Krone, eine lang gestielte Blüte sowie rundliche Früchte. Die Flügel am Rand der Früchte sind im Gegensatz zur Feld- oder Bergulme dicht gewimpert.

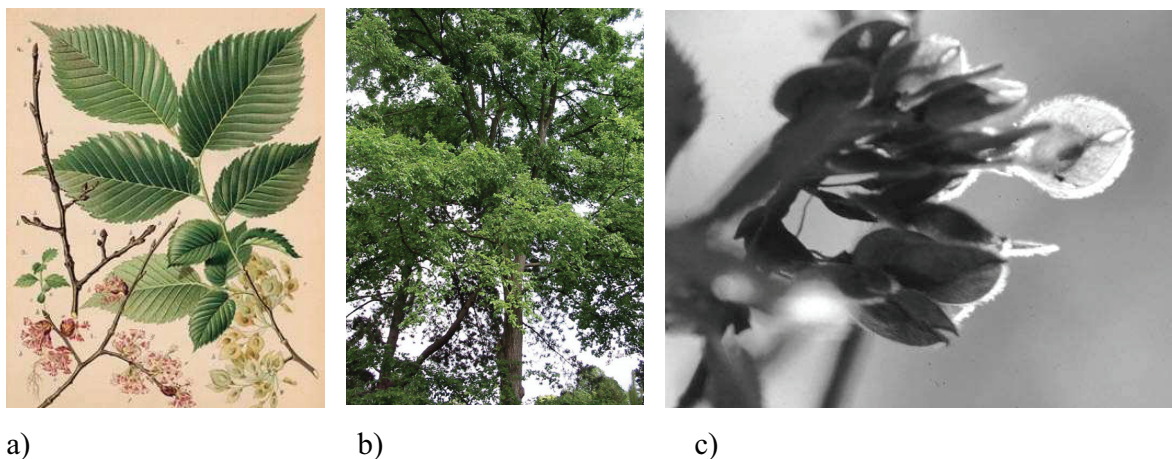


Abb.3: Flatterulme-*Ulmus laevis*

3a: Blätter und Früchte der Flatterulme; 3b: Flatterulme; 3c: lang gestielte Früchte der Flatterulme (Foto 3c: S. Müller-Kroehling [73])

Innerhalb ihrer Merkmale ist die Flatterulme sehr stabil. Sie kreuzt sich nicht mit anderen Ulmenarten und bildet keine Rassen aus [73]. Ohnehin gibt es nichtmorphologische Merkmale, welche sie von den anderen Arten unterscheidet und somit auch aus wissenschaftlichem Gesichtspunkt interessant werden lässt.

So ist die Flatterulme wesentlich weniger vom Ulmensterben (Dutch elm disease-DED) betroffen, als viele andere Ulmenarten. Sie verfügt über Resistenzmechanismen und besondere Rindeninhaltsstoffe gegen den DED-Erreger *Ophiostoma ulmi*/*Ophiostoma novo ulmi*, einen Schlauchpilz, sowie gegen den Vektor der DED-Erkrankung, den großen und den kleinen Ulmensplintkäfer (*Scolytus scolytus*/*Scolytus multistriatus*).

Die Erreger der DED gelangten über Ostasien nach Europa und wurden 1920 erstmals in Holland isoliert. Bis 1923 hatte er sich praktisch in ganz Europa ausgebreitet und einen wesentlichen Teil der Ulmenbestände vernichtet. Bis 1960 erholten sich die Bestände durch ein erfolgreich durchgeführtes Züchtungsprogramm. Zum Ende der 60er Jahre brach eine zweite Sterbewelle durch einen neuen und aggressiveren Pilz (*Ophiostoma novo ulmi*) aus. Durch seinen "Import" durch eingeführtes Funierholz aus Kanada, waren in ganz Europa enorme Ausfälle zu verzeichnen [96]. Einige der Ulmenarten (u.a. die Flatterulme) hatten sich im Laufe der Zeit effektive Resistenzmechanismen angeeignet. Die genauen Wirkmechanismen sind noch weitestgehend unklar, jedoch soll die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies eine wesentliche

Rolle spielen [94, 18]. Des Weiteren entwickelte sich durch die Pilzbesiedlung eine dickere Zellmembran als Schutzbarriere [94]. Zusätzlich bilden resistente Ulmenarten sogenannte Phytoalexine, welche zu den sekundären Pflanzenstoffen gehören. Bei den Substanzen, die als Phytoalexine wirken, handelt es sich um eine Vielzahl von Verbindungen aus diversen Stoffklassen, wie z.B. Flavonoide, Terpenoide, Alkaloide, Stilbenoide, Polyacetylene, sowie Isoflavone.

In Früherer Zeit wurden Ulmenrindenbestandteile für medizinische Anwendungen genutzt. So wurde zum Beispiel ein Sud hergestellt, um Ausschläge, Geschwüre und Gicht zu lindern [24, 64, 40].

Aus ökologischer Sicht stellt die Flatterulme eine schützenswerte Baumart dar und leistet einen wichtigen Beitrag zum Artenschutz. Sie ist unter anderem einziger Lebensraum des Ulmenblattflohs (*Psylla ulmi*), ein Honigtau-Produzent, welcher nur an dieser Ulmenart vorkommt. Auch für den Ulmenzipfelfalter (*Satyrrium w-album*) stellt die Flatterulme eine "Rettungsinsel" dar [74].

1.2. Steroidale Hormone

1.2.1. Definition

Steroidhormone, auch kurz Steroide genannt, sind ein Informationssystem, welches steuernd und regulierend auf Reproduktion und Verhalten, Immunantwort, Aufrechterhaltung des Elektrolyt-, Wasserhaushaltes, sowie auf Zellstoffwechsel und Energiegleichgewicht wirkt [61]. Zu ihnen gehören die Sexualhormone der Keimdrüsen und die Corticosteroide der Nebennierenrinde. Die Steroidhormone können in fünf Gruppen eingeteilt werden, je nachdem an welche Rezeptoren sie anbinden: Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Androgene, Estrogene und Gestagene [46].

1.2.2. Biosynthese und Klassifizierung von Steroid-Hormonen

Steroidhormone machen anteilmäßig ca. 15 % aller im menschlichen Körper vorkommenden Hormone aus. Die Biosynthese erfolgt hauptsächlich in den Nebennierenrinden, den Gonaden sowie in der Plazenta und dem Corpus luteum (Gelbkörper) während der Schwangerschaft. Auch das weiße Fettgewebe ist in der Lage Steroidhormone zu produzieren [65].

Steroidhormone leiten sich vom Cholesterin ab und sind gut fett- und schwer wasserlöslich. Im Gegensatz zu den anderen Hormongruppen können sie direkt in die Zelle gelangen und benötigen keinen Second Messenger.

Vom Cholesterin entsteht zunächst das Pregnenolon, welches die zentrale Ausgangsverbindung der Steroidhormonbiosynthese ist (Abb. 4). Pregnenolon wird im weiteren Verlauf zu Progesteron umgewandelt. Im Ovar ist Progesteron das Endprodukt. In der Theka interna kann Progesteron in Androstendion umgewandelt werden. Nachdem Androstendion entstanden ist, gelangt es wieder zurück in die Granulosazelle, wo es zu Testosteron hydroxyliert wird. Testosteron ist das Endprodukt der Androgensynthese. Sowohl Androstendion als auch Testosteron können über den Aromatase-Komplex (Cytochrom P450 Enzym) zu E2-Estradiol und E1-Östron weiter umgewandelt werden.

In einem zweiten Reaktionsweg wird aus Pregnenolon, Cortisol und in einem Dritten das Mineralcorticoid Aldosteron gebildet.

Die Kontrolle der Steroidhormonesynthese erfolgt durch Peptidhormone der Hypophyse. Diese werden wiederum von Neuronen des Hypothalamus gesteuert. Beim Transport über die Blutbahn sind Steroidhormone durch ihre hydrophoben Eigenschaften auf Plasmaproteine und spezielle Transportproteine wie das Testosteron-Estrogen-bindende-Protein oder Transcortin (Progesterontransport) angewiesen.

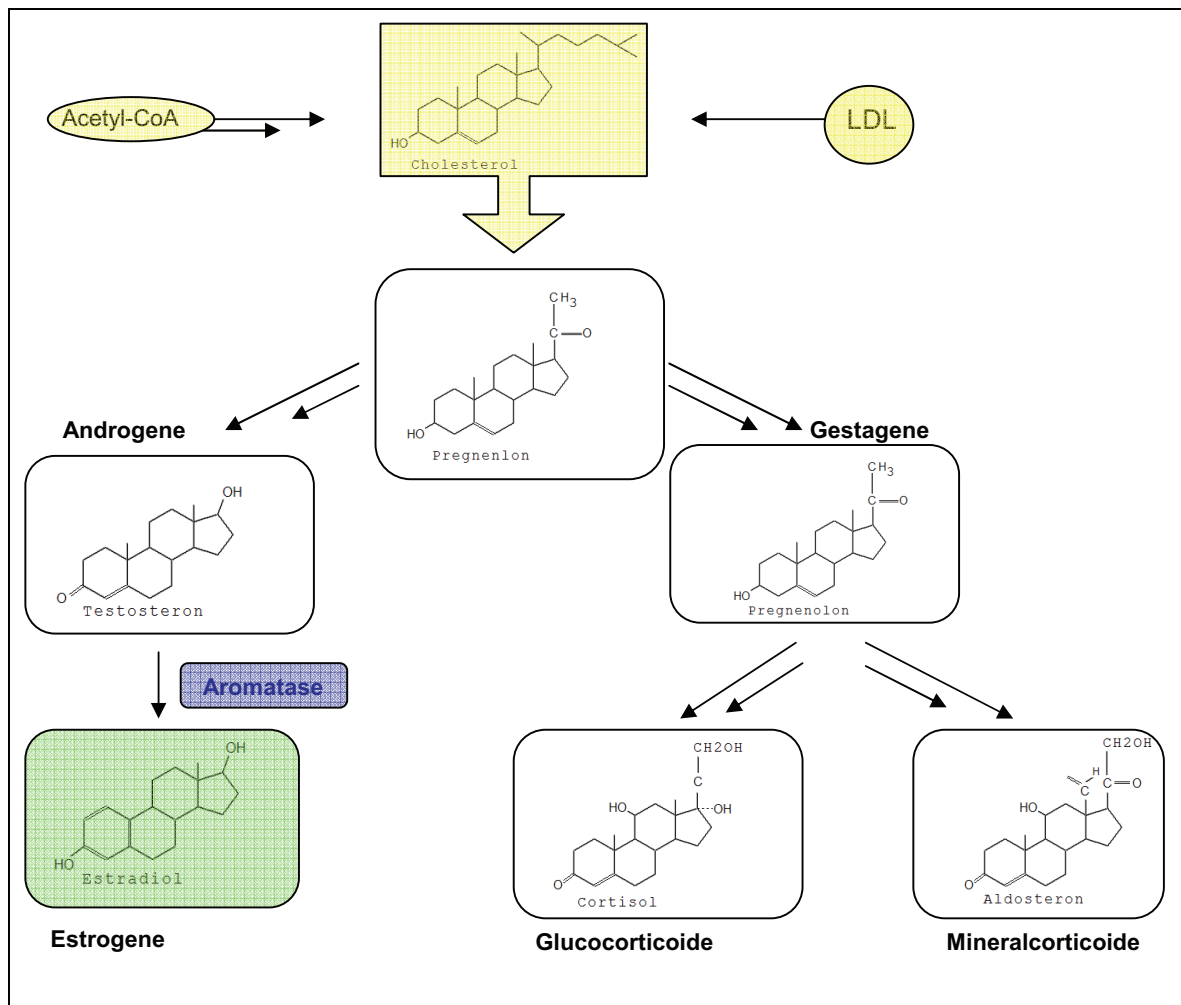


Abb.4 Schematische Übersicht der Biosynthese von Steroidhormonen (Doppelpfeil = nicht dargestellte Reaktionsschritte)

1.2.3. Estrogenrezeptor α/β

Bereits 1962 wurde von Jensen und Jacobsen die Existenz eines spezifischen Rezeptors für Estradiol im Uterusgewebe postuliert [39]. Es dauerte weitere 24 Jahre, bis Green et al. 1986 den Estrogenrezeptor (ER) aus MCF-7 Zellen klonierte [30]. 1995 gelang es Kuiper et al. einen weiteren ER aus Ratten-Prostata cDNA zu isolieren [49]. Der früher entdeckte ER wurde als ER α und der zweite als ER β bezeichnet. Beide Isoformen bestehen aus fünf funktionellen Domänen (A-F) und haben wie alle nukleären Steroidrezeptoren einen gemeinsamen strukturellen Aufbau (Abb.5). Des Weiteren sind sie ligandenabhängig [25]. Der ER α enthält 595 Aminosäuren mit einer zentralen DNA-bindenden Domäne, einer C-terminalen Hormon-bindenden Domäne und einer N-terminalen Domäne, welche für

Protein-Protein-Interaktionen des Rezeptors und der Aktivierung von Zielgenen der DNA durch die beherbergte AF-1 Domäne verantwortlich ist. Im Gegensatz zum ER α enthält der ER β nur 530 Aminosäuren. In der DNA-bindenden Domäne besitzen beide Rezeptoren eine hohe Homologie von 95 %. Interessanterweise beträgt die Hormon-bindende Domäne nur eine Homologie von 53 %. So binden beispielsweise Phytoestrogene selektiv an den ER β . Die Estradiol vermittelte Genaktivierung wird durch die Transaktivierungs-Domänen AF-1 und AF-2 stimuliert.

Der klassische ER α ist vorrangig in Endometrium, Mammatumorzellen und Stroma der Ovarien vorhanden. Hingegen kommt der ER β häufig in Granulosazellen, Spermatiden in der Entwicklung, Nieren, Darmmucosa, Lungenparenchym, Knochenmark, Knochen, Gehirn, Endothelzellen und Prostata vor [60].

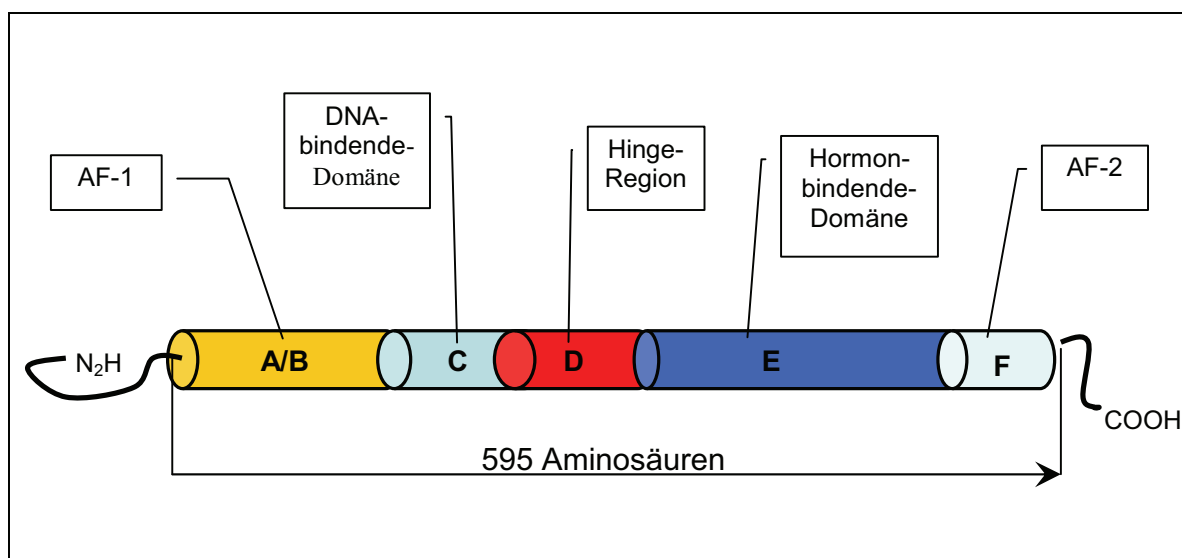


Abb.5: Aufbau des Estrogenrezeptors- α [60]

1.2.4. Molekularer Wirkmechanismus der Estrogene

Das hydrophobe Estradiol (E_2) wird im Blutstrom an das „sex-hormon-binding-globulin“ bzw. an Serumalbumin gebunden und erreicht über Diffusion durch die Zell- und Kernmembran den Nukleus. Bei Abwesenheit der Liganden ist der ER durch Hitzeschockproteine (u. a. Hsp90), sog. Chaperone, im Kern liegend inaktiviert [89]. Erreicht Estradiol den Nukleus und bindet an einen ER, durchläuft dieser eine Konformationsänderung, welche eine Ablösung der Hsp bewirkt (Abb. 6). Der Rezeptor

dimerisiert und bindet an die DNA über ein spezifisches Estrogen-Responsive-Element (ERE). Dieser Komplex rekrutiert verschiedene Co-Faktoren, was zu einer transkriptionellen Aktivierung des Zielgens durch die RNA-Polymerase II führt.

Neben diesem Signalweg werden in letzter Zeit weitere schnelle, nicht genomische Estrogen-Wirkungen beobachtet [57]. So konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von membranständigen Estrogen Rezeptoren, welche an cytosolische Signalproteine gekoppelt sind, eine wachstumsregulierende Rolle spielen. So können intrazelluläre Signalkaskaden, wie beispielsweise der MAP-Kinase Signalweg, eine Transkription initiieren [76, 81]. Weitere durch Estradiol verursachte Effekte sind die Steigerung des zellulären Ca^{2+} -Influxes und die Bildung von cAMP und IP_3 als Second-Messenger [57].

In der Summe aller bekannten und unbekannten Wirkungsweisen, stellt die Vielzahl der möglichen Estrogeneffekte ein komplexes System der Zell- und Gewebebeeinflussung dar.

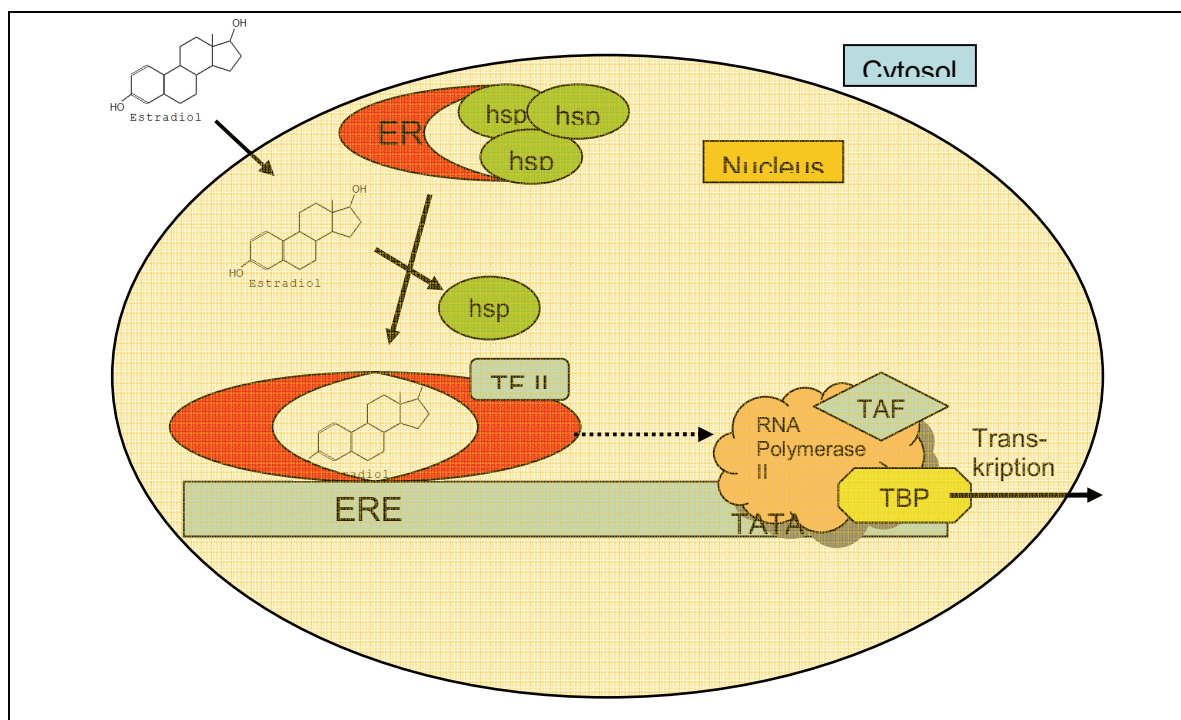


Abb.6: Schematische Darstellung des klassischen Weges der estrogenen Signaltransduktion

1.2.5. Menopause und Klimakterium

Mit dem Eintritt der Menopause, welche nach WHO als das Ende der Menstruation durch Absinken der ovariellen-follikulären Aktivität definiert ist, können sich klimakterische Beschwerden einstellen. Diese mehrere Jahre andauernde Übergangsphase, gewöhnlich 45-

55 Lebensjahr, bezeichnet die Zeit von der vollen Geschlechtsreife, bis zur hormonellen Ruhe der Ovarien. Klassische, durch das Absinken des Estrogenspiegel bewirkte Symptome, sind Hitzewallungen („hot flushes“), prämenopausale Blutungsstörungen, und vaginale Atrophie. Weniger spezifisch sind Stimmungsschwankungen, nächtliche Schweißausbrüche, Tachykardien, Schlafstörungen und Libido-Verlust. Wird dem absinkenden Estrogenspiegel nicht entgegengewirkt, können sich langfristig eine Osteoporose mit der Gefahr von Frakturschäden oder eine Arteriosklerose einstellen.

1.2.6. Hormonersatztherapie - HRT

Um klimakterische Beschwerden zu lindern, wird seit über 50 Jahren die Hormonersatztherapie (HRT) eingesetzt. Durch eine HRT werden die perimenopausalen Symptome in mehr als 90 % der Fälle erfolgreich behandelt [92]. Besonders effektiv schützt die HRT vor estrogenabhängiger Osteoporose [17]. Einige Studien belegen die schützende Wirksamkeit von Hormon-Substitutionen auf das kardiovaskuläre System und damit eine Verringerung von koronaren Ereignissen [34]. Als Therapeutika sind Estradiol, Ethinylestradiol, Estron oder Mischpräparate wie Estradiol/Progesteron im Einsatz. Eine alleinige Gabe von Estrogenen erhöht das Risiko einer Endometriumneoplasie und somit des Endometriumkarzinoms. Seit längerer Zeit steht, nicht nur aus diesem Grund, die HRT in der Kritik. In der „Woman Health Initiative“ (WHI) sowie in der „Million Woman Study“ (2002/2004) wurden die Risiken einer Langzeitbehandlung mit Hormonen deutlich aufgezeigt [51, 107]. Um den Effekt einer Estrogen/Gestagen Kombination zu testen, wurde in der WHI Langzeitstudie ein Zeitraum von 8,5 Jahren angesetzt. Überraschend wurde diese Studie nach 5,2 Jahren abgebrochen, da sich nach 4-5 Jahren das Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms um 26%, Myokardinfarkt 24%, Schlaganfall 41% und venösen Thromboembolismus um 11% erhöhte. Auch die geringeren Risiken für Hüftgelenksfrakturen (-34%) und Dickdarmkrebs (-37%), ließen nicht über das bedenkliche Studienergebnis hinwegtäuschen.

Nachdem in letzterer Zeit die Frage nach Alternativen laut geworden ist, rückten die Phytoestrogene als sekundäre Pflanzenstoffe vermehrt in den Blickpunkt des Interesses. Eine europäische Expertengruppe kam nach kritischer Auswertung der vorliegenden Studien zu dem Ergebnis, dass Phytoestrogene zu einer Reduktion klimakterischer Beschwerden führen und positiv auf den Fettstoffwechsel und die Knochendichte wirken

können [14, 84]. Eine Empfehlung für den therapeutischen Einsatz von Phytoestrogenpräparaten gibt es derzeit nicht.

1.2.7. selektive Estrogen Rezeptor Modulatoren - SERMs

Zur Therapie des Mammakarzinoms werden seit mehr als 30 Jahren Antiestrogene eingesetzt, dessen Prototyp das Tamoxifen, ein ursprünglich aus der Eibe isolierter Wirkstoff, ist (Abb. 7). Tamoxifen wird als nichtsteroidaler selektiver-Estrogen-Rezeptor-Modulator (SERM) bezeichnet. Antiestrogene binden an den Estrogenrezeptor und antagonisieren dessen Wirkung. Es kommt nicht zur Signaltransduktion und damit zur Unterbindung der Transkription. Tamoxifen zeigt keine rein antagonistischen Wirkungen, sondern vielmehr partiell antagonistische in Brustgewebe und estrogene Effekte auf Knochen [58, 19].

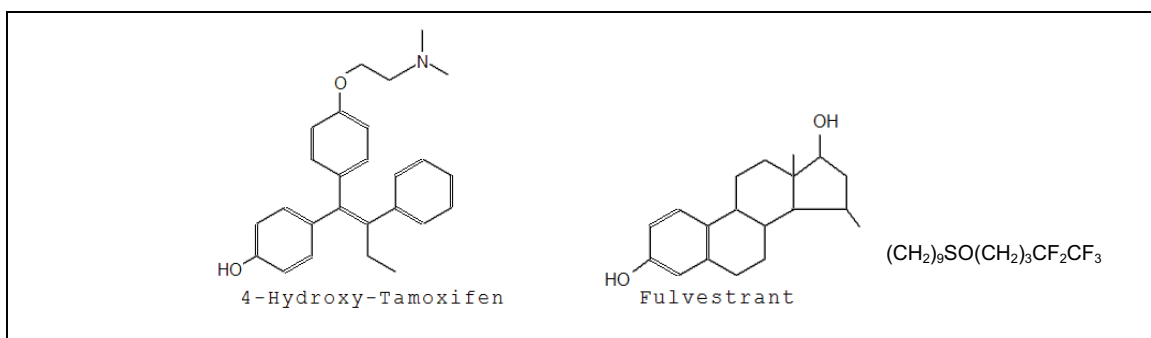


Abb.7: Strukturformeln Tamoxifen und Fulvestrant (Faslodex™)

Auf Molekularebene bewirkt Tamoxifen eine Inaktivierung der AF-2 Domäne des Estrogenrezeptors. Die AF-1 Domäne bleibt aktiv und rekrutiert Co-Aktivatoren. Damit bewirkt Tamoxifen keine vollständige Unterbrechung der Transkription, sondern verlangsamt diese, was zu einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors führt. Tamoxifen stellt eine Haupts substanz der endokrinen Therapie des Mammakarzinoms postmenopausaler Patientinnen dar. Die übliche Dosierung liegt bei 20 mg/d über einen Zeitraum von 5 Jahren. Bei Therapie des Mammakarzinoms bedarf es großer Beachtung, bezüglich der Eigenschaft des Tamoxifens gewebsp proliferierend auf das Endometrium zu wirken. Unter dieser Antiestrogentherapie kommt es zu einer Steigerung der Karzinomentstehung um den Faktor 2,0-7,5 [32,42].

Fulvestrant (Faslodex™) ein neuerer ER-Antagonist ist in der Lage ähnlich wie Tamoxifen an den ER zu binden. Im Unterschied zu Tamoxifen, ist die Affinität jedoch 1000 mal höher. Zusätzlich wird die AF-1 Domäne inaktiviert. Folglich kommt es dadurch zur vollständigen Unterbrechung der Transkription. Außerdem arretiert Fulvestrant den ER und initiiert dessen Abbau im Zytosol. Dadurch werden sekundäre Signaltransduktionsmechanismen unterbunden. Aufgrund des Estrogenrezeptor-Mangels kann der Signalweg auch über die Membranen nicht mehr stattfinden. Derzeit ist Faslodex™ auf dem amerikanischen Markt seit 2002 zur Therapie des metastasierten Mammakarzinoms zugelassen. Eine Indikation zum Einsatz des Medikamentes besteht bei postmenopausalen Patienten nach Versagen der Tamoxifentherapie. Auf dem deutschen Markt wird dieses Therapeutikum seit 2004 eingesetzt.

SERMs sind keine Alternative zur herkömmlichen HRT, da sie klimakterische Beschwerden wie Hitzewallungen nicht lindern, sondern sogar noch verschlimmern können.

1.3. Tumoren

1.3.1. Definitionen

Der Begriff „Tumor im weiteren Sinne“ ist ein rein deskriptiver Begriff, welcher sich formell gesehen nur auf die makroskopische Gestalt einer Oberfläche bezieht. Dabei wird als Tumor jegliche Vorwölbung über die Norm beschrieben, unabhängig von der Ätiologie der Entstehung [85]. Die Bezeichnung „Tumor im engeren Sinne“ beschreibt eine abnorme Gewebsmasse, die durch eine überschießende, autonome und eventuell progressive Proliferation körpereigener Zellen entsteht und sich in keiner Weise (weder funktionell, noch strukturell) in das Normalgewebe eingliedert. Charakteristisch ist ebenfalls, dass das Wachstum auch durch den Wegfall des auslösenden Reizes nicht eingeschränkt wird [85].

Unter Krebs werden im Allgemeinen alle bösartigen Neubildungen, einschließlich primärer systemischer Lymphome und Leukämien, beschrieben [1].

Der im Folgenden verwendete Begriff „Tumor“, wird ausschließlich im Sinne der malignen Ätiologie verstanden.

1.3.2. Pathogenese und Epidemiologie von Tumoren

Der Entstehung von Tumoren liegen Veränderungen im Genom der Zellen zugrunde. Es kommt häufig zu unkontrollierten Teilungen der Mutterzelle, bei der Protoonkogene aktiviert, sowie Tumorsuppressorgene und Differenzierungsgene inaktiviert werden. Im Zuge dieser Veränderungen wird das Genom zunehmend instabilisiert. Nun kann sich die "entartete" Zelle ungehindert teilen. Daraus resultiert eine Vermehrung und Veränderung des Gewebemusters, was zum Überschreiten der normalen Grenzen führt [85].

Es gibt verschiedene Einflüsse, unter welchen eine Veränderung des Genoms zustande kommt. Diese Risikofaktoren sind unterschiedlichster Natur und bilden oft erst im gegenseitigen Zusammenspiel ein Geflecht aus krebsfördernden Faktoren. Eine Früherkennung oder Prävention ist nur begrenzt möglich, da viele Zusammenhänge noch ungeklärt sind. Einigkeit herrscht aber über sogenannte vermeidbare Risikofaktoren, wie z.B. dem Zigaretten-Rauchen, durch welches schätzungsweise zwischen einem Viertel und einem Drittel aller Krebserkrankungen verursacht werden [45]. Die im Zigarettenrauch enthaltenen Benz(a)pyrene und Nitrosamine sind typische Verursacher von p53 Mutationen und somit starke Prädiktoren für maligne Tumoren. Diese Mutationen zeigen eine hoch signifikante Korrelation mit der Entstehung des Bronchialkarzinoms. Somit kommt dem Nicht-Rauchen eine überdurchschnittliche Bedeutung in der primären Tumorprävention zu [1, 45].

Weniger genau abschätzbar ist der Einfluss falscher Ernährung, wie hoher Anteil tierischen Fettes, allgemeine Überernährung und ein zu geringer Anteil an Obst und Gemüse in der Nahrung [85, 45]. Nach Meinungen der amerikanischen Forscher Doll und Peto (1981) sind Fehler in der Ernährung zu ca. 35 % an der Entstehung verschiedener Krebsarten beteiligt [21]. Welche Rolle Nahrungsmittel in der Krebsentstehung haben, zeigt das deutlich verringerte Auftreten von Tumorerkrankungen im asiatischen Raum. Studien zeigten eine viel geringere Inzidenz von Brust-, Uterus- und Prostatakrebs, Osteoporose sowie Herz-Kreislauferkrankungen in Japan, als in westlichen Ländern [3, 83, 77, 7]. Nach Einwanderung aus dem asiatischen Raum in die USA, zeigten sich bei Annahme der westlichen Ernährungsweise bereits nach wenigen Generationen die gleichen Inzidenzraten für das Auftreten eines Mammakarzinoms wie in den USA. Bei Frauen die ihre asiatische Ernährungsweise beibehielten war keine Erhöhung der Brustkrebsinzidenz zu verzeichnen [8, 72].

Ein weiterer Risikofaktor, welcher besonders großen Einfluss auf die Entstehung von Tumoren hat, ist der übermäßige Genuss von Alkohol. Besonders in der Leber wird die detoxifizierende Mischoxidase gehemmt, welche die Karzinogene entgiftet. So können die nicht abgebauten Karzinogene im Körper fluktuieren und zur Krebsentstehung beitragen. Außerdem sind bestimmte alkoholische Getränke (z.B. Obstschnäpse) zytotoxisch und enthalten Nitrosamine aus Faulstoffen. Diese führen bei Abusus zu einer Hypovitaminose und damit zu einer verminderten Regenerationsfähigkeit der Plattenepithelien, was wiederum eine Entartung der Zellen begünstigt [85]. Die französische Forschergruppe Ferrari et al. (2007) hat in einer europäischen Studie festgestellt, dass eine tägliche Aufnahme von 30g Alkohol, das Risiko an Colon und Rektumkarzinomen zu erkranken, deutlich steigert [26].

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Tumorenstehung ist die nicht beeinflussbare, genetische, sporadisch auftretende oder familiär vererbte Mutation. Auch chronische Infektionen, sowie Schadstoffexpositionen am Arbeitsplatz, UV Strahlung, Feinstaub und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe tragen maßgeblich zur Entstehung maligner Erkrankungen bei [45].

Es wird deutlich, unter welchen beeinflussenden Faktoren Tumorwachstum entstehen kann. Auch in den Medien wird das Thema Ernährung, Sport und Gesundheit vermehrt aufgegriffen, wobei sich ein Trend zu gesunder Lebensweise abzuzeichnen scheint.

1.3.3. Demographie und Epidemiologie gynäkologischer Tumoren

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Institutes (RKI) werden für das Jahr 2002 etwa 424.250 Krebsneuerkrankungen (Männer 218.250, Frauen 206.000) verzeichnet. Im Vergleich zum Jahr 2000 erhöhte sich die Neuerkrankungsrate um 29600 Fälle. Insgesamt ist das Mammakarzinom mit 55.150 Neuerkrankungen pro Jahr (26,8 %) die häufigste, und das Korpuskarzinom der Gebärmutter mit 11.350 Erkrankungen die vierthäufigste Ursache aller malignen Erkrankungen bei der Frau (Abb.8).

Die Erhöhung der Neuerkrankungen scheint erschreckend hoch. So stellte sich die Frage worauf ein Anstieg von 7 % innerhalb von 2 Jahren beruht? Diese Differenz ist weniger auf einen Anstieg der Tumorerkrankungen, sondern vielmehr auf einem vermehrten Einsatz besserer diagnostischer Verfahren zurückzuführen. Dieses wird am Beispiel der

Brustkrebsfrüherkennung durch die Mammographie deutlich. Im Vergleich zum Jahr 2000 erwartet das RKI 2007 einen relativen Anstieg der Neuerkrankungen um 7600 Fälle [102]. Derzeit wird flächendeckend ein strukturiertes und qualitätsgesichertes Mammographie-Screening-Programm für alle Frauen im Alter von 50–69 Jahren zur Früherkennung von Brustkrebs in Deutschland etabliert. Diese Prävention unterliegt der gemeinsamen Selbstverwaltung der Ärzte und Krankenkassen in Kooperation mit den Ländern. Ergänzend bleibt die ärztliche Tastuntersuchung der Brust sowie die Anleitung zur Selbstuntersuchung für Frauen ab 30 Jahre (ohne Altersbegrenzung) weiter im gesetzlichen Früherkennungsangebot [102, 45]. Als Trend ist nach Angaben des RKI eine steigende Brustkrebsinzidenz in Deutschland seit 1970 zu verzeichnen, während die Mortalität seit Mitte der 1990er Jahre leicht sinkt. Die Wahrscheinlichkeit an einem Mammakarzinom zu erkranken, nimmt mit dem Alter zu, wobei die Fünf-Jahres-Überlebensrate mit 75 % und die Zehn-Jahres-Überlebensrate mit 60 % angegeben wird. Eine schwedische Studie zeigte, dass eine postmenopausale Einnahme von Estrogenen und Progesteron, das Krebsrisiko senkt [82]. Eine Heilung lässt sich endgültig erst nach einem Zeitraum von 20-40 Jahren nach Erstdiagnose feststellen und wird zu ca. 50 % erreicht [95].

Das Korpuskarzinom der Gebärmutter ist mit einem Anteil von 5,5 % (11350 Fälle/Jahr in Deutschland) aller bösartiger Neuerkrankungen die häufigste Erkrankung der weiblichen Genitalorgane, wobei der Anteil an Sterbefällen durch die bessere Prognose mit 2,7 % deutlich geringer ausfällt, als bei dem Mammakarzinom. Selten tritt das Endometriumkarzinom vor der Menopause auf, vorwiegend jedoch in der 7. Lebensdekade.

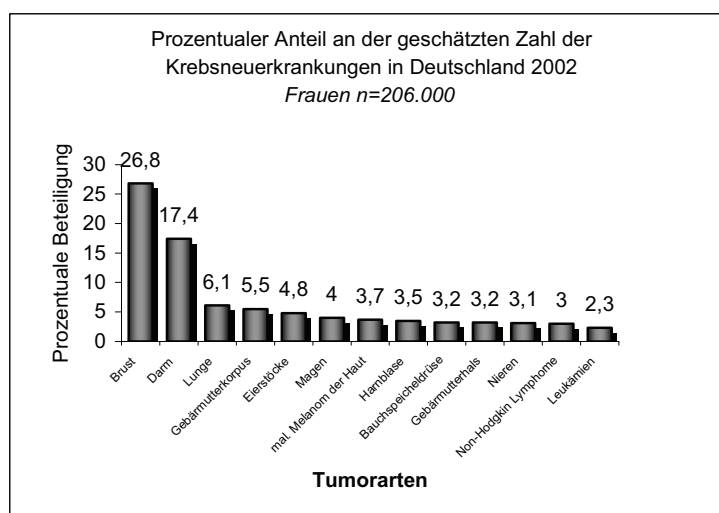


Abb.8: Krebsneuerkrankungen bei Frauen in Deutschland (nach RKI 2007)

1.3.4. Pathogenese und Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Bei dem Mammakarzinom handelt es sich um einen vom Epithel der Drüsentubuli (lobuläre Karzinome) oder den Milchgängen (duktale Karzinome) ausgehenden, bösartigen Tumor.

Die Ätiologie konnte bisher noch nicht vollständig erschlossen werden. Bekannt ist, dass familiäre Häufung und exogene Einflüsse eine Rolle spielen. Eine familiäre Disposition ist mit 5-10 % relativ selten und in 90 – 95 % aller Mammakarzinome liegt eine sporadische Entstehung zugrunde. Besonderes Augenmerk galt in der Vergangenheit der Untersuchung genetischen Veränderungen. Heute ist bekannt, dass u. a. die Gene p53, c-myc, c-erbB-1, c-erbB-2 (Her2/neu), c-Ki-ras und bcl-2 das Risiko einer Tumorentstehung erhöhen. Die Wissenschaftler gehen davon aus, dass eine Amplifikation von c-erb-2 (HER2/neu) mit einer steigenden Malignität einhergeht und die Beteiligung von c-myc für die rapide Progression verantwortlich ist [28, 88]. Her2/neu wurde als Onkogen klassifiziert, welches für ein Membranprotein kodiert, das molekular dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) verwandt ist. Damit ist es einerseits in die Differenzierung, andererseits in die Proliferationsprozesse von Tumorzellen eingebunden [15].

Besonders beachtenswert ist die Beteiligung der Gene BRCA1 (auf Chromosom 17q21 lokalisiert) und BRCA2 (auf Chromosom 13q12 lokalisiert), die als Tumorsuppressorgene mit Aufgabe bei der DNA Reparatur fungieren und zu 50-85 % mit der Bildung eines familiär vererbten Mammakarzinoms einhergehen [109, 11, 108]. Dieser Umstand löste eine Diskussion zur prophylaktische Mastektomie aus. Aufgrund der hohen Brisanz dieser umstrittenen Vorschläge hat diese Diskussion bis zum heutigen Zeitpunkt zu keinem endgültigen Ende geführt. Des Weiteren ist bekannt, dass eine Veränderung der BRCA1/2 Gene zu einem erhöhten Risiko (18%–54%) an einem Ovarialkarzinom zu erkranken führt [69, 99, 86].

Risikofaktoren für das Mammakarzinom	
Risikofaktor	Risikoerhöhung
fleisch- und fettreiche Ernährung	o. A.
Fettsucht, besonders in der Menopause	2-3
Alkohol (> 20g Ethanol/Tag)	1,5-2
Rauchen (prämenopausal)	o. A.
genetische Disposition (BRCA1-Gen auf Chrom. q17, BRCA2-Gen auf Chrom. q13), familiäre Belastung: Mammakarzinom bei der Mutter, Schwester	2-9
Mammakarzinom auf der anderen Seite	>10
frühe Menarche und späte Menopause, somit langer Östrogeneinfluss	1-2
Gestörtes Östrogen-Gestagen-Verhältnis (Gestagenmangelhypothese)	o. A.
Supraphysiologische Östrogenbehandlung in der Postmenopause	1-3
Höheres Alter (>30 Jahre) bei ausgetragener Erstschwangerschaft	3
Nulliparität	1,5-2,3
Mastopathie (mit einer entsprechenden mammographischen Dichte-ACR 3-4) a) ohne Atypien b) mit Atypien	1-1,5 2-10
ansteigendes Risiko mit dem Alter	o. A.
Ionisierende Strahlen	o. A.
Hyperprolaktinämie	o. A.
Ethnische Faktoren	o. A.

Tab. 2: Risikofaktoren des Mammakarzinoms [95]

Das Mammakarzinom entwickelt sich in einem biphasischen Verlauf über sogenannte in-situ Stadien (intraepithelial), aus welcher sie vermutlich nach mehreren Jahren schließlich in ein invasives Karzinom übergehen. Je nach histologischem Typ beträgt die Zellverdopplungszeit 100-300 Tage (v. Fournier et al. 1980). Neben den histologisch zu unterscheidenden Typen (duktales Karzinom vs. lobuläres Karzinom) werden weitere

morphologische Typen wie das muzinöse ~, papilläre ~, adenoid-zystische ~, meduläre ~ und das tubuläre Karzinom dazugezählt.

1.3.5. Molekularpathologie des Mammakarzinoms

Auf normalem Brustdrüsenepithel sind Estrogen und Progesteronrezeptoren vorhanden, welche die Übermittlung endokriner Signale steuern. Damit sind sie wesentlich an der Regulation der Zellproliferation beteiligt. Kommt es im Rahmen der Karzinomentstehung zu Zellveränderungen, ist zunächst die Regulation der Zellzahl betroffen, deren Folge eine Epithelhyperplasie ist. Im folgenden Schritt kommt es zu einer genetischen Instabilität in verschiedenen kleinen Zellklonen. Die daraus entstandene atypische Hyperplasie führt durch einen kaskadenartigen Ablauf von genetischen Störungen zur Progression. Pathogenomisch sind u. a. eine vermehrte Expression wachstumsfördernder Onkogene wie c-erb-B2/neu, int-2, c-ras und das bereits erwähnte c-myc. Es kommt zur verminderten Expression bzw. Funktionsbeeinträchtigung wachstumshemmender Tumorsuppressionsgene wie BRCA1/2, p53, PTEN-Gen, ATM-Gen, NM23 und RB1 [54, 104, 33, 101]. Als weitere Mechanismen der Tumorentstehung werden die Beeinträchtigung der Zellzykluskontrolle (Cyclin-D1) [62] und die Verminderung der integrinvermittelten Zelladhäsion (E-Cadherin) angesehen. Die Expression von matrixauflösenden Proteasen, zur Auflösung des umgebenden Gewebes um eine Invasion des Tumors zu erleichtern, sowie die Erhöhung von Angiogenesefaktoren zur Tumorerneuerung [85], tragen ebenso zum Tumorwachstum bei.

1.3.6. Pathogenese und Risikofaktoren des Endometriumkarzinoms

Bei diesen mit 40 % am häufigsten unter den gynäkologischen Malignomen auftretenden Tumoren handelt es sich histologisch zumeist um Adenokarzinome, welche sich aus der Schleimhaut des Corpus uteri entwickeln. Östrogene stimulieren den Aufbau dieser drüsenreichen Schleimhaut. Sporadisch auftretende Endometriumkarzinome werden pathogenetisch in zwei Typen unterteilt:

1. Hyperöstrogenismus-assoziierte Karzinome (Typ I)

Diese Tumoren entstehen auf dem Boden einer Hyperplasie, gefördert durch ein Überangebot von Estrogenen z.B bei Adipositas, insbesondere wenn ein Fehlen von Gestagenen („Progesteronschutz“ wirkt proliferationshemmend) vorliegt. Vorrangig sind häufiger jüngere Patientinnen betroffen, wobei die Prognose deutlich besser ist als bei Typ II Karzinomen. Häufig besteht zusätzlich ein 10q23 Allelverlust.

2. Endometriumkarzinome ohne Hyperöstrogenismus (Typ II)

Bezeichnend für diese Tumoren, ist eine maligne Transformation ohne den Einfluss von Estrogenen. Es kommt auch nicht zur Expression von Estrogen- oder Progesteron Rezeptoren. Im Gegensatz zum Typ I findet sich das Typ II Karzinom auf atrophierter Schleimhaut. Betroffen sind meistens ältere Patientinnen, wobei dieser Typ prognostisch schlechter als der Typ I anzusehen ist. Histologisch zeigt sich eine geringere Differenzierung, und Nachahmung ovarieller Gewebsmuster. Es besteht häufig ein Allelverlust in der 1 p-Region.

Typische Risikofaktoren für die Entstehung eines Endometriumkarzinoms sind längjährige Applikation von hohen Estrogendosen, Verlängerung der Geschlechtsreife durch frühe Menarche und späte Menopause, Nulliparität, Adipositas, höheres Lebensalter, gestörter Estrogen Metabolismus und Tamoxifen-Therapie bei Mammakarzinompatientinnen (Faktor 2,0-7,5) [85, 95]. Multiparität, Rauchen, körperliche Belastung, Kontrazeptiva-Einnahme und eine lebenslange sojareiche Ernährung senken das Risiko der Entstehung eines Endometriumkarzinoms [37].

2. Zielstellung der Arbeit

Am Beispiel des Tamoxifens, welches aus der Eibe isoliert wurde, zeigt sich, dass die Suche nach therapeutisch nutzbaren Verbindungen pflanzlicher Herkunft lohnenswert ist. Die Ulme ist in einigen Studien hinsichtlich verwertbarer Substanzen zur Bekämpfung von hormonabhängigen Tumoren untersucht worden und zeigt Potential weiteren Untersuchungen Vorschub zu leisten. Ulmen dominierten zeitweise die Wälder in Mitteleuropa. Auch im asiatischen Raum sind Gattungen der Ulme noch heute weit verbreitet und werden in der traditionellen fernöstlichen Medizin als Heilpflanzen genutzt. Es ist nachweislich bekannt, dass besonders Rindeninhaltsstoffe von Pflanzen in ihrer Wirksamkeit stärkere Eigenschaften haben als andere Pflanzenteile. Deshalb ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkung eines aus der Ulmenrinde hergestellten Extraktes auf das Proliferationsverhalten von hormonsensitiven Mammakarzinom- und Endometriumkarzinomzellen mittels immunhistochemischer Methoden zu prüfen. Um eine Abschätzung der Inhaltsstoffe des Extraktes zu bekommen, wurde eine Analyse mittels Massenspektrometrie durchgeführt. Des Weiteren ist es wichtig, die Toxizität des Extraktes auf die ausgewählten Zelllinien zu bestimmen. Daher wurde eine indirekte Vitalitätsbestimmung zwecks Zytotoxizitätstest durchgeführt.

Tamoxifen ist ein Medikament in der Standardchemotherapie des Mammakarzinoms und wirkt durch seine antiöstrogenen Effekte proliferationshemmend. Deshalb wurde hier der Versuch unternommen eine ähnliche Regulation über die ER-positiven Tumorzellen nachzuweisen. Im Falle der Endometriumkarzinomzellen stellte das Tamoxifen die Positiv-Kontrolle dar, da es proliferationsfördernd auf diese Gewebe wirkt. Ebenso sollte eine Wachstumsförderung durch die Stimulation mittels 17 β -Estradiol nachgewiesen werden, welches als Positiv-Kontrolle mitgeführt wurde.

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenextrakt

3.1.1. Gewinnung des Pflanzenmaterials

Das verwendete Rohmaterial stammt von der Rinde einer Flatterulme (*Ulmus laevis*), deren Standort der Botanische Garten Rostock ist. Das Material wurde von Herrn Prof. Porembski freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Probe von etwa 40 g wurde am 19.02.06, im unteren Drittel des Baumes entnommen. Ein Teil diente der Extrakterstellung und wurde mechanisch mit einer elektrischen Mühle zerkleinert.

3.1.2. Extraktion nach Luyengi et al., (1996) [63]

Nach mechanischer Zerkleinerung wurden noch unzureichend zerkleinerte Rindenstücke mit flüssigem Stickstoff und Mörser weiter zerkleinert. Das erhaltene Pflanzenmaterial war zum Teil pulverförmig, ähnlich grob gemahlenem Kaffee, zum anderen Teil aus nicht zerkleinerbaren ca. 2 mm großen Holzspänen bestehend. 25g des Rindenpulvers wurden in einen Rundkolben überführt und mit 221 ml Methanol versetzt. Zur Vermeidung von Siedeverzügen wurden Siedesteine hinzu gegeben. Unter Rückfluss kochte das Probenmaterial 15 min bei 70°C. So konnte verhindert werden, dass leicht flüchtige Substanzen entweichen und verloren gingen. Die an den kühlen Gefäßwänden kondensierten Dämpfe, wurden auf diesem Wege wieder dem Reaktionsgemisch zugeführt. Als Kühlmittel diente fließendes Wasser. Anschließend konnte das Gemisch über einem Faltenfilter von den festen Bestandteilen getrennt und mit dem Rotationsverdampfer bei 40°C / 280 mbar nicht ganz bis zur Trockne eingengt werden. Das verbliebene Destillat wurde mit 8 ml H₂O aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Nach Überführung in einen 50 ml Scheidetrichter wurde, um die Inhaltstoffe abzutrennen, die Suspension mit 8 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Durch zwei-Phasentrennung stellte sich als obere Schicht die angereicherte Ethylacetatschicht dar. Diese konnte nun abpipettiert und in einen separaten Rundkolben überführt werden. Nach fünfmaliger Wiederholung wurde die erhaltene Probe in einem Rotationsverdampfer eingengt und über Nacht in einem Exsikkator abschließend getrocknet. Die exakte Extraktmenge ermittelte sich durch Wiegen des Probe enthaltenden Rundkolbens in Bestimmung der Differenz zum Leerrundkolben. Für die nachfolgenden Experimente erfolgte die Lösung der Probe in 100 % Ethanol.

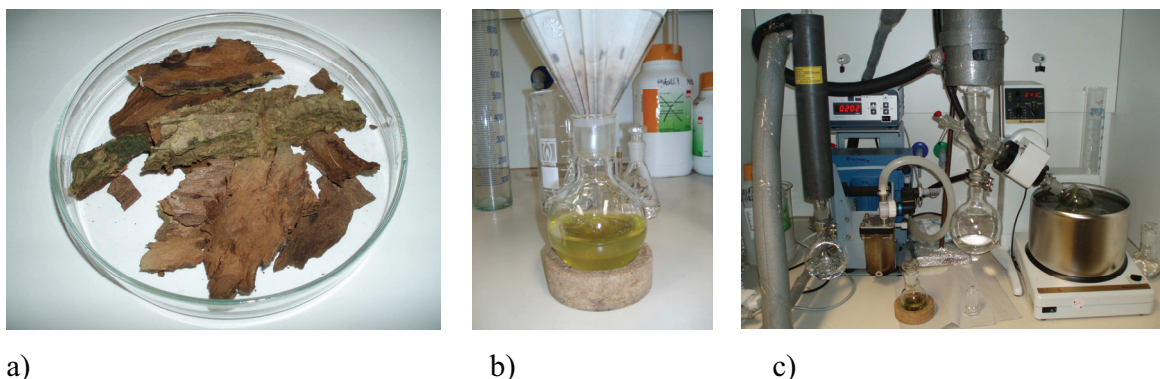


Abb. 9: Extrakterstellung

a) Rohmaterial Ulmenrinde; b) Faltenfiltration der festen Bestandteile; c) Rotationsverdampfer

3.1.3. Aufarbeitung der Extrakte und Kontrollen

Aus dem gelösten Extrakt wurde eine Stammlösung von 100 mg/ml angesetzt, welche zur Herstellung der Verdünnungsreihe genutzt wurde. Für alle durchgeführten Experimente war die Konzentrationsreihe von 2,5 µg/ml bis 500 µg/ml grundlegend.

In jedem Testansatz erfolgte der Bezug einer Extrakt bzw. Estradiol oder Tamoxifen Probe auf eine ethanolhaltige Probe. Diese enthielt den gleichen Testansatz von Zellzahl, Nährmedium und Testkit, mit einem an Volumen und Konzentration der Extraktprobe gleichwertigem Anteil Ethanol. Es erfolgte, wie mit allen Testwerten eine vierfach Bestimmung, deren Mittelwert als Referenz galt. Im Folgenden wird diese ethanolische Kontrolle als Negativ-Kontrolle bezeichnet.

Der Ansatz von Tamoxifen und 17β-Estradiol umfasste eine Verdünnungsreihe von 10E-4 bis 10E-8 mol/l, deren Konzentration sich im Experimentieransatz auf 10E-6 bis 10E-10 mol/l verringert. Tamoxifen ist bei den Mammakarzinomtests als Negativ-Kontrolle und bei den Endometriumtests als Positiv-Kontrolle anzusehen. Um Verwirrungen zu vermeiden, ist im Folgenden als Negativ-Kontrolle die ethanolische Leerkontrolle gemeint. Im Falle der Tamoxifen Negativ-Kontrolle, wird an der entsprechenden Stelle explizit darauf verwiesen. Die mitgeführte Estradiol Kontrolle ist in allen Tests als Positiv-Kontrolle anzusehen.

3.2. Die verwendeten Zellkulturen

Alle verwendeten Zelllinien stammen von der „Human Tumor Cell Bank-HTB“, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA 20108 U.S.A., und dem europäischen Vertriebspartner LGC Promochem, Queens Road, Teddington, Middlesex, TW11 0LY, UK.

3.2.1. Mammakarzinomzelllinien

Die Tumorzelllinie HCC 70 entstammt, laut ATCC-Vertrieb, einem als wenig differenziertem, primären, duktalem Mammakarzinom, TNM Stadium IIIa, Grad 3, welches in 4/17 untersuchten Lymphknoten, Metastasen enthält. Als zelluläre Produkte werden Glycoprotein 2 (EGP2) und Cytokeratin 19 exprimiert. Der Rezeptorstatus ist ER positiv und PR negativ. Der Onkogenstatus ist her2/neu negativ und p53 positiv.

Die Tumorzelllinie MCF-7 wurde von einer Pleurametastase isoliert und als epitheliale Adenokarzinomzelle der Brustdrüse klassifiziert. Der Rezeptorstatus ist ER positiv und es werden die Onkogene Tx-4 und WNT7B exprimiert.

Die Mammakarzinomzelllinie BT-20 entstammt einem primären Mammatumor und wurde 1958 isoliert und kultiviert. Die Zelle exprimiert Estrogenrezeptor mRNA, jedoch keine Rezeptoren. Es besteht eine Deletion auf Exon 5. Des Weiteren werden die Onkogene WNT3 und WNT7B exprimiert. Das Wachstum der Zelle, kann laut Tumorzellbank ATCC, durch den Tumornekrosefaktor TNF α inhibiert werden.

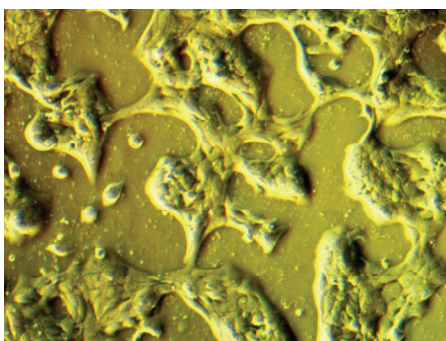


Abb. 10 a: HCC-70; 400x Vergrößerung

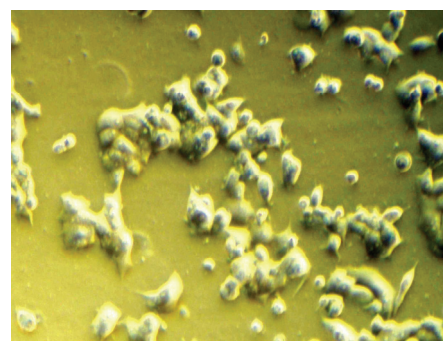


Abb. 10 b: MCF-7; 400x Vergrößerung

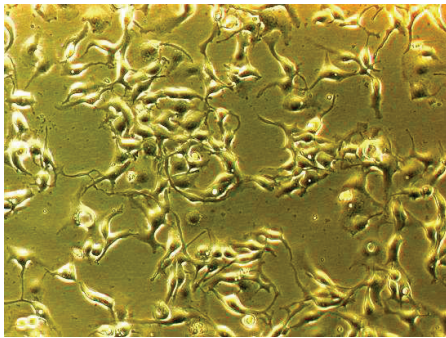


Abb. 10 c: BT-20; 400x Vergrößerung

Abb. 10 a, b, c: Lichtmikroskopische Aufnahme der verwendeten Mammakarzinomzellen

3.2.2. Endometriumkarzinomzelllinien

Die Tumorzelllinie RL95-2 ist eine epitheliale Endometrium-Karzinomzelllinie mit positiver Expression des ER. Eine Besonderheit, auf welche der Hersteller verweist, ist dass die Zellen über gut ausdifferenzierte junctionale Komplexe, α -Keratin, Tonofilamente und Oberflächen-Mikrovilli verfügen.

Ebenso ist die verwendete Tumorzelllinie Ishikawa eine gut differenzierte Endometrium Adenokarzinomzelllinie, welche ER und PR exprimiert.

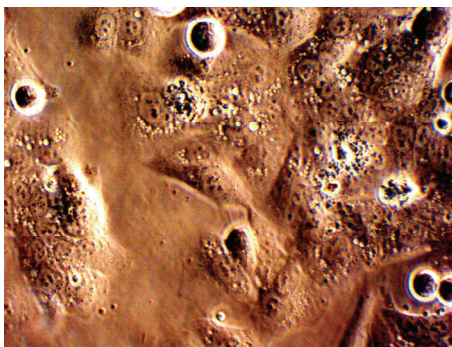


Abb. 11 a: Ishikawa; 400x Vergrößerung

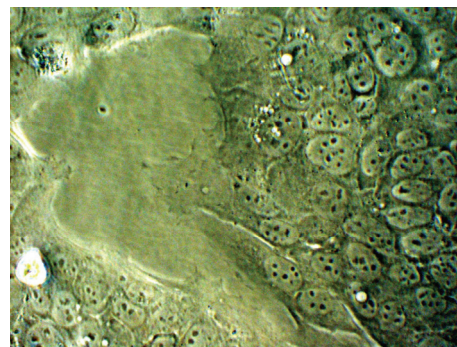


Abb. 11 b: RL95-2; 400x Vergrößerung

Abb. 11a,b: Lichtmikroskopische Aufnahmen der verwendeten Endometriumkarzinomzellen

3.2.3. Die Zellkulturmedien

Die Tumorzellen wachsen alle adhären auf Zellkulturflaschen in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Wahlweise kann für die Zelllinie HCC 70 auch RPMI 1640 Medium genutzt werden. Beide benutzte Kulturmedien enthalten 2 mM L-Glutamin, 1.5 g/L Natriumbicarbonat, 4.5 g/L Glucose, 10 mM HEPES, 1.0 mM Natrium-Pyruvat, 90% und

fetales Kälberserum (FKS), 10%. Das fetale Kälberserum dient als Proteinzusatz der Zellernährung. Das Medium ist steril mit pH 7,4 vorgefertigt und zum Gebrauch mit 1% Penicillin/Streptomycin (antibakteriell) sowie 0,5% Amphotericin B (antifungizid) versetzt worden. Die Lagerung erfolgte kühl bei ca. +7°C.

3.2.4. Prinzip der Zellkultivierung

Die Zellen sind in ca 1,5 ml Nährmedium mit den Zusätzen 20% FKS und 10% DMSO bei -80°C eingefroren und müssen nach dem Auftauen in reines Nährmedium (DMEM) überführt werden, da sich das DMSO zytotoxisch auf die Zellen auswirkt. Dazu wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Eppendorf Röhrchen mit 10 ml DMEM pipettiert, mit dem Vortex-Rüttler durchmengt und in der Zentrifuge (Heareus) bei 1000 U/min 5 min vom Überstand getrennt. Nach abdekantieren des Mediums wurden 5 ml DMEM zum Zellpellet hinzugegeben und mit dem Vortex-Rüttler aufgeschüttelt. Die Zellsuspension wurde in die kleinste Kulturflasche pipettiert und in dem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Kulturflaschen verfügen über einen Bakterienfilter, der zum einen dem Gasaustausch dient und zum anderen die Zellkultur vor eindringenden Keimen geschützt. Alle Pipettierarbeiten erfolgen unter einer Sterilbox, um Verunreinigungen von Kultur oder Materialien zu verhindern.

Nach zwei Tagen erfolgte eine Medium- und Wachstumskontrolle, wobei verbrauchtes Nährmedium gewechselt wurde bzw. bei mindestens 80%iger Bewachsung des Kulturflaschenbodens eine Passagierung in eine größere Flasche erfolgte. Hierzu wurden die Zellen, welche flächig als Monolayer den Flaschenboden bewachsen haben, mit PBS-Puffer gewaschen. Dieser Vorgang diente dazu die von den Zellen produzierte Proteinschicht abzuwaschen, um sie mit 2 ml Trypsin enzymatisch vom Boden abzulösen. Hierfür ist eine Inkubationszeit von 5 min im Brutschrank bei 37°C notwendig. Anschließend konnten die Zellen nach Zentrifugation und Resuspension mit DMEM in eine größere Kulturflasche überführt und bei 37°C/5% CO₂ im Brutschrank zum weiteren Wachstum aufbewahrt werden.

3.2.5. Zellzählung

Alle Experimente wurden mehrfach durchgeführt und sollten unter den gleichen Bedingungen stattfinden. Deshalb ist es wichtig, die Zellzahl in der Suspension zu

bestimmen. Dazu wurden zunächst die Zellen wie oben beschrieben, von dem Kulturflaschenboden abgelöst und in ein 50 ml Eppendorfröhrchen überführt. Für die Zellzählung in der „Bürker-Zählkammer“ erfolgte die Vorbereitung der Zellen nach folgendem Schema :

- 1.) 360 µl DMEM-Medium in einem kleinen Eppendorfröhrchen vorlegen
- 2.) 20 µl Tryptanblau in das Röhrchen pipettieren (Farbstoff dringt bei defekter Zellmembran in das Innere der Zellen ein und färbt sie blau → Unterscheidung zu lebenden Zellen)
- 3.) 20 µl Zellsuspension dazugeben → Verdünnung von 1:20 entsteht
- 4.) mit dem Vortex-Rüttler kurz durchmengen
- 5.) auf je zwei Zählkammerfelder wird ein Tropfen der Zellsuspension von ca. 10 µl aufgetragen
- 6.) zweimalige lichtmikroskopische Auszählung von 5 x 5 Feldern
- 7.) Berechnung der Zellzahl pro ml
- 8.) Verdünnung auf gewünschte Zellzahl/ml

$$\sum (\text{der gezählten lebenden Zellen}) \times 10 \times 10^4 \text{ Zellen/ml}$$

Tab. 3: Formel zur Berechnung der Zellzahl

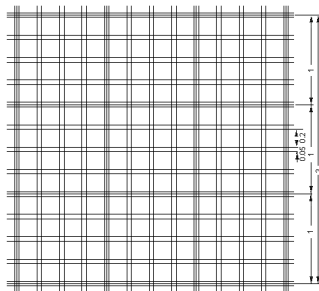


Abb.12: Darstellung einer Bürker-Zählkammer

3.3. Testverfahren

3.3.1. MTT-Proliferationstest

Dieser Test dient der Bestimmung des Wachstums und der Viabilität von metabolisch aktiven Zellen. Hierbei wird der gelbe Farbstoff 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid (MTT) durch die mitochondriale Dehydrogenase in lebenden Zellen gespalten. Es entstehen blauviolette MTT-Formazan-Kristalle, die wasserunlöslich

sind. Die photometrische Auswertung erfolgte mit dem ELISA-Reader. Die Zellen wurden in den Konzentrationen von 2,5 µg/ml bis 500 µg/ml inkubiert, wobei lebende Zellen mit der mitochondrialen Dehydrogenase den gelben MTT-Farbstoff in blauviolette MTT-Formazan-Kristalle spalten. Diese dunklen Kristalle zeigen im ELISA Reader eine höhere Absorption als der nicht gespaltene MTT-Farbstoff. Somit korreliert eine hohe Absorption mit einer hohen Anzahl an lebenden Zellen.

Durchführung: (vereinfacht)

- 1.) 50.000 Zellen/Well (100 µl) + Experimentieransatz (Extrakte, pos./neg. Kontrollen-Tamoxifen, Estradiol, EtOH 1%) , werden in einer 96-Well-Platte 24 h bei 37°C/5% CO₂ kultiviert
- 2.) 10 µl/Well MTT-labeling-reagent dazugeben und weitere Inkubation für 4 h
- 3.) 100µl/Well Solubilisierungslösung und Inkubation über Nacht
- 4.) photometrische Auswertung (Absorptionsmessung) mit dem ELISA-Reader bei 570 nm

3.3.2. *BrdU-Proliferationstest*

Der BrdU Test ermöglicht ähnlich dem MTT-Test eine qualitative und quantitative Beurteilung des Zellwachstums unter Kulturbedingungen. Das colorimetrische Immunoassay BrdU ist ein nicht-radioaktiver Proliferationstest. Er basiert auf der Messung von in DNA inkorporiertes Thymidinanalogon 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU). Nach Inkubation mit den Extrakten und Kontrollen, werden die Zellen fixiert und die DNA denaturiert. Ist das BrdU in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut, bindet ein spezifischer Antikörper (Anti-BrdU-POD) an das Thymidinanalogon. Über die konjugierte Peroxidase wird mit dem hinzugegebenen Substrat eine Farbreaktion ausgelöst. Die entstehende blaue Färbung kann anschließend mit dem ELISA-Reader photometrisch ausgemessen werden.

Durchführung: (vereinfacht)

- 1.) 50.000 Zellen/Well (100 µl) werden in einer 96-Well-Platte 24 h bei 37°C/5%CO₂ kultiviert → Zellen werden adhären
- 2.) 1µl/Well Extrakt und Pos./Neg.-Kontrollen (Tamoxifen, Estradiol, EtOH 1%) mit anschließender Inkubation von 24 h (37°C/5%CO₂)

- 3.) 10 μ l / Well BrdU-labeling-solution und weitere Inkubation im Brutschrank (37 °C/5 % CO₂)
- 4.) Entfernung des Gemisches von den Zellen und Fixation mit 200 μ l Fix-Denat; Inkubation für 30 min bei 15-25°C
- 5.) Entfernung der Fixationslösung und Inkubation mit 100 μ l/Well anti-BrdU-POD (Antikörper) für 90 min bei 15-25°C
- 6.) Entfernung des Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit 200 μ l/Well Washing-solution
- 7.) Entfernung der Waschlösung und Inkubation mit 100 μ l/Well Substrate-solution (Farbsubstrat) für 15 min
- 8.) Abstoppen der Farbreaktion mit 25 μ l/Well 1M H₂SO₄
- 9.) Messen der Absorption mittels ELISA-Reader (450 nm)

3.3.3. LDH-Zytotoxizitätstest

Zur Unterscheidung, ob eine Wachstumshemmung oder eine zytotoxisch bedingte Abtötung der Zellen vorliegt, dient der LDH-Zytotoxizitätstest. Diese quantitative Bestimmung erfolgte durch Messung der Lactat-Dehydrogenase (LDH) Aktivität toter Zellen, welche nach Abtötung die LDH durch Zellmembranschäden frei aus dem Zytosol in das Medium abgeben. Dabei korreliert die Höhe der gemessenen Enzymaktivität proportional mit der Menge an abgetöteten Zellen. Aufgrund der Enzymstabilität und schnellen Freigabe des Enzyms nach einem Zellmembranschaden, eignet sich die Messung der LDH Aktivität besonders gut.

Zur Testdurchführung wurde ausschließlich der zellfreie Überstand verwendet, um Verfälschungen durch nachträgliche Zellschäden zu vermeiden. Die LDH katalysiert, wie in Abb. 13 dargestellt, innerhalb des Testprozedere die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat unter der Reduktion von NAD⁺ zu NADH/H⁺. Im zweiten Schritt wird H⁺ vom NADH/H⁺ auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) übertragen, welches dadurch zu dem roten Formazansalz reduziert wird. Diese Reaktion wird durch das hinzugegebene Enzym Diaphorase katalysiert. Um eine Referenz über die maximale LDH Freisetzung zu erhalten, wurde eine sogenannte High-control mitgeführt, bei welcher durch die Substanz Triton X-100 alle Zellen zerstört und somit eine maximale LDH Freisetzung provoziert wurde.

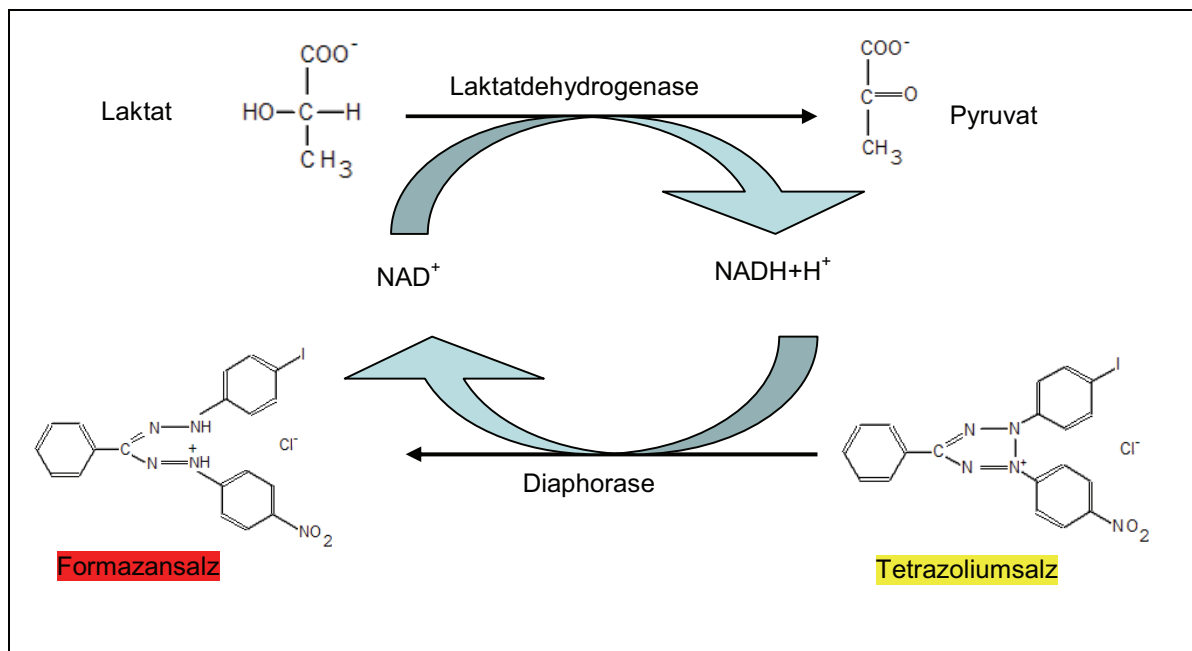


Abb.13: Prinzip des LDH-Zytotoxizitätstest

Durchführung: (vereinfacht)

- 1.) 50.000 Zellen/Well (100 μl) wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät und 24h bei $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ kultiviert
- 2.) der Überstand wurde abgenommen und mit 198 μl Nährmedium mit 2 μl des Experimentieransatzes (Extrakte, Tamoxifen, Estradiol, High-control mit Triton X-100 1%, neg. Kontrolle mit EtOH 1%) angesetzt und weitere 24 h bei $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ kultiviert
- 3.) Pippettierung des Überstandes in eine neue 98 Well-Platte
- 4.) 100 μl /Well reaction-mixture (Diaphorase/ NAD^+) zu dem Überstand und weitere 10-30 min. inkubiert
- 5.) Abstoppen der Reaktion mit 1 M HCl
- 6.) Messung der Extinktion am ELISA-Reader bei 492 nm; Referenz 620 nm
- 7.) Berechnung der Zytotoxizität mit folgender Formel:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Extinktion (Probe)} - \text{Extinktion (EtOH Negativkontrolle)}}{\text{Extinktion (high control)} - \text{Extinktion (EtOH Negativkontrolle)}} \times 100$$

Tab.4: Formel zur Berechnung der Zytotoxizität in %

3.4. Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie

Für die Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (Py-FIMS) wurden ca. 5 µl Probenmaterial in einem Quarztiegel eingewogen. Der Tiegel wurde in den Mikroheizer einer Probenschubstange transferiert und in die Ionenquelle des doppelt fokussierenden Finnigan MAT 900 Massenspektrometers eingeführt (Finnigan, MAT, Bremen, Deutschland). Hier erfolgte bei 10^{-1} hPa im Vakuum die Zerlegung der Probe in ihre chemischen Untereinheiten und enthaltenen Biomakromoleküle. Die Heizrate betrug 6,66 K je Scan (entspricht ca. 0,9 K s⁻¹). Kurze Reaktionszeiten, kleine Substanzmengen, die schonende Ionisierung im sehr hohen elektrischen Feld (FI) und die unmittelbare Zuführung der Molekülionen zum Massenspektrometer begünstigten die Bildung und Detektion primärer thermischer Bruchstücke, die sich mit der Struktur der zu untersuchenden Substanz korrelieren ließen.

Die molekularen Bruchstücke des thermischen Abbaus wurden in einem hohen elektrischen Feld (FI Emitter + 4,8 kV, Gegenelektrode -5,5 kV) schonend ionisiert und die gasförmigen Ionen im Massenspektrometer beschleunigt, getrennt, elektrisch verstärkt und registriert. Während der Aufheizphase von 110 bis 700 °C konnten 91 einzelne Massenspektren aufgenommen und im Datensystem gespeichert werden.

Bei der massenspektrometrisch analysierten Probe handelt es sich um das verwendete ethanolische Rohextrakt der Ulmenrinde in der Konzentration 100 mg/ml. Das hierbei verwendete Rohmaterial wurde unmittelbar vor der Erstellung des Extraktes im Feb. 2006 geerntet. Diese massenspektrometrische Untersuchung sollte eine Substanzklassenverteilung der Probe zeigen.

3.5. Reproduzierbarkeit der Messdaten und statistische Auswertung

Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Experimente (MTT, BrdU, LDH) für jede der 5 Zelllinien viermalig wiederholt (BT-20 nur MTT). Innerhalb eines Testansatzes wurde eine 4-fach Bestimmung für jede Extraktkonzentration bzw. Kontrollkonzentration (Tamoxifen, Estradiol, EtOH) durchgeführt. Aus den Werten innerhalb eines Testes wurde nach Abzug des Blindwertes jeweils der Mittelwert bestimmt und die Standardabweichung berechnet. Für die Proliferationsteste BrdU und MTT wurden die Absorptionswerte prozentual auf den Negativ-Kontrollwert (Zellsuspension+EtOH), welcher 100% gesetzt

wurde, bezogen. Der Referenzwert des LDH-Testes ist die maximale LDH-Freisetzung durch maximale Zellzerstörung mittels Triton X-100. Dieser Extinktionswert wurde 100% gesetzt und alle anderen Extinktionswerte wurden prozentual auf diesen bezogen.

Die Auswertung der Messergebnisse und deren Berechnungen erfolgte mit Microsoft Excel. Die Signifikanz der Ergebnisse bezüglich der Negativkontrolle wurden mit Student's t-test ermittelt. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle und sind in den Diagrammen mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Um eine Veränderung des Extraktes durch äußere Einflüsse, wie Temperatur, Lichteinwirkung und Sauerstoff möglichst gering zu halten, wurde die Rohprobe bei $-83\text{ }^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt tiefgekühlt. Die in den Experimenten verwendeten Verdünnungsreihen wurden bei $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgekühlt und nur zum Zweck des laufenden Experimentes entnommen. Da jedoch Änderungen der Zusammensetzung des Experimentieransatzes durch etwaige Alterprozesse und Verdunstungen der alkoholischen Bestandteile nicht auszuschließen sind, wurden die Verdünnungsreihen jeweils nach 10-12 Wochen erneuert.

3.6. Geräte und Chemikalien

Anwendung	Geräte und Chemikalien
Extraktion nach Luyengi et al. (1996)	• Methanol, Roth • Ethylacetat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland • Faltentrichter, Durchmesser 185 mm, Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland • Vakuumrotationsverdampfer, Heidolph VV2011 • mechanische Kaffemühle
Zellkultur	<u>Chemikalien</u> • DMEM; Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland • PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung), 10 mM, pH = 7,4 (8,0 g NaCl + 2,9 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O + 0,2 g NaH₂PO₄ + 0,2 g KCl / 1,0 l Aqua dest.) • FKS = Fetales Kälberserum; Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland • Amphotericin B: Fungizone, 250 UGML, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland • Penicillin-Streptomycin-Solution: 10000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml; 0,9 % NaCl, Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland • Trypanblau (0,4 %ig); Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland • HEPES-BSS (HEPES Buffer Saline Solution, w/o Calcium/Magnesium), Promocell • TNS (Trypsin Neutralisation Solution), Promocell <u>Materialien</u> • Kulturflaschen; Nunclon™ Surface • Sterilbox; Heraeus • Zentrifuge; Hettrich • Reaktionsgefäße 50 ml; Grüner bio- one Cellstar® • Brutschrank (37°C, 5% CO₂); Heraeus • Kühltruhe (-80°C); Heraeus • Desinfektionsmittel; Bacillol R plus, Bode • 96- Well- Platte; Grüner bio- one Cellstar® • Pipetten, 5 ml, 10 ml; Eppendorf
Chemikalien	• 17β- Estradiol, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland • Tamoxifen, Sigma-Aldrich-Chemie, Deisenhofen, Deutschland • HCl; Roth • H₂SO₄; Roth
MTT-Test	• Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche
BrdU-Test	• Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche
LDH-Test	• Cytotoxicity Detection Kit, Roche

Tab. 5: Geräte und Chemikalien

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Resultate der Proliferationstests MTT und BrdU sowie die Zytotoxizitätsmessung mittels LDH Test der Mammakarzinom Zelllinien MCF-7 und HCC-70 sowie der Endometriumkarzinom Zelllinien RL95-2 und Ishikawa dargestellt. Durch lichtmikroskopische Aufnahmen kann unter dem Einfluss des Extraktes das Wachstumsverhalten der Zellen beschrieben werden. Es wurde weiterhin, um eine Verteilung und Übersicht der enthaltenen Substanzklassen innerhalb des Extraktes zu erhalten, diese abschließend graphisch dargestellt.

4.1. MTT-Test Mammakarzinomzellen

4.1.1. MTT-Test MCF-7

Mit Hilfe des MTT-Tests kann eine qualitative und quantitative Aussage über das Wachstumsverhalten der Zellen unter dem Einfluss des Extraktes getroffen werden.

Im MCF-7 MTT-Test unterscheiden sich die Konzentrationen 150 µg/ml, 250 µg/ml und 500 µg/ml signifikant von der negativ Kontrolle. Ebenfalls zeigten die Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml eine Wachstumshemmung. Hiermit ist eine direkte Korrelation zwischen Höhe der Konzentration des Extraktes und der Proliferationshemmung der Zellen anzunehmen. Eine maximale Hemmung des Zellwachstums (um 35,69 %) wird unter der höchsten verwendeten Konzentration von 500 µg/ml erreicht (Abb. 14).

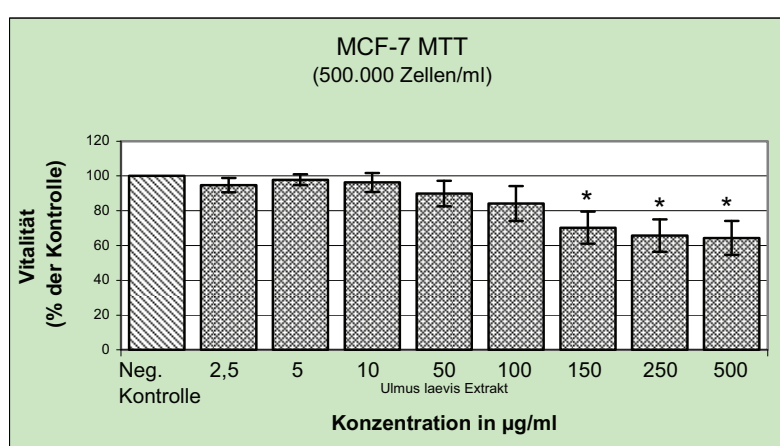


Abb. 14: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (MTT Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolschen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Im gleichen Testansatz wurde neben dem Ulmenextrakt eine weitere Negativ-Kontrolle in Form des Tamoxifens und eine 17 β -Estradiol Positiv-Kontrolle, jeweils in Konzentrationen von 10E-6 mol/l bis 10E-10 mol/l mitgeföhrt.

Das 17 β -Estradiol zeigt in keiner Konzentration eine signifikante Proliferationsföhderung. Die höchsten Konzentrationen von 10E-6 und 10E-7 mol/l bewirken eine geringfügige Verminderung des Zellwachstums um max. 15,49 % (Abb. 15).

Unter Einfluss des Tamoxifens sinkt die mitochondriale Dehydrogenase Aktivität besonders in den Konzentrationen 10E-6 und 10E-7 mol/l stark ab. Die maximale Verringerung der Absorption um 86,73 % im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, wurde bei 10E-7 mol/l gemessen. Die Konzentration 10E-8 mol/l zeigt ebenfalls eine signifikante Hemmung und stellt den Übergang zur nicht wirksamen Konzentration dar (Abb. 15).

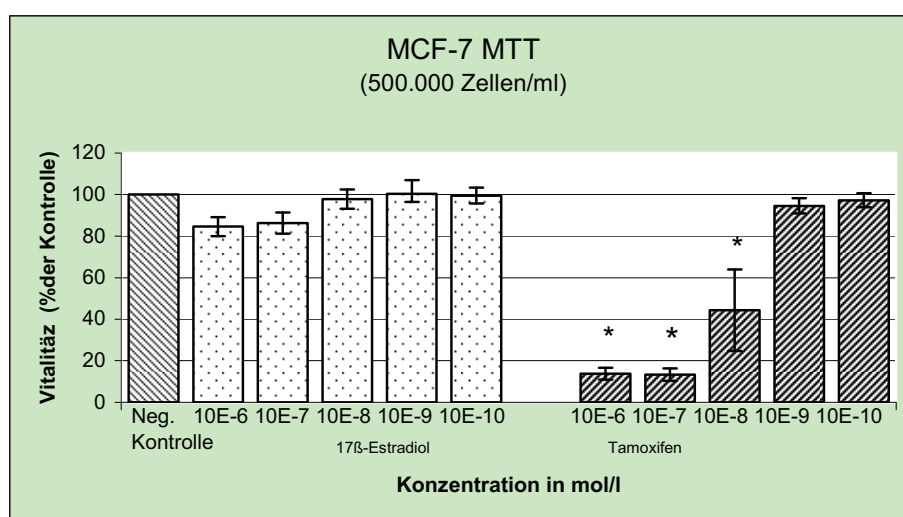


Abb. 15: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17 β -Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.1.2. MTT- Test HCC-70

Bei ansteigender Extraktkonzentration, reagiert die ER-positive und PR-negative Mammakarzinomzelllinie HCC-70 in Ihrem Wachstumsverhalten mit einer nahezu linearen Abnahme der Proliferation. Wie in Abb. 16 dargestellt, reagieren die Zellen bereits ab einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ mit einem verminderten Wachstum, wobei bereits 5 $\mu\text{g/ml}$

eine signifikante Unterscheidung von der Negativ-Kontrolle anzeigen. Eine maximale Hemmung von 69,65 % erfolgt bei der Konzentration 500 µg/ml.

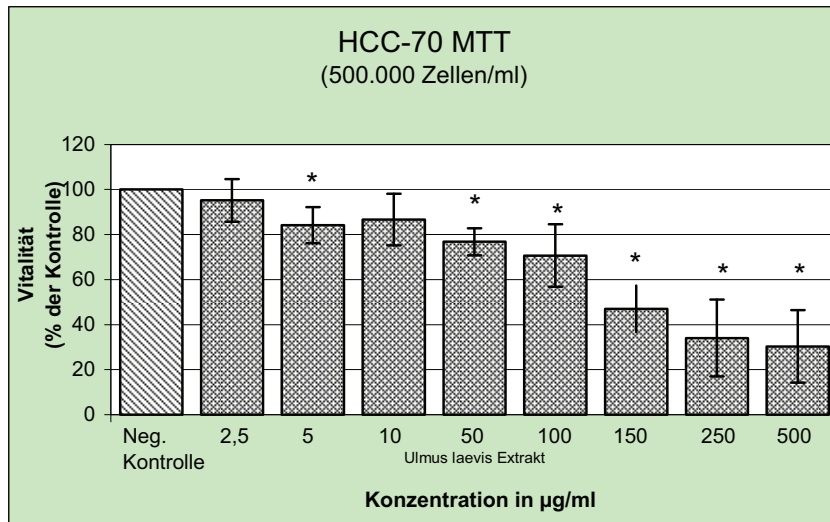


Abb. 16: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (MTT Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie HCC-70 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die mitgeführten Kontrollen 17β-Estradiol und Tamoxifen zeigen, jeweils in den beiden höchsten Konzentrationen, hemmende Effekte. Diese betrugen bei 17β-Estradiol (10E-6 mol/l) max. 30,6 % und bei Tamoxifen (10E-7 mol/l) max. 82,7 %. Eine signifikante Stimulation unter Einfluss des Estradiols ließ sich nicht verzeichnen.

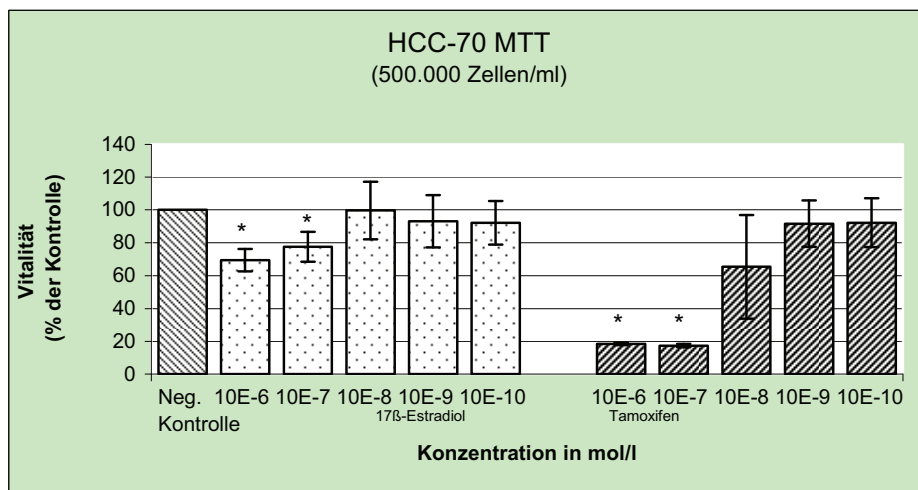


Abb. 17: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17β-Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie HCC-70 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.1.3. MTT-Test BT-20

Um Aussagen über die Wirkungsweisen des Ulmenextraktes in Bezug auf das Vorhandensein von Estrogen und Progesteron Oberflächenrezeptoren treffen zu können, wurde eine ER- und PR-negative Zelllinie im Proliferationstest MTT untersucht. Die Mammakarzinomzelllinie BT-20 zeigt im MTT-Test keine signifikante Änderung des Wachstumsverhaltens bezüglich der mitgeführten Negativ-Kontrolle. Lediglich bei einer Konzentration von 500 µg/ml stellt sich eine Verringerung der Vitalität um 14,3 % ein, welche allerdings nicht als signifikant zu betrachten ist (Abb. 18).

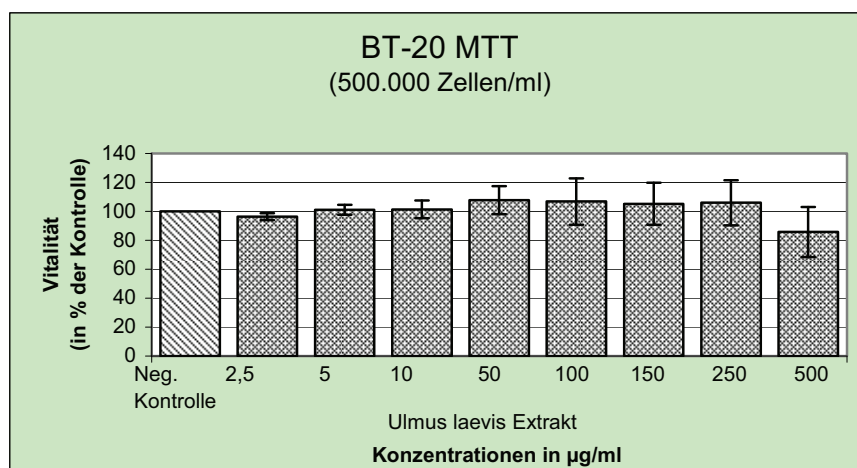


Abb.18: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (MTT Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie BT-20 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanologischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

In der Positiv-Kontrolle, welche durch 17 β -Estradiol repräsentiert wird, lassen sich ebenso wie in der Negativ-Kontrolle mit Tamoxifen keine nennenswerten Unterschiede zu den anderen getesteten Zelllinien feststellen. Die Konzentrationen 10E-6 mol/l und 10E-7 mol/l des Estradiols bewirken eine Hemmung der BT-20 Zellen von ca. 30%. Die niedrigen Konzentrationen weisen keinen relevanten Unterschied zur Negativ-Kontrolle auf. Das Tamoxifen zeigt wie in den anderen Tests eine deutliche Verringerung der Zellpopulation in den hohen Konzentrationen (10E-6 mol/l, 10E-7 mol/l, 10E-8 mol/l), während die Konzentrationen 10E-9 mol/l und 10E-10 mol/l keine Effekte bewirken.

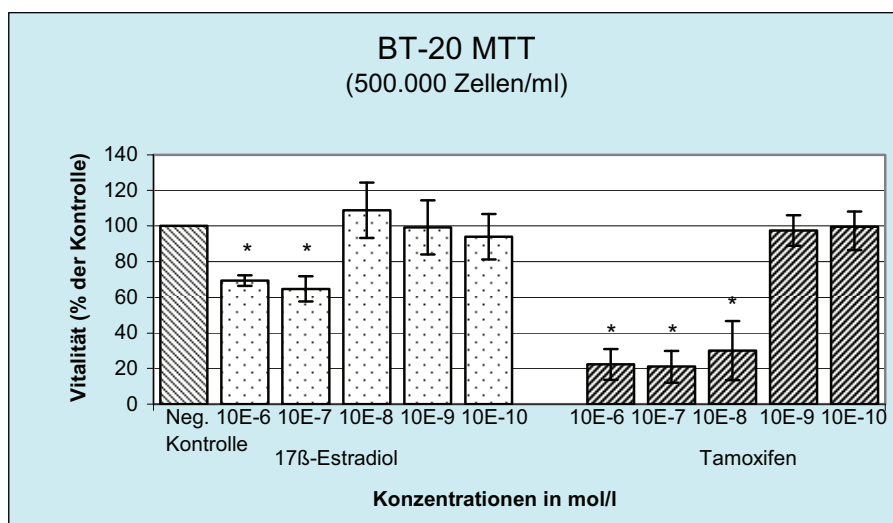


Abb.19: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17β-Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Vitalität der Mammakarzinomzelllinie BT-20 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.2. MTT-Test Endometriumkarzinomzellen

4.2.1. MTT-Test RL95-2

Die ER positive Zelllinie reagiert auf eine Inkubation mit dem *Ulmus laevis* Extrakt durch besonders starke Hemmung des Wachstums bereits ab 5 µg/ml. Mit ansteigender Konzentration sinkt die Zellzahl deutlich ab und erreicht eine maximale Abnahme bei 500 µg/ml. Hier beträgt die Zellreduktion im Vergleich zur Neg. Kontrolle 79,92 % (Abb. 20).

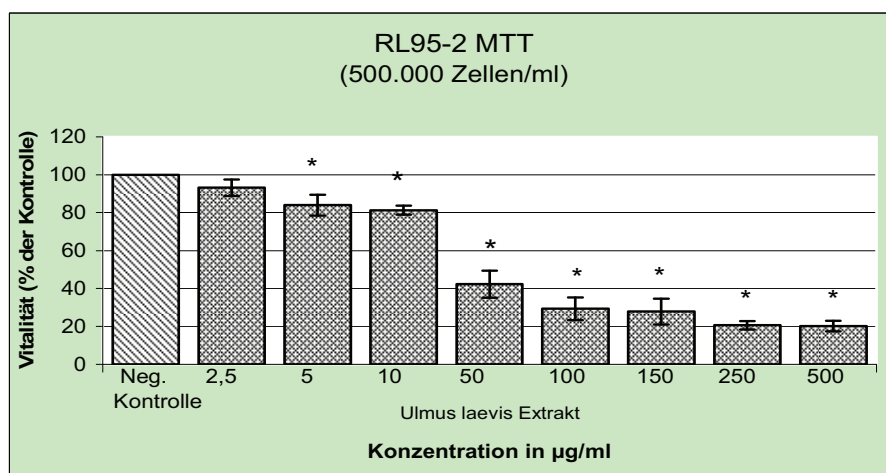


Abb. 20: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (MTT Test) auf die Vitalität der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

RL95-2 ließ sich durch 17 β -Estradiol im MTT-Test nicht signifikant stimulieren. Unter dem Einfluss des Estradiols mit der Konzentration von 10E-8 mol/l ergab sich ein leichter Anstieg der Zellaktivität um 3,09 %. Die beiden höchsten Konzentrationen wirkten sowohl mit 17 β -Estradiol, als auch mit Tamoxifen hemmend auf die Zellen. Die Konzentrationen 10E-8 mol/l bis 10E-10 mol/l unterschieden sich nicht signifikant von der Neg. Kontrolle (Abb. 21).

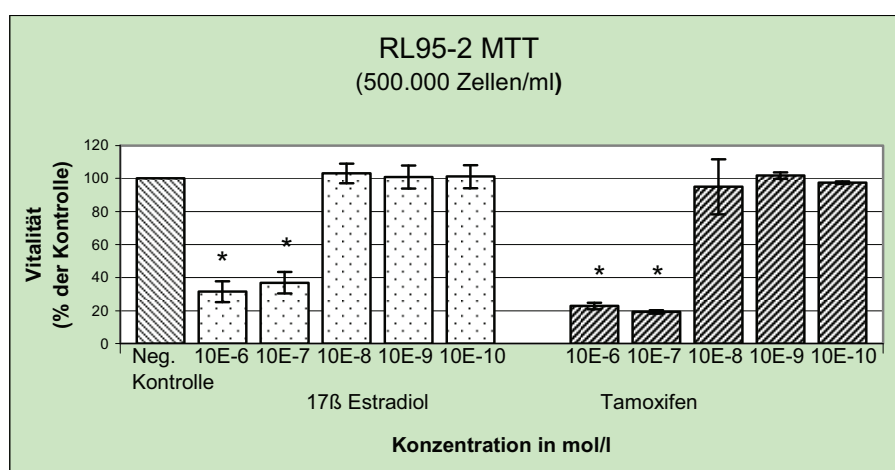


Abb. 21: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17 β -Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Vitalität der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanologischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.2.2. MTT-Test Ishikawa

In Abb. 22 wird die Hemmung des Zellwachstums der ER und PR positiven Endometriumkarzinomzellen bereits ab 5 $\mu\text{g/ml}$ Extraktkonzentration deutlich. In diesem Test fällt die Zellaktivität nahezu linear mit steigender Konzentration des Extraktes ab. Bei 500 $\mu\text{g/ml}$ wird wiederum die höchste Vitalitätsabnahme mit einem Wert von 57,47 % erreicht.

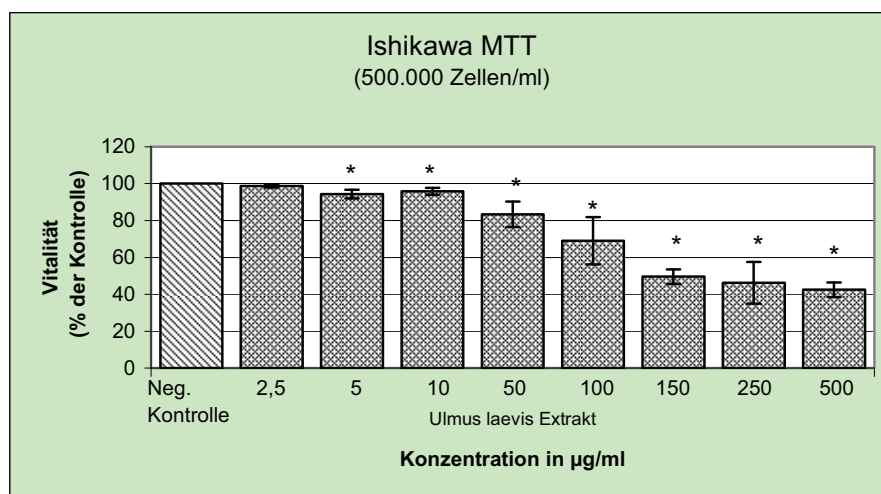


Abb. 22: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (MTT Test) auf die Vitalität der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Nach Zusatz von 17β -Estradiol ließen sich die Ishikawa Zellen in ihrem Wachstum nicht signifikant stimulieren. Unter Applikation von Tamoxifen in den Konzentrationen $10E-6$ mol/l und $10E-7$ mol/l sank die Aktivität der Zellen um max. 83,24 % (Abb. 23).

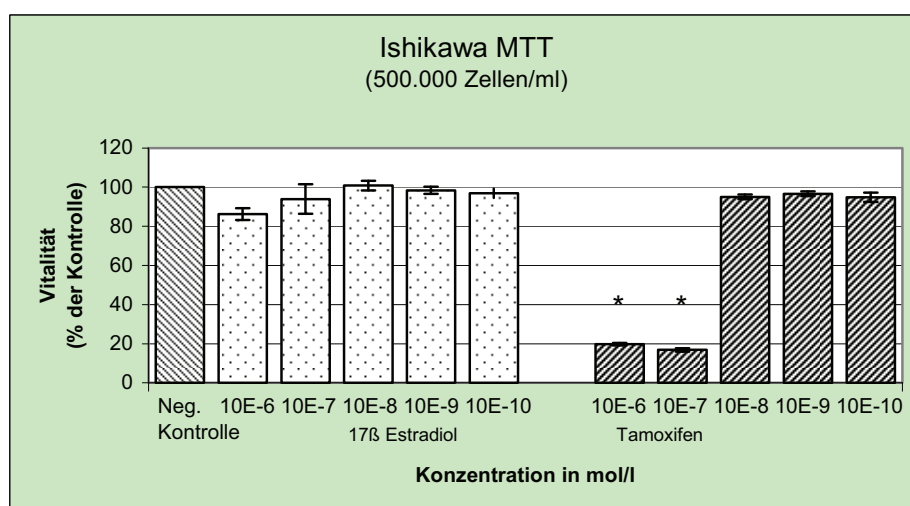


Abb. 23: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17β -Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Vitalität der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.3. BrdU-Test Mammakarzinomzellen

Im Folgenden wird auf die Wirkungen des Extraktes, sowie des 17β -Estradiols und Tamoxifens auf die Mammakarzinomzelllinien eingegangen. Es wird graphisch die Proliferation der Zellen im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle dargestellt.

4.3.1. BrdU-Test MCF-7

Das Wachstumsverhalten der MCF-7 Zellen zeigt, wie schon im MTT-Test, einen Rückgang der Zellpopulation. Diese setzt bereits bei geringeren Konzentrationen ein, wobei eine signifikante Verminderung ab 5 $\mu\text{g/ml}$ Extrakt zu verzeichnen ist. Im Vergleich zur unbehandelten Negativ-Kontrolle zeigte die Konzentration 500 $\mu\text{g/ml}$ mit einer Hemmung des Zellwachstums um 38,1 % den größten Effekt. Jedoch unterscheidet sich diese nicht wesentlich von den Effekten geringerer Konzentrationen. So kommt es unter Einfluss von 10 $\mu\text{g/ml}$ Extrakt zu einer Proliferationshemmung von 29,72 %, obwohl der Extraktzusatz 50 fach geringer konzentriert ist.

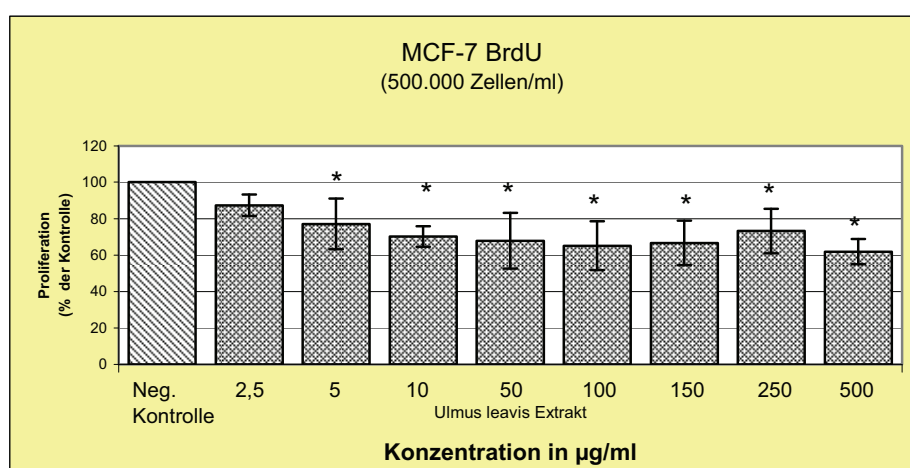


Abb. 24: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (BrdU Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanologischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die Zellen ließen sich in allen Einzelversuchen durch 17β -Estradiol stimulieren, wobei die Wachstumssteigerung in Bezug zur Neg. Kontrolle zwischen 5,32 % und 127,94 % für die Konzentration $10\text{E-}6$ mol/l betrugen (nicht dargestellt). Da sich daraus eine sehr hohe Standardabweichung ergibt, stellt der Mittelwert der Einzelversuche trotz der Gesamtstimulation des Wachstums von 43,6 % keine signifikante Proliferation dar (Abb.25). Ebenfalls waren unter Einfluss der Konzentrationen $10\text{E-}6$ mol/l und $10\text{E-}8$ mol/l,

jeweils in den Einzelversuchen deutliche Zunahmen der Zellzahl im Vergleich zur Negativ-Kontrolle zu beobachten. Dennoch resultiert auch hier in der Summe aller Tests keine signifikante Stimulation.

Besonders hoch ist wiederum die Abnahme der Zellzahl unter Einfluss des Tamoxifens in den Konzentrationen $10\text{E-}6$ mol/l (Verringerung um 82,09 %) und $10\text{E-}7$ mol/l (Verringerung um 84,32 %), wie in Abb. 25 dargestellt.

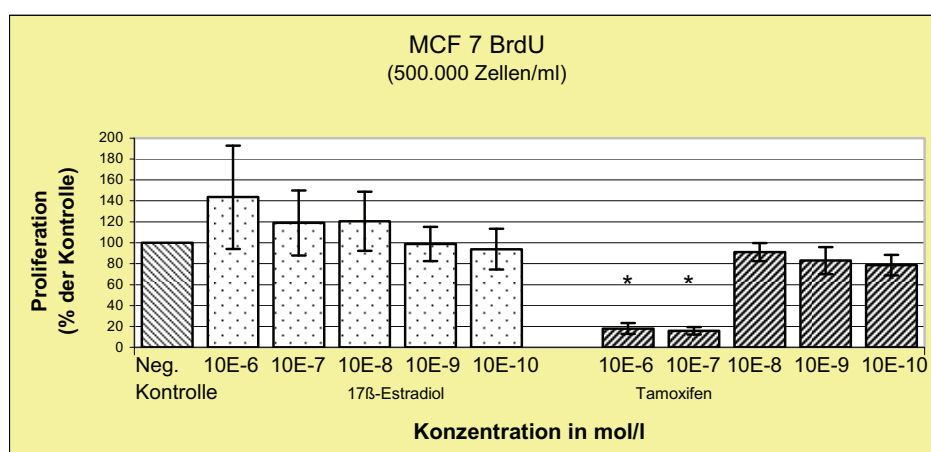


Abb. 25: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17β -Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanologischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.3.2. BrdU-Test HCC-70

Die Brustkrebszelle HCC-70 reagiert im BrdU Test mit einer signifikanten Verminderung des Wachstums durch die Inkubation mit den Extraktkonzentrationen $5 \mu\text{g/ml}$ bis $500 \mu\text{g/ml}$. Die maximale Hemmung tritt bei $500 \mu\text{g/ml}$ mit 45,92 % im Vergleich zur Negativ-Kontrolle ein.

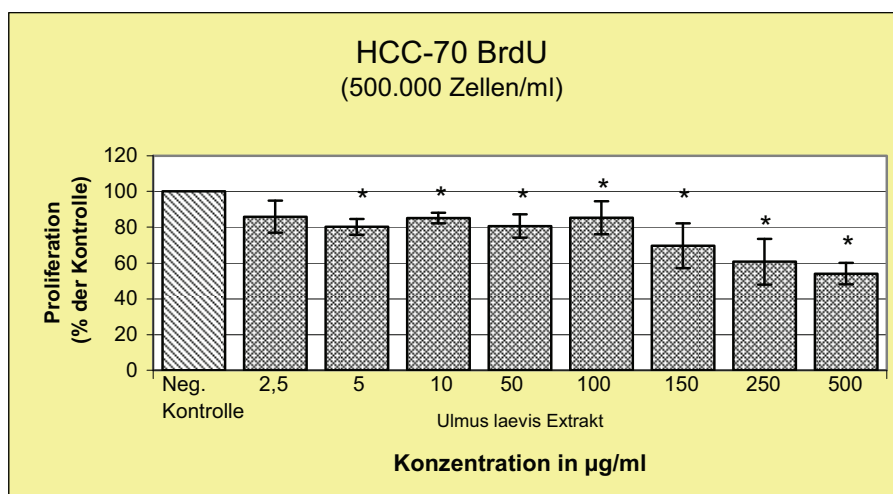


Abb. 26: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (BrdU Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie HCC-70 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolschen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die HCC-70 Zellen zeigten die Tendenz, sich durch mittlere Estradiol Konzentrationen, wie z.B. $10E-8$ mol/l, im Wachstum signifikant stimulieren zu lassen. Jeweils kleinere und größere Konzentrationen als $10E-8$ mol/l zeigten keine bzw. nur kleine proliferativen Effekte auf das Zellwachstum (Abb. 27).

Tamoxifen konnte in allen verwendeten Konzentrationen eine Hemmung erzielen. Eine massive Abnahme der Zellpopulation fand unter Einfluss der Konzentrationen $10E-6$ mol/l (89,53 %) und $10E-7$ mol/l (84,89 %) statt.

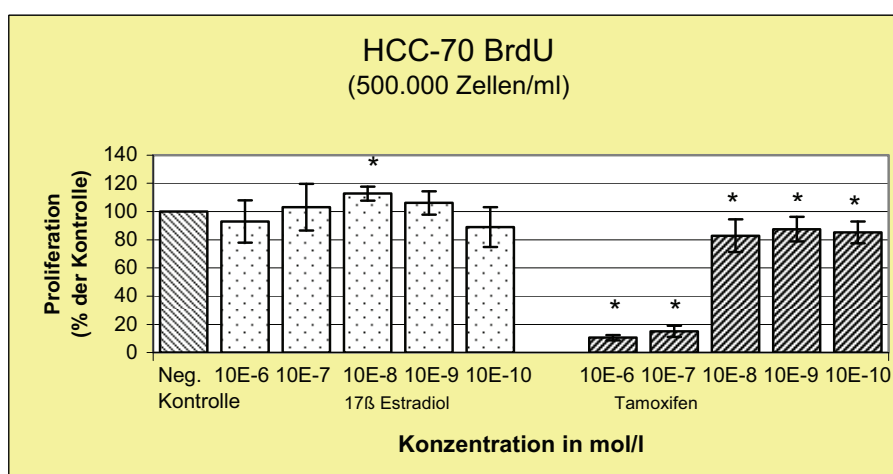


Abb. 27: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17β-Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Proliferation der Mammakarzinomzelllinie HCC-70 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolschen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.4. BrdU-Test Endometriumkarzinomzellen

4.4.1. BrdU-Test RL95-2

Die ER positive Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2 wurde im BrdU Test, insbesondere in den Konzentrationen 100-500 µg/ml Extrakt, signifikant in ihrem Wachstum gehemmt. Die Proliferation der Zellen verringerte sich unter Einfluss von 500 µg/ml am stärksten (Verringerung um 81,47 %). In Hinblick auf alle durchgeführten Experimente, zeigte sich die größte Inhibition durch das Ulmenrindenextrakt auf die Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2 (Abb. 28, 40).

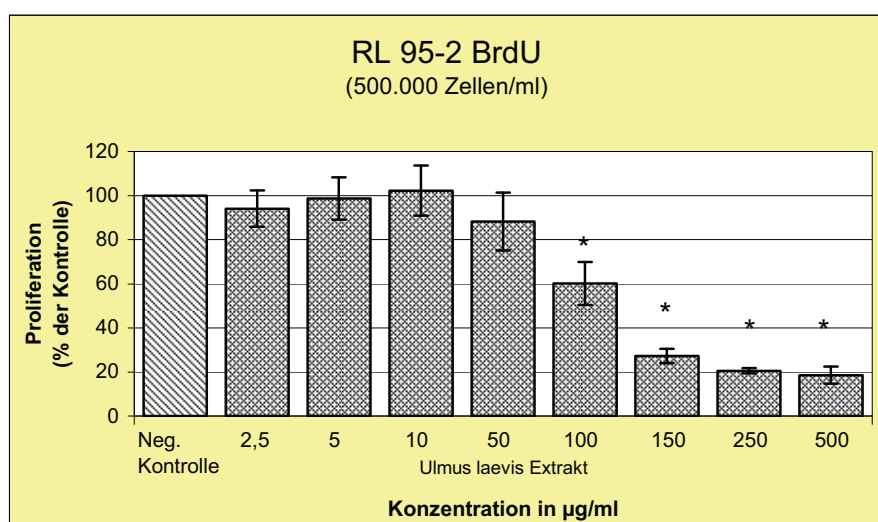


Abb. 28: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (BrdU Test) auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzelllinie RL 95-2 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Auch in diesem Test war die Konzentration von $10E-8$ mol/l Estradiol in der Lage eine signifikante Proliferationssteigerung der RL95-2 Zellen zu erreichen. Diese beträgt im Vergleich zur Negativ-Kontrolle 53,91 %. Alle anderen genutzten Konzentrationen wirkten ebenfalls stimulierend, wiesen allerdings durch die hohe Standardabweichung bedingt, keine signifikanten Unterschiede zur Negativ-Kontrolle auf.

Tamoxifen wirkte in den beiden höchsten Konzentrationen stark reduzierend auf das Zellwachstum. Die Konzentration von $10E-6$ mol/l wirkte zu 84,08 % und $10E-7$ mol/l zu 80,74 % wachstumshemmend.

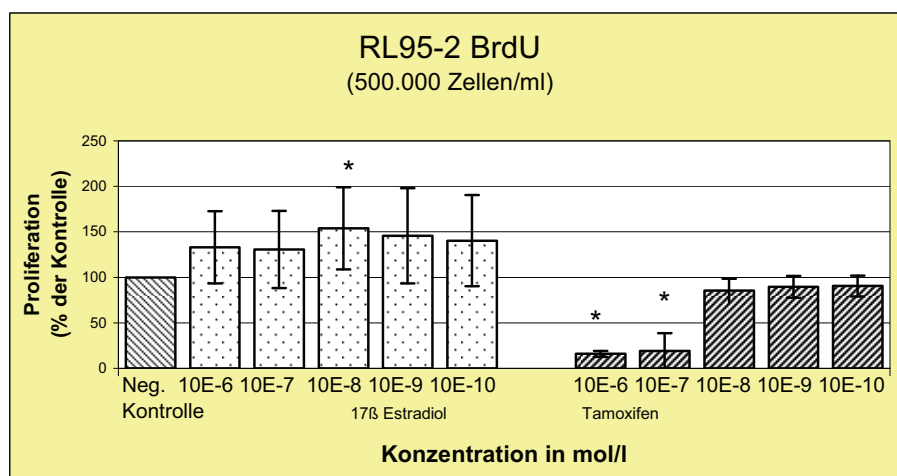


Abb. 29: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17β-Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzelllinie RL 95-2 nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.4.2. BrdU-Test Ishikawa

Im BrdU-Test konnte bei der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa, wie in Abb. 25 sichtbar, keine Extraktkonzentration eine deutliche Wachstumshemmung bewirken. Einerseits wurde eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der Zellproliferation verzeichnet, andererseits konnte jedoch kein massiver Rückgang der Zellpopulation wie beispielsweise im MTT-Test beobachtet werden. Die größten Effekte wurden bei der am höchsten verwendeten Konzentration von 500 µg/ml Extrakt erzielt (Verminderung um 37,27 %). Die relativ hohen Standardabweichungen ergeben rechnerisch keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.

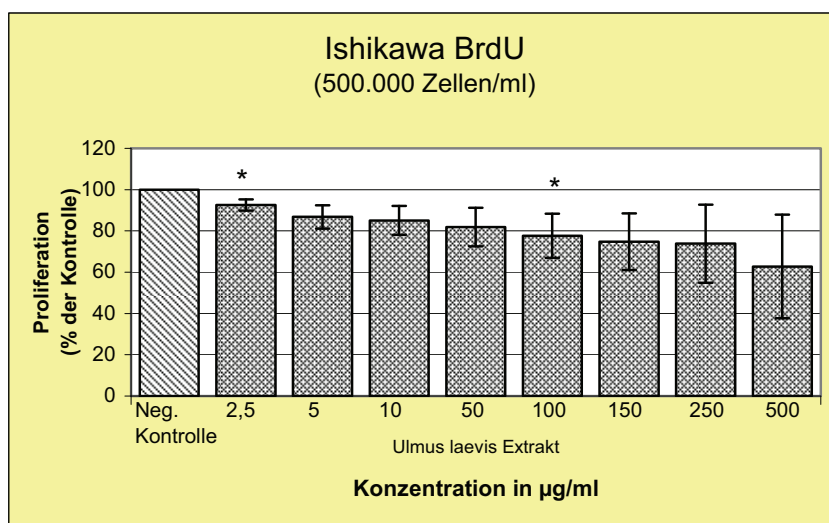


Abb. 30: Einfluss verschiedener Konzentrationen des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (BrdU Test) auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Eine Stimulation der Ishikawazellen konnte weder mit 17β Estradiol noch mit Tamoxifen verzeichnet werden. In hohen Konzentrationen ($10E-6$ mol/l und $10E-7$ mol/l) wirkt Tamoxifen stark proliferationsinhibierend (Abb 31).

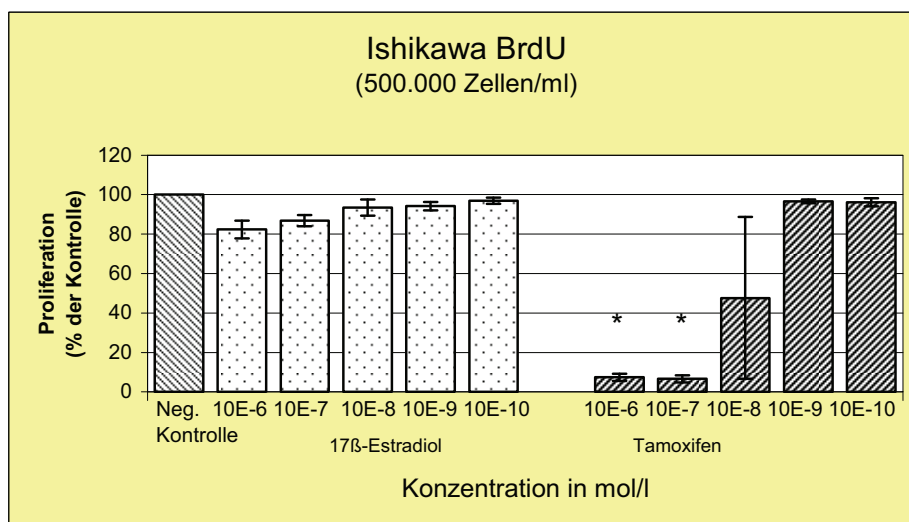


Abb. 31: Einfluss verschiedener Konzentrationen 17β -Estradiol und Tamoxifen (MTT Test) auf die Proliferation der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten ethanolischen Neg. Kontrolle. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.5. LDH-Zytotoxizitätstest Mammakarzinomzellen

Der hier genutzte Test dient der Bestimmung der Zellvitalität. Das durch tote Zellen freigesetzte Enzym Laktatdehydrogenase wird mit Antikörpern markiert und durch Substratreaktion dargestellt.

4.5.1. LDH-Test MCF-7

Die Mamakarzinomzelle MCF-7 wurde mit den Konzentrationen 2,5 µg/ml bis 500 µg/ml des Extraktes, analog zu den durchgeführten Tests MTT und BrdU, inkubiert. Im Vergleich zur 100 % gesetzten Kontrolle mit maximaler Zellzerstörung durch Triton X-100, wurde die Zelltötung des Extraktes ermittelt. Die Konzentration 250 µg/ml erbrachte eine Zellletalität von 17,4 %. Eine Zellschädigung von 28,01 % wurde durch 500 µg/ml verursacht. Alle anderen getesteten Konzentrationen ergaben keine messbare Zelltötung.

Die in gleicher Weise mitgeführte Kontrolle von 17β-Estradiol ergab in keiner der getesteten Konzentrationen 10E-6 mol/l bis 10E-10 mol/l eine LDH Freisetzung und somit keine Zellschädigung. Tamoxifen wirkte in der Konzentration 10E-6 mol/l zu 49,48 % und in der Konzentration 10E-7 mol/l zu 52,36 % zytotoxisch.

4.5.2. LDH-Test HCC-70

Die Brustkrebszellen HCC-70 zeigten unter dem Einfluss des Extraktes eine Letalität von 12,56% bei einer Konzentration von 2,5 µg/ml bis zu 48,65 µg/ml bei 500 µg/ml. Es deutet sich wie in der Abb. 27 sichtbar ein konzentrationsabhängiger Verlauf an. Niedrige Extraktkonzentrationen wirkten wenig zytotoxisch, während hohe Konzentrationen einen größeren Anteil der Zellen abtöten.

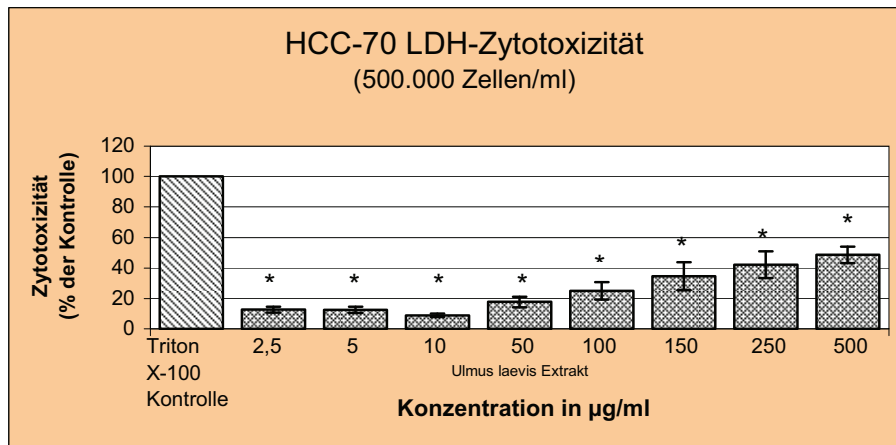


Abb. 32: Zytotoxische Effekte des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie HCC-70, nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten Kontrolle mit max. Zelldestruktion durch Triton X-100. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Unter 17β -Estradiol ergab sich in dieser Testreihe eine geringe LDH-Freisetzung der Zellen und somit eine geringe Zelltötung in allen verwendeten Konzentrationen. Den größten Zelltod bewirkte die Konzentration $10E-9$ mol/l mit 16,55 % Zelldestruktion. Tamoxifen zeigte eine massive Zytotoxizität in den Konzentrationen $10E-6$ mol/l, $10E-7$ mol/l, $10E-8$ mol/l, mit maximalen Werten von 78,29 % Zelltod. $10E-9$ mol/l und $10E-10$ mol/l wiesen, wie in Abb. 28 sichtbar, nur geringe Effekte auf die Vitalität der Zellen auf.

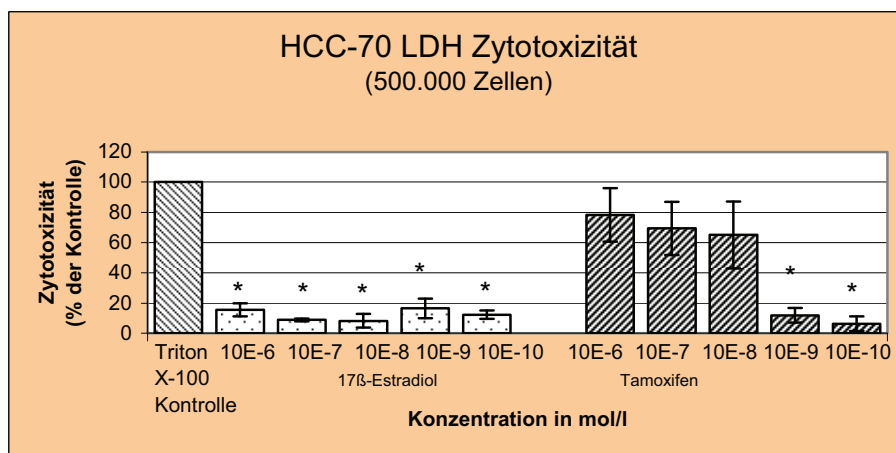


Abb. 33: Zytotoxische Effekte von 17β -Estradiol und Tamoxifen (LDH-Test) auf die Mammakarzinomzelllinie HCC-70, nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten Kontrolle mit max. Zelldestruktion durch Triton X-100. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.6. LDH-Zytotoxizitätstest Endometriumkarzinomzellen

4.6.1. LDH-Test RL95-2

Das Extrakt wirkte nur sehr gering zytotoxisch auf die RL95-2 Zellen. Alle Konzentrationen unterscheiden sich signifikant von der Triton X-100 Kontrolle. In der getesteten Bandbreite der Konzentrationen sind untereinander, wie in Abb. 34 sichtbar, keine stark differierenden Effekte auf die Zellvitalität sichtbar. Mit einer Zytotoxizität von 13,9 % hatte die Konzentration von 500 µg/ml den größten Einfluss auf die RL95-2 Zellen.

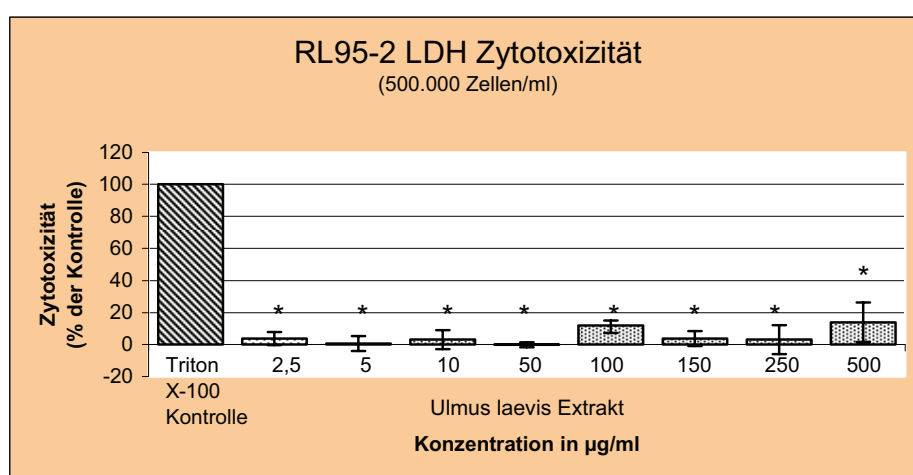


Abb. 34: Zytotoxische Effekte des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (LDH-Test) auf die Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2, nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten Kontrolle mit max. Zerstörung durch Triton X-100. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Das 17 β -Estradiol hatte in diesem Versuch nur geringen Einfluss auf die Zellletalität. Dieses wird im Diagramm Abb. 35 deutlich. Keine der Konzentrationen bewirkte einen Zelltod über 14,8 % (10E-7 mol/l), im Vergleich zur maximalen LDH Freisetzung. Tamoxifen zeigte einen konzentrationsabhängigen zytotoxischen Effekt, wobei 10E-6 mol/l die Zellen zu 66,2 % (max.) und 10E-10 mol/l die Zellen zu 6,88 % (min.) abtöten.

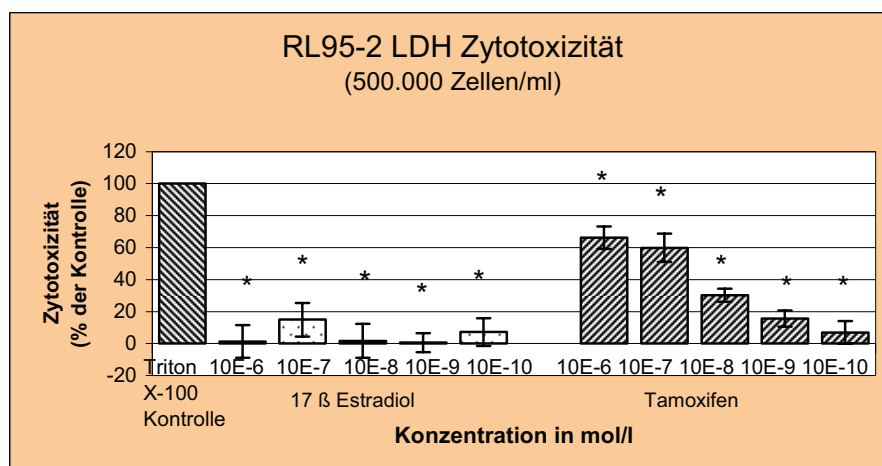


Abb. 35: Zytotoxische Effekte von 17β-Estradiol und Tamoxifen (LDH-Test) auf die Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2, nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten Kontrolle mit max. Zelldestruktion durch Triton X-100. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der Neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4.6.2. LDH-Test Ishikawa

Auch bei dieser Testreihe wirkte das *Ulmus laevis* Extrakt konzentrationsabhängig gering zytotoxisch. Den größten Zelltod provozierte dabei die Konzentration 500 µg/ml mit 23,28 % im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Abb. 36).

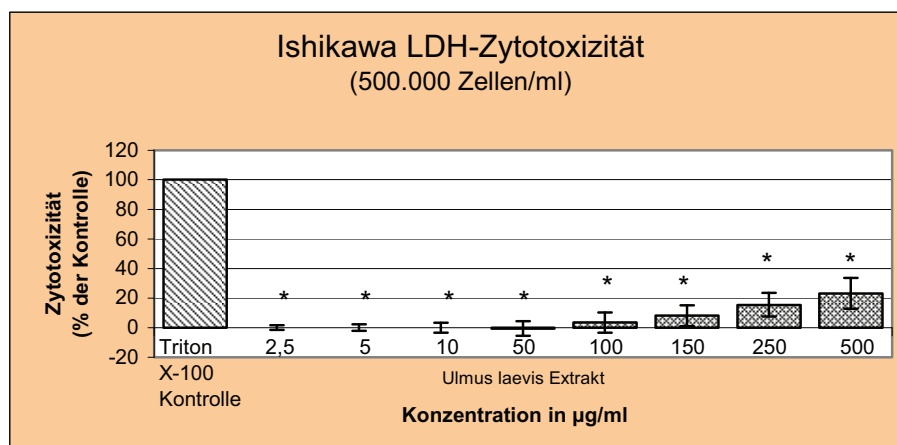


Abb. 36: Zytotoxische Effekte des *Ulmus laevis* Rindenextraktes (LDH-Test) auf die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa, nach 48 h Inkubationszeit, in Bezug zur 100% gesetzten Kontrolle mit max. Zelldestruktion durch Triton X-100. Alle Werte mit $P < 0,05$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 5\%$) unterscheiden sich signifikant von der neg. Kontrolle und sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Durch 17β-Estradiol konnte in keiner Konzentration ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Durch Tamoxifen kam es in den hohen Konzentrationen zu einer massiven

Zellreduktion. Unter dem Einfluss von $10\text{E-}6 \text{ mol/l}$ wurden 82,13 % und unter $10\text{E-}7 \text{ mol/l}$ 75,09 % aller Zellen abgetötet (graphisch nicht dargestellt). Die Konzentration von $10\text{E-}8 \text{ mol/l}$ senkte die Zellpopulation um 10 %, während keine Zellverminderung bei $10\text{E-}9 \text{ mol/l}$ und $10\text{E-}10 \text{ mol/l}$ zu beobachten war.

4.7. Lichtmikroskopische Auswertung des Zellwachstums

Am Beispiel der Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2 soll hier die lichtmikroskopische Verlaufskontrolle unter Einfluss des *Ulmus laevis* Extraktes dargestellt werden. Diese Kontrolle dient der visuellen Beurteilung des Wachstumsverhaltens nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Extraktes (Abb. 37).

Die extraktfreie Negativ-Kontrolle zeigt einen geschlossenen Zellrasen und ein homogenes Wachstumsmuster. Auch die Zellen unter den Extraktkonzentrationen $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$ und $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$ zeigen einen nahezu geschlossenen Zellverband, jedoch sind bereits Verluste von Zell-Zell-Kontakten sichtbar, was an den leichten Spaltbildungen zwischen den Zellen erkennbar ist. Eine Zunahme dieser Spaltbildung und ein “aufreißen“ des Zellrasens ist deutlich bei einer Konzentration von $150 \text{ }\mu\text{g/ml}$ zu erkennen. Dieser Prozess setzt sich bei $250 \text{ }\mu\text{g/ml}$ fort, verstärkt sich und führt außerdem zu einer sichtbaren Reduktion der Zellzahl. Bei der maximalen Extraktkonzentration von $500 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ist kein Zellverband zu erkennen. Es finden sich einzelne Zellen, welche eine abgekugelte Struktur haben. Im Wachstum befindliche Zellen suchen untereinander Kontakt und bilden Pseudopodien aus. Dieses Merkmal fehlt diesen Zellen.

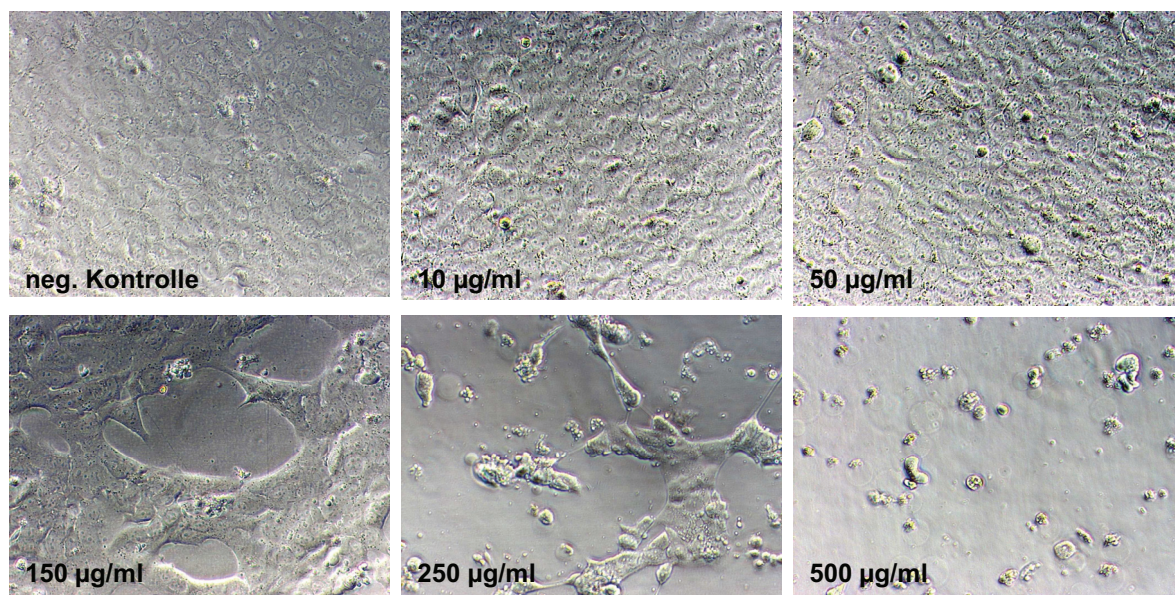


Abb. 37: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Endometriumkarzinomzellen RL95-2 bei 400 facher Vergrößerung nach Inkubation mit *Ulmus laevis* Extrakt nach 48h. Die auf den Abbildungen verzeichneten Konzentrationen stellen die Inkubationskonzentration dar.

4.8. Massenspektrometrische Auswertung des *Ulmus laevis* Extraktes

In der durchgeführten Massenspektrometrie konnten die Hauptklassen der im Extrakt enthaltenen Substanzklassen bestimmt werden. In Abb. 38 sind die mengenmäßig am häufigsten aufgetretenen Gruppen logarithmisch dargestellt. Den größten Anteil stellen hier die Triterpene und Sterole (STER) oder auch Phytosterine mit 64,9 % dar. Mit ca. 11,19 % stellen die Phytoestrogene, welche als Zusammenfassung der Fraktionen Phenole/Lignin Monomere, Lignane, Lignan Dimere und Flavonoide (PHLM+LIGN+LDIM+FLAV) dargestellt wurden, den zweitgrößten Anteil. Die freien Fettsäuren (FATA) folgen mit 9,5 % als drittgrößte Gruppe. Weniger stark vertretene Substanzklassen sind Lipide (LIPI), Alkylaromaten (ALKY), heterozyklische Stickstoffverbindungen (NCOM), Peptide (PEPT), Suberine (SUBE) und Kohlenhydrate (CHYD).

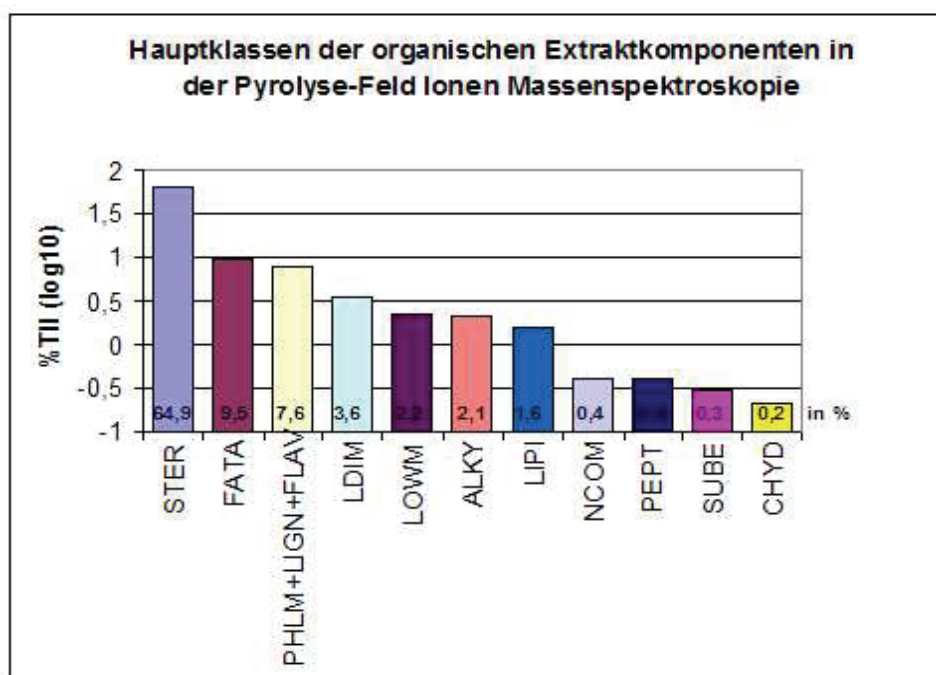


Abb. 38: Hauptklassen der organischen Extraktkomponenten in der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie. Alle Inhaltsstoffe sind als log10 der totalen Ionen-Intensität in % dargestellt. Die mengenmäßigen Anteile wurden jeweils in Prozent an die Basis jeden Balkens notiert.

Sterols and triterpenes=STER; free fatty acids=FATA; phytoestrogens (phenols and lignin monomers=PHLM; lignans=LIGN; flavonoids=FLAV; lignin dimers=LDIM); low molecular mass signals (m/z 15...56)=LOWM; alkyl aromatics=ALKY; Lipide=LIPI; heterocyclic nitrogen containing compounds=NCOM; peptides=PEPT; suberin=SUBE; carbohydrates=CHYD.

5. Diskussion

5.1. Wirkungen des Extraktes auf die Zelllinien im Vergleich

Der MTT-Test wurde in dieser Arbeit als Verfahren zur Messung der Mitochondrienaktivität der Zellen genutzt. Somit können Aussagen über die Vitalität der untersuchten Zellen getätigt werden. Durch den BrdU Test kann die Menge an wachstumsaktiven Zellen bestimmt werden. Beide Tests sind ein Maß für die Proliferation der Zellkulturen.

Im Vergleich aller getesteten Zelllinien wird deutlich, dass besonders die Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2 mit einer starken Einschränkung ihres Wachstums ab einer Konzentration von 50 µg/ml reagiert. Jeweils im MTT-Test und im BrdU Test (Abb. 39, 40) erreicht diese Zelllinie maximale Hemmwerte von ca. 80 %. Im BrdU Test verhalten sich die anderen Zelllinien sehr ähnlich. Es kommt zunächst zu einem kontinuierlichen Abfall der Zellzahl mit einem Endpunkt, welcher um eine Populationsgröße von 60 % tendiert. Dagegen zeigte sich im MTT-Test anfänglich ein ähnliches Verhalten, wobei die Endpunkte variierten. Bei der Mammakarzinomzelllinie BT-20 zeigten sich die geringsten Hemmeffekte (Abb. 39). Bei dieser ER-negativen Zelllinie sind keine signifikanten Proliferationshemmungen oder Induktionen zu beobachten gewesen. Dieses lässt den Schluss zu, dass die Wachstumshemmungen der anderen Zelllinien, zumindest zu einem wesentlichen Anteil, über den ER gesteuert werden. Allen ER-positiven Zelllinien ist gemein, dass sie bei Inkubation mit höheren Konzentrationen des Extraktes ein Wachstumsplateau erreichen, unabhängig davon, wie groß die vorhandene Zellpopulation ist. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass die Wirksamkeit des Extraktes ab einer Konzentration von ca. 150-250 µg/ml nachlässt bzw. keine wesentlichen Veränderungen mehr erzielt werden.

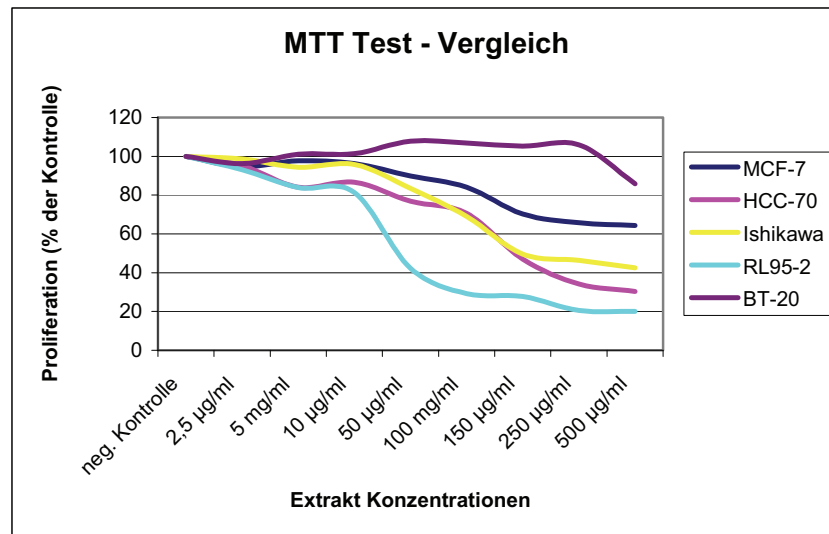


Abb. 39: Vergleichsdarstellung der Mammakarzinomzelllinien MCF-7, HCC-70 und BT-20 mit den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und RL-95-2 im MTT-Test.

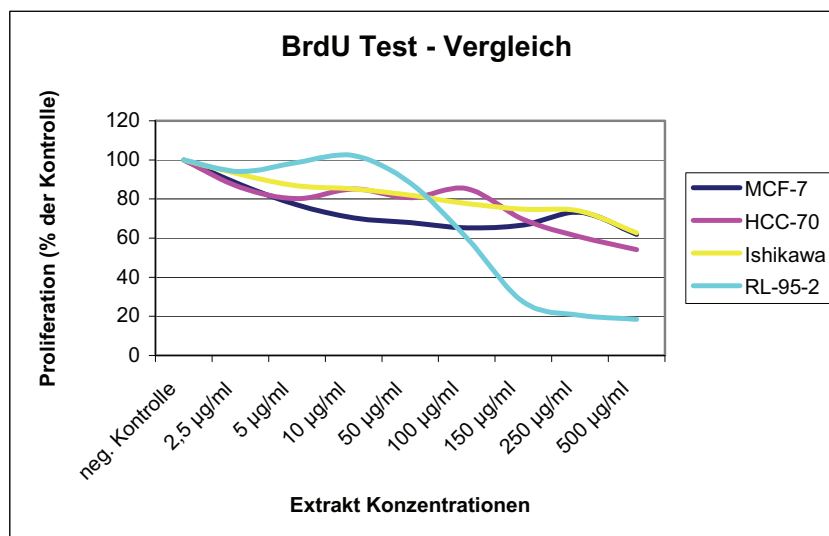


Abb. 40: Vergleichsdarstellung der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und HCC-70 mit den Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und RL95-2 im BrdU-Test.

Es stellt sich nun die Frage, warum besonders die Endometriumzelllinie RL95-2 die größte Hemmung, im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, aufweist. Um diese Frage zu beantworten, lassen sich nur Vermutungen anstellen. So ist denkbar, dass durch das Vorhandensein von Mikrovilli an der Oberfläche mit ausgeprägten Aktinfilamenten, wie sie nur bei dieser Zelllinie beschrieben worden sind, die resorptiven Eigenschaften stärker

ausgeprägt sind als bei den anderen Zellen. Ist die aufzunehmende Substanz membrangängig, erhöht sich durch die größere Oberfläche die Resorptionskapazität deutlich. Das führt zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration und somit zu einem erhöhten Potential für regulatorische Prozesse.

Eine weitere These kann durch die Ergebnisse der Forschergruppe Ward et al. (2007) [106] in Betrachtung gezogen werden. In ihrer Arbeit untersuchten sie die Regulation des „forkhead“ Transkriptionsfaktors FOXO1, einem Mitglied der „Forkhead/winged helix family“. Dieser ist an verschiedensten Zellfunktionen, wie z.B. Zelldifferenzierung, Metabolismus und Zellüberleben beteiligt [31]. Außerdem stellt FOXO1 einen wesentlichen Faktor im Prozess der Dezidualisation der Gebärmutter dar. Hierbei ist der „crosstalk“ mit dem Progesteronrezeptor eine wichtige Eigenschaft [98]. Ward et al. (2007) [106] stellten in ihrer Arbeit fest, dass die Endometriumkarzinomzelllinien Ishikawa und RL95-2 über eine signifikant geringere Expression des FOXO1 Factors verfügen als „normale“ humane Endometriumzellen. Wenn nun dieser „survival-factor“ vermindert ist, könnten sich Veränderungen in der Signaltransduktion mit dem Ziel der Differenzierung und Wachstumsstimulation, stärker auswirken. Dieses könnte insgesamt eine geringere Zunahme der Proliferation zur Folge haben.

Da es sich beim MTT und dem BrdU Test jeweils um Proliferationstests handelt, sollte man annehmen, dass die Ergebnisse im Vergleich identisch oder zumindest ähnlich sind. Tendenziell trifft dieses auch zu, denn alle Zelllinien zeigen mit ansteigender Konzentration des Extraktes eine Abnahme des Zellwachstums. Dennoch unterscheiden sich die Endpunkte des Wachstums im Verlaufe der Konzentrationssteigerung. Besonders deutlich wird dies am Beispiel der Zelllinie HCC-70. So differiert die Proliferation zwischen MTT- und BrdU-Test bei einer Konzentration von 500 µg/ml um 24 %. Ursächlich für diese Variabilität ist einerseits der unterschiedliche experimentelle Ablauf, welcher jeweils einem anderen Protokollmanagement unterliegt, andererseits verändern äußere und innere Einflüsse wie Umgebungstemperatur, Luftfeuchte oder die Anzahl der Zellpassage das Ergebnis.

5.2. Zytotoxizität des *Ulmus laevis* Extraktes

Im Vergleich der getesteten Zelllinien untereinander stellt sich die Zytotoxizität des Extraktes auf die Zellvitalität unterschiedlich dar. Während die Zelllinien MCF-7, Ishikawa und RL95-2 erst in Konzentrationen ab 150 µg/ml zunehmend absterben, beginnt eine nahezu lineare Steigerung der Zelltötung bei HCC-70 bereits ab 10 µg/ml (Abb. 32). Hier wird das Maximum der Zytotoxizität mit 48,6% bei der höchsten getesteten Konzentration von 500 µg/ml beobachtet. Betrachtet man die Ergebnisse der Proliferationstests MTT und BrdU wird klar, dass die „Hemmungseffekte“ der hohen Konzentrationen durch eine Zytotoxizität gestützt sind. Im Fall der Zelllinie HCC-70, würde sich die gezeigte Hemmung im BrdU- Test vollständig durch die Zytotoxizität des Extraktes erklären lassen, im MTT-Test jedoch nicht. Hier reicht die Zelltötung als alleiniger „Inhibitionsmechanismus“ nicht aus. Im Gegensatz dazu, erreicht die Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2 ein relativ geringes Zytotoxizitätsniveau. Erst bei 500 µg/ml steigt die Zelltötung auf 13,9 % (Abb. 34). Die dem gegenüberstehenden hohen Hemmungswerte der Proliferationstests zeigen, dass weitere inhibitorische Faktoren eine Rolle spielen.

Zytotoxische Effekte von Ulmenbestandteilen werden in der Literatur durch die Aktivierung von Apoptosemechanismen beschrieben. Durch die Induktion des „programmierten Zelltodes“ kommt es durch Caspasen zur Proteolyse von Zellproteinen, Veränderungen an der Zellmembran, Abbau der DNA und schließlich zur endgültigen Zerstörung der Zelle. Die frei werdende LDH wird in dem verwendeten Zytotoxizitätstest gemessen. Lee et al. (2005) [53] und Wang et al. (2004) [105] beschrieben die zytotoxischen Effekte von Ulmenbestandteilen durch Induktion der Apoptose.

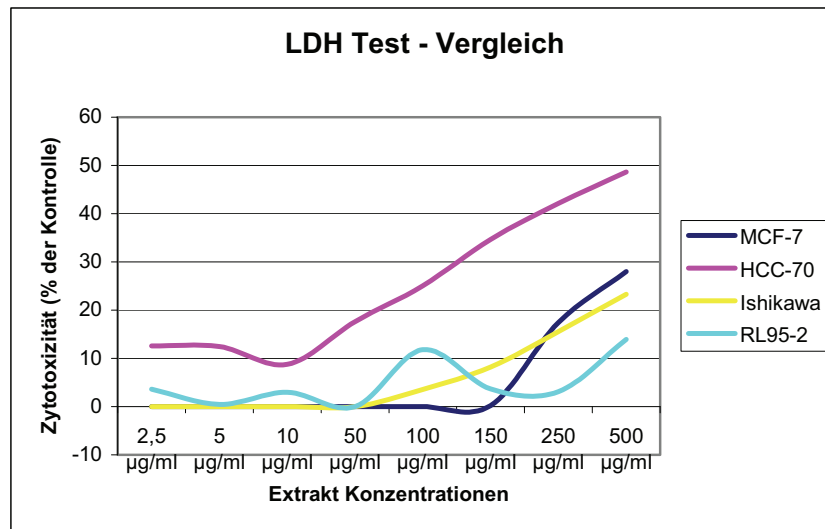


Abb. 41: Vergleichsdarstellung der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und HCC-70 mit den Endometrium-karzinomzelllinien Ishikawa und RL95-2 im LDH-Test.

5.3. Wirkungen des Estradiols und des Tamoxifens auf die Zelllinien

Das zur Positiv-Kontrolle eingesetzte 17β -Estradiol (E2) wirkt auf ER positive Zellen in hohen Konzentrationen zytotoxisch und in geringeren gewebeproliferierend [13, 22]. Dennoch sind die niedrigsten verwendeten Konzentrationen von $10E-10$ mol/l immer noch höher als im menschlichen Körper natürlich zirkulierend. In keinem der durchgeführten MTT-Tests konnte eine signifikante Stimulation durch E2 nachgewiesen werden. Die Zelllinien RL95-2 und HCC-70 zeigten unter dem Einfluss von E2 in den Konzentrationen $10E-6$ mol/l und $10E-7$ mol/l eine Verminderung des Wachstums. Es ist bekannt, dass es unter Hormonüberschuss zur Rezeptor-Downregulation und damit zur Rezeptorinternalisierung in die Zelle kommt, wodurch das Wachstum verringert wird.

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der BrdU-Tests, in welchen sich die Zelllinien RL95-2, HCC-70 und MCF-7 durch E2 stimulieren ließen. Insbesondere RL95-2 zeigt eine massive Erhöhung des Zellwachstums, was auf einen hohen ER Status hinweist. Da RL95-2, laut Tumorzellbank ATCC, eine größere Oberfläche als alle anderen getesteten Zellen besitzt, erreicht sie vermutlich eine höhere Aufnahmekapazität für E2. Es gibt in der Literatur keine Hinweise darauf, dass der BrdU Test gegenüber dem MTT Test eine höhere oder niedrigere Sensitivität aufweist. Somit lassen sich nur Vermutungen anstellen, warum es im MTT Test nicht zu einer Proliferationssteigerung kam. Die Tests sind zeitlich

voneinander unabhängig durchgeführt worden, wodurch sich natürliche, beeinflussende Faktoren ergeben, wie z.B. eine andere Passage der Zelllinie. Daraus resultieren Unterschiede beispielsweise im Rezeptorstatus, welcher in seiner Anwesenheit aber nicht in seiner Anzahl konstant bleibt. Insgesamt scheint die Inkubationszeit mit E2 relativ kurz, um eine konstante Steigerung der Proliferation zu erreichen. Dem zugrunde liegen Wachstumsprozesse, welche zunächst auf genetischer Ebene induziert werden müssen. Liu et al. (2002) [59] beschrieb weiterhin, dass E2 über den α -Rezeptor zwar stimulierend wirken kann, jedoch über den β -Rezeptor auch eine wachstumshemmende Wirkung möglich ist. Dieses geschieht über die Regulation der Expression von Schlüsselgenen des Zellzyklus, wie z.B. dem Cyclin D. Dadurch könnte eine Unterdrückung der Proliferation in den verschiedenen Tests erklärt werden.

Tamoxifen als Antiöstrogen senkt das Wachstum bei Mammakarzinomzellen und erhöht die Proliferationsrate bei Endometriumkarzinomzellen [32, 42]. Die hohen Konzentrationen wirkten wie erwartet stark zytotoxisch auf die Zellen. In niedrigen Konzentrationen konnten keine signifikante Beeinflussung des Zellwachstums festgestellt werden. Diese Ergebnisse finden sich in allen durchgeführten Tests wieder.

5.4. Wirkungsweisen der Ulmeninhaltsstoffe

Die meisten diagnostizierten malignen Brust- und Endometriumtumoren, weisen einen positiven ER und PR Status auf. Diese Eigenschaften sollten durch die ausgewählten Zellkulturen repräsentiert werden. Estrogen Rezeptoren sind bestimmende Faktoren in der Wachstumsstimulation. So bestand die Möglichkeit, die Zellen durch die mitgeführten Estradiol Kontrollen auf ein hormonelles Ansprechen zu testen.

Die Mammakarzinomzellen MCF-7 und HCC-70, sowie die Endometriumkarzinomzelllinien RL95-2 und Ishikawa, sind weitläufig genutzte und gut untersuchte Zelllinien, welche über Estrogenrezeptoren verfügen. Frühere immunhistochemische Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigten das Vorhandensein von ER α und ER β , sowie Progesteronrezeptoren in MCF-7 Zellen (M. Szewczyk, Diplomarbeit, 2007). Ebenso wurde das Fehlen von Estrogen und Progesteron Oberflächenrezeptoren bei der Mammakarzinomzelllinie BT-20 bestätigt (S. Gailus, Diplomarbeit, 2006).

Insgesamt stellt der Anteil, der im Extrakt enthaltenen Phytoestrogene mit 11,19 %, die zweitgrößte Gruppe dar. Es ist davon auszugehen, dass die Phytoestrogene in Form von Lignanen und Flavonoiden, den Zellzyklus über den ER β beeinflussen können. Der direkte Weg durch die Aktivierung von nukleären Rezeptoren, wie in Abb. 6 dargestellt erfordert zunächst eine Genaktivierung. Daraus resultiert eine Verzögerung der Wachstumsregulation.

Neben diesem klassischen Weg werden in der Literatur „nichtgenomische“ Effekte des Estradiols diskutiert. Hinweisend dafür sind Beobachtungen, dass die Effekte durch Estradiol bereits nach kurzer Zeit auftraten. Es ist daher auszuschließen, dass sie über eine transkriptionelle Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen und Wachstumsfaktorgenen ausgelöst worden sind [36]. So konnte Migliaccio et al. (1996) in Studien am Modell von MCF-7 Mammakarzinomzellen nachweisen, dass durch einen Östrogenstimulus eine schnelle Aktivierung des MAP-Kinase (ERK-1/2) Weges ausgelöst werden kann [68].

In den durchgeführten Experimenten zeigten sich insbesondere im BrdU-Test deutliche Proliferationsraten unter Estradioleinfluss bereits nach 48 Stunden Inkubation (Abb. 27, 29, 25). Dies lässt auf sogenannte „nichtgenomische“ kurze Signaltransduktionen schließen, welche zu einer Wachstumssteigerung unter E2 geführt haben. Es ist ebenfalls vorstellbar, dass durch die antagonistische Wirkung der im Extrakt enthaltenen Phytoestrogenen diese Signalwege verlangsamt oder unterbunden werden können.

Auch andere Inhaltsstoffe der Ulme haben neben den Phytoestrogenen das Potential regulierend auf das Zellwachstum einzuwirken. Lee et al. (2005) [53] isolierten ein Glycoprotein G-120 aus der Ulmenart *Ulmus davidiana* Nakai (UDN), welches signifikant die Proliferation von MCF-7 Zellen inhibierte. Sie konnten nachweisen, dass die Fraktion G-120 die Bindung von NF- κ B, einem wesentlichen Signaltransduktionsprotein, an die DNA verhinderte. Darüber hinaus verminderte G-120 die Expression von c-Jun, Fra-1 und Fra-2. Innerhalb des Zellkerns stellen diese Proteine Glieder in der Kette der Informationsübertragung zur DNA dar.

Weitere mögliche Wirkstoffe sind Mykotoxine in Form von Zearalenone bzw. α -Zearalenol, dem Estradiol strukturell sehr ähnlichen Stoffen. Sie besitzen eine hohe Bindungsfähigkeit an die Estrogenrezeptoren α und β . Gray et al. (2004) [29] konnten dieses von Pilzen produzierte Phytoestrogen (Abb. 1), an den Wurzeln des amerikanischen und asiatischen

Ginsengs nachweisen. Eine genaue Wirkungsweise konnte nicht beschrieben werden. Allerdings kann vermutet werden, dass sich solche oder ähnliche Mykotoxine auch an anderen pflanzlichen Bestandteilen befinden, und Einfluss auf die Effekte von Extrakten haben könnten.

Eine besondere Rolle in der Wachstumsbeeinflussung von menschlichen Tumorzellen scheinen sekundäre Naturstoffe aus der Gruppe der Terpene zu spielen. Die in dieser Arbeit durchgeführte Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie identifizierte eine große Anzahl an Triterpene und Sterole. Diese Gruppe bildet mit 64,9 % den mengenmäßig größten Anteil aller im Extrakt enthaltenen Stoffe. Insgesamt sind die Terpene, wie in der Einleitung beschrieben, sehr heterogene Substanzen und weisen eine Vielzahl Untergruppen auf. Die größte Untergruppe mit 3000 chemischen Verbindungen stellen die Sesquiterpene dar. Zu diesen gehören z.B. die Substanzen Mansonone E und F. Die Forschergruppe Wang et al. (2004) [105] isolierten diese beiden Substanzen aus der Wurzelrinde einer *Ulmus pumila*. Sie untersuchten die Wirkung dieser beiden Stoffe u.a. auf die Zelllinie MCF-7, sowie weitere Tumorzelllinien. Es fanden sich deutliche Proliferationshemmungen, welche die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigen. Darüber hinaus stellte sich Mansonone F als potenter Inhibitor der humanen histiozytären Lymphomzelle U937 heraus. Die Wirksamkeit ist, nach Meinung der Forschergruppe Wang et al. (2004) [105], mit dem vielgenutzten Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil vergleichbar.

In Auswertung der durchgeführten Massenspektrometrie des Ulmenextraktes, konnten verschiedene Massensignale expliziten Substanzen zugeordnet werden: β -Sitosterol (m/z 414), Protoalnulin und Lupenon (m/z 424), Taraxerol, Anulin, β -Amyrin, Lupeol, Friedelin, Ilexol (m/z 426), Friedelinol, Moretenol (m/z 428) und Betulin (m/z 442). Es gibt eine Vielzahl an Literaturhinweisen über die estrogenen Wirkungen von Sterolen und Triterpenen. Ju et al. (2004) [43] untersuchte beispielsweise die estrogenen Effekte von β -Sitosterol und dessen Glykosiden *in vitro*. Diese Sterole waren in der Lage durch Estrogene induziertes Tumorstadium zu inhibieren und darüber hinaus das Estradiol Level im Serum zu senken.

Eingriffe in den Apoptosezyklus von humanen Zellen scheinen sich durch Inhaltsstoffe der Ulmengattungen zu bestätigen. In der *in vitro* Studie von Wang et al. (2004) [105] zeigte sich unter Einfluss des Mansonone E eine verminderte Expression des antiapoptotischen

Proteins Bcl-XL und Bcl-2, sowie eine Steigerung des pro-Apoptose Proteins Bax in HeLa Leberkarzinomzellen nach 24 Stunden Inkubation.

Bei dem aus der Rinde der Ulmenart *Ulmus davidana nakai* (UDN) isolierten, bisher nicht weiter identifizierten Glykoprotein G-120, zeigte sich ähnlich dem Mansonone E eine apoptotische Wirkung auf MCF-7 Zellen [53]. Auch sind Phytoestrogen in der Lage eine Apoptose zu induzieren. So zeigten Jo et al. (2005) [41] und Danbara et al. (2005) [16], dass durch ein Pflanzenextrakt bzw. Enterolacton, einem Phytoestrogen aus der Gruppe der Lignane, das Tumorsuppressorgen p53 verstärkt exprimiert wurde. Weiterhin kam es unter dem Einfluss von Enterolacton zur Induktion der Apoptose, indem der Apoptose-Suppressor Bcl-2 herab reguliert wurde. Ob eine Apoptose in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten stattfand ist nicht nachgewiesen. Jedoch sprechen die wachstumshemmenden Wirkungen des Extraktes dafür.

Die verschiedenen Ergebnisse aus zahlreichen Studien lassen den Schluss zu, dass Rindenbestandteile von Ulmen auf verschiedenste Weise in die Regulationsmechanismen von Tumorzellen eingreifen können.

5.5. Bedeutung und medizinisches Potential von *Ulmus laevis*

Derzeit werden Rindenbestandteile von Ulmen u. a. zur Herstellung „medizinischer Heiltees“ genutzt. So ist nach Überlieferungen aus der traditionellen chinesischen Medizin die Anwendung von Ulmenrindenbestandteilen bei Ödemen, Brustdrüsenentzündung, Magenkrebs und Magenentzündung heilsam [38, 40].

Einige dieser Teesorten wurden genauer untersucht, wobei „Essiac tea®“ (Hersteller: Essiac Canada International, Ottawa, Kanada) als Radikalfänger fungierte und Hydroxyl-Radikale bis zu 84% sowie Superoxid-Radikale bis zu 82 % reduzierte [55]. Die Untersucher schlossen daraus eine DNA-protektive Wirkung und somit Anti-Krebs Eigenschaften.

Eine andere *in vitro* Studie zeigte inhibitorische Effekte bei einer Prostatakarzinom-Zelllinie (LNCaP) [79]. Eine weitere bereits näher untersuchte Teesorte ist Flor Essence®. Dieser Tee enthält neben der Ulmenrinde (*Ulmus rubra*) sieben weitere Kräuter und zeigte bei *in vitro* Untersuchungen inhibitorische Effekte auf das Wachstum von verschiedenen Mammakarzinomzelllinien (MCF-7 und MDA-MB-468) [97].

Diese Ergebnisse scheinen aus medizinischer Sicht interessant, jedoch gibt es mindestens ebenso viele Studien, welche diesen Teesorten keine signifikante Wirkung bescheinigen [56, 23].

Es stellt sich die Frage, ob die in geringen Mengen enthaltenen Phytoestrogene in Form von Lignanen medizinisches Potential in der Behandlung von Krankheiten oder klimakterischen Beschwerden haben. Es existieren derzeit eine Vielzahl von Studien über die Sinnhaftigkeit des Einsatzes von Phytoestrogenen als Hormonersatztherapie bei klimakterischen Beschwerden. Die Nutzung antiöstrogener Effekte durch Phytoestrogene ist derzeit ein vieldiskutierter Sachverhalt. Bisher ist daraus noch keine verbindliche Empfehlung zum Einsatz von Phytoestrogenen entstanden. Die im *Ulmus laevis* enthaltenen Phytoestrogene stellen eine mengenmäßig geringe Anzahl an Inhaltsstoffen dar. Demzufolge scheint eine perspektivische Nutzung im Bezug auf die Hormonersatztherapie eher unwahrscheinlich.

Das vermutlich größte Potential der Ulme liegt in der direkten Beeinflussung des Wachstums hormonaktiver Tumoren. Nicht hormonaktive Zellen zeigten in den Untersuchungen der BT-20 Mammakarzinomzelllinie keine Effekte. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen, hat das Extrakt einen großen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen. Insbesondere die Endometriumkarzinomzellen reagierten durch starke Wachstumshemmungen, ohne dabei wesentlich zytotoxische Wirkungen zu zeigen. So könnten „normale“ Körperzellen geschützt und Tumorzellen selektiv in ihrem Wachstum gehemmt werden. Um eine Schädigung von gesunden Körperzellen auszuschließen, müssten diesbezügliche Experimente mit „nicht-Tumorzellen“ folgen.

6. Ausblick

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Zielsetzung und die ausgewählten Methoden sind der Grundlagenforschung zuzuordnen und beschäftigen sich mit der Auseinandersetzung, ob Zusammenhänge zwischen Inhaltsstoffen aus der Rinde der Flatterulme und dem Wachstum humaner hormonaktiver Karzinomzellen bestehen. Es wurden Aussagen zu der Wirksamkeit eines ethanolischen „Vielstoffgemisches“ getroffen. Um detaillierte Wege der Beeinflussung zu entschlüsseln, müssen entscheidende Komponenten isoliert werden und deren Mechanismen geklärt werden. Erst dann sind Aussagen möglich, ob eine Zusammenwirkung vieler oder einzelner Stoffe verantwortlich sind. Dazu wäre z.B. eine fraktionierte Chromatographie eine sinnvolle Methode, um die Stoffe entsprechend ihrer chemischen Polarität voneinander zu trennen. In weiteren Schritten kann eine erneute Massenspektrometrie der Fraktionen weitere Aufschlüsselung bringen. Folgende anschließende Untersuchungen sind möglich:

- Kombination von Tamoxifen oder Fulvestrant + Ulmenextrakt in niedrigen Dosierungen auf Mammakarzinomzelllinien, zur Beurteilung sich potenzierender oder beeinflussender Effekte
- Kombination von Ulmenextrakt oder fraktionierten Inhaltsstoffen mit Aromatasehemmern
- Testung einer Estrogenrezeptor negativen Zelllinie (BrdU/LDH)
- Untersuchung von Apoptosemechanismen
- Messung der Veränderung des ER Status unter Extrakt-Inkubation
- Messung des Ca^{2+} Influxes in die Zelle, zur Beurteilung von Second-Messenger Mechanismen
- Einfluss des Extraktes auf die Angiogenese bei Tumorzellen.

7. Zusammenfassung

Die Inzidenzen für gynäkologische Tumoren wie Brustkrebs oder Gebärmutterkrebs steigen weltweit. Die Ursachenforschung hat in den letzten Jahren und Jahrzehnten zwar große Fortschritte erzielt, jedoch liegen insbesondere molekulare Mechanismen der Entstehung von malignen Tumoren noch im Unklaren. Viele Wechselwirkungen der Rezeptoren untereinander sowie die Beziehungen zu den beeinflussenden Liganden, Faktoren und Co-Faktoren einer Signaltransduktion sind noch nicht vollständig verstanden. Um neue Therapiemöglichkeiten zu schaffen, wird in neuerer Zeit zunehmend versucht pflanzliche Wirkstoffquellen zu erschließen, welches wie das Beispiel Tamoxifen zeigt, durchaus lohnenswert ist.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Herstellung eines Ulmenextraktes aus der Rinde einer in Europa heimischen *Ulmus laevis* und dessen Testung auf das Wachstumsverhalten von Brust- und Gebärmutterkrebszellen *in vitro*. Zusätzlich konnte die Zytotoxizität des Gemisches auf die Zellen mittels LDH Test bestimmt werden. Um eine Qualifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe zu erhalten, wurde eine Massenspektrometrie durchgeführt. Als Hauptinhaltsstoffe wurden die Gruppen der Sterole, Fettsäuren und Phytoestrogenen klassifiziert. Darüber hinaus diverse geringanteilig vertretene Substanzklassen wie Alkylaromaten, Lipide, heterozyklische Stickstoffverbindungen, Suberine und Kohlenhydrate.

In der Vielzahl der nachgewiesenen Effekte durch Rindeninhaltsstoffe von Ulmen ist anzunehmen, dass nicht ein einzelner Stoff für die genannten Wirkungen verantwortlich ist, sondern vielmehr ein Zusammenspiel mehrerer, bekannter und noch unbekannter Stoffe entscheidend für die beschriebenen Effekte sind. Die diskutierten Quellen lassen verschiedene Mechanismen hinter den wachstumshemmenden Effekten des *Ulmus laevis* Extraktes vermuten. So sind unter anderem Apoptose, Senkung des Estradiol-Levels, Blockade der intrazellulären Signaltransduktion oder zytotoxische Effekte möglich. In Anbetracht der vorhandenen Studien in Bezug zu Ulmenrindenextrakten und deren Wirksamkeit auf humane Zellen, stehen die Forschungen noch am Anfang der Entwicklung. Es ist jedoch abzusehen, dass sich durch weitere Forschungsarbeit noch interessante Aspekte mit Hinblick auf medizinische Nutzbarkeit eröffnen lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich eine direkte Wirkung des *Ulmus laevis* Extraktes auf das Wachstum hormonaktiver Brustkrebs und Gebärmutterkrebszellen. Eine Inhibition ist sowohl bei den Mammakarzinomzellen HCC-70 als auch bei der MCF-7 Zelllinie im MTT und BrdU Test deutlich sichtbar. Die getestete Estrogen- und Progesteron-Rezeptor negative Zelllinie BT-20 zeigte entgegen den anderen Hormonrezeptor positiven Zelllinien keine signifikante Reduktion der Zellzahl. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Blockade der Signaltransduktion mittels Estrogenrezeptor eine wesentliche Rolle spielt. Eine Untersuchung der Endometriumzellen ergab noch eindrucksvollere Ergebnisse. Insbesondere die Endometriumkarzinomzelllinie RL95-2 zeigte eine starke Einschränkung ihrer Proliferation. Die Zelllinie Ishikawa reagiert ebenfalls deutlich mit einer Verminderung des Zellwachstums. Eine direkte zellschädigende Wirkung des Extraktes ist nur in den am höchsten verwendeten Konzentrationen nachgewiesen worden, wodurch der Schluss zugelassen werden kann, dass das Ulmenextrakt ein chemotherapeutisches bzw. präventives Potential, insbesondere auf die Behandlung des Endometriumkarzinoms, hat. Aussagen zu einer Nutzung des Extraktes sind jedoch zu diesem Zeitpunkt, bei derzeitigem Wissensstand über Wirkstoffe und Wirkmechanismen noch nicht möglich.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Adami, HO, Hunter, D, Trichopoulos, D (Hrsg): Textbook of Cancer Epidemiology. Oxford, Oxford University Press, (2002)
- [2] Adlerkreutz H, Bannwart C, Wahala T, Makela T, Brunow G, Hase T, arosemena PJ, Kellis JT, Vickery LE. Inhibition of human aromatase by lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* (1993) 44: 147-53
- [3] Adlerkreutz H, Gorbach S, Goldin B. Dietary phyto-estrogens and the menopause in Japan. *Lancet.* (1992) 339: 1233
- [4] Adlerkreutz H. Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest* 50/Suppl. 201 (1990) 3-23
- [5] Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh , Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* (1987) 262: 5592-5
- [6] Ariga T, Seki T.; Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. *Biofactors* (2006) 26(2):93-103
- [7] Barnes S. Evolution of the Health Benefits of Soy Isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med* (1998) 217(3):386-92
- [8] Bartha R, Griffiths K, Altwein JE. Auswirkungen der Ernährung auf das Mamma- und Prostatakarzinom. *PZ* 34 (1997) 11-9
- [9] Bermejo BP, Abad Martínez MJ, Silván Sen AM, Sanz Gómez A, Fernández Matellano L, Sánchez Contreras S, Díaz Lanza AM. In vivo and in vitro antiinflammatory activity of saikosaponins; *Life Sci.* (1998) 63(13):1147-56
- [10] Bitsch R. Pflanzliche Phenole und ihre gesundheitliche Wirkung. *VitaMinSpur* (1999) 14: 16-20
- [11] Brody LC, Biesecker BB. Breast cancer susceptibility genes. BRCA1 and BRCA2. *Medicine (Baltimore).* (1998) 77(3):208-26
- [12] Caragay, AB, cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technology* (1992) 65-68
- [13] Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Stone K, Browner W, Cummings SR. Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* (1999) 130: 270–277

- [14] Clementi W, Cross HS, Fischl F, Foth D, Foth G, Freude G, Huber JC, Jungbauer A, Kleine-Gunk B, Krenn L, Leodolter G, Metka M, Reuss F, Schindler AE, Tscherne G Konsensus. Pytoöstrogene. (2005) Frauenarzt 46(11): 996-998
- [15] Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, Mc Grath J, Seeburg PH, Libermann A, Schlessinger J, Hancke U, Levinson A, Ullrich A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor share chromosomal location with neu oncogene. Science (1985) 230:1132-1139
- [16] Danbara N, Yuri T, Tsujita-Kyutoku M, Tsukamoto R, Uehara N, Tsubura A. Enterolactone induces apoptosis and inhibits growth of Colo 201 human colon cancer cells both in vitro and in vivo. Anticancer Res. (2005) 25(3B):2269-2276
- [17] Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. Lancet (2002) 359:2018-2026
- [18] De Rafaela MA, Vallea T, Babiano MJ, Corchete P, Correlation of resistance and H₂O₂ production in *Ulmus pumilacand* *Ulmus campestris* cell suspension cultures inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi*, Physiol. Plant. (2001) 11: 512–518
- [19] Dhingra K. Antiestrogens--tamoxifen, SERMs and beyond. Invest New Drugs. (1999) 17(3):285-311.
- [20] Dilworth LL, Omoruyi FO, Simon OR, Morrison EY, Asemota HN. The effect of phytic acid on the levels of blood glucose and some enzymes of carbohydrate and lipid metabolism. West Indian Med J. (2005) 54(2):102-6
- [21] Doll R, Peto R. The causes of cancer. quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. J Natl Cancer Inst. (1981) 66: 1191–308
- [22] Dorgan JF, Longcope C, Stephenson HE Jr., Falk RT, Miller R, Franz C, Kahle L, Campbell WS, Tangrea JA, Schatzkin A. Relation of prediagnostic serum estrogen and androgen levels to breast cancer risk. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev (1996) 5: 533–539
- [23] Eberding A, Madera C, Xie S, Wood CA, Brown PN, Guns ES. Evaluation of the Antiproliferative Effects of Essiactrade mark on In Vitro and In Vivo Models of Prostate Cancer Compared to Paclitaxel. Nutr Cancer. (2007) 58(2):188-96
- [24] Ebert HP. Ulmus spec. Die Behandlung seltener Baumarten (2. bearbeit. Aufl.) Schriftenreihe der FHS Rottenburg, Hochschule für Forstwirtschaft. (1999) S.233-241
- [25] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science (1988) 240:889-95
- [26] Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, et al.: Int J Cancer.; Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). (2007) 121(9):2065-72

- [27] Fotsis T, Pepper M, Adlerkreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr.* (1997) 125: 790-797
- [28] Garcia I, Dietrich PY, Aapro M, Vauthier G, Vadas L, Engel E. Genetic alterations of c-myc, c-erbB-2, and c-Ha-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. *Cancer Res.* (1989) 49(23):6675-9.
- [29] Gray SL, Lackey BR, Tate PL, Riley MB, Camper ND. Mycotoxins in Root Extracts of American and Asian Ginseng Bind Estrogen Receptors α und β . *Exp Biol Med* (2004) 229:560-568
- [30] Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* (1986) 320:134-9
- [31] Grinius L, Kessler C, Schroeder J, Handwerger S. Forkhead transcription factor FOXO1 is critical for induction of human decidualization. *J Endocrinol* (2006) 189:179-187
- [32] Hardell L. Tamoxifen as risk factor for carcinoma of corpus uterus [letter]. *Lancet* (1988) 2(8610): 563
- [33] Hennessy C, Henry JA, May FE, Westley BR, Angus B, Lennard TW. Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst.* (1991) 83:281-285.
- [34] Herrington DM, Klein KP. Randomized clinical trials of hormone replacement therapy for treatment and prevention of cardiovascular diseases: a review of the findings. *Atherosclerosis.* (2003) 166:203-212
- [35] Hsu, S, Green tea and the skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* (2005) 52: 1049-1059.
- [36] Huynh H, Yang X, Pollak M. Estradiol and antiestrogens regulate a growth inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3 autocrine loop in human breast cancer cells. *Biol Chem* (1996) 271:1016-1021
- [37] Interdisziplinäre Kurzgefäßte Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe [Informationszentrum für Standards in der Onkologie - ISTO] (2006)
- [38] Institutum Botanicum Academiae Sinicae, „Iconographia Cormophytorum Sinicorum“ 1st ed., Tomus I, Science Press, Beijing (1972)
- [39] Jensen EV, Jacobsen HI, Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec Prog Horm Res.* (1962) 18:387-414

- [40] Jiangsu New Medical Collage, „ Chinese Crude Drug Dictionary“, 1st ed., Shanghai People’s Press, Shanghai (1977)
- [41] Jo EH, Kim SH, Ra JC, Kim SR, Cho SD, Jung JW, Yang SR, Park JS, Hwang JW, Aruoma OI, Kim TY, Lee YS, Kang KS. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* (2005) 230(2): 239-247
- [42] Jordan VC. Tamoxifen and endometrial cancer [letter]. *Lancet* (1988) 2(8618): 1019
- [43] Ju YH, Clausen LM, Allred KF, Almada AL, Helferich WG. Beta-Sitosterol, Beta-Sitosterol Glucoside, and a Mixture of Beta-Sitosterol and Beta-Sitosterol Glucoside Modulate the Growth of Estrogen-Responsive Breast Cancer Cells In Vitro and in Ovariectomized Athymic Mice. *Journal of Nutrition* (2004) 134:1145-1151.
- [44] Kleine- Gunk B. Phytoestrogene. Die sanfte Alternative während der Wechseljahre, Thieme Verlag (2000)
- [45] Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, (2006)
- [46] Kreutzg T. Kurzlehrbuch Biochemie. 10. Auflage, Urban & Fischer, München, Jena, (2000)
- [47] Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* (2002) 113: 715-885.
- [48] Krönig B, Pittrow DB, Kirch W, Welzel D, Weidinger G. Different concepts in first-line treatment of essential hypertension. Comparison of a low-dose reserpine-thiazide combination with nitrendipine monotherapy. German Reserpine in Hypertension Study Group. *Hypertension.* (1997) 29(2):651-8
- [49] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1996) 93:5925-30
- [50] Kurkin VA. Phenylpropanoids from medical plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. *Chem Nat Compd.* (2003) 39: 123-153
- [51] Leb G. Hormonersatztherapie: Was ändert sich nach der WHI- und der Million-Women-Studie? *J Mineralstoffw.* (2003) 4: 57-60
- [52] Lee JY, Woo ER, Kang KW. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. *J. Ethnopharmacol.* (2005) 97: 561-566

- [53] Lee JC, Lee KY, Son YO, Choi KC, Kim J, Truong TT, Jang YS. Plant-originated glycoprotein, G-120, inhibits the growth of MCF-7 cells and induces their apoptosis. *Food and Chemical Toxicology* 43 (2005) 961-968
- [54] Lee EY, To H, Shew JY, Bookstein R, Scully P, Lee WH. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* (1988) 241:218-21
- [55] Leonard SS, Keil D, Mehlmann T, Proper S, Shi X, Harris GK. Essiac tea: Scavenging of reactive oxygen species and effects on DNA damage. *Ethnopharmacol.* (2006) 16;103(2): 288-96
- [56] Leonard BJ, Kennedy DA, Cheng FC, Chang KK, Seely D, Mills E. An in vivo analysis of the herbal compound essiac. *Anticancer Res.* (2006) (4B):3057-63
- [57] Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* (2002) 76:471-5
- [58] Lewis-Wambi JS, Jordan VC. Treatment of Postmenopausal Breast Cancer with Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Breast Dis.* (2005-2006) 24:93-105
- [59] Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH, Jr. Pestell RG, Kushner PJ. Opposing action of estrogen receptors α and β on cyclin D1 gene expression. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 24353–24360
- [60] Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Aufl., Springer Verlag, Berlin / Heidelberg (2003) 900S-903S
- [61] Lucas PC, Granner DK, Hormone response domains in gene transcription. *Annu Rev Biochem.* (1992) 61:1131-73
- [62] Lung JC, Chu JS, Yu JC, Yue CT, Lo YL, Shen CY, Wu CW. Aberrant expression of cell-cycle regulator cyclin D1 in breast cancer is related to chromosomal genomic instability. *Genes Chromosomes Cancer.* (2002) 34(3):276-84
- [63] Luyengi L, Suh N, Fong H, Pezzuto J, Konghorn D. A lignan and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Phytochemistry* (1996) 43(2): 409–412
- [64] Mackenthun, G. Die Gattung Ulmus in Sachsen. *Forstwissenschaftliche Beiträge Tharandt, Heft 9*. Ulmer, Stuttgart 294S, (2000)
- [65] Meseguer A, Puche C, Cabero A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res.* (2002) 34:731-6
- [66] Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S, Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer.* (1994) 21: 113-131

- [67] Meusel H, Jäger E, Weinert E. Vergleichende Chronologie der zentraleuropäischen Flora. Karten-Band I. Fischer Verlag, Jena (1965) 258S
- [68] Migliaccio A, Di Domencio M, Nola E et al. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO* (1996) 15:1292-1300
- [69] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harsham K, Tavtigian S, Liu Q, et al.: A strong candidate for the 17 linked breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* (1994) 266:66–71
- [70] Moharram FA, El-Shenawy SM.; Antinociceptive and Anti-Inflammatory Steroidal Saponins from *Dracaena ombet*. *Planta Med.* (2007) 73(10):1101-6
- [71] Moran BT. The Herbarius of Paracelsus; *Pharm Hist.* (1993) 35(3):99-127
- [72] Morse DE, Psoter WJ, Cleveland D, Cohen D, Mohit-Tabatabai M, Kosis DL, Eisenberg E. Cancer Causes Control.; Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. (2007) 18(9):919-29
- [73] Müller-Kroehling S, Flatterulme-ein unbekannter Baum. Zehn verbreitete Irrtümer zu einer heimischen Baumart. *AFZ/Der Wald.* (2003) 25: 1282-1286
- [74] Müller-Kroehling S, Ulmus laevis Pall. Flatterulme. In: Weisgerber, H. et al. (Hrsg.): Enzyklopädie der Holzgewächse. (2003) 33. Ergänzungslieferung, 13 S.
- [75] Murkies AL., Wilcox G, Davis SR, Phytoestrogens, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* (1997) 83: 297-303
- [76] Nadal A, Ropero AB, Fuentes E, Soria B. The plasm membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol Sci.* (2001) 22:597-9
- [77] Nagata C. Ecological study of the association between soy product intake and mortality from cancer and heart disease in Japan. *Int J Epidemiol* 29 (2000) 832-6
- [78] Okura A, Arakawa H, Oka H, Yoahinari T, Monden Y. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12]Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (1988) 157: 183-9
- [78] Ottenweller J, Putt K, Blumenthal EJ, Dhawale S, Dhawale SW. Inhibition of prostate cancer-cell proliferation by Essiac. *J Altern Complement Med.* (2004) (4):687-91
- [80] Panlasigui LN, Thompson LU. Blood glucose lowering effects of brown rice in normal and diabetic subjects. *Int J Food Sci Nutr.* (2006) 57(3-4):151-8
- [81] Pappas, TC, Gametchu B, Watson CS. Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labelling and impeded-ligand binding. *Faseb J.* (1995) 9:404-10

- [82] Persson I, Weiderpass E, Bergkvist L, Bergström R, Schairer C. Risks of breast and endometrial cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *Cancer Causes Control*. (1999) 10(4):253-60
- [83] Polkowski K, Mazurek AP: Biological Properties of Genistein. A Review of In Vitro and In Vivo Data. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 57/2 (2000) 135-55
- [84] Price, KR und Fenwick, GR, Naturally occurring oestrogens in foods-a review. *Food Addit Contam*. (1985) 2: 73-106
- [85] Riede UN, Werner M, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme, Stuttgart, 5. komplett überarb. Aufl. (2004) S340-S342; 373S-378S
- [86] Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, Jack E, Vesprini DJ, Kuperstein G, Abrahamson JL, Fan I, Wong B, Narod SA (2001) Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 68:700–710
- [87] Röhrig E. Die Ulmen in Europa. *Forstarchiv* 67, (1996) 5: 179-198
- [88] Salmon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science* (1986) 235:177-182
- [89] Sanchez ER, Faber LE, Henzel WJ, Pratt WB. The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins. *Biochemistry* (1990) 29:5145-52
- [90] Schönfelder und Bresintzky. Bayrischer Atlas der Gefäßpflanzen. Bayrisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, (1990)
- [91] Sexton E, Van Themsche C, LeBlanc K, Parent S, Lemoine P, Asselin E. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *Molecular Cancer* (2006) 5:45
- [92] Shanafelt TD, Barton DL, Adjei AA, Loprinzi CL. Pathophysiologie and treatment of hot flushes. *Mayo Clin Proc*. (2002) 77:1207-1218
- [93] Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone?. *Clin Biochem*. (1997) 30: 91-113
- [94] Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* (1995) 268: 661–667
- [95] Stauber M, Weyerstahl T. Gynäkologie und Geburtshilfe, 2. aktualisierte Auflage (2005) Thieme, Stuttgart; 371S-372S

- [96] Stipes RJ, Campana RJ. Compendium of elm diseases. The American Phytopathological Society, (1982) 96 Seiten
- [97] Tai J, Cheung S. In Vitro culture studies of Flor Essence on human cell lines. *Phytother Res.* (2005) 19(2):107-12
- [98] Takano M, Lu Z, Goto T, Fusi L, Higham J, Francis, Withey A, Hardt J, Cloke B, Stavropoulou AV, Ishihara O, Lam EW, Unterman TG, Brosens JJ, Kim JJ. Transcriptional cross talk between the forkhead transcription factor forkhead box O1A and the progesterone receptor coordinates cell cycle regulation and differentiation in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* (2007) 21:2334-2349
- [99] Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, et al. (1996) The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* 12:333–337
- [100] Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M. and Impicciatore, M., Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety a basic core for antiplatelet activity. *Life Sci.* (2006) 78: 1419-1432
- [101] Tommasi S, Fedele V, Crapolicchio A, Bellizzi A, Paradiso A, Reshkin SJ. ErbB2 and the antimetastatic nm23/NDP kinase in regulating serum induced breast cancer invasion. *Int J Mol Med.* (2003) 12(1):131-4
- [102] Urbschat I, Kieschke J, Schlanstedt-Jahn U., von Gehlen S., Thiel A., Jensch P. Beiträge bevölkerungsbezogener Krebsregister zur Evaluation des bundesweiten Mammographie-Screenings, Gesundheitswesen, (2005) 67(7): 448–544
- [103] Vakil RJ. A clinical trial of Rauwolfia serpentina in essential hypertension. *Br Heart J.* (1949) 11(4):350-5
- [104] Varley JM, Armour J, Swallow JE, et al. The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumors. *Oncogene* (1989) 4:725-9
- [105] Wang D, Xia M, Cui Z, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Cytotoxic Effects of Mansonone E and F isolated from *Ulmus pumila*. *Biol. Pharm. Bull.* (2004) 27(7) 1025-1030
- [106] Ward EC, Hoekstra AV, Leen JB, Hanifi-Moghaddam P, Lurain JR, Singh DK, Buttin BM, Schink JC, Kim JJ. The regulation and function of the forkhead transcription factor, FOXO1, is dependent on the progesterone receptor in endometrial carcinoma. *Endocrinology.* (2007) 149(4):1942-50
- [107] Wei F, Wei F, Ma LY, Jin WT, Ma SC, Han GZ, Khan IA, Lin RC. Antiinflammatory triterpenoid saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* (2004) 52(10):1246-8
- [108] WHI. Risks and benefits of estrogen plus progesterin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. In

Jama. Vol. 288. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002) 321-333

[109] Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N
Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature (1995) 378:789–792

[110] Yang X, Lippman ME. BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. (1999) 54(1):1-10

9. Thesen

1. Das Mammakarzinom und das Endometriumkarzinom gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen der Frau. Derzeit existieren keine Empfehlungen für die präventive Einnahme von Nahrungsergänzungs- oder Arzneimitteln.
2. Die meisten malignen Brust- und Gebärmutterkörper Tumoren sind Estrogen- und Progesteronrezeptor positiv. Beim Mammakarzinom greifen hier die Mechanismen der Hormon- und Antihormontherapie. Darüber hinaus existieren eine Vielzahl weiterer potenter Chemotherapeutika zur Behandlung des Mammakarzinoms. Dazu zählen Zytostatika, Antikörper und Immunmodulatoren. Hier gilt es, ergänzend neue Wirkstoffe bzw. Präventivstoffe für Risikopatientinnen zu isolieren.
3. Das Endometriumkarzinom ist in der Regel eine Erkrankung der älteren Frau. Die Behandlung erfolgt operativ durch Hysterektomie. In speziellen Fällen, wie z.B. der Behandlung niedriggradiger Tumorstadien bei Patientinnen mit Kinderwunsch oder bei Hyperplasien des Endometriums mit Atypien, kann eine medikamentöse Behandlung mit Progesteronpräparaten erwogen werden. Es existieren derzeit keine effektiven Chemotherapien, welche das Gesamtüberleben verbessern. Eine lokale Strahlentherapie kann in Einzelfällen erwogen werden, ist jedoch kein Standard in der Behandlung des Endometriumkarzinoms.
4. Die Ulme ist eine heimische Baumart. Bestandteile einiger Unterarten werden traditionell, insbesondere im asiatischen Raum als Heilmittel genutzt. Experimentelle Studien von Ulmenbestandteilen zeigten *in vitro*, Wirkpotential auf diverse Zellkulturen.
5. Die Flatterulme (*Ulmus laevis*) enthält eine Vielzahl an Wirksubstanzen – sekundäre Pflanzenstoffe. In dieser Arbeit wurden insbesondere Sterole, Fettsäuren und Phytoestrogene massenspektrometrisch neben einer Vielzahl an weiteren Substanzen identifiziert. Diese stellen potente Inhibitoren der Zellproliferation dar.

6. Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass das ethanolische Extrakt der *Ulmus laevis* Rinde signifikant das Wachstum von hormonaktiven Brustkrebszellen *in vitro* senkt.
7. Ebenso reduziert das getestete Extrakt signifikant das Wachstum von hormonaktiven Endometriumkarzinomzellen *in vitro*.
8. Die ER und PR negative Zelllinie BT20 lässt sich im MTT-Proliferationstest wesentlich weniger beeinflussen, als Hormonrezeptor positive Zelllinien. Daher ist als Wirkmechanismus der Proliferationshemmung eine Beteiligung der Steroidhormonrezeptoren anzunehmen.
9. Das *Ulmus laevis* Extrakt wirkt nur geringfügig zytotoxisch. Erst in höheren getesteten Konzentrationen erfolgt eine vermehrte Letalität der Zellen, wobei sich die Zelllinien in ihrem Überleben unter Einfluss des Extraktes unterscheiden.
10. Das Wirkstoffgemisch zeigt chemotherapeutisches Potential, mit Hinblick auf die Isolierung wirksamer Komponenten oder als Vielstoffgemisch. Eine eingehende Testung nach Fraktionierung ist notwendig.

10. Anhang

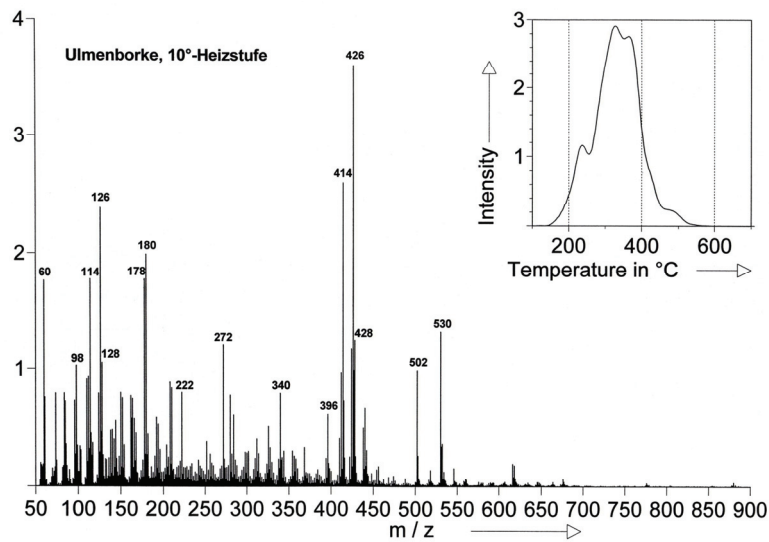


Abb. 42: Darstellung der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektroetrie in Massensignalen m/z (Ulmenrinde 10° Heizstufe)

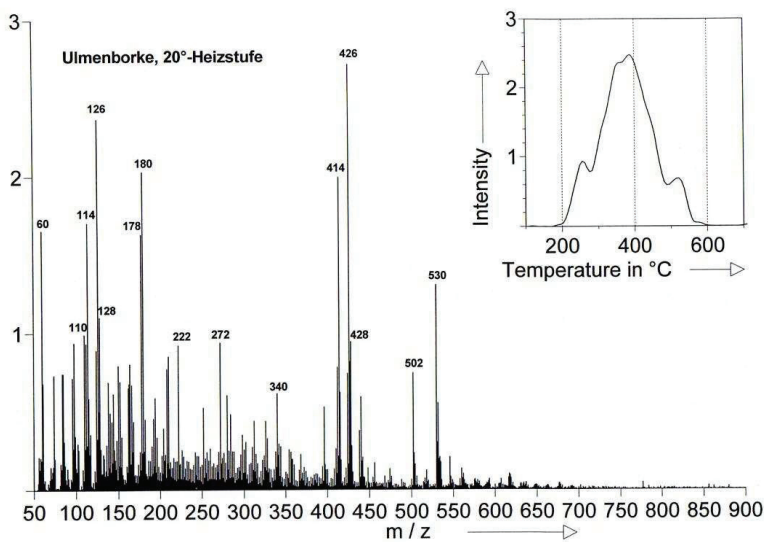


Abb. 43: Darstellung der Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektroskopie in Massensignalen m/z (Ulmenrinde 20° Heizstufe)

Marker signals in Py-FIMS of aquatic and terrestrial humic substances, soil fractions and whole soils.

Carbohydrates

60,72,82,84,96,98,110,112,
114,126,132,144,162

Phenols+lignin monomers

94,108,110,122,124,138,140
150,152,154,164,166,168,178
180,182,194,196,208,210,212

Lignin dimers

246,260,270,272,274,284,286,296
298,300,310,312,314,316,326
328,330,340,342,356

**Lipids, alkanes, alkenes,
fatty acids, n-alkyl esters**

202,216,230,244,256,258,270,272
284,286,298,300,312,314,326
328,340,342,354,368,380,382
394,396,408,410,422,424,438
452,466,480,494,508,522,536
550,564,578,592,606,620,634
648,662,676,704,718,732,746

Alkylaromatics

170,176,184,190,192,198,204
206,218,220,232,234,246,260
274,288,302,316,330,344,358
372,386

N-containing compounds

59,67,79,81,95,103,109,111
123,125,137,139,153,161,167
181,183,195,203,233,245,255
257,271,285,333,359,363,393

Sterols

372,386,388,390,392,394,396,398
400,402,408,410,412,414,416
426,430

Peptides

57,70,73,74,75,84,87,91
97,99,115,120,129,135

Suberin

432,446,460,474,488,502,516,530

Fatty acids n-C16 to n-C34

256,270,284,298,312,326,340,354
368,382,396,410,424,438,452,466
480,494,508

m/z 15-56

Isotope ¹³C signals and M+1 peaks

58,61,71,73,76,80,85,88
97,99,104,113,116,121,127
130,133,135,136,141,143,145
149,151,155,157,163,165,169
171,177,179,185,191,193,197
199,205,207,209,211,213,217
219,221,231,235,247,259,261
273,275,287,289,297,299,301
303,311,313,315,317,327,329
331,334,341,343,355,357,360
364,369,373,381,383,387,389
391,395,397,399,401,403,409
411,413,415,417,423,425,427
431,433,439,447,453,461,467
475,481,489,495,503,509,517
523,531,537,551,565,579,593
607,621,635,649,663,677,705
733,747

Abb. 44: Markersignale der Ulmenrindeninhaltsstoffe in der Massenspektrometrie

11. Danksagung

Bedanken möchte ich mich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. V. Briese, für die Vergabe dieses interessanten Themas und für die vielen Anregungen, Ideen und Ratschläge, sowie bei Frau Dr. D.-U. Richter für die zahlreichen praktischen Hilfestellungen im Umgang mit der Laborarbeit.

Mein Dank gilt auch der medizinisch technischen Assistentin Frau Greschkowitz und des Weiteren

Herrn Prof. Dr. S. Porembski vom Institut für Botanik der Universität Rostock für die freundliche Bereitstellung der Ulmenrindenproben.

Dank in besonders großem Maße meiner Familie für die langjährige Unterstützung während des Studiums.

12. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Rostock, den 12. Juni 2009

13. Lebenslauf

Name: Daniel Paschke
Geburtsdatum: 06.11.1974
Geburtsort: Ostseebad Kühlungsborn
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstatus: ledig

Schulen:

1981-1987: Dr. Gronau-Grundschule in Neubukow
1887-1991: Polytechnische Oberschule in Neubukow
1991-1994: Ausbildung und Tätigkeit im Handwerksgewerbe
1994-1999: Ausbildung und Tätigkeit als Zahntechniker
1999-2002: Abitur am Heinrich-Schliemann-Gymnasium in Neubukow

Universität:

2002-2003: Studium an der Universität Rostock FB Dipl. Chemie
2003 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Rostock
2005 erfolgreich bestandener Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2009 erfolgreich bestandener Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

14. Publikationen und wissenschaftliche Arbeiten

- Publikationen:** - Postervorstellung NGGG-Tagung 07. 09. 2007 Göttingen
- Paschke D, Abarzua S, Schlichting A, Richter DU, Leinweber P, Briesse V. Inhibitory effects of bark extracts from *Ulmus laevis* on endometrial carcinoma: an in-vitro study. Eur J Cancer Prev. 2009 Apr;18(2):162-8.
 - “Inhibitory effects of *Ulmus laevis* on Breast Cancer - an *in vitro* study”
(eingereicht: Archives of Gynaecology and Ostetrics, 2009)