

Aus der Universitätsfrauenklinik der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. B. Gerber

Bereich: Forschungslabor

**„Gesundheitsfördernde Eigenschaften der Lupine:  
Prävention des Mammakarzinoms *in vitro*“**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der  
Medizinwissenschaften  
der Universitätsmedizin Rostock.



vorgelegt von Dipl. Biologin Jana Stapel,  
geb. am 24.01.1976 in Schwerin,  
aus Rostock.

Rostock, 16.01.2015

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2010 bis Oktober 2013 im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik in Rostock angefertigt.

gefördert durch das

Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)  
„PlantsFroFood“

1. Gutachter :

Prof. Dr. med. habil. Volker Briese  
Universitätsfrauenklinik und Poliklinik, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Michael Lalk  
Institut für Biochemie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

3. Gutachter:

Dr. Uta Effmert  
Institut für Biochemie, Universität Rostock

**Datum der Disputation:** 21. Juli 2015

---

## Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Volker Briese für die Bereitstellung und Überlassung des Promotionsthemas sowie für seine Unterstützung und Betreuung.

Frau Dr. rer. nat. Dagmar-Ulrike Richter danke ich für die Betreuung der Arbeit, für Anregungen, Verständnis und Unterstützung sowie den gewährten Freiraum.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Ruth und Frau Dr. rer. nat. Christina Oppermann bedanke ich mich für die Herstellung der Extrakte.

Dr. Andre Schlichting danke ich für die Durchführung der Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie.

Dipl.-Biol. Marlen Szewczyk danke ich für ihre freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Michael Lalk und Frau Dr. rer. nat. Uta Effmert ich für die Gutachtertätigkeit.

Frau Greschkovitz der MTA des Forschungslabors danke ich für ihre Hilfe im Laboralltag und freundliche Unterstützung.

Ich bedanke mich beim gesamten Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik in Rostock für die freundliche Aufnahme in ihrem Team, für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Vielen Dank

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit bisher weder von mir an der Universitätsmedizin Rostock der Universität Rostock noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

---

Jana Stapel

Rostock, Januar 2015

---

## Inhaltsverzeichnis

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
II. TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	X
1 Einleitung .....	1
1.1 DAS MAMMAKARZINOM.....	1
1.1.1 <i>Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms</i> .....	1
1.1.2 <i>Kanzerogenese des Mammakarzinoms</i> .....	1
1.1.3 <i>Risikofaktoren für das Mammakarzinom</i> .....	4
1.1.4 <i>Prävention des Mammakarzinoms</i> .....	5
1.2 NATURSTOFFE .....	8
1.3 ANGRIFFSPUNKTE FÜR ANTIKANZEROGENE SUBSTANZEN.....	10
1.3.1 <i>Zelltod: Apoptose und Nekrose (Nekroptose)</i> .....	11
1.3.2 <i>Metabolismus: Die aerobe Glykolyse</i> .....	14
1.3.3 <i>Metastasierung: Migration und Invasion</i> .....	16
1.4 ZIELSTELLUNG .....	17
2 Material und Methoden .....	19
2.1 MATERIAL.....	19
2.1.1 <i>Chemikalien</i> .....	19
2.1.2 <i>Laborgeräte</i> .....	19
2.1.3 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	20
2.1.4 <i>Kits</i> .....	20
2.1.5 <i>Software</i> .....	20
2.1.6 <i>Antikörper</i> .....	21
2.1.7 <i>Medien, Puffer, Lösungen</i> .....	21
2.1.8 <i>Zelllinien</i> .....	22
2.1.9 <i>Lupinus angustifolius (Sorte Boregine): Das Ausgangsmaterial</i> .....	23
2.2 METHODEN.....	24
2.2.1 <i>Mikrowellenextraktion (microwave assisted extraction MAE)</i> .....	24
2.2.2 <i>Bestimmung der Substanzklassen über die Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Screening)</i> .....	25
2.2.3 <i>Messung der Proteinkonzentration (BCA Protein Assay Kit)</i> .....	26
2.2.4 <i>Zellkultur</i> .....	26
2.2.5 <i>Untersuchung zur Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität</i> .....	29
2.2.6 <i>Untersuchungen zum apoptotischen und nekrotischen Zelltod</i> .....	32
2.2.7 <i>Untersuchungen zur Migration und Invasion der Tumorzellen</i> .....	35
2.2.8 <i>Methoden zur metabolischen Analyse</i> .....	36
2.2.9 <i>Berechnung der mittleren Hemmkonzentration (Inhibitory Concentration, IC<sub>50</sub>)</i> .....	38

---

2.2.10 Statistische Analyse .....	39
3 Ergebnisse .....	40
3.1 BESTIMMUNG DER SUBSTANZKLASSEN.....	40
3.2 ZELLCHARAKTERISIERUNG DURCH IMMUNHISTOCHEMIE .....	41
3.3 ERGEBNISSE ZUR PROLIFERATION, VITALITÄT UND ZYTOTOXIZITÄT.....	45
3.3.1 <i>Einfluss des Proteinisolats auf die Proliferation von MCF-7 und BT20</i> .....	45
3.3.2 <i>Einfluss des Lupinenöls auf die Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 sowie benignen Zellen ad. Fibroblasten und MCF12A</i> .....	46
3.3.3 <i>Wirkung des Samen-, Blatt-, Spross- und Wurzelextraktes (19.07.2010) von Lupinus angustifolius auf die Zellproliferation und Zytotoxizität von MCF-7 und BT20</i> .....	48
3.3.4 <i>Einfluss des Wurzelalters auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20</i> .....	50
3.3.5 <i>Einfluss des Wurzelalters auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten</i> .....	52
3.3.6 <i>Die Wirkung des Spross- und Wurzelextraktes (05.08.2011) auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20</i> .....	55
3.3.7 <i>Die Wirkung des Spross- und Wurzelextraktes (05.08.2011) auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten</i> .....	58
3.3.8 <i>Wirkung des Wurzel- und Sprossextraktes nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation auf die Zellproliferation, Vitalität und Zytotoxizität von MCF-7 Zellen</i> .....	60
3.3.9 <i>Wirkung des Wurzel- und Sprossextraktes nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation auf die Vitalität der BT20 Zellen</i> .....	63
3.3.10 <i>Wirkung der Kontrollen Tamoxifen und 17-β Estradiol auf die Zellproliferation, Vitalität und Zytotoxizität der malignen MCF-7 und BT20 Zellen sowie benignen MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten</i> .....	64
3.4 ERGEBNISSE ZUM APOPTOTISCHEN UND NEKROTISCHEN ZELLTOD.....	64
3.4.1 <i>Morphologische Differenzierung von Apoptose und Nekrose durch die Lichtmikroskopie</i> .....	64
3.4.2 <i>Qualitative Bestimmung von Apoptose und Nekrose über die Fluoreszenzmikroskopie (Annexin V-FITC Kit, Miltenyi Biotec)</i> .....	65
3.4.3 <i>Quantitative Bestimmung von Apoptose und Nekrose (Cell Death Detection ELISA)</i> .....	66
3.5 ERGEBNISSE ZUR MIGRATION UND INVASION DER TUMORZELLEN .....	67
3.6 ERGEBNISSE DER METABOLISCHEN ANALYSE .....	69
3.6.1 <i>Ergebnisse der quantitativen Glukosebestimmung</i> .....	69
3.6.2 <i>Ergebnisse der quantitativen Laktatbestimmung</i> .....	70
3.6.3 <i>Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration</i> .....	71
3.7 DARSTELLUNG DER MITTLEREN HEMMKONZENTRATION (INHIBITORY CONCENTRATION, IC <sub>50</sub> ) .....	73
4 Diskussion.....	75

---

4.1	SUBSTANZKLASSENANALYSE (PYROLYSE-FELDIONISATION MASSENSPEKTROMETRIE).....	75
4.2	UNTERSUCHUNG ZUR PROLIFERATION, VITALITÄT UND ZYTOTOXIZITÄT.....	76
4.2.1	<i>Einfluss des Proteinisolates auf die Proliferation von MCF-7 und BT20.....</i>	76
4.2.2	<i>Einfluss des Lupinenöls auf die Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 sowie benignen Zellen ad. Fibroblasten und MCF12A.....</i>	77
4.2.3	<i>Wirkung des Samen, Blatt, Spross und Wurzelextraktes (19.07.2010) von Lupinus angustifolius auf die Zellproliferation und Zytotoxizität von MCF-7 und BT20.....</i>	79
4.2.4	<i>Der Einfluss des Wurzelalters auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der malignen Zellen MCF-7 und BT20 sowie benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten.....</i>	80
4.2.5	<i>Wirkung von Wurzel- und Sprossextrakt (05.08.2011) auf verschiedene in vitro Parameter.....</i>	82
5	Zusammenfassung.....	89
6	Ausblick.....	91
7	Literaturverzeichnis .....	92

---

## I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mehrschrittmodell der Kanzerogenese des Mammakarzinoms [8].....	3
Abbildung 2: Herkunft der Antitumor-Medikamente weltweit, 1981-2010 [91].....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus [45].....	14
Abbildung 4: Glykolyse der Tumorzelle [137].....	15
Abbildung 5: Fließschema der Arbeitsschwerpunkte.....	18
Abbildung 6: Beispiel für eine H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Standardkurve [11].....	37
Abbildung 7: Grafische Darstellung der Substanzklassen über die Totalionenintensität (%), des Wurzel- und Sprossextraktes (05.08.2011, 200 µg/ml).....	40
Abbildung 8: Immunhistochemische Charakterisierung der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20.....	42
Abbildung 9: Immunhistochemische Charakterisierung der benignen Zelllinien ad. Fibroblasten und MCF12A.....	44
Abbildung 10: Grafische Darstellung des BrdU-Tests für das Proteinisolat ( <i>L. angustifolius</i> , Boregine).....	45
Abbildung 11: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests des Öls von <i>L. angustifolius</i> .....	47
Abbildung 12: Grafische Darstellung der Wirkung des Samen-, Blatt-, Spross- und Wurzelextraktes (19.07.2010) auf die Zellproliferation und Zytotoxizität von MCF-7 und BT20 Zellen.....	49
Abbildung 13: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF-7 und BT20 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (01.07.2010, 19.07.2010) von <i>L. angustifolius</i> .....	51
Abbildung 14: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (01.07.2010 (9 W.), 19.07.2010 (12 W.)) von <i>L. angustifolius</i> .....	54
Abbildung 15: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF-7 und BT20 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von <i>L. angustifolius</i> ....	57
Abbildung 16: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und des Sprossextrakt (05.08.2011) von	

---

<i>L. angustifolius</i> .....	59
Abbildung 17: Grafische Darstellung des Ergebnisses des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF-7 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von <i>L. angustifolius</i> .....	62
Abbildung 18: Grafische Darstellung des MTT-Tests der BT20 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) der blauen Süßlupine ( <i>L. angustifolius</i> )...63	
Abbildung 19: Morphologische Differenzierung von Apoptose und Nekrose.....	65
Abbildung 20: Bestimmung von Apoptose und Nekrose über die Fluoreszenzmikroskopie.....	66
Abbildung 21: Quantitative Bestimmung von Apoptose und Nekrose ( <i>Cell Death Detection ELISA</i> ).....	67
Abbildung 22: Grafische Darstellung des Migrations- und Invasionstests der MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von <i>L. angustifolius</i> .....	68
Abbildung 23: Grafische Darstellung der quantitativen Glukosebestimmung. ....	70
Abbildung 24: Grafische Darstellung der prozentualen Laktatproduktion. ....	71
Abbildung 25: Grafische Darstellung der quantitativen Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Konzentration.....	72

---

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für das Mammakarzinom nach [148].....	5
Tabelle 2: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.....	23
Tabelle 3: Auflistung der <i>in vitro</i> untersuchten Pflanzenorgane und Produkte von <i>L. angustifolius</i> (Sorte Boregine).....	24
Tabelle 4: Darstellung des pflanzlichen Ausgangsmaterials für die Mikrowellenextraktion, Zerkleinerung und Trocknung des Ausgangsmaterials, Extraktion, Verdünnungen der Rohextrakte und Lagerung der Extrakte.....	25
Tabelle 5: Immunreaktiver Score (IRS): SI x PP.....	29
Tabelle 6: Immunhistochemische Charakterisierung der unterschiedlichen Zelltypen: dargestellt ist die Zelllinie, das nachzuweisende Protein (Antigen), die Funktion des Proteins (Antigen) sowie der Antikörper.....	29
Tabelle 7: Kontrollen des MTT, LDH und BrdU Tests.....	30
Tabelle 8: Kontrollen des <i>Cell Death Detection ELISAs</i> (Roche).....	34
Tabelle 9: Überblick über die IC <sub>50</sub> -Werte.....	74

---

### III. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6)]
ad. Fib.	benigne Zelllinie adulte Fibroblasten
ALA	Linolensäure
ALAT	<i>alanine aminotransferase</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
Bax	<i>Bcl-2-interactive cell death susceptibility regulator</i>
BCA	Bicinchonsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
BET	brusterhaltende Therapie
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BT20	maligne Mammakarzinomzelllinie
b.z.w	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CAT	Katalase
CCND1	Gen kodiert das <i>cyclin D1 protein</i>
CDH1	Gen kodiert das <i>cadherin-1 protein</i>
CDKs	<i>cyclin-dependet kinases</i>
c-erB2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
CHK1	<i>checkpoint kinase-1</i>
CHK2	<i>checkpoint kinase-2</i>
CHYDR	Kohlenhydrate
c-myc	Protoonkogen
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cu <sup>1+</sup>	Kupfer (I) Ion
Cu <sup>2+</sup>	Kupfer (II) Ion
CXCR4	<i>chemokine receptor type 4</i>

---

DCA	Dichloracetat
2-DG	2-Deoxyglucose
d.h.	das heißt
Dipl.-Biol.	Diplom Biologe/in
dkfz	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
Dr. med.	<i>Doctor medicinae</i>
Dr. rer. nat.	<i>Doctor rerum naturalium</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EMS1	Gen
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ERK1/2	<i>extracellular-signal-regulated kinase 1/2</i>
ER	Estrogenrezeptor
et al.	und Mitarbeiter
F2, 6BP	Fruktose-2,6-bisphosphat
FLAVO	Flavone
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G <sub>0</sub>	Zellzyklusphase
GLUT	Glukosetransporter
GLUT1	Glukosetransporter Typ 1
GLUT3	Glukosetransporter Typ 3
GnRH-Analoga	Analoga des Gonadotropin-Releasing-Hormons
GPX	Gluthathionperoxidase
h	Stunde
Ham's F12	Zellkulturmedium
HCL	Chlorwasserstoff
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

---

$\text{H}_2\text{SO}_4$	Schwefelsäure
$\text{IC}_{50}$	mittlere inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitratdehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
int2	Protoonkogen
IRS	immunreaktiven Score
ISOFL	Isoflavone
ISOPR	Isoprenoide
KCL	Kaliumchlorid
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
LC/ESI/MS	<i>liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry</i>
LC/MS/MS	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LDH5	Laktatdehydrogenase 5
LDIM	Lignindimere
LHRH-Analoga	Analoga des Gonadotropin-Releasing-Hormons
LIGNA	Lignane
LIPID	Alkane Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette
LOD	Laktatoxidase
LOWMW	niedermolekulare Verbindungen
LPS	Lipopolysaccharid
LS	Lupinensprosseextrakt
LW	Lupinenwurzelextrakt
M	Molarität
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MCF-7	maligne Mammakarzinomzelllinie
MCF12A	benigne Mammazelllinie
ml	Mililiter
mM	Millimolar
MCT1	<i>monocarboxylate transporter 1</i>
$\text{MgCl}_2$	Magnesiumchlorid
MEM	Zellkulturmedium

---

MET	<i>mesenchymal-epithelial transition</i>
min	Minute
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
MMP-9	<i>matrix metallopeptidase 9</i>
MnSOD	<i>manganese superoxide dismutase</i>
mol	Stoffmenge
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
MTT	Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2- yl]-2,5 Diphenyl Tetrazolium
n	Anzahl der Messungen
NaCL	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH/H <sup>+</sup>	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NF <sub>κ</sub> B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
p <sup>53</sup>	<i>tumor suppressor protein</i>
P <sup>73</sup>	<i>tumor suppressor protein</i>
Pa	Pascal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pH	pH-Wert
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PDK1	Pyruvatdehydrogenase-Kinase1
PEPT1	Peptide und freie Aminosäuren
PFKBP3	<i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase3</i>

---

PHLM	Monolignole
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PI3K/AKT	Signalweg AKT Protoonkogen
PKM2	<i>pyruvate kinase M2</i>
3 PO	(3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one)
POD	anti-DNA-peroxidase
POLYO S	sonstige Polyphenole (Suberin, Cutin, Stilbene, Tannine)
PP	Prozentsatz positiver Zellkerne
PR	Progesteronrezeptor
Prof.	Professor
PRIMA-1	<i>p<sup>53</sup> reactivation and induction of massive apoptosis</i>
PS	Phospholipid Phosphatidylserin
PTEN	Tumorsuppressor
RB1	Retinoblastom 1-Gen
RIP1	<i>receptor interaction protein kinase 1</i>
RIP3	<i>receptor interaction protein kinase 3</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rho-GTPasen	GTPasen der Rho Familie
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium
SDF1	<i>stromal derived factor 1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SI	<i>staining intensity</i>
SOD	Superoxiddismutase
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
4T1	Mammakarzinomzelllinie
TA	transaktivierende Domaine
TAp <sup>73</sup>	<i>tumor suppressor gene</i>
TCA	<i>tricarbonacid cycle</i>
TKTL1	<i>transketolase-like 1</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>

---

TOOS	Wasserstoffdonator
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trp <sup>73</sup>	<i>transformation related protein 73</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
W	Watt
WCRF	<i>World Cancer Research Fund</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WNT3	Proto-Onkogen
WNT7B	Onkogen
w.z.B.	wie zum Beispiel
µl	Mikroliter
%	Prozent

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Mammakarzinom

### 1.1.1 Inzidenz und Mortalität des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom tritt wesentlich früher auf als die meisten anderen Krebsarten. Bei der Diagnosestellung ist etwa jede vierte Frau jünger als 55 Jahre und jede zehnte unter 45 Jahre alt [111]. In Deutschland erkrankten 2010 rund 70.000 Frauen neu an Brustkrebs [111] und bei Männern lag die Inzidenz im Jahr 2010 in Deutschland bei 610/Jahr [33]. Die Prognose der Neuerkrankungen für das Jahr 2014 liegt bei 75.200 Frauen/Jahr [111]. Die Mortalitätsrate lag in Deutschland bei 17.466 Sterbefällen/Jahr [111]. In den neuen Bundesländern liegen die Inzidenz und Mortalitätsraten deutlich niedriger als in den alten [111]. Das Mammakarzinom tritt in der europäischen Region gemessen an der prozentualen Gesamtinzidenz aller auftretenden Krebsarten am häufigsten mit 28% auf [149]. Auch in Bezug auf die Krebsmortalität stellt das Mammakarzinom mit 17%, gemessen an der Gesamtzahl der krebsbedingten Todesfälle in der europäischen Region die Krebsart mit der größten Mortalität da [149]. Im Jahr 2012 war das Mammakarzinom mit einer Inzidenz von 1,67 Millionen/Jahr die häufigste Krebsart der Frau weltweit [145]. Die höchste Inzidenz weltweit wurde in Nordamerika und die niedrigste Inzidenz des Mammakarzinoms in Asien und Afrika beobachtet [145]. Das Mammakarzinom tritt in Asien weniger häufig auf, was besonders auf den Anteil an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie Flavone/Isoflavone, die mit einem hohen Anteil in Soja vorkommen und für einen präventiven Effekt verantwortlich sind, zurückzuführen ist [163]. Am höchsten waren die Mortalitätsraten im internationalen Vergleich in Dänemark, den Niederlanden und Irland und am niedrigsten in Korea und Japan [93]. Trotzdem die gemessenen Inzidenzraten beim Brustkrebs im letzten Jahrzehnt in den meisten Ländern zugenommen haben, ist die Brustkrebsmortalität zurückgegangen oder stabil geblieben, was auf einen Anstieg der Überlebensquoten dank frühzeitiger Diagnose und verbesserter Therapiemöglichkeiten zurückzuführen ist [93].

### 1.1.2 Kanzerogenese des Mammakarzinoms

#### 1.1.2.1 Das Mehrschrittmodell

Das Mammakarzinom ist eine maligne Entartung der Drüsenepithelien der Brust [107]. Das maligne Wachstum geht dabei von den Epithelien der Drüsengänge oder den

Läppchen aus [107]. Die Kanzerogenese des Mammakarzinoms kann anhand des Mehrschrittmodells in vier Phasen eingeteilt werden, welche als Initiation, Promotion, maligne Transformation und Progression bezeichnet werden [71].

Die Initiation ist der erste Schritt der Kanzerogenese und kann durch Kanzerogene ausgelöst werden [144]. Initiatoren der Kanzerogenese können unter anderen Viren, Strahlen oder chemische Substanzen w.z.B. Nitrosamine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sowie heterozyklische Amine sein [144]. Die Initiation stellt dabei eine nicht reversible Veränderung einer Zelle zur präneoplastischen Zelle dar, welche Mutationen in kritischen Genen beinhaltet [139]. Während der Kanzerogenese verändert sich durch Mutationen eine Reihe von intrazellulären Signal- und Stoffwechselwegen, es werden Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert (Abb. 1) [56]. Onkogene, die an der Entstehung des Mammakarzinoms beteiligt sind, sind zum Beispiel c-myc, int2, EMS1, CCND1 und c-erB2 [8, 66]. Wichtige Tumorsuppressorgene der Kanzerogenese des Mammakarzinoms, die normalerweise die Zellteilung inhibieren und für die DNA-Reparatur codieren, jedoch durch Mutation ihre Funktion nicht mehr ausführen können sind p<sup>53</sup>, BRCA1, BRCA2, ATM, PTEN, CDH1 und RB1 [16, 66].

In der Phase der Promotion findet eine Wachstumsförderung dieser initiierten Zelle bis zur Entstehung eines (prä-) neoplastischen Zellherdes statt [139]. Tumorpromotoren sind generell nicht mutagen und alleine in ihrer Wirkung nicht kanzerogen [71]. Der Tumorpromotor wirkt proliferationsfördernd, jedoch nur zusammen mit dem Tumorinitiator [71]. Tumorpromotoren des Mammakarzinoms sind zum Beispiel Estrogene, Progesteron und Prolaktin [67].

Die maligne Transformation ist die Veränderung einer präneoplastischen Zelle in eine Zelle mit malignem Phänotyp [71]. Dieser Prozess erfordert weitere genetische Veränderungen.

Die Tumorprogression stellt den letzten Schritt der Kanzerogenese da. Dieser umfasst die Expression des malignen Phänotyps und die Tendenz von malignen Zellen noch mehr aggressive Merkmale zu erwerben [71]. Eine bedeutende Eigenschaft des malignen Phänotyps ist die Tendenz zur genetischen Instabilität und unkontrolliertem Wachstum sowie die Fähigkeit der Tumorzelle Proteasen zu sezernieren, welche ihnen die Invasion ermöglicht und zur Metastasierung beiträgt [71].

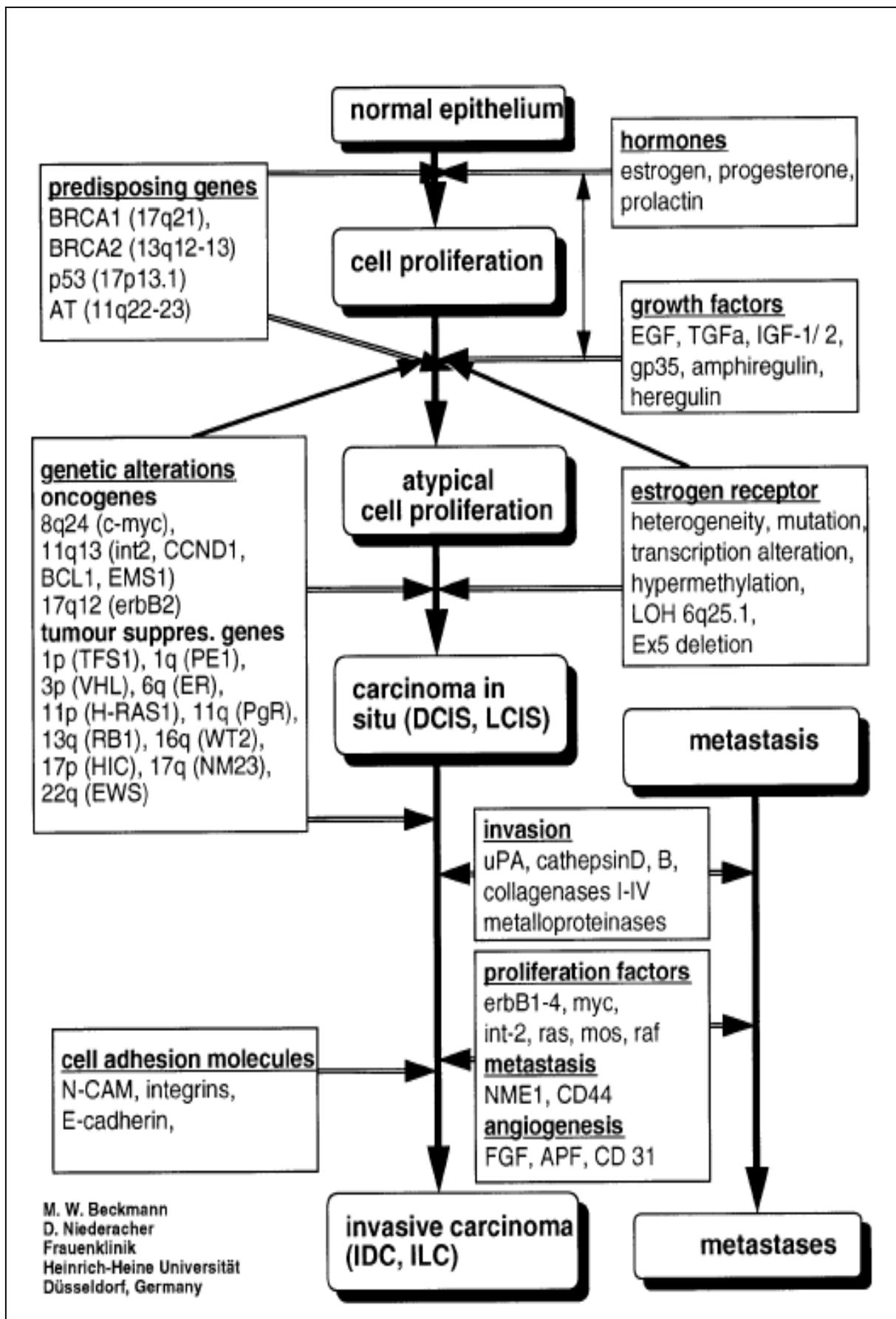


Abbildung 1: Mehrschrittmodell der Kanzerogenese des Mammakarzinoms [8].

### 1.1.2.2 Bedeutung der Tumorstammzellen

Neben dem bisherigen Modell der Kanzerogenese, welches seine Berechtigung hat, jedoch in wesentlichen Teilen inkomplett ist [57], hat sich das Verständnis der Tumorentstehung grundlegend geändert. Die Krebsstammzell-Hypothese beschreibt eine kleine Population von Zellen innerhalb des Tumors, welche die Kapazität zur grenzenlosen Selbsterneuerung besitzen [55].

Durch ihre Fähigkeit der unbegrenzten Selbsterneuerung und Apoptoseresistenz haben Tumorstammzellen eine zentrale Rolle bei der Kanzerogenese [57]. Die Hauptmasse eines Tumors kann durch Medikamente oder Bestrahlung meist schnell zerstört werden [28]. Widerstandsfähiger sind dagegen die Tumorstammzellen, sie können sich in einer Art Ruhezustand befinden und überstehen so die Krebstherapie [28]. Überlebende Krebsstammzellen können so nach Monaten oder Jahren wieder aktiv werden und neue Tumore und Metastasen entwickeln [28]. Brustkrebsstammzellen existieren in zwei verschiedenen Stadien und jedes Stadium spielt eine Rolle in der Krebsentwicklung [77].

An der Außenseite des Tumors existiert ein Typ von Tumorstammzellen, welcher sich im Stadium der *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) befindet [77]. Diese Tumorstammzellen scheinen ruhend, sind aber sehr invasiv.

Im zweiten Stadium zeigen die Tumorstammzellen charakteristische Eigenschaften der *mesenchymal-epithelial transition* (MET) [77]. Diese Tumorstammzellen proliferieren und bilden neue Tumore. Beide Formen der Tumorstammzellen sind notwendig, um zu metastasieren und in andere Organe zu wachsen [77]. Das Verständnis beider Stadien der Tumorstammzellen ist wichtig für die Entwicklung neuer Therapien.

### 1.1.3 Risikofaktoren für das Mammakarzinom

Im Allgemeinen wird zwischen endogenen und exogenen Risikofaktoren unterschieden. In Tabelle 1 auf Seite 5 sind mögliche Risikofaktoren für das Mammakarzinom aufgeführt.

**Tabelle 1: Risikofaktoren für das Mammakarzinom nach [148].**

Risikofaktor	Risikoerhöhung
fleisch- und fettreiche Ernährung	-
Fettsucht besonders in der Postmenopause	2-3
Alkohol (> 20 g Ethanol/Tag)	1,5-2
Rauchen	-
Genetische Disposition (BRCA1-Gen, BRCA2-Gen) familiäre Belastung, bei der Mutter, Schwester	2-9
frühe Menarche und späte Menopause, somit langer Estrogeneinfluss	1,0-2
gestörtes Estrogen-Gestagen Verhältnis (Gestagenmangelhypothese)	-
Supraphysiologische Estrogenbehandlung in der Postmenopause	1,0-3,0
höheres Alter (> 30 Jahre) bei ausgetragener Erstschwangerschaft	-3
Nulliparität	1,5-2,3
Mastopathie (mit einer entsprechenden mammografischen Dichte ACR 3-4)	-2
ansteigendes Risiko mit dem Alter	-
ionisierende Strahlen	-
Hyperprolaktinämie	-
ethnische Faktoren	-
weibliches Geschlecht	-

### 1.1.4 Prävention des Mammakarzinoms

Die Nomenklatur präventiver Maßnahmen beim Mammakarzinom sieht eine Gruppierung in primäre, sekundäre und tertiäre Interventionen vor [119].

#### 1.1.4.1 Primäre Prävention

Die primäre Prävention ist der Versuch durch die Beseitigung möglicher Ursachen und Risiken die Erkrankung zu verhindern [119]. Hierbei werden einige Faktoren, die das Brustkrebsrisiko erhöhen, wie Übergewicht, körperliche Inaktivität, hoher Alkoholkonsum oder die Hormonersatztherapie, durch Änderungen des Lebensstils günstig beeinflusst [134]. Bei erhöhtem Risiko aufgrund nicht modifizierbarer Risikofaktoren, wie höheres Lebensalter, hereditäre Brustkrebsformen, Kinderlosigkeit, frühe Menarche oder späte Menopause, kann nach individueller Nutzen-Risiko-Abwägung eine medikamentöse (Tamoxifen, Raloxifen, Aromatasehemmer, Chemoprävention) oder chirurgische (bilaterale Mastektomie) Primärprävention in Betracht gezogen werden [134].

### 1.1.4.2 Sekundäre Prävention

Die sekundäre Prävention hat das Ziel die Brustkrebskrankung in einem möglichst frühen Stadium zu diagnostizieren und damit die Heilungschancen zu verbessern. In dieses Ziel einbezogen sind auch die präinvasiven Veränderungen [119]. Hinsichtlich der Bildgebung zur Entdeckung des Mammakarzinoms werden 3 Modalitäten eingesetzt: die Mammografie, der Ultraschall und Mamma-MRT (Magnetresonanztomografie), wobei die Leistungsfähigkeit der verschiedenen Modalitäten unterschiedlich ist [39]. Die Mammografie wird als Standardverfahren in der Brustkrebsfrüherkennung mit einer Sensitivität von 70% und einer Spezifität von 90% eingesetzt [39]. Das leistungsfähigste Verfahren in der Früherkennung des Mammakarzinoms ist jedoch die Mamma-MRT mit einer Sensitivität von 90% und einer Spezifität von über 90% [39].

### 1.1.4.3 Tertiäre Prävention

Die tertiäre Prävention entspricht dem Prinzip der Tumornachsorge unter dem Aspekt der Rezidivfrüherkennung, wobei allerdings nur die Früherkennung lokoregionärer Rezidive unter den aktuellen therapeutischen Möglichkeiten einen Überlebensvorteil für betroffene Frauen bietet [119]. Ziele der Nachsorge sind neben der Erkennung lokoregionärer bzw. intramammärer Rezidive, kontralateraler Mammakarzinome und Zweitkarzinome, vorzugsweise die physische und psychische Gesundung sowie die psychosoziale Rehabilitation der Patientinnen [50].

## 1.1.5 Therapie des Mammakarzinoms

### 1.1.5.1 Operative Therapie

Die operative Behandlung wird entweder als Tumorexzision oder Quadrantenresektion mit zusätzlicher axillärer Lymphonodektomie vorgenommen (brusterhaltende Therapie = BET), oder als modifizierte radikale Mastektomie, bestehend aus der Entfernung der Brustdrüse inklusive der Faszie des *M. pectoralis major* und der ipsilateralen axillären Lymphknoten [84]. Unabhängig von der sich postoperativ meist anschließenden systemischen Behandlung (Chemo- und/oder Hormontherapie) muss nach brusterhaltender Operation stets eine Radiotherapie der Brust erfolgen [84]. Der plastische Wiederaufbau der Brust kann im Rahmen der Primäroperation oder nach Abschluss der adjuvanten Behandlung stattfinden [84].

### 1.1.5.2 Radioonkologische Therapie des Mammakarzinoms

Das Ziel der postoperativen Strahlentherapie ist die Senkung des Lokalrezidivrisikos [84]. Nach brusterhaltender Operation ist die Radiatio der Brust obligat, nach modifiziert radikaler Mastektomie wird sie in Abhängigkeit von der Höhe des Rezidivrisikos indiziert [84]. Ferner kommt die Strahlentherapie oftmals im Rahmen der Rezidivtumor Behandlung sowie der Palliativbehandlung von Metastasen zum Einsatz [84] aber auch bei primärer Inoperabilität [39].

### 1.1.5.3 Medikamentöse Therapie

Beim Mammakarzinom besteht eine Indikation zur medikamentösen Therapie als neoadjuvante Therapie, als adjuvante Therapie und in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms [126]. Die Indikationsstellung ist abhängig vom Stadium der Expression der Hormonrezeptoren und der Amplifikation des HER2-Gens [126].

#### 1.1.5.3.1 Neoadjuvante Therapie

Die neoadjuvante systemische Therapie umfasst alle medikamentösen Therapieformen, die nach der histologischen Diagnosesicherung eines Mammakarzinoms vor Durchführung der operativen Maßnahmen verabreicht werden. Somit kann eine Chemotherapie neoadjuvant vor der Operation durchgeführt werden [39]. Eine neoadjuvante (primäre, präoperative) systemische Therapie wird als Standardbehandlung bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen oder inflammatorischen Mammakarzinomen im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes angesehen [39]. Die neoadjuvante Therapie kann zu einer höheren Rate an brusterhaltenden Therapien führen [39]. Der Effekt der neoadjuvanten Therapie ist bei hormonrezeptornegativen Karzinomen am größten [39].

#### 1.1.5.3.2 Adjuvante Therapie

Die adjuvante Behandlung der Primärerkrankung wird in Form einer endokrinen Therapie, einer Chemotherapie, einer anti-HER2-Antikörpertherapie oder in Kombination bzw. Sequenz dieser Therapieformen nach der Operation durchgeführt [39]. Für das Ansprechen auf die adjuvante endokrine Therapie ist der Status der Hormonrezeptoren ein prädiktiver Faktor [85]. Tamoxifen ist dabei ein integraler Bestandteil der antihormonalen Therapie sowohl beim prä- wie auch beim

postmenopausalen Mammakarzinom [85]. Durch den Einsatz von Aromatasehemmern wurden in den letzten Jahren bei hormonsensitiven Tumoren neue Fortschritte erzielt [15]. Es wird zwischen nicht steroidalen Aromatasehemmern wie Anastrozol (Arimidex) und Letrozol (Femara) und steroidalen Aromatasehemmern wie Exemestan (Aromasin) unterschieden [15]. Für die postmenopausale Patientin lautet die Empfehlung für die standard endokrine systemische Therapie, die Verabreichung eines Aromatasehemmers für 5 Jahre oder Verabreichung von Tamoxifen für 2-3 Jahre mit anschließender Aromatasehemmerbehandlung [97].

Bei prämenopausalen Patientinnen erfolgt dagegen die Ausschaltung der Ovarialfunktion mittels GnRH-Analoga/LHRH-Analoga über einen Zeitraum von mindestens 2 Jahren mit anschließender Kombination von Tamoxifen für 5 Jahre [97]. Die adjuvante Chemotherapie gilt als Standard für folgende Indikationen: hormonrezeptornegative Tumore, fraglich hormonrezeptornegative Tumore, HER2-positive Tumore mit simultaner Antikörpertherapie, nodalpositive Tumore, Grading: 3, junges Erkrankungsalter unter 35 Jahren und triple negative Tumore (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2) [39]. Standardsubstanzen der adjuvanten Chemotherapie sind Anthracykline und Taxane [39]. Bei 15-30% aller invasiven Mammakarzinome kann eine HER2 Überexpression festgestellt werden [97]. Die adjuvante Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin) wird beim immunhistochemischen Nachweis (3+) oder einer Amplifikation mittels FISH-Technik bei mittlerem oder hohem Risiko indiziert [97].

### 1.2 Naturstoffe

Als Naturstoffe werden alle organischen Verbindungen bezeichnet, die im Pflanzen- und Tierreich vorkommen [17]. Naturstoffe und von ihnen abgeleitete Derivate oder Analoga haben in der medizinischen Anwendung und Forschung einen festen Platz (Abb. 2). So sind etwa die Hälfte der in den letzten Jahren zugelassenen Arzneimittel Naturstoffe, Naturstoffderivate oder Naturstoffanaloga. Historisch gesehen stehen die Pflanzen als Quelle für Arzneimittel an erster Stelle [133]. Schätzungsweise sind von ca. 250000 Pflanzenarten auf der Erde weniger als 10% bezüglich ihres medizinischen Nutzens systematisch untersucht worden [133]. Mikrobielle Arzneistoffe erlangten mit der Entdeckung des Penicillins große Bedeutung. Neben der Suche nach neuen Antibiotika war es überraschend, dass Mikroorganismen auch Metaboliten bereitstellen, welche Einsatz als Zytostatika, Immunsuppressiva oder Inhibitor der Cholesterinbiosynthese fanden. Große Hoffnung setzt man in der medizinischen

Forschung auf biologisch aktive Naturstoffe aus Meeresorganismen [133]. Immer wieder stellte sich heraus, dass Wirbellose Tiere, d.h. Schwämme, Korallen, Manteltiere oder Muscheln, in ihren Extrakten Wirkstoffe enthielten, die nur in geringer Konzentration in Tieren enthalten waren [133].

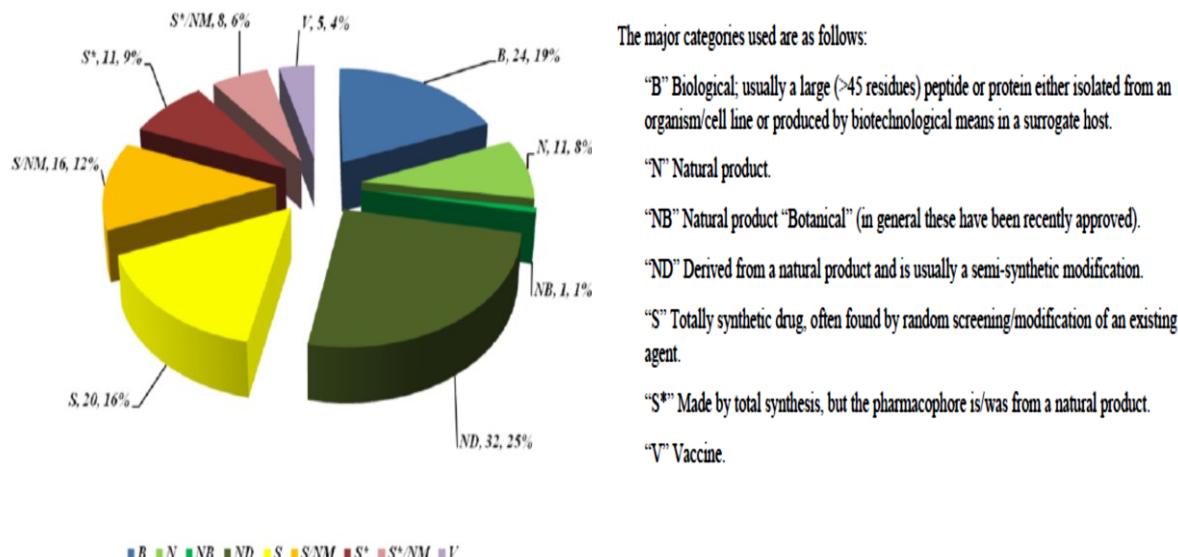


Abbildung 2: Herkunft der Antitumor-Medikamente weltweit, 1981-2010 [91].

### 1.2.1 Therapeutika des Mammakarzinoms auf Naturstoffbasis

Ein zugelassenes Krebsmedikament auf der Basis eines Naturstoffes ist das Eribulin (Halaven), welches bei der Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms eingesetzt wird [106, 122, 161]. Eribulin (Halaven) ist ein synthetisches Derivat aus dem Meeresschwamm *Halichondria okadai* [122], welcher an der pazifischen Küste von Japan vorkommt [106]. Die hauptsächlich antikanzerogene Substanz aus dem Meeresschwamm *Halichondria okadai*, ist das Halichondrin B, dessen synthetisches Analogon das Eribulin (Halaven) ist [106, 122]. Durch Bindung an Tubuline hemmt Eribulin (Halaven) die Mikrotubuli-Dynamik und somit die Replikation, wodurch es infolgedessen zur Apoptose der Tumorzellen kommt [122, 161].

Weitere natürlich vorkommende Zytostatika sind die Taxane, welche eine signifikante Wirksamkeit beim frühen und fortgeschrittenen Mammakarzinom haben [26]. Die am häufigsten eingesetzten Zytostatika während der Brustkrebsbehandlung sind die Taxane Paclitaxel (Taxol®) und Docetaxel (Taxotere®) [78]. Paclitaxel (Taxol®) ist eine in der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) vorkommende Substanz [40, 114].

Die Gewinnung von Paclitaxel (Taxol®) aus der Rinde der pazifischen Eibe hätte zu enormen Bestandsschäden geführt [114, 133]. Dieses Problem konnte gelöst werden indem der Biosynthesevorläufer 10-Deacetylbaccatin III aus den Nadeln schnell nachwachsender europäischer Eiben (*Taxus baccata*) oder aus pflanzlichen Zellkulturen gewonnen werden konnte und halbsynthetisch in Taxol umgewandelt wurde [114, 133]. Docetaxel (Taxotere®) ist halbsynthetisch von 10-Deacetylbaccatin III abgeleitet und ist etwas besser wasserlöslich als Paclitaxel (Taxol®) [114]. Taxane hemmen die Zellproliferation durch Auslösung einer mitotischen Blockade in der Metaphase/Anaphase, wodurch es zu einer unvollständigen Anordnung der Chromosomen in der Metaphase kommt und einer nicht normalen Organisation des Spindelapparates [114].

### 1.2.2 Die blaue Süßlupine (*Lupinus angustifolius*)

Die blaue Süßlupine (*Lupinus angustifolius*) gehört zur Familie der *Fabaceae* und wird zurzeit in Deutschland angebaut, um aus den Samen Proteine und Ballaststoffe zu gewinnen, welche eine breite Anwendung in der industriellen Lebensmittelindustrie haben sollen [101]. Die Lupine als Hülsenfrucht besitzt einen hohen Proteingehalt, Ballaststoffe, Mikronährstoffe sowie bioaktive Substanzen [116]. Die hauptsächlichen Sekundärmetabolite der Gattung *Lupinus* sind Alkaloide, Flavonoide und triterpenoide Saponine [168]. Zusätzlich zu dem hervorragenden Ernährungsprofil der Lupine können die in ihr enthaltenen bioaktiven Substanzen wie phenolische Verbindungen und Phytosterole gegen Krebs und Herz-Kreislauferkrankungen schützen [116]. So vermindert zum Beispiel, der Verzehr von Lupinen Samenfasern das Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken [37, 61]. Weitere Studien konnten zeigen, dass die Samen der blauen Süßlupine antibakterielle Wirkungen [95] haben sowie immunotrope Aktivität [12]. Außerdem wird auch über eine cholesterinsenkende (hypercholesterolemischen) Wirkung des Lupinenproteins [147] sowie der Bindung von Insulin *in vitro* und einer Reduzierung des Plasma-Glukosespiegels berichtet [81]. Eine antikanzerogene Wirkung der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*) bezogen auf das Mammakarzinom ist bisher nicht bekannt.

## 1.3 Angriffspunkte für antikanzerogene Substanzen

Eine gesunde Zelle kann proliferieren, differenzieren und als differenzierte Zelle ihre Funktion ausüben, in eine vorübergehende Ruhephase des Zellzyklus ( $G_0$ ) eintreten

oder den programmierten Zelltod (Apoptose) sterben. Tumorzellen unterscheiden sich in mehreren Eigenschaften von gesunden Zellen. Die Moleküle und Mechanismen, die diesen tumorspezifischen Merkmalen zugrunde liegen, werden als therapeutische Angriffspunkte genutzt. Fünf grundlegende Aspekte seien genannt [140].

1. Verglichen mit gesunden Zellen benötigen Tumorzellen weniger externe Wachstumsfaktoren. Tumorzellen können entweder unabhängig von Wachstumsfaktoren wachsen oder diese selbst produzieren. So können sie ihre Zellteilung und ihr Wachstum autonom regulieren.
2. Tumorzellen können sich unbegrenzt teilen und beachten bei ihrem Wachstum keine natürlichen Barrieren, wie Organgrenzen.
3. Tumorzellen sind bis zu einem gewissen Grad resistent gegen äußere wachstumshemmende und Apoptose induzierende Signale.
4. Der direkte Kontakt zu Nachbarzellen, der bei gesunden Zellen zur Hemmung der Zellteilung führt, hat bei Tumorzellen keinen Effekt.
5. Sehr häufig sind in Tumorzellen intrazelluläre Signalwege defekt, die für die Apoptose verantwortlich sind.

### 1.3.1 Zelltod: Apoptose und Nekrose (Nekroptose)

Die Lebenszeit jeder normalen Zelle ist begrenzt. Unterschieden werden prinzipiell die zwei Wege Apoptose und Nekrose (Nekroptose), welche zum Zelltod führen können.

#### 1.3.1.1 Apoptose

Die Apoptose spielt zum einen eine wichtige Rolle bei der Zell- und Organentwicklung und ist im erwachsenen Organismus der Gegenspieler der Zellproliferation und verantwortlich für die Aufrechterhaltung einer gleichmäßigen Zellzahl [140]. Des Weiteren handelt es sich bei der Apoptose um eine Qualitätskontrolle und einen Reparaturmechanismus, durch welchen einzelne genetisch geschädigte oder alternde Zellen entfernt werden [130]. Die Apoptose ist ein aktiver, ATP abhängiger

und strikt regulierter biochemischer Prozess, der gewährleistet, dass Zellen ohne Schädigung des Nachbargewebes sterben. Apoptose kann durch Bindung von Liganden an die sogenannten Todesrezeptoren über den extrinsischen oder den intrinsischen mitochondrialen Weg ausgelöst werden [22, 96, 130].

Defekte in den Signalwegen der Apoptose sind verantwortlich für die Tumorentwicklung sowie der Resistenz von Tumoren gegenüber der Chemo- und Strahlentherapie [130]. Tumorzellen haben eine Vielzahl von molekularen Mechanismen um Apoptose zu unterdrücken [130]. Durch die Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*) oder durch die Herabregulierung von proapoptotischen Proteinen wie Bax (*Bcl-2-interactive cell death susceptibility regulator*) können Tumorzellen eine Apoptoseresistenz erwerben [130]. Die Expression von Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*) und Bax (*Bcl-2-interactive cell death susceptibility regulator*) ist durch das Tumorsuppressorgen p<sup>53</sup> reguliert, welches in über 50% aller Tumore mutiert ist [130]. Deshalb ist p<sup>53</sup> ein Angriffspunkt in der Krebstherapie. PRIMA-1 ((2,2-bis(Hydroxymethyl)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-one), (*p<sup>53</sup> reactivation and induction of massive apoptosis*)) ist ein zellpermeabler p<sup>53</sup> Reaktivator. Die antionkogene Substanz verursacht Apoptose indem sie p<sup>53</sup> in seine aktive Konformation bringt und wieder DNA-bindefähig und damit funktionsfähig macht [88]. Das Trp<sup>73</sup> Gen enthält zwei Promotoren, welche die Expression der zwei Hauptgruppen der p<sup>73</sup> Isoform mit unterschiedlicher zellulärer Funktion steuern [130]. Die TAp<sup>73</sup> Isoform umfasst dabei die p<sup>73</sup> transaktivierende Domäne (TA) und zeigt proapoptotische Aktivität, wohingegen die N-terminal verkürzte Isoform ΔNp<sup>73</sup> eine antiapoptotische Wirkung hat [130]. In einigen Tumoren ist die Herabregulierung von Tap<sup>73</sup> gekoppelt mit einer Hochregulation von ΔNp<sup>73</sup> und dient als Marker für eine ungünstige Prognose bei vielen Krebsarten [130]. Deshalb wird pharmakologisch versucht die Expression von ΔNp<sup>73</sup> zu hemmen [130].

### 1.3.2 Nekrose (Nekroptose)

Der nekrotische Zelltod wurde lange Zeit als ein passiver unregulierter Prozess beschrieben [25, 34, 102]. Forschungen der letzten Jahre konnten jedoch zeigen, dass auch die Nekrose über zielgerichtete programmierte Zelltodssignalwege verfügt [25, 34, 102]. Reguliert wird die programmierte Nekrose (Nekroptose) durch die Proteinkinasen RIP1 sowie RIP3 (*receptor interaction protein kinase 1 and 3*) [25, 154]. Der gebildete Komplex aus RIP1/RIP3 (*receptor interaction protein kinase 1 and 3*) innerhalb des

Nekrosoms ist entscheidend für die Induktion der Nekroptose [47]. Die Proteinkinase RIP1 (*receptor interaction protein kinase 1*) kann zum Beispiel aktiviert werden durch TNF (*tumor necrosis factor*), TRAIL (*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*), LPS (*lipopolysaccharides*), oxidativen Stress und DNA-Schäden (über die Poly-ADP-Ribosepolymerase) [102]. Die Signalübertragung erfolgt dabei direkt oder indirekt über weitere Kinasen durch die Proteinkinase RIP1 (*receptor interaction protein kinase 1*) zu den Mitochondrien, wodurch spezifische Schäden entstehen [102]. Durch den Zusammenbruch der Mitochondrien werden verschiedene Proteasen (Calpaine, Cathepsine) und Phospholipasen aktiviert, was letztendlich zur Zerstörung der Plasmamembran führt, einem Merkmal des nekrotischen Zelltodes [102]. Ein therapeutischer Angriffspunkt wäre die Kontrolle von Nekroptose über bestimmte Signaltransduktionswege.

### 1.3.2.1 Zellteilung

Um Tumorzellen möglichst selektiv abzutöten, werden spezifische und selektive Unterschiede zu den Normalzellen als Angriffspunkte ausgewählt. Da die erhöhte Proliferationsrate einer der Hauptunterschiede ist, stellt der Zellzyklus einer Tumorzelle mit den erhöhten Raten der DNA, RNA und Proteinsynthese einen wichtigen Angriffspunkt für antikanzerogene Substanzen dar [35, 120]. Typische Zellzyklusunterschiede zwischen Tumorzellen und sich schnell teilenden Normal- sowie somatischen Stammzellen können jedoch verwischen [140]. Daher bedeutet ein Angriff auf den Zellzyklus der Tumorzelle immer auch ein Angriff auf bestimmte Normalzellen, woraus auch die häufig beobachteten Nebenwirkungen einiger Zytostatika resultieren [140]. Ein möglicher Angriffspunkt der Tumortherapie sind die CDKs (*cyclin-dependet kinases*) (Abb.3), welche als zentrale Zellzyklusregulatoren identifiziert wurden. Hier wird versucht, CDK spezifische Kinaseinhibitoren als Tumortherapeutika zu finden und zu entwickeln [45]. Neben CDKs als Zielmoleküle für die Entwicklung neuer Pharmaka werden auch gegen zahlreiche andere Kinasen etwa der Aurora-Familie oder der Checkpoint-Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related*), CHK1 (*checkpoint kinase-1*) und CHK2 (*checkpoint kinase-2*), Inhibitoren entwickelt und getestet [45].

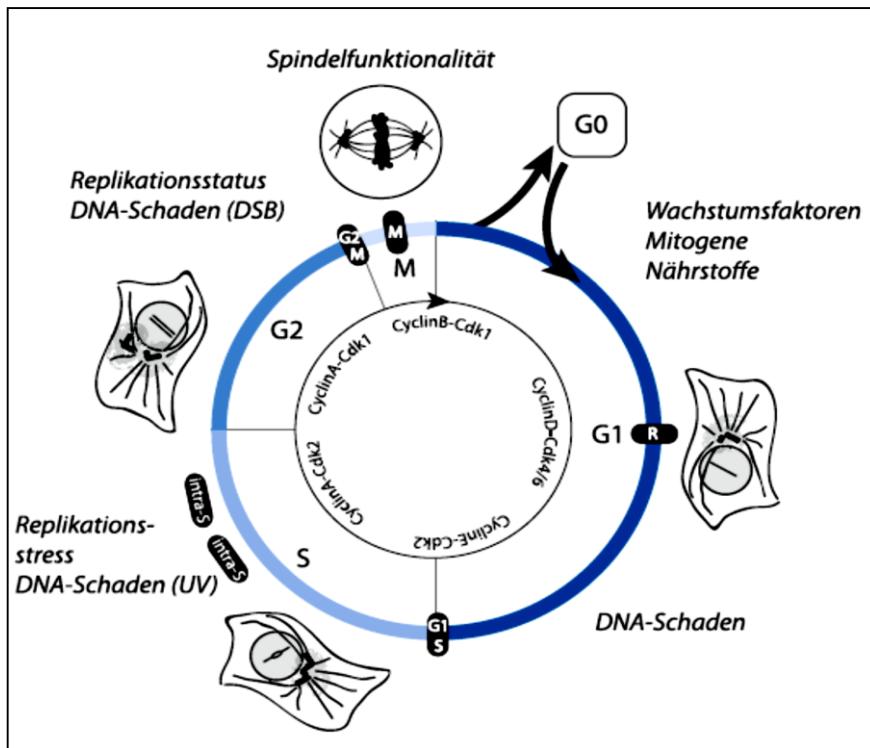


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus [45].

Dargestellt sind die einzelnen Zellzyklusphasen, deren wichtigste Cyclin-CDK-Komplexe sowie eine vereinfachte Darstellung wichtiger zellulärer Vorgänge während des Zellzyklus (Verdoppelung der DNA und des Zentrosoms sowie die Ausbildung der mitotischen Spindel während der Mitose). Die schwarzen Balken symbolisieren jene Zellzyklusübergänge, die durch Checkpoint-Proteine reguliert werden. *Kursiv* sind Faktoren dargestellt, die zur Aktivierung des Checkpoint medierten Zellzyklusarrestes führen können.

### 1.3.3 Metabolismus: Die aerobe Glykolyse

Der Stoffwechsel von Tumorzellen unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von dem ihres Ursprungsgewebes. Zellen gewinnen normalerweise den größten Teil ihrer Energie durch die oxidative Phosphorylierung. Bei vielen Tumorzellen zeigte sich trotz Anwesenheit von Sauerstoff eine vermehrte Glukoseaufnahme und Laktatproduktion. Diese aerobe Form der Glykolyse (Abb. 4), die nach ihrem Entdecker auch als „Warburg-Effekt“ bezeichnet wird, ist das bekannteste Beispiel für metabolische Veränderungen in Tumorzellen und stellt eine Gemeinsamkeit vieler Tumore dar [68, 162]. Diesen veränderten Stoffwechsel als möglichen therapeutischen Ansatz zu nutzen, gewann in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Die involvierten Enzyme stellen ein direktes Ziel spezifischer Inhibitoren dar [132] ebenso wie die Manipulation der Signalwege die in Tumorzellen überaktiviert oder unterdrückt sind. So lässt sich zum Beispiel durch den spezifischen PFKBP3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3) Inhibitor 3 PO (3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one) die Konzentration an F2,6BP (fructose-2,6-bisphosphate) in

Tumorzellen verringern, was zu einer geringeren Glukoseaufnahme führt und einer damit verbundenen Wachstumshemmung [27]. Die PKM2 (*pyruvate kinase M2*) als ein Schlüsselenzym der Glykolyse ist ebenfalls ein attraktives Ziel für die Tumortherapie [99]. Das Enzym PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*) ist ein mitochondrielles Enzym, welches die Aktivität der PDH (*pyruvate dehydrogenase*) einem Enzymkomplex, der zytosolisches Pyruvat in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA als Substrat für den TCA (*tricarbonacid cycle*) umwandelt, selektiv inhibiert [131]. Dichloracetat (DCA) ist ein bekannter PDK Inhibitor [99, 131]. Das Enzym LDH5 (*lactate dehydrogenase 5*) spielt eine essenzielle Rolle bei der Aufrechterhaltung einer hohen Glykolyserate von Tumorzellen und ist somit ein weiterer therapeutischer Angriffspunkt in der Krebstherapie [74, 155]. In vielen Tumortypen sind die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT3 überexprimiert und somit geeignete Ziele für Tumorhemmstoffe. Auch der MCT1 (*monocarboxylate transporter 1*), welcher ein Schlüsselregulator des Laktattransports zwischen Tumorzellen ist, eignet sich als therapeutisches Ziel [123]. Als ein Hauptregulator der Glykolyse ist HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) ein weiterer bedeutender Angriffspunkt in der Krebstherapie [99].

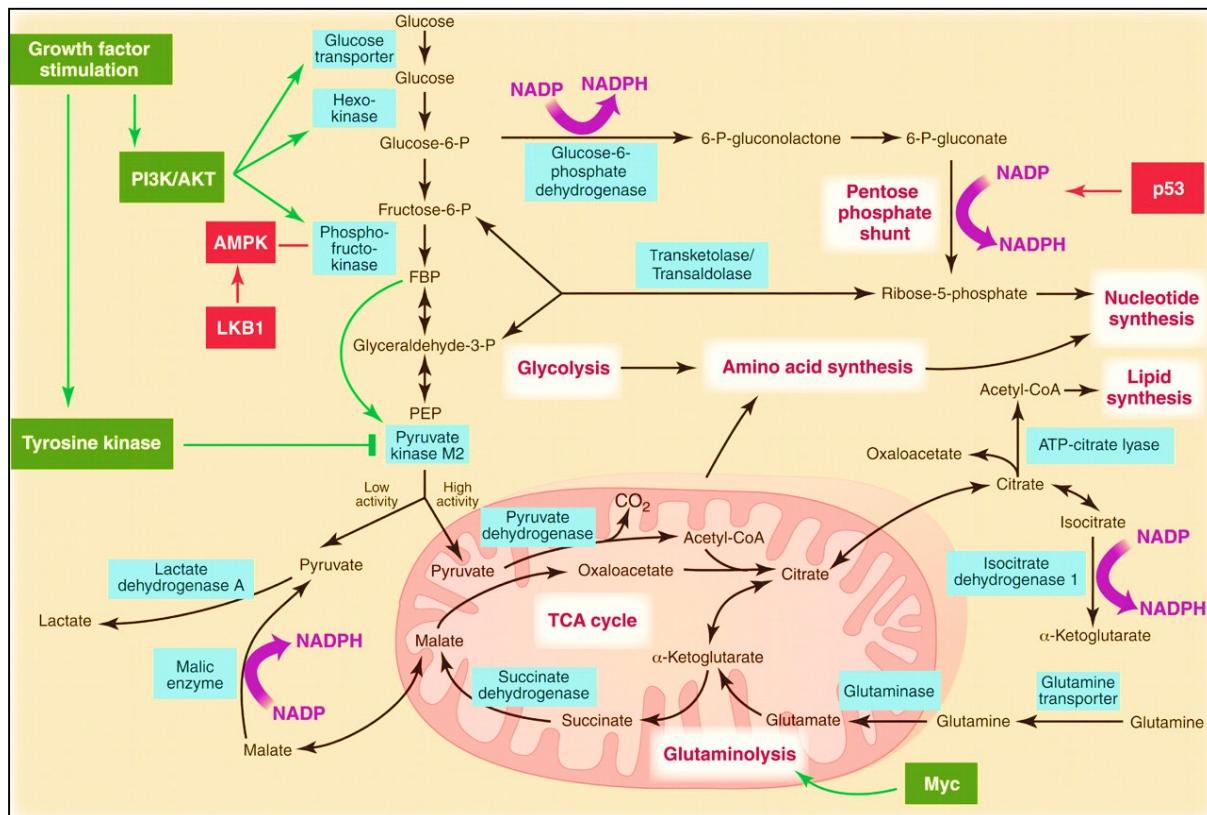


Abbildung 4: Glykolyse der Tumorzelle [137].

Enzyme sowie Transporter sind blau gekennzeichnet und ihre Substrate schwarz. PKM2 (*pyruvate kinase M2*), ALAT (*alanine aminotransferase*), PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*), PDH (*pyruvate dehydrogenase*), GLUT (*glucose transporter*), MCT (*monocarboxylate transporter*), IDH (*isocitrate dehydrogenase*).

### 1.3.4 Metastasierung: Migration und Invasion

Die gerichtete Migration von Tumorzellen sowie deren invasive Kapazität sind fundamentale Bestandteile des Metastasierungsprozesses [70]. Metastasen sind aufgrund der schwierigen Behandlung und der Ausbreitung von Tumorzellen in Lunge, Leber, Gehirn und andere Organe [104] eine der Hauptursachen für die Mortalität von Krebspatienten [126, 158]. Beim metastasierenden Mammakarzinom beträgt die 5-Jahres Überlebensrate nur 26% [104]. Die Tumormetastasierung ist ein mehrstufiger Prozess, bei welchen Tumorzellen einige funktionelle Proteine und Methoden benötigen, um vom Primärtumor aus zu migrieren, damit sie in das umliegende Gewebe sowie in Blut und Lymphgefäß eindringen können [104]. Deshalb sind die Moleküle, welche involviert sind in die Tumorzellmigration/invasion potenzielle Angriffspunkte für die Anti-Metastasen Therapie.

Die funktionellen Proteine aus der Gruppe der MMPs (*matrix metalloproteinases*) sind zum Beispiel kritische Faktoren innerhalb des Metastasierungsprozesses [104]. Sie spielen eine zentrale Rolle beim Durchdringen der Tumorzellen von Geweben, der Ausbreitung von Tumoren sowie der Bildung von Metastasen [156]. MMPs (*matrix metalloproteinases*) sind somit potenzielle therapeutische Zielmoleküle innerhalb der Krebstherapie [32].

Des Weiteren wurde der CXCR4 (*chemokine receptor type 4*) wegen seiner bedeutenden Rolle bei der Metastasierung intensiv untersucht [48]. CXCR4 (*chemokine receptor type 4*) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der die Zellmigration entlang des Chemokingradienten in Richtung des Chemokins SDF1 (*stromal derived factor 1*) reguliert [48]. Die CXCR4 (*chemokine receptor type 4*) Ligandenbindung kann zur Aktivierung von PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) und Rho-GTPasen führen, welche beteiligt sind an der Regulierung der Chemotaxis [48]. Jedes dieser Moleküle spielt ebenfalls eine wichtige Rolle beim metastasierenden Mammakarzinom. Geeignete CXCR4-Inhibitoren sind somit von pharmakologischem Interesse.

### 1.4 Zielstellung

Pflanzen werden traditionell nicht nur zur Ernährung, sondern auch zur Therapie von Krankheiten eingesetzt, da sie pharmakologisch wirksame Substanzen enthalten.

Dabei beruhen die therapeutischen und protektiven Wirkungen auf einer Vielfalt an gesundheitsfördernden sekundären Pflanzenstoffen.

Die blaue Süßlupine (*L. angustifolius*), welche ebenfalls wie die Sojapflanze (*Glycine max*) einen hohen Proteingehalt aufweist, wird auch „Sojabohne des Nordens“ genannt. Im Gegensatz zur Sojapflanze lässt sich die blaue Süßlupine unter hiesigen Klimabedingungen leicht kultivieren. Beide Pflanzen gehören zur Familie der Leguminosen (*Fabaceae*). Epidemiologische Studien der asiatischen Bevölkerung zeigten ein deutlich verringertes Brustkrebsrisiko, durch eine mit der Nahrung aufgenommene hohe Menge an Soja [87, 152].

Neben dem ähnlich hohen Proteingehalt der blauen Süßlupine und dem ernährungsphysiologischen Wert der hochwertigen Lupinenproteine, welche aus dem Samen der Pflanzen gewonnen werden, stellte sich die Frage ob die blaue Süßlupine (*L. angustifolius*) ebenfalls wie die Sojapflanze (*Glycine max*) gesundheitsfördernde Eigenschaften am Mammakarzinom besitzt.

Im Rahmen des BMBF-Projektes „PlantsProFood“ erfolgte die Testung der durch Mikrowellenextraktion gewonnenen ethanolischen Extrakte aus den pflanzlichen Organen Samen, Blatt, Spross und Wurzel sowie dem Öl und dem Proteinisolat *in vitro* am Mammakarzinom.

Neben Tumorgröße, Ausbreitungsmuster und Zellart sind auch die Expression der Hormonrezeptoren sowie die Expression des HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) entscheidend für die Typisierung und Therapie des Mammakarzinoms. Deshalb wurden für die *in vitro* Untersuchungen die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit positiven Hormonrezeptorstatus und Expression des HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) verwendet sowie die Mammakarzinomzelllinie BT20 mit negativen Hormonrezeptorstatus und negativer Expression von HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*). Als Kontrolle für nichtkanzerogenes Gewebe wurde die benigne Zelllinie MCF12A und primäre ad. Fibroblasten verwendet.

Die über die Mikrowellenextraktion gewonnenen Vielstoffgemische aus Samen, Blatt, Spross und Wurzel sollten zunächst Aufschluss darüber geben, welches Pflanzenorgan von *L. angustifolius* über antikanzerogene Eigenschaften verfügt.

Die Biosynthese pflanzlicher Sekundärmetabolite ist abhängig von biotischen und

abiotischen Faktoren, somit stellte sich die Frage, welchen Einfluss das Pflanzenalter auf eine antitumorale Wirkung *in vitro* am Mammakarzinom besitzt.

Des Weiteren wurden die Extrakte der Pflanzenorgane, welche eine antikanzerogene Wirkung zeigten auf weitere *in vitro* Parameter wie Apoptose, Nekrose, Migration, Invasion, Glukoseaufnahme, Laktatproduktion und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration an den malignen Mammakarzinomzellen sowie benignen Zellen untersucht.

Die einzelnen Arbeitsschwerpunkte dieser Arbeit können aus folgenden Fließschema in Abbildung 5 betrachtet werden.

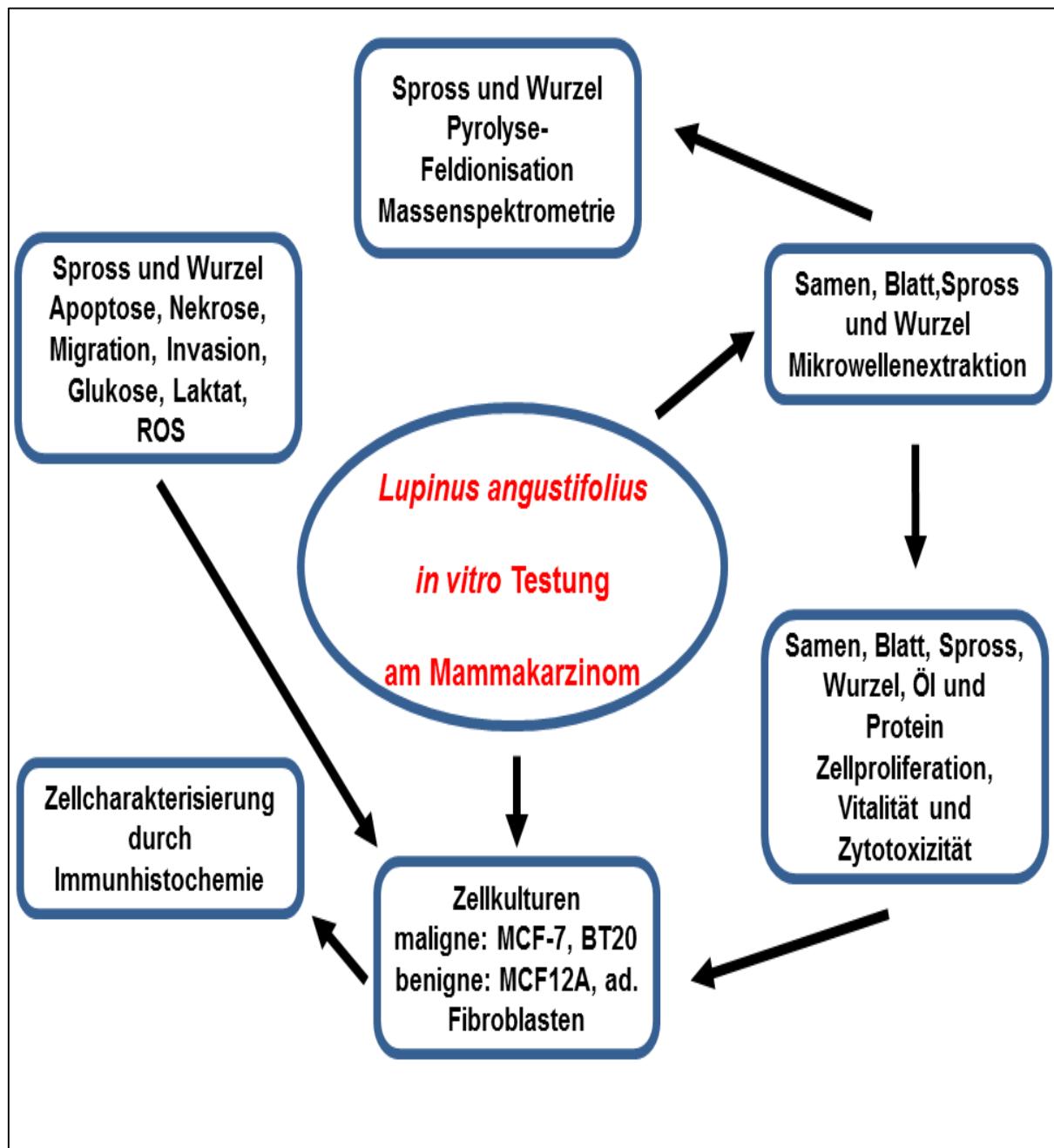


Abbildung 5: Fließschema der Arbeitsschwerpunkte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Amphotericin B	GibcoBRL
Bacillol R plus	Bode
Ethanol (absolut)	Applichem
17-β Estradiol	Sigma-Aldrich-Chemie
FKS = fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich-Chemie
Formafix 4% gepuffert	Grimm med. Recycling GmbH
HCL 37%	CarlRoth
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 37%	CarlRoth
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%	Merck
PBS (phoshatgepufferte NaCl-Lösung)	Biochrom
Penicillin-Streptomycin-Solution	Sigma-Aldrich-Chemie
Supplement-Mix	Promo Cell
Tamoxifen	Sigma-Aldrich-Chemie
Trypanblau (0,4%ig)	Sigma-Aldrich-Chemie
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich-Chemie

#### 2.1.2 Laborgeräte

Gerät	Firma
Biofuge pico	Heraeus, Deutschland
Brutschrank „Function Line“	Heraeus Deutschland
Bürker Zählkammer	Poly-Optik, Deutschland
Concentrator 5301	Eppendorf
Digitalkamera Canon Power Shot G5	Canon, Deutschland, GmbH
ELISA-Fotometer BioRad Modell 680	BioRad Laboratories
Kühlschrank	Liebherr Premium
Massenspektrometer MAT 900	Finnigan, MAT, Bremen, Deutschland
Mikroskop Fluoreszenz	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH
Mikroskop Olympus CK2-TR	Optical Co.
Mikroskop Carl Zeiss Axiovert 40 C	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH
Olympus Analyser	Olympus
Sterilbank Heraeus „Hera safe“	Kendro Laboratory Products
Tiefkühlschrank Samyo Ultra Low	Ewald Innovationstechnik GmbH
Vortexer Heidolph „Reax 2000“	Heidolph
Waage BP2105	Sartorius, Deutschland
Zentrifuge Hettich „Universal 30 RF“	Hettich Zentrifuge

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Kulturflaschen	Nunclon TM Surface
1,5 ml Eppendorf-Tubes	Eppendorf
Pipetten Typ Research	Eppendorf
Pipetten (Glas) (5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP
Reaktionsgefäß 25, 50 ml	Grüner bio-one Cellstar ®
24-Wellplatte, 96-Wellplatte	Grüner bio-one Cellstar®

### 2.1.4 Kits

Kit	Firma
Annexin V-FITC Kit	Mytenyi Biotec
BCA Protein Assay Kit (Pierce)	Thermo Scientific
Cell-Proliferation ELISA, (BrdU)	Roche
Cytotoxicity Detection Kit, (LDH)	Roche
Cell Proliferations Kit I (MTT)	Roche
Cell Death Detection ELISA	Roche
CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Kit	Cell Biolabs, INC.
Hydrogen Peroxide Assay Kit	BioVision
ImmPRESS Universal Reagenz Anti Mouse/Rabbit Ig Kit	Vector Laboratories
LinRed Substratkit für Peroxidase	LINARIS

### 2.1.5 Software

Software	Hyperlink
Axio Vision Rel 4.8	<a href="https://www.micro-shop.zeiss.com">https://www.micro-shop.zeiss.com</a>
Microsoft Office	<a href="http://www.microsoft.com">http://www.microsoft.com</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez</a>
Sigma Plot 11.0	<a href="http://www.itmz.uni-rostock.de">http://www.itmz.uni-rostock.de</a>
SPSS	<a href="http://www.itmz.uni-rostock.de">http://www.itmz.uni-rostock.de</a>
Windows Vista	<a href="http://www.microsoft.com">http://www.microsoft.com</a>

## 2.1.6 Antikörper

Spezifität	Isotyp	Klon	Endverdünnung	Bezugsquelle
Zytokeratin 18	IgG1	CY90	Ready-to-use	Serotec
Estrogenrezeptor $\alpha$	IgG1	1D5	Ready-to-use	DAKO
Estrogenrezeptor $\beta$	IgG1	57/3	Ready-to-use	Serotec
HER2 Onkoprotein	-	-	1:1000	DAKO
Progesteronrezeptor	IgG1	PgR 636	Ready-to-use	DAKO
TKTL1	IgG1	1C10	Ready-to-use	Serotec
Vimentin	HuCAL Fab	8866	-	Serotec

## 2.1.7 Medien, Puffer, Lösungen

### 2.1.7.1 Medien für Zellkultur

Medium	Zelllinie
DMEM 10% FKS	MCF-7, ad. Fibroblasten
Einfriermedium (DMEM, 20% FKS, 10% DMSO)	Alle Zelllinien
Ham's F12	MCF12A
MEM 10% FKS	BT20
RPMI 10% FKS	BT20

### 2.1.7.2 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Verwendung
1N HCL-Lösung (833 $\mu$ l konz. HCL für 10 ml Lösung)	LDH-Test
1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (278 $\mu$ l konz. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> für 10 ml Lösung)	BrdU-Test
PBS 7,4 steril (1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2,7 mM KCL, 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 137 mM NaCL)	Pufferlösung

## 2.1.8 Zelllinien

### 2.1.8.1 MCF-7

Bei der Zellkulturlinie MCF-7 handelt es sich um humane Mammakarzinomzellen der Linie MCF-7. Diese bestehen aus epithelialen Adenokarzinomzellen und sind Estrogenrezeptor  $\alpha$  und  $\beta$  positiv [2]. Vor einigen Jahrzehnten wurden die MCF-7 Brustkrebszellen der 69-jährigen Ordensschwester Catherine Frances aus einem Pleuraerguss entnommen [2]. In dem Namen MCF-7 steht MCF für *Michigan Cancer Foundation*, der Institution in Detroit, die den Bezug dieser Zellen für Forschungseinrichtungen in der ganzen Welt ermöglichte [118]. Die Zahl 7 gibt die erforderlichen Biopsien an, die notwendig waren, um die der Patientin entnommenen Zellen im Labor weiter zu züchten [118]. MCF-7 Zellen wachsen einschichtig als Monolayer und adhären auf dem Boden von Zellkulturflaschen.

### 2.1.8.2 BT20

Die Mammakarzinomzelllinie BT20 wurde durch E.Y. Lasfargues und L. Ozzello im Jahre 1958 durch die Entnahme eines Tumors, bei einer 74-jährigen Kaukasierin etabliert [4]. Sie ist eine humane Mammakarzinomzelllinie, welche epitheliale Adenokarzinome (2. Grades) in Nacktmäusen hervorruft [4]. BT20 Zellen sind negativ für die Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$ , sie exprimieren jedoch die Estrogenrezeptor mRNA, welche eine Deletion im Exon 5 aufweist [4]. Das Wachstum der BT20 Zellen wird durch den Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) gehemmt [4]. Weiterhin exprimieren die BT20 Zellen die Onkogene WNT3 und WNT7B [4].

### 2.1.8.3 MCF12A

Die MCF12A Zelllinie ist eine benigne epitheliale Zelllinie, welche etabliert wurde aus Gewebe einer Reduktionsmammaplastik [3]. Die Patientin war eine 60-jährige Kaukasierin, welche als Nulliparen Patientin mit fybrocystischer Erkrankung der Brust, die zentrale Bereiche von intraduktaler Hyperplasie enthielten, beschrieben wird [3]. MCF12A Zellen bilden eine typische luminaire Morphologie aus [3]. Die Zellen sind positiv für die epithelialen Zytokeratine 8, 14 und 18 und negativ für Zytokeratin 19 [3].

### 2.1.8.4 Fibroblasten

Bei den Fibroblasten handelt es sich um normale primäre humane dermale Fibroblasten eines adulten Donors. Fibroblasten sind im Bindegewebe vorkommende Zellen mesenchymalen Ursprungs, die eine wichtige Rolle bei der Synthese der Interzellulärsubstanz, der extrazellulären Matrix spielen [103].

**Tabelle 2: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.**

Zelllinie	Histologie	Herkunft	Referenz
MCF-7	Milchdrüse, Brust, Adenokarzinom	<i>Homo sapiens</i>	[2]
BT20	Milchdrüse, Brust, Adenokarzinom	<i>Homo sapiens</i>	[4]
ad. Fibroblasten	Haut	<i>Homo sapiens</i>	[103]
MCF12A	Milchdrüse, Brust, benigne	<i>Homo sapiens</i>	[3]

### 2.1.9 *Lupinus angustifolius* (Sorte Boregine): Das Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial wurden verschiedene Pflanzenorgane der blauen Süßlupine *L. angustifolius* (Sorte Boregine) verwendet. Im Jahr 2010 erfolgte am 01.04.2010 durch Mitarbeiter der Universitätsfrauenklinik in Rostock die Aussaat von Lupinensamen sowie die Ernte der Pflanzen am 01.07.2010 und 19.07.2010 in Rostock. Die Lagerung der unterschiedlichen Pflanzenorgane wie Wurzel, Spross und Blätter fand bei -80°C statt. Über die Saatzucht Steinach GmbH konnten im Jahr 2011 konventionell angebaute Lupinenpflanzen bezogen werden. Das Lupinenproteinisolat und das Lupinenöl wurden über das Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung IVV in Freisingen bezogen. Alle für die *in vitro* Testung verwendeten Pflanzenorgane sowie pflanzlichen Produkte der blauen Süßlupine *L. angustifolius* (Sorte Boregine) sind in der Tabelle 3 Seite 24 aufgeführt.

**Tabelle 3: Auflistung der *in vitro* untersuchten Pflanzenorgane und Produkte von *L. angustifolius* (Sorte Boregine).**

Pflanzenorgan	Standort	Erntezeitpunkt/Alter	<i>In vitro</i> Endkonzentration
Wurzel	Rostock/Eigenanzucht	01.07.2010 9 Wochen	200, 100, 50, 25, 10, 1, 0,1 µg/ml
Samen	Rostock/Eigenanzucht	19.07.2010 12 Wochen	200, 100, 50, 25, 10, 1, 0,1 µg/ml
Blatt	Rostock/Eigenanzucht	19.07.2010 12 Wochen	200, 100, 50, 25, 10, 1, 0,1 µg/ml
Spross	Rostock/Eigenanzucht	19.07.2010 12 Wochen	200, 100, 50, 25, 10, 1, 0,1 µg/ml
Wurzel	Rostock/Eigenanzucht	19.07.2010 12 Wochen	200, 100, 50, 25, 10, 1, 0,1 µg/ml
Samen (Proteinisolat)	Saatzucht Steinach/ konventionell	–	10000, 6000, 3000, 300, 150, 75, 60 µg/ml
Samen (Lupinenöl)	Saatzucht Steinach /konventionell	2011	1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000
Spross	Saatzucht Steinach/ konventionell	05.08.2011 12 Wochen	200, 100, 50, 25, 10, 1, 0,1 µg/ml
Wurzel	Saatzucht Steinach/ konventionell	05.08.2011 12 Wochen	200, 100, 50, 25, 10, 1, 0,1 µg/ml

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrowellenextraktion (*microwave assisted extraction MAE*)

Die Herstellung der pflanzlichen Extrakte erfolgte über das Verfahren der Mikrowellenextraktion durch Mitarbeiter der technischen Chemie in Rostock. Die Mikrowellenextraktion hat viele Vorteile gegenüber traditionellen Methoden, wie eine erhöhte Leistungsfähigkeit und einen verringerten Energie- und Zeitaufwand [23, 160]. Bei der Mikrowellenextraktion ist der Einsatz von polaren Lösungsmitteln nötig, da sich apolare Lösungsmittel durch die Mikrowelle nicht erhitzen lassen. Die Mikrowellenenergie wird auf die feste Probe übertragen und erhitzt sie gleichmäßig, dabei ist die Erwärmung des Lösungsmittels viel schneller als mit herkömmlichen Aufheizmethoden. Ebenfalls kann mit der Mikrowelle unter erhöhten Druck gearbeitet werden. Die Extraktionszeit ist somit wesentlich kürzer als beispielsweise bei einer Soxhletextraktion. In der Tabelle 4 auf Seite 25 ist das gesamte pflanzliche Probenmaterial, die Trocknung, Zerkleinerung, Extraktion, Verdünnungen der Rohextrakte sowie die Lagerung der Extrakte aufgeführt.

**Tabelle 4: Darstellung des pflanzlichen Ausgangsmaterials für die Mikrowellenextraktion, Zerkleinerung und Trocknung des Ausgangsmaterials, Extraktion, Verdünnungen der Rohextrakte und Lagerung der Extrakte.**

Proben	Trocknung/ Zerkleinerung	Extraktion	Verdünnungen	Lagerung
Samen (2010)	Schneidmühle 9 mm, 1 mm	3g + 15 ml Ethanol, 10 min, 800 W, 60°C	20, 10, 5, 2,5, 1, 0,1, 0,01 mg/ml	-80°C
Blatt (19.07.2010)	1 h, 105°C, Schneid- mühle, 9 mm, 1mm	3,046 g + 15 ml Ethanol, 10 min, 800 W, 60°C	20, 10, 5, 2,5, 1, 0,1, 0,01 mg/ml	-80°C
Spross (19.07.2010)	1 h, 105°C, Schneid- mühle, 9 mm, 1mm	3,032 g + 15 ml Ethanol, 10 min, 800 W, 60°C	20, 10, 5, 2,5, 1, 0,1, 0,01 mg/ml	-80°C
Wurzel (19.07.2010)	1 h, 105°C, Schneid- mühle, 9mm, 1mm	3,015 g + 15 ml Ethanol, 10 min, 800 W, 60°C	20, 10, 5, 2,5, 1, 0,1, 0,01 mg/ml	-80°C
Wurzel (01.07.2010)	1 h, 105°C, Schneid- mühle, 9 mm, 1 mm	3,041 g + 15 ml Ethanol, 10 min, 800 W, 60°C	20, 10, 5, 2,5, 1, 0,1, 0,01 mg/ml	-80°C
Spross (05.08.2011)	1 h, 105°C, Schneid- mühle, 9 mm, 1 mm	3 g + 15 ml Ethanol, 10 min, 800 W, 60°C	20, 10, 5, 2,5, 1, 0,1, 0,01 mg/ml	-80°C
Wurzel (05.08.2011)	1 h, 105°C, Schneid- mühle, 9 mm, 1 mm	3,001 g + 15 ml Ethanol, 10 min, 800 W, 60°C	20, 10, 5, 2,5, 1, 0,1, 0,01 mg/ml	-80°C

## 2.2.2 Bestimmung der Substanzklassen über die Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Screening)

Eine Analyse der Substanzklassen der Rohextrakte von Spross und Wurzel (05.08.2011), welche über die Mikrowellenextraktion gewonnen wurden, erfolgte durch den Einsatz der Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie. Bei der Feldionisation handelt es sich um eine weiche Ionisation, diese bewirkt keine oder nur sehr geringe Molekülionenfragmentierungen so bleiben auch hochmolekulare Biomoleküle in ihrer Struktur erhalten. Für die Feldionisation wird ein Emitter eingesetzt und aktiviert. Die Aktivierung erfolgt durch einen pyrolytischen Vorgang in einer Benzonitrilatmosphäre, bei einem Partialdruck von ca. 80 Pa und unter hoher Spannung (4,8-kV-FI-Emitter) an einem bis zur Weißglut aufgeheizten Wolframfaden. Dadurch kommt es zur Ausbildung von borstenartigen Kohlenstoffnadeln. Die Proben wurden in einem Quarziegel eingewogen. Der Quarziegel wurde auf einer Probenstange in die Ionenquelle eingebracht und die Probe verdampft. Die Ionisation der Probenmoleküle

erfolgte unmittelbar vor den Kohlenstoffnadeln durch Tunneln von Elektronen [46]. Die Molekülionen wurden mithilfe des Massenspektrometers MAT 900 S, welches einen doppelfokusierenden Sektorfeldanalysator besitzt, detektiert. Dieser Analysator-Typ ermöglicht durch die Kombination aufeinander abgestimmter magnetischer und elektrostatischer Felder, die getrennte Registrierung von Molekülionen dessen Massen nahe beieinanderliegen.

### 2.2.3 Messung der Proteinkonzentration (*BCA Protein Assay Kit*)

Damit das Proteinisolat der blauen Süßlupine (Boreagine) mit definierten Konzentrationen *in vitro* an den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20 getestet werden konnte, musste zunächst die Proteinkonzentration des Proteinisolates bestimmt werden. Der *BCA Protein Assay* basierend auf Bicinchonsäure (BCA), dient der kolorimetrischen Bestimmung und Quantifizierung des Gesamtproteins einer Probe. Diese Methode ist kombiniert mit der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> Ionen zu Cu<sup>1+</sup> Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuretreaktion). Die reduzierten Cu<sup>1+</sup> Ionen bilden zusammen mit der Bicinchonsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Die Absorption dieses Farbkomplexes wurde am *Elisa-Reader* (BioRad) bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt. Als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 25 µl der Testlösung bzw. des BSA-Standards mit 200 µl BCA-Reagenz in eine 96-Wellplatte pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der 96-Wellplatte auf Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption der Proben am *Elisa-Reader* (BioRad) bei einer Wellenlänge von 560 nm. Anhand der BSA-Standardkurve ließ sich die Proteinkonzentration der Testlösung berechnen.

### 2.2.4 Zellkultur

#### 2.2.4.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Damit Zellen dauerhaft über einen längeren Zeitraum in Stickstoff gelagert werden können, müssen zunächst die adhärenten Zellen mit 5 ml Trypsin durch 5 min Inkubation aus der Kulturflasche gelöst werden. Die Trypsinierung wurde mit 5 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension für 5 min bei 1000 rpm und 20°C zentrifugiert. In 1,5 ml Einfriermedium wurden 1 Millionen Zellen in Kryo-Röhrchen bei -196°C in Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur in

den Kryo-Röhrchen. Die Zellen wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen in 5 ml Zellkulturmedium überführt und für 5 min bei 1000 rpm und 20°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 5 ml Zellkulturmedium gelöst und die Zellsuspension in eine Zellkulturflasche überführt.

#### **2.2.4.2 Kultivierung und Passagieren adhärenter Zellen**

Je nach ihrer Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt oder in neue Kulturflaschen passagiert. Die Kulturflaschen wurden dazu unter dem Mikroskop betrachtet, zeigten die Zellen eine geringe Zelldichte wurde das verbrauchte Medium zur Hälfte oder ganz mit einer 10 ml oder 25 ml Glaspipette abgesaugt und gegen frisches Medium ersetzt. War mehr als 70% des Bodens mit adhärenten Zellen bewachsen, wurden diese Zellen in neue Kulturflaschen passagiert. Das Passagieren der Zellen fand unter der Sterilbank statt, dazu konnte das gesamte Medium mit einer 10 ml oder 25 ml Glaspipette oder einer Medium Pumpe abgesaugt werden. Verbliebene Mediumreste wurden mit 5 ml 1 x PBS von den Zellen gewaschen und durch eine 10 ml Glaspipette abgesaugt. Damit die adhärenten Zellen von dem Boden der Kulturflasche gelöst werden konnten, erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA, wobei das Trypsin als Protease die Peptid-bindungen enzymatisch spaltet, mit welchen die Zellen am Boden der Kulturflasche haften. Nach einer Inkubationszeit von 5 min im Brutschrank konnten die Zellen von dem Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt, um eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Danach konnte der gesamte Inhalt der Kulturflasche mit einer 10 ml Glaspipette in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 rpm soft zentrifugiert, danach der Überstand abdekantiert und das Pellet mit 20 ml frischem Medium versehen und durch vortexen gelöst. Je 10 ml der Zellsuspension wurden durch eine 10 ml Glaspipette in eine neue Kulturflasche gegeben und mit weiteren 10 ml Medium gemischt. Danach konnten die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert werden.

#### **2.2.4.3 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die Zählung der Lebendzellzahl stellte eine wichtige Voraussetzung dar, um die gewünschte Anzahl an lebenden Zellen für die unterschiedlichen *in vitro* Tests zu erhalten. Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Bürker-Zählkammer

verwendet. Dazu wurden 360 µl Medium, 20 µl der Zellsuspension sowie 20 µl Trypanblau in ein Eppendorftube pipettiert, sodass eine 1:20 Verdünnung vorlag. Um die Lebensfähigkeit der Zellen zu prüfen, wurde der Farbstoff Trypanblau eingesetzt. Trypanblau ist ein großer anionischer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell, wodurch eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen gewährleistet wird. Auf die Bürker-Zählkammer wurden nach dem Auflegen des Deckgläschens 20 µl der Lösung aufgetragen. Auf beiden Seiten der Bürker Zählkammer erfolgte in einem Bereich von 5 x 5 Quadranten die Zählung der lebenden Zellen. Die Lebendzellzahl konnte durch folgende Formel berechnet werden, wobei der Verdünnungsfaktor 10 betrug.

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \text{Zellzahl}(2 \times 5 \times 5 \text{ Quadrate}) \times \text{VF} \times 10^{-4}$$

#### 2.2.4.4 Zellcharakterisierung durch Immunhistochemie

Durch die Methode der Immunhistochemie war es möglich die Zellen eines bestimmten Zelltyps anhand der Expression spezifischer Proteine (Antigene) zu charakterisieren. Der Nachweis dieser Proteine (Antigene) erfolgte mithilfe des „*ImmPRESS Universal Reagenz Anti Mouse/Rabbit Ig Kit*“ von Vector Laboratories und dem „LinRed Substratkit für Peroxidase“ von LINARIS. Das Kit von Vector Laboratoires basiert auf dem Einsatz von Mikropolymeren mit Peroxidase, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt wurde. Dieser Komplex aus Peroxidase und sekundären Antikörper bindet an den primären Antikörper, der spezifisch an das Epitop des entsprechenden Antigens gebunden hat. Durch die Peroxidase wird das Chromogen LinRed zu einem roten Farbstoff enzymatisch umgesetzt. Die Mikropolymer-Methode ermöglicht eine schnellere sowie sensitivere Anfärbung am Ort des Antigens. Tabelle 6 auf Seite 29 zeigt die zu charakterisierende Zelllinie mit dem nachzuweisenden Protein (Antigen), dessen zellulärer Funktion und den Primärantikörper, welcher zum Nachweis des entsprechenden Proteins (Antigen) eingesetzt wurde. Die Bestimmung der Hormonrezeptoren erfolgte nach dem immunreaktiven Score für Hormonrezeptoren [108]. Als Bewertungsfaktoren wurde die Farbintensität (*staining intensity (SI)*) und der Prozentsatz positiver Zellkerne (PP) verwendet, deren in Punktwerten übertragenes Produkt den immunreaktiven Score (IRS) ergibt. Hier

sind Werte von 0-12 möglich, wie aus der Tabelle 5 ersichtlich wird.

**Tabelle 5: Immunreaktiver Score (IRS): SI x PP.**

Positive Zellkerne (%) \ Farbintensität	Keine Farbreaktion = 0 Punkte	Schwache Farbreaktion = 1 Punkt	Mäßige Farbreaktion = 2 Punkte	Starke Farbreaktion = 3 Punkte
keine positiven Zellkerne = 0 Punkte	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
< 10% positive Zellkerne = 1 Punkt	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10-50% positive Zellkerne = 2 Punkte	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51-80% positive Zellkerne = 3 Punkte	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
> 80% positive Zellkerne = 4 Punkte	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

**Tabelle 6: Immunhistochemische Charakterisierung der unterschiedlichen Zelltypen:** dargestellt ist die Zelllinie, das nachzuweisende Protein (Antigen), die Funktion des Proteins (Antigen) sowie der Antikörper.

Zelllinie	Protein (Antigen)	Funktion (Antigen)	Antikörper
MCF-7	Estrogenrezeptor α	Steroidrezeptor	anti-α ER (DAKO)
	Estrogenrezeptor β	Steroidrezeptor	anti-β ER (Serotec)
	Progesteronrezeptor	Steroidrezeptor	anti-Progesteron (DAKO)
	HER2	Wachstumsfaktorrezeptor	anti-HER2 (DAKO)
	Transketolase 1	Enzym	anti-TKTL1 (Serotec)
BT20	Estrogenrezeptor α	Steroidrezeptor	anti-α ER (DAKO)
	Estrogenrezeptor β	Steroidrezeptor	anti-β ER (Serotec)
	Progesteronrezeptor	Steroidrezeptor	anti-Progesteron (DAKO)
	HER2	Wachstumsfaktorrezeptor	anti-HER2 (DAKO)
	Transketolase 1	Enzym	anti-TKTL1 (Serotec)
MCF12 A	Estrogenrezeptor α	Steroidrezeptor	anti-α ER (DAKO)
	Estrogenrezeptor β	Steroidrezeptor	anti-β ER (Serotec)
	Progesteronrezeptor	Steroidrezeptor	anti-Progesteron (DAKO)
	CK18	Zytoskelett	anti-cytokeratin 18 (Serotec)
ad. Fibroblasten	Estrogenrezeptor α	Steroidrezeptor	anti-α ER (DAKO)
	Estrogenrezeptor β	Steroidrezeptor	anti-β ER (DAKO)
	Progesteronrezeptor	Steroidrezeptor	anti-Progesteron (DAKO)
	Vimentin	Zytoskelett	anti-Vimentin (Serotec)

## 2.2.5 Untersuchung zur Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität

Der Einfluss der pflanzlichen Extrakte von *L. angustifolius* (Sorte Boregine) auf die Viabilität der vier humanen Zelllinien konnte mithilfe des MTT-Tests bestimmt werden. Als Zytotoxizitätstest wurde der LDH-Test eingesetzt. Die Auswirkung der

pflanzlichen Extrakte auf die Zellproliferation der vier verschiedenen Zelltypen konnte mithilfe des BrdU-Tests bestimmt werden. Die in dem MTT, LDH und BrdU Test mitgeführten Kontrollen sind in der Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Kontrollen des MTT, LDH und BrdU Tests.**

Kontrolle	Zusammensetzung	Testsystem
Negativkontrolle 1	100 µl Medium/Well mit $5 \times 10^5$ Zellen/ml	MTT, BrdU, LDH-Test
Negativkontrolle 2	100 µl Medium/Well mit $5 \times 10^5$ Zellen/ml und 1 µl Ethanol absolut	MTT, BrdU, LDH-Test
Tamoxifen	1 µl $10^{-4}$ mol/l Tamoxifen auf 100 µl Zellsuspension mit $5 \times 10^5$ Zellen/ml	MTT, BrdU, LDH-Test
17-β Estradiol	1 µl $10^{-9}$ mol/l 17-β Estradiol auf 100 µl Zellsuspension mit $5 \times 10^5$ Zellen/ml	MTT, BrdU, LDH-Test
Substanzkontrolle	1 µl Extrakt (200 µg/ml) in 100 µl Medium	MTT, LDH-Test
Triton x-100	200 µl (1:46 mit Medium) 100% Kontrolle	LDH-Test
<i>background control</i>	ohne BrdU, unspezifische Bindungen	BrdU-Test

### 2.2.5.1 MTT-Vitalitätstest (Roche)

Bei dem MTT-Test handelt es sich um einen kalorimetrischen nicht radioaktiven Test, durch welchen die Zellproliferation und Viabilität quantifiziert werden kann. Dieser Test basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) zu blauvioletten, wasserunlöslichen Formazankristallen in metabolisch aktiven Zellen. Das Tetrazoliumsalz (MTT) wird nur von lebenden Zellen aufgenommen und in den Mitochondrien durch die Succinatdehydrogenase mit dem Cofaktor NADH zu blauvioletten Formazankristallen reduziert, deshalb eignet sich die Reduktion von MTT zu Formazan als Maß für die Viabilität der Zellen. Um die Absorption des entstandenen Formazans fotometrisch mit dem *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 560-600 nm zu bestimmen, müssen die wasserunlöslichen Kristalle des Formazans mit geeigneten Detergenzien (SDS und HCL) aus den Zellen gelöst werden. Dabei korreliert die gemessene Konzentration an Formazan mit dem Proliferationsverhalten der Zellen.

$$\text{Relative Vitalität (\%)} = \frac{\text{Absorption (Probe)} \times 100\%}{\text{Absorption (NK2)}}$$

### 2.2.5.2 LDH-Zytotoxizitätstest (Roche)

Der LDH-Test ist ein kalorimetrischer, nicht radioaktiver Test, durch welchen die Zelllyse sowie der Zelltod quantifiziert wurden. Das Prinzip des *in vitro* Zytotoxizitätstests basiert auf der Bestimmung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH), welche aus zerstörten oder beschädigten Zellen freigesetzt wird und somit im Zellkulturmedium nachweisbar ist. Das Enzym Laktatdehydrogenase ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, das sehr schnell in das Zellkulturmedium abgegeben wird, wenn die Zellmembran zerstört ist. Die LDH Aktivität wird mithilfe eines enzymatischen Tests bestimmt, dabei finden Redoxreaktionen statt. Im ersten Schritt wird Laktat durch die Oxidoreduktase LDH zu Pyruvat oxidiert, während das Coenzym NAD<sup>+</sup> durch die Übertragung von Wasserstoff (vom Substrat Laktat) zu NADH/H<sup>+</sup> reduziert wird. Im zweiten Schritt transferiert der im Testreagenz enthaltene Katalysator Diaphorase Wasserstoff vom entstandenen NADH/H<sup>+</sup> auf das schwach gelbfarbende Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodphenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid), welches dadurch zu dem rot gefärbten Formazan-Salz reduziert wird, während das NADH/H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wird. Die Bildung des Formazans kann fotometrisch mit dem *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) bestimmt werden. Die Menge an freigesetzter LDH im Überstand (Medium) ist umso größer, je höher der Grad der Zellschädigung ist. Die Menge an freigesetzter LDH korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan-Salz und ist deswegen direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen.

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = \frac{\text{Absorption (Probe)} - \text{Absorption (NK2)}}{\text{Absorption (high control)} - \text{Absorption (NK2)}} \times 100$$

### 2.2.5.3 BrdU-Proliferationstest (Roche)

Lebende (proliferierende) Zellen zeichnen sich unter anderem durch DNA-Synthese, die während der S-Phase der Mitose stattfindet aus. Der BrdU-Test ist ein kolorimetrischer immunologischer Test, der auf dem Einbau des Pyrimidinanalogs 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) anstelle der Base Thymidin in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen beruht. Dadurch können vitale (proliferierende) Zellen nachgewiesen werden. Die DNA wird in diesem Test durch das Reagenz FixDenat

denaturiert und ermöglicht somit das Angreifen der Testsystem Antikörper, die das inkorporierte BrdU detektieren sollen. Durch Zugabe eines Peroxidase gekoppelten anti-BrdU-Antikörpers, der den primären Antikörper gegen BrdU darstellt, entsteht ein Immunkomplex. Das anschließende zugegebene Tetramethylbenzidin (TMB) wird durch die an den BrdU-anti-BrdU-Komplex konjugierte Peroxidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, dessen Farbe durch die anschließend zugegebene Schwefelsäure nach gelb umschlägt. Die fotometrische Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die entstehende Farbintensität korreliert mit der Anzahl proliferierender Zellen. Je höher der Grad der Zellschädigung ist, desto niedriger ist die Menge an inkorporiertem BrdU in der neu synthetisierten DNA.

$$\text{Zellproliferation (\%)} = \frac{\text{Absorption (Probe)} \times 100\%}{\text{Absorption (NK2)}}$$

## 2.2.6 Untersuchungen zum apoptotischen und nekrotischen Zelltod

Da eukaryotische Zellen sowohl durch Apoptose (programmierter Zelltod) oder durch Nekrose sterben können, war es wichtig diese beiden Typen des Zelltodes zu unterscheiden. Dies erfolgte zunächst durch die Beurteilung typischer morphologischer Veränderungen der Zellen nach Inkubation mit den Extrakten des Sprosses und der Wurzel über das Lichtmikroskop. Weiterhin war mit dem Fluoreszenzmikroskop die qualitative Bestimmung von nekrotischen und apoptotischen Zellen über die Annexin V-FITC/Propidiumiodide Doppelfärbung möglich. Der *Cell Death Detection ELISA* (Roche) ermöglichte die quantitative Bestimmung von Apoptose über die spezifische Messung von Mono- und Oligonukleosomen innerhalb der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten.

### 2.2.6.1 Morphologische Differenzierung von Apoptose und Nekrose durch die Lichtmikroskopie

Morphologische Veränderungen der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20 nach Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt wurden mit dem Axiovert 40 C Lichtmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) erfasst. Mithilfe der Kamera AxioCam MRc (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) und dem Programm Axio Vision Rel 4.8 konnten Fotos von den Zellen erstellt werden.

### Durchführung

1. Schritt: Aussaat von 300 µl Zellsuspension ( $5 \times 10^5$  Zellen/ml) in eine 24-Wellplatte.
2. Schritt: 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank.
3. Schritt: Zugabe 3 µl Lupinenextrakt der Konzentrationen 200 und 100 µg/ml.
4. Schritt: 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank.
5. Schritt: Betrachtung am Lichtmikroskop sowie Aufnahme der Fotos.

### **2.2.6.2 Qualitative Bestimmung von Apoptose und Nekrose über die Fluoreszenzmikroskopie (Annexin V-FITC Kit, Miltenyi Biotec)**

Die qualitative Bestimmung von apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen erfolgte nach dem Protokoll des Annexin V-FITC Kit (Miltenyi Biotec). Während der Apoptose ändert das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) seine Lokalisation von der Innenseite der Doppelipidschicht der Plasmamembran zur Außenseite. Das Protein Annexin V vermag an PS zu binden. Bei nekrotischen Zellen kann Annexin V durch den Verlust der Membranintegrität (permeabilisiert) in die Zelle eindringen und ebenfalls an PS an der Innenseite der Zellmembran binden. Somit kann bei alleiniger Färbung mit Annexin V-FITC (Fluorescein Isothiocyanat) nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen differenziert werden. Deshalb wird die Annexin V-FITC Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung kombiniert. Das Propidiumiodid (PI), welches ein Nukleinsäureinterkalator ist, dringt nur durch durchlässige Zellmembranen in die Zelle ein, somit nur in nekrotische Zellen. Apoptotische Zellen sind Annexin V-FITC positiv und Propidiumiodid (PI) negativ und nekrotische Zellen sind Annexin V-FITC positiv und Propidiumiodid (PI) positiv.

### **2.2.6.3 Cell Death Detection ELISA (Roche)**

#### **2.2.6.3.1 Testprinzip eines Sandwich-ELISA**

##### Prinzip

Das Testprinzip beruht auf einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immuno-Assay, bei welchem monoklonale Antikörper (*mouse*) verwendet werden, welche direkt an der DNA und den Histonen binden. Das ermöglicht die spezifische Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten.

Beschreibung

1. Schritt: Der anti-Histone Antikörper bindet an der Wand der Mikroplatten-Module.
2. Schritt: Die nicht spezifischen Bindungen der Wand werden durch die Behandlung mit Blocking-Lösung gesättigt.
3. Schritt: In der Probe enthaltende Nukleosomen binden mit ihrer Histon-Komponente an den anti-Histone Antikörper.
4. Schritt: Zugabe der anti-DNA-peroxidase (POD), welche an der DNA des Nukleosomen bindet.
5. Schritt: Durch Waschen erfolgt die Eliminierung ungebundener Peroxidase.
6. Schritt: Fotometrische Bestimmung der Menge an Peroxidase innerhalb des Immunkomplexes mit ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6)]) als Substrat.

Berechnung

Bildung der Mittelwerte aus der dreifachen Messung der Absorption der Proben. Von jedem Mittelwert der Proben wird die *background* Kontrolle abgezogen. Die spezifische Anreicherung (*enrichment factor*) von Mono- und Oligonukleosomen im Zytoplasma wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Enrichment factor} = \frac{\text{Absorption (Probe)}}{\text{Absorption (Negativkontrolle)}}$$

**Tabelle 8: Kontrollen des *Cell Death Detection ELISAs* (Roche).**

Kontrolle	Zusammensetzung
Negativkontrolle	Zellen + Medium
Positivkontrolle	5 x 10 <sup>4</sup> Zellen/Tube + 500 µl Hypertonischen Puffer (10 mM Tris, pH 7,4, 400 mM NaCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> und 10 mM MgCl <sub>2</sub> )
<i>background</i> Kontrolle	100 µl Inkubationspuffer/Well

## 2.2.7 Untersuchungen zur Migration und Invasion der Tumorzellen

Die Zellmigration spielt eine wichtige Rolle im Krankheitsverlauf von Krebs. Die Fähigkeit von malignen Tumorzellen in normales Umgebungsgewebe einzufallen, trägt größtenteils zur Morbidität und Mortalität von Krebs bei. Die Invasivität von Tumorzellen wird möglich durch unterschiedliche zelluläre Funktionen, einschließlich der Adhäsion, der Motilität sowie der Spaltung extrazellulärer Matrixproteine. Mithilfe des *CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion Assay (8 µm, Colorimetric Format)* sollte der Einfluss des Spross- und Wurzelextraktes (05.08.2011) auf die Migration und Invasion der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20 bestimmt werden. Als Negativkontrolle im Testsystem wurden Zellen in Medium und dem Lösungsmittel Ethanol absolut mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde für die Berechnung der Migration und Invasion auf 100% gesetzt.

### 2.2.7.1 Migrations und Invasionstest *CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion Assay (8 µm, Colorimetric Format)*

#### Prinzip

Für die Bestimmung der Migration und Invasion verwendet dieser Test Polykarbonatmembraninserts mit einer Porengröße von 8 µm in einer 24 Wellplatte. Die Membran stellt eine Barriere für migratorische Zellen dar. Migratorische Zellen sind in der Lage die Poren der Membran zu passieren, wo sie dann gefärbt und quantifiziert werden können. Damit die Zellinvasion bestimmt werden kann, sind die Polykarbonatmembraninserts mit einer gleichmäßigen trockenen Schicht Matrixlösung überzogen, welche als Basalmembran dient. Diese Basalmembranschicht hat eine Barrierefunktion um invasive Zellen von nichtinvasiven Zellen zu trennen. Invasive Zellen sind in der Lage die Matrixproteine in der Schicht abzubauen und können somit die Poren der Polykarbonatmembran durchdringen. Die nichtinvasiven Zellen werden von der Oberfläche entfernt und die invasiven Zellen gefärbt und quantifiziert. Die Zellmigration sowie Invasion (%) wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{Zellmigration/Invasion}(\%) = \frac{\text{Absorption (Probe)} \times 100\%}{\text{Absorption (Negativkontrolle)}}$$

## 2.2.8 Methoden zur metabolischen Analyse

### 2.2.8.1 Quantitative Glukosebestimmung

Die quantitative Analyse der Glukoseaufnahme der Zellen erfolgte mit dem BIOSEN 4140. Hierbei handelt es sich um ein enzymatisches Verfahren, welches auf der reduzierenden Wirkung von Glukose beruht. Glukose wird durch das Enzym Glukoseoxidase zu Gluconat und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgesetzt. In Gegenwart eines Chromogens und Peroxidase (POD) erfolgt eine Farbstoffbildung. Die Intensität des Farbstoffkomplexes wird dann mit dem BIOSEN 4140 bestimmt.

Für die Analyse wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in eine 96-Wellplatte pipettiert und für 24 h bei 37°C und 5%  $CO_2$  im Zellkulturschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 1  $\mu l$  Lupinenextrakt auf 100  $\mu l$  Zellsuspension mit anschließender 24 h Inkubation bei 37°C und 5%  $CO_2$ . Die quantitative Glukosebestimmung erfolgte aus dem Zellüberstand, dem Zellkulturmedium sowie der Negativkontrolle 2. Um die zelluläre Glukoseaufnahme zu bestimmen, wurde zunächst die Differenz aus gemessener Glukosemenge des Mediums und der Probe ermittelt. Die Glukoseaufnahme der Negativkontrolle 2 wurde auf 100% gesetzt und die prozentuale Glukoseaufnahme der Zellen nach folgender Formel berechnet.

$$Glukoseaufnahme(\%) = \frac{Glukose \text{ in } \frac{mmol}{l}(\text{Probe}) \times 100\%}{Glukose \text{ in } \frac{mmol}{l}(\text{NK2})}$$

### 2.2.8.2 Quantitative Laktatbestimmung

Bei der quantitativen Laktatbestimmung handelt es sich um eine enzymatische Analyse. Laktat wird durch die Laktatoxidase (LOD) zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oxidiert. Durch das Vorhandensein der Peroxidase (POD),  $H_2O_2$ , Aminoantipyrin und einem Wasserstoffdonator (TOOS) entsteht ein farbiges Produkt, das fotometrisch mit dem Olympus-Analyser gemessen wird. Die Farbintensität ist proportional zur Laktatkonzentration. Es wurden für die Analyse  $5 \times 10^5$  Zellen/ml der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 in eine 96-Wellplatte pipettiert und für 24 h bei 37°C und 5%  $CO_2$  im Zellkulturschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 1  $\mu l$  Lupinenextrakt auf 100  $\mu l$  Zellsuspension mit anschließender 24 h Inkubation bei 37°C und 5%  $CO_2$ . Als Kontrolle mitgeführt wurde die Negativkontrolle 2, bestehend aus Zellen, Medium und dem Lösungsmittel Ethanol absolut.

### 2.2.8.3 Hydrogen Peroxide Assay Kit (BioVision)

Das BioVision's *Hydrogen Peroxide Assay Kit* ist eine einfache, sensible, kolorimetrische Methode um die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration in biologischen Proben zu bestimmen. Die OxiRed Probe und  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagieren in Anwesenheit der *horse radish peroxidase* (HRP) zu einem farbigen Produkt mit einer maximalen Wellenlänge von 570 nm. Für die Messung, der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in eine 96-Wellplatte pipettiert und für 24 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Zellkulturschrank inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Lupinenextrakt auf 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit anschließender 24 h Inkubation bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$ . Aus dem Überstand der Proben wurden 50  $\mu\text{l}$  abgenommen und in neue Eppendorftube pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 1000 x g zentrifugiert. Zu jeder Probe und jedem  $\text{H}_2\text{O}_2$  Standard wurden 50  $\mu\text{l}$  *Reaction-Mix* dazugegeben und die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Konzentration wurde mit einem *ELISA-Reader* (BIO RAD) bei einer Wellenlänge von 570 nm durchgeführt. Anhand einer  $\text{H}_2\text{O}_2$  Standardkurve (Abb. 6) konnte die entsprechende  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration der Proben berechnet werden.

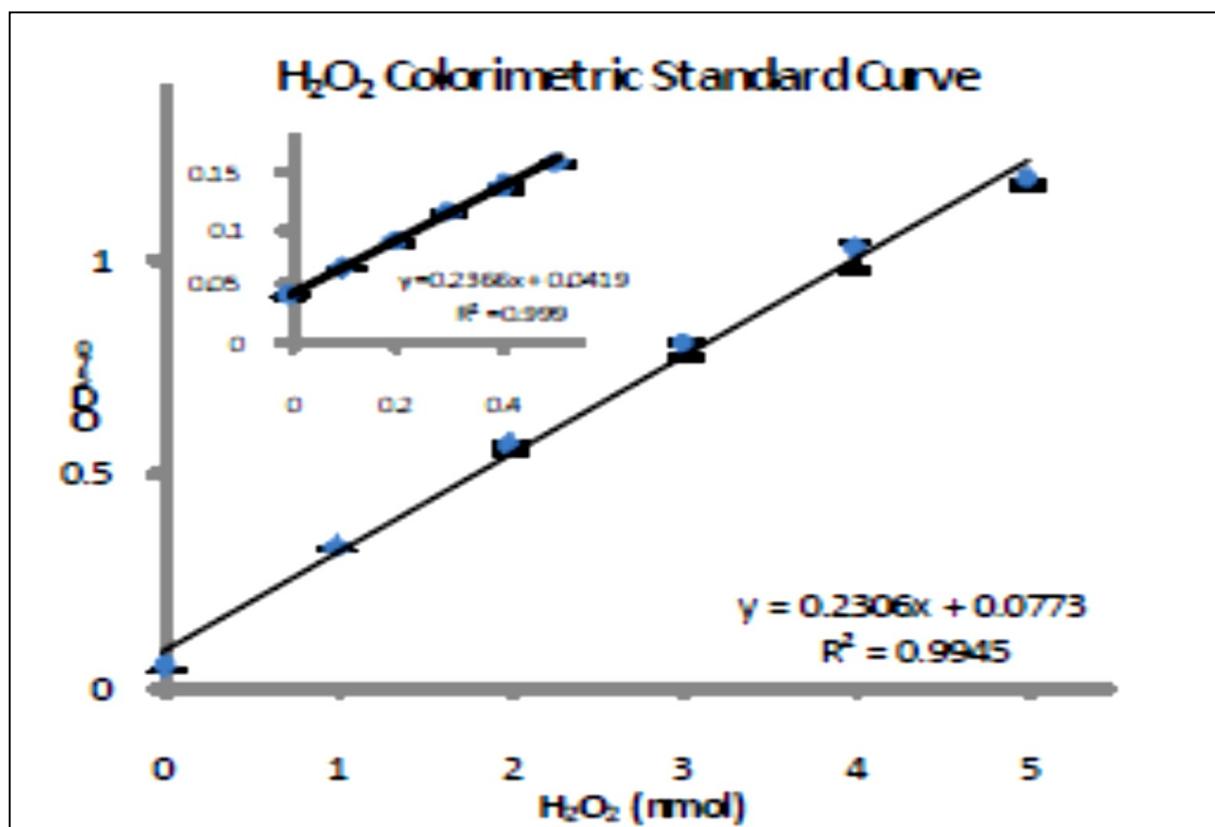


Abbildung 6: Beispiel für eine  $\text{H}_2\text{O}_2$  Standardkurve [11].

## 2.2.9 Berechnung der mittleren Hemmkonzentration (*Inhibitory Concentration, IC<sub>50</sub>*)

Die mittlere Hemmkonzentration (IC<sub>50</sub>-Wert) ist eine charakteristische Größe zur Beurteilung der Wirksamkeit von potenziell zytotoxischen/zytostatischen Substanzen und entspricht der Wirkstoffkonzentration, bei der das Zellwachstum um 50% gehemmt wird [98]. Anhand des IC<sub>50</sub>-Wertes ist ein objektiver Vergleich der Hemmwirkung verschiedener Substanzen möglich. Für eine exakte Bestimmung der Hemmkonzentrationen sollte eine ausreichende Anzahl an Inhibitorkonzentrationen über einen möglichst breiten Konzentrationsbereich getestet werden, um einen sigmoiden Kurvenverlauf zu erhalten, wobei die beiden Plateaus gegen 100% bzw. 0% Hemmung streben sollten. Zur Berechnung der mittleren Hemmkonzentrationen der hier verwendeten Testsubstanzen wurde die Methode der nichtlinearen Regressionsanalyse (Sigma Plot 11.0) verwendet.

### 2.2.9.1 Nichtlineare Regressionsanalyse mit Sigma Plot 11.0

Die Regressionsanalyse beschäftigt sich mit der Schätzung funktionaler Beziehungen zwischen zwei oder mehreren metrisch skalierten Merkmalen [76]. Gegenstand der Regressionsanalyse ist die Art der Abhängigkeit zwischen den Variablen, w.z.B. die Beziehung zwischen der Proliferationshemmung (%) (Y) und der Inhibitorkonzentration (X) [76]. Für den IC<sub>50</sub>-Wert bedeutet dies, dass einer bestimmten Inhibitorkonzentration (X) der Wert y = 50% (50% Zellproliferation bezogen auf die Kontrolle) zugeordnet werden kann. Durch das Programm Sigma Plot 11.0 lässt sich der Zusammenhang zwischen der Konzentration einer Substanz und deren Wirkung durch nichtlineare Regression über eine typische Dosis-Wirkungskurve darstellen. Die Konzentration wird als Logarithmus auf der x-Achse und die Wirkung linear auf der y-Achse aufgetragen. Ein weiterer Parameter, der den Verlauf der Kurve bestimmt, ist die Steigung. Diese Kurven haben üblicherweise einen sigmoiden Verlauf. Die Dosis-Wirkungskurve ist eine logistische Funktion mit vier Parametern und wird durch folgende Formel beschrieben.

$$y = \min^+ \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{-Hillslope}}$$

### 2.2.10 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Mit Microsoft Office Excel 2007 wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung ermittelt. Des Weiteren erfolgte mit diesem Programm die Durchführung des T-Tests (ungepaart) um die Signifikanz der Ergebnisse in Bezug auf die Kontrolle zu bestimmen. Damit signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Testsubstanzen oder Inkubationszeiträumen sichtbar werden, wurde mit dem Programm *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS 10.0) eine Varianzanalyse (einfaktorielle Anova) mit anschließendem Untergruppenvergleich (Tukey-Test) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung der Substanzklassen

Das Substanzklassenspektrum, grafisch dargestellt in Abbildung 7 beider Lupinenextrakte unterscheidet sich nur geringfügig. In beiden Extrakten wurden am häufigsten die Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette (LIPID) mit einer Totalionenintensität von 29,4% im Wurzelextrakt sowie zu 32,1% im Sprossextrakt detektiert. Ebenfalls war die Substanzklasse der Isoprenoide (ISOPR) vorherrschend im Wurzel- (25,4%) und Sprossextrakt (25,1%). Es konnten des Weiteren wichtige Substanzklassen, welche Substanzen mit antikanzerogenen Potenzial enthalten können wie Polyphenole (LW (10,4%); LS (8,6%)), sonstige Polyphenole (POLYOS) (LW (5,3%); LS (3,5%)), Isoflavone (ISOFL) (LW (0,6%); LS (0,7%)), Flavone (FLAVO) (LW (0,9%), LS (0,2%)) und Lignane (LW (0,5%); LS (0,8%)) detektiert werden.

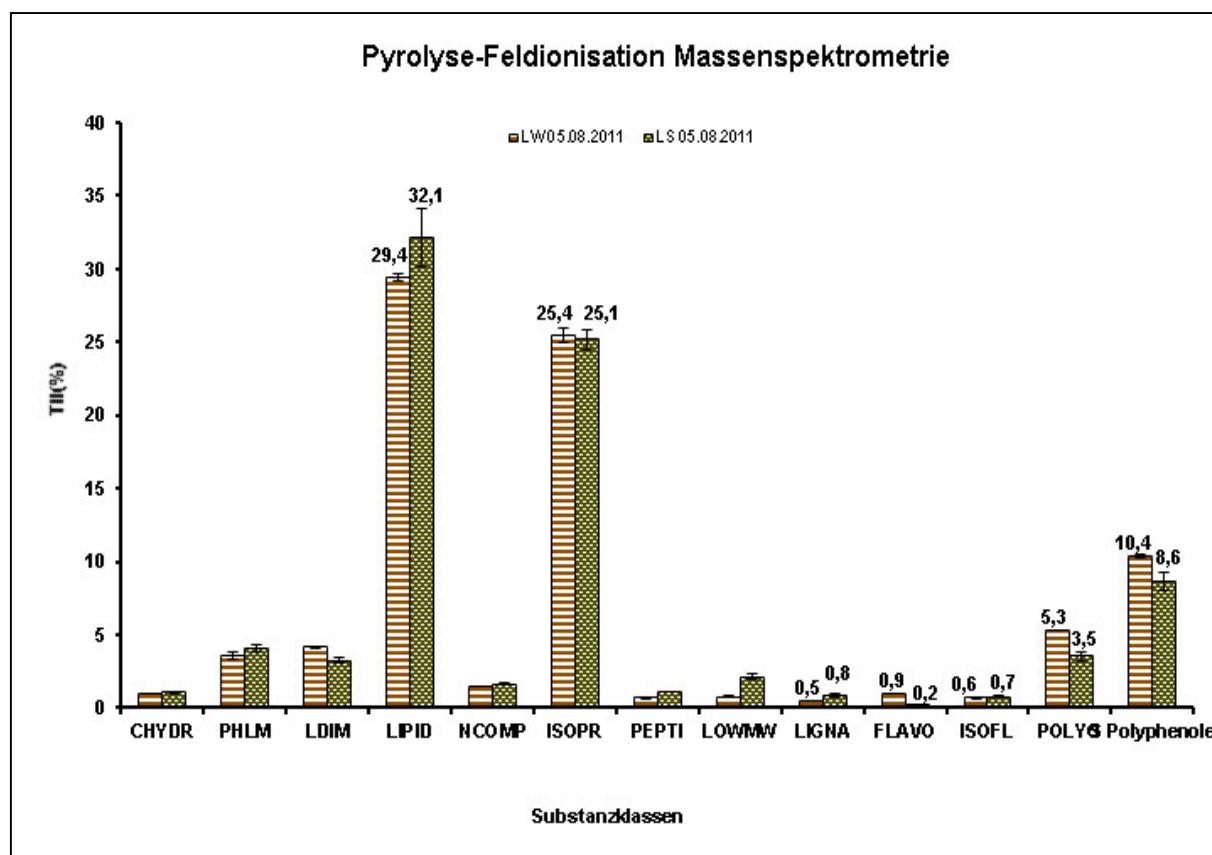


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Substanzklassen über die Totalionenintensität (%), des Wurzel- und Sprossextraktes (05.08.2011, 200 µg/ml).

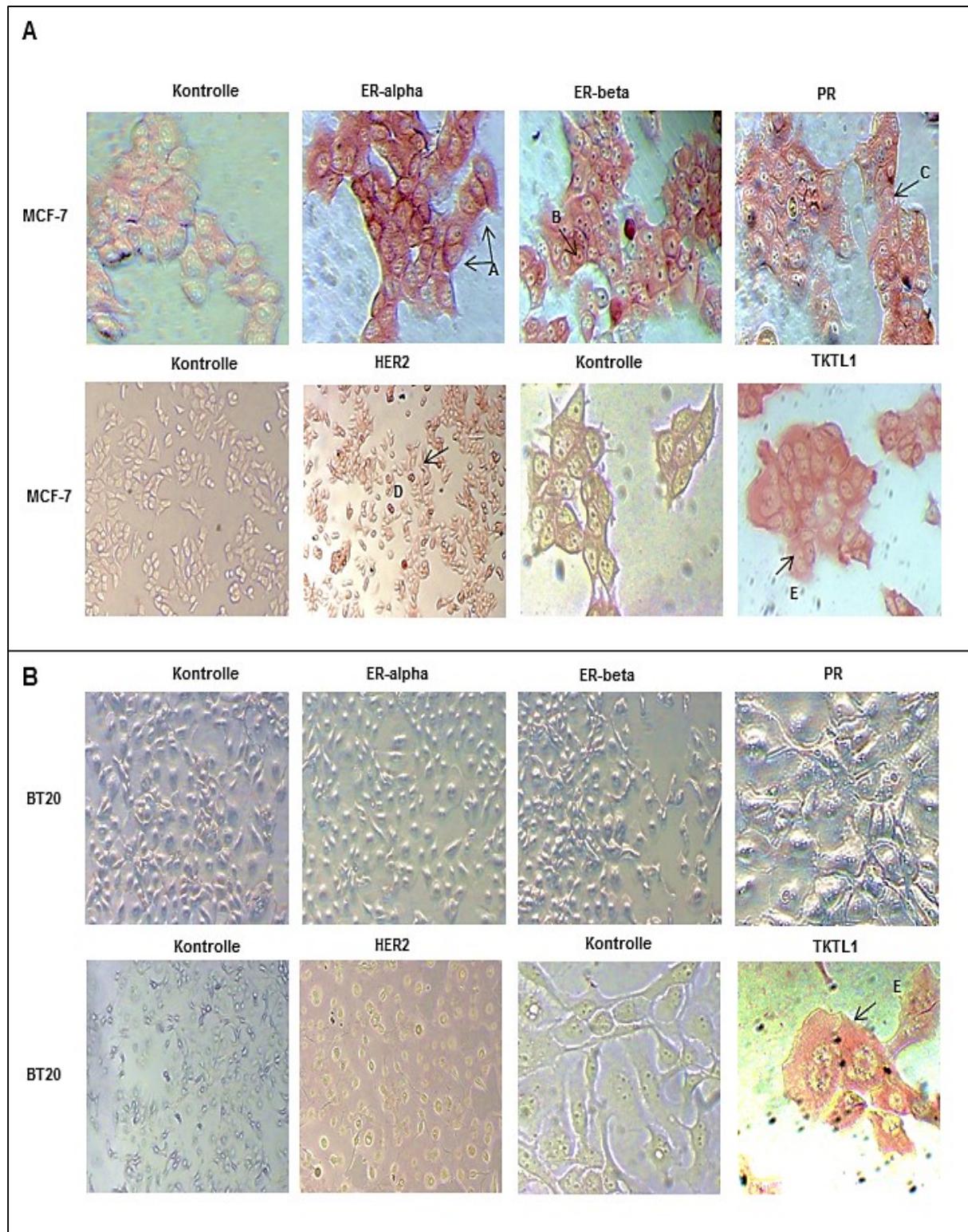
Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen ( $n = 3$ ). CHYDR = Kohlenhydrate, PHL M = Monolignole, LDIM = Lignindimere, LIPID = Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette, ISOPR = Isoprenoide Verbindungen (Sterole, Terpene, Carotinoide), PEPTI = Peptide und freie Aminosäuren, LOWMW = niedermolekulare Verbindungen, LIGNA = Lignane, FLAVO = Flavone, ISOFL = Isoflavone, POLYO S = sonstige Polyphenole (Suberin, Cutin, Stilbene, Tannine). LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.2 Zellcharakterisierung durch Immunhistochemie

Tumorzellen weisen einige Besonderheiten in der Expression von Enzymen, Rezeptoren, Transportproteinen und Regulatoren des Stoffwechsels auf. Eine Auswahl bestimmter Proteine wurde immunhistochemisch in den Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 sowie in den benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten untersucht.

Die Abbildung 8 auf Seite 42 zeigt die immunhistochemische Charakterisierung der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20. Die Negativkontrolle der MCF-7 Zellen zeigte eine schwache Farbreaktion, jedoch keine positiven Zellkerne (IRS = 0). Die Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$  drückte sich in einer starken Farbreaktion aus und etwa 51-80% positiver Zellkerne (Abb. 8 A, A, IRS = 9). Die Expression des Estrogenrezeptors  $\beta$  war bei den MCF-7 Zellen gekennzeichnet durch eine mäßige Farbreaktion mit 10-50% positiven Zellkernen (Abb. 8 A, B, IRS = 4). Der Progesteronrezeptor zeigte bei den MCF-7 Zellen eine ähnlich starke Expression wie der Estrogenrezeptor  $\beta$  (Abb. 8 A, C, IRS = 4). Die Negativkontrolle, der Estrogenrezeptor  $\alpha$  sowie  $\beta$  und der Progesteronrezeptor der BT20 Zellen, zeigten keine Farbreaktion sowie keine positiven Zellkerne und wurden mit einem Immunreaktivenscore von 0 bewertet (Abb. 8 B). Somit zeigte sich für die MCF-7 Zellen eine positive Expression aller drei Hormonrezeptoren und bei den BT20 Zellen keine Expression dieser. Die Expression von HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) ließ sich an MCF-7 Zellen immunhistochemisch nachweisen (Abb. 8 A, D). BT20 Zellen exprimierten HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) nicht. Das Enzym TKTL1 (*transketolase-like-1*), welches als Schlüsselenzym des anaeroben Teils des Pentosezyklus gilt, wurde sowohl von MCF-7 Zellen (Abb. 8 A, E) als auch von BT20 Zellen (Abb. 8 B, E) exprimiert.

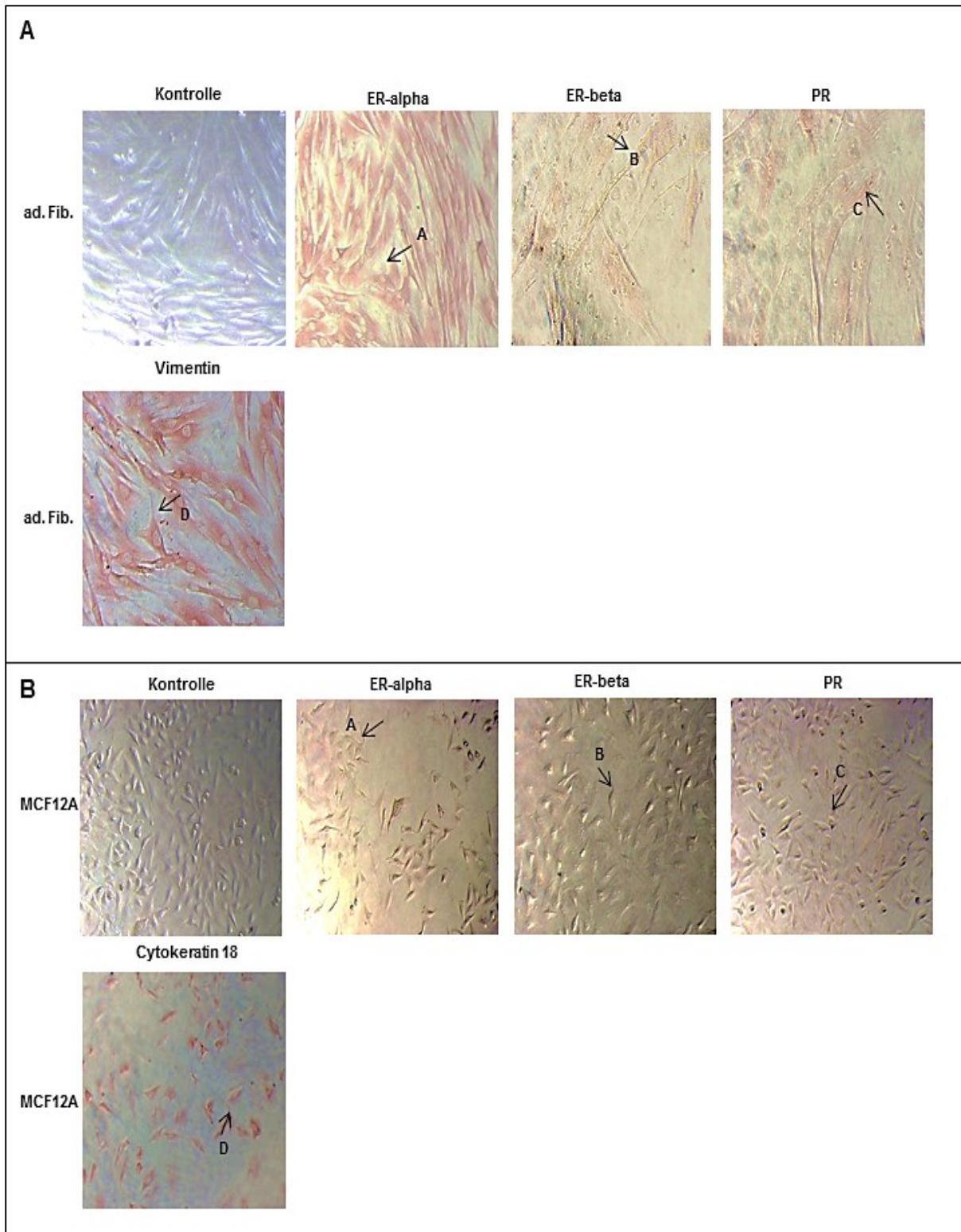
MCF-7 Zellen waren zusammenfassend positiv für die Expression der drei Hormonrezeptoren, positiv für die Expression des HER2 (*human epidermal growth factor-receptor 2*) und dem Enzym TKTL1 (*transketolase-like-1*). Zellen der Zelllinie BT20 waren negativ in der Expression der drei untersuchten Hormonrezeptoren und des Wachstumsfaktorrezeptors HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*). Eine positive Expression dieser Zellen für das Enzym TKTL1 (*transketolase-like-1*) ließ sich nachweisen.



**Abbildung 8: Immunhistochemische Charakterisierung der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20.**

**A:** MCF-7: Nachweis der Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$  (A), Estrogenrezeptors  $\beta$  (B), Progesteronrezeptors (C), *human epidermal growth factor receptor 2* (D) und der *transketolase-like-1* (E). **B:** BT20: Nachweis der Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$ , Estrogenrezeptors  $\beta$ , Progesteronrezeptors, *human epidermal growth factor receptor 2* und der *transketolase-like-1* (E). ER-alpha = Estrogenrezeptor  $\alpha$ , ER- $\beta$  = Estrogenrezeptor  $\beta$ , PR = Progesteronrezeptor, HER2 = *human epidermal growth factor receptor 2*, TKTL1 = *transketolase-like-1*.

Die benignen Zellen ad. Fibroblasten wiesen eine schwache Farbreaktion mit 10-50% positiven Zellkernen für die Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$ ,  $\beta$  und des Progesteronrezeptors auf (Abb. 9 **A**, A, B, C, Seite 44; IRS = 2). Das Intermediärfilament Vimentin ist ein zuverlässiger Marker für Fibroblasten und zeigte in Abbildung 9 **A**, D eine positive Expression. Zellen der Zelllinie MCF12A zeigten ebenfalls eine schwache Farbreaktion mit 10-50% positiven Zellkernen für die Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$ ,  $\beta$  und des Progesteronrezeptors (Abb. 9 **B**, A, B, C, Seite 44). Als Marker für die MCF12A Zellen diente das Intermedialfilament *cytokeratin 18* (CK18). Hier zeigte sich in Abbildung 9 **B**, D auf Seite 44 eine positive Expression.



**Abbildung 9: Immunhistochemische Charakterisierung der benignen Zelllinien ad. Fibroblasten und MCF12A.**

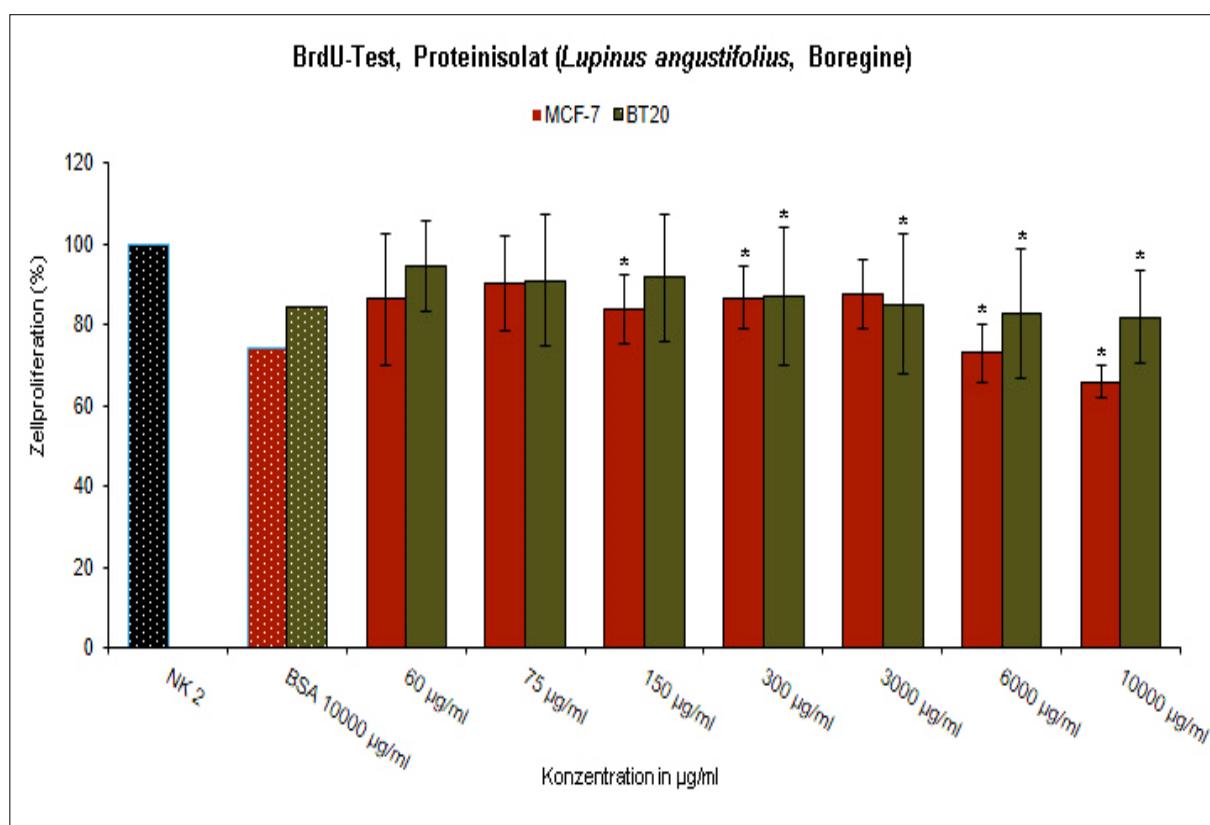
**A:** ad. Fibroblasten: Nachweis der Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$  (A), Estrogenrezeptors  $\beta$  (B), Progesteronrezeptors (C) und Vimentin (D).

**B:** MCF12A: Nachweis der Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$  (A), Estrogenrezeptors  $\beta$  (B), Progesteronrezeptors (C) und *cytokeratin 18* = CK18 (D). ER-alpha = Estrogenrezeptor  $\alpha$ , ER- $\beta$  = Estrogenrezeptor  $\beta$ , PR = Progesteronrezeptor, Vimentin = Intermediärfilament, CK18 = *cytokeratin 18* = Intermediärfilament.

### 3.3 Ergebnisse zur Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität

#### 3.3.1 Einfluss des Proteinisolats auf die Proliferation von MCF-7 und BT20

Der Einfluss des Proteinisolats von *L. angustifolius* (Boregine) in dem Konzentrationsbereich 60-10000 µg/ml auf die Zellproliferation der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 nach 24 h Inkubation ist in Abbildung 10 grafisch dargestellt. Eine signifikante Hemmung der Zellproliferation der MCF-7 Zellen von 20-35% konnte bei den Konzentrationen 150, 300, 6000 und 10000 µg/ml beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte auch die 10000 µg/ml BSA (*bovine serum albumin*) Kontrolle eine Verminderung der Zellproliferation der MCF-7 Zellen um 30%. Eine signifikante Abnahme der Zellproliferation der BT20 Zellen um 20% erfolgte bei den Konzentrationen 300, 3000, 6000 und 10000 µg/ml. Die 10000 µg/ml BSA (*bovine serum albumin*) Kontrolle bewirkte ebenfalls eine Verringerung der Zellproliferation der BT20 Zellen von ca. 18%. Proliferationsfördernde Effekte an beiden Zelltypen wurden nicht beobachtet.



**Abbildung 10: Grafische Darstellung des BrdU-Tests für das Proteinisolat (*L. angustifolius*, Boregine).**

MCF-7 und BT20 Zellen wurden für 24 h mit dem Proteinisolat (60-10000 µg/ml) inkubiert. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von (n = 8-12) \* = p < 0,01 im Vergleich zur NK2 (ungepaarter T-Test). NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut), BSA = *bovine serum albumin*.

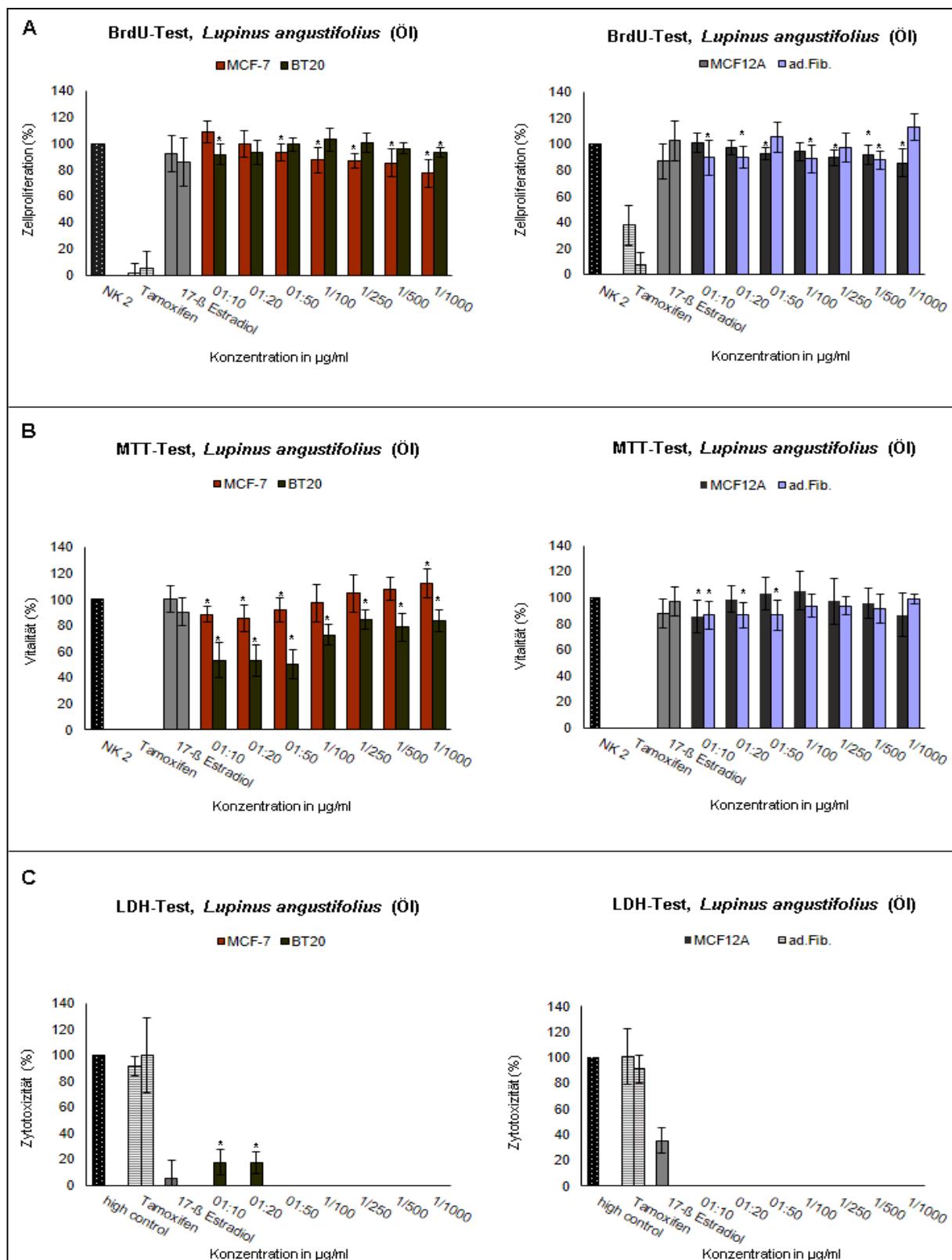
### 3.3.2 Einfluss des Lupinenöls auf die Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 sowie benignen Zellen ad. Fibroblasten und MCF12A

In Abbildung 11 A auf Seite 47 ist das Ergebnis des BrdU-Tests nach 24 h Inkubation mit dem Öl von *L. angustifolius* für die Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 (links) sowie den benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten (rechts) dargestellt. Die MCF-7 Zellen waren bei den Verdünnungen 1:50, 1/100, 1/250, 1/500 und 1/1000 durch das Lupinenöl signifikant konzentrationsabhängig in der Zellproliferation um ca. 7-23% gehemmt. Eine signifikante Verminderung der Zellproliferation konnte bei den BT20 Zellen bei der Verdünnung 1:10 (8%) sowie 1/1000 (7%) beobachtet werden. Proliferationsfördernde Effekte an den Mammakarzinomzelllinien wurden unter den beschriebenen Testbedingungen nicht beobachtet. Eine signifikante Beeinträchtigung der Zellproliferation der MCF12A Zellen war messbar bei den Verdünnungen 1:50 (7%), 1/250 (10%), 1/500 (8%) und 1/1000 (15%). Bei den ad. Fibroblasten war die Zellproliferation signifikant bei den Verdünnungen 1:10 (10%), 1:20 (10%), 1/100 (11%) sowie 1/500 (12%) vermindert.

Die Wirkung des Öls von *L. angustifolius* auf die Zellvitalität von MCF-7, BT20 (links) sowie MCF12A und ad. Fibroblasten (rechts) ist in der Abbildung 11 B auf Seite 47 grafisch dargestellt. Eine signifikante Veränderung der Zellvitalität der MCF-7 Zellen trat bei den Verdünnungen 1:10 (11%), 1:20 (14%), 1:50 (8%) sowie 1/1000 (+12%) auf. Bei den BT20 Zellen zeigten sich bei allen Verdünnungen signifikante konzentrationsabhängige Veränderungen der Zellvitalität von 16-50%. Die Zellvitalität der MCF12A Zellen war signifikant verringert bei der Verdünnung 1:10 (15%). Auch bei den ad. Fibroblasten zeigte sich eine signifikante Abnahme der zellulären Vitalität bei den Verdünnungen 1:10 (14%), 1:20 (14%) sowie bei 1:50 (13%).

Die zytotoxische Wirkung des Öls von *L. angustifolius* an den Zellen MCF-7, BT20 (links) sowie MCF12A und ad. Fibroblasten (rechts) ist in der Abbildung 11 C auf Seite 47 grafisch dargestellt. In dem gesamten Konzentrationsbereich von 1:10-1/1000 konnte keine Zytotoxizität an den MCF-7 Zellen nachgewiesen werden. Bei den BT20 Zellen war eine signifikante Zytotoxizität bei den Verdünnungen 1:10 (18%) und 1:20 (18%) messbar. An den benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten bewirkte die 24 h Inkubation mit dem Öl der blauen Süßlupine keine Zytotoxizität.

## Ergebnisse



**Abbildung 11: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests des Öls von *L. angustifolius*.**

MCF-7, BT20, MCF12A und ad. Fibroblasten wurden 24 h mit dem Lupinenöl (1:10-1/1000) inkubiert. **A:** BrdU-Test: links maligne Zellen; rechts benigne Zellen. **B:** MTT-Test: links maligne Zellen; rechts benigne Zellen. **C:** LDH-Test: links maligne Zellen; rechts benigne Zellen. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von ( $n = 10-12$ ) \* =  $p < 0,01$  im Vergleich zur NK2 (BrdU, MTT), high control (LDH) (ungepaarter T-Test). NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut).

### 3.3.3 Wirkung des Samen-, Blatt-, Spross- und Wurzelextraktes (19.07.2010) von *Lupinus angustifolius* auf die Zellproliferation und Zytotoxizität von MCF-7 und BT20

Die Wirkung des Samen-, Blatt-, Spross- und Wurzelextraktes (19.07.2010) der blauen Süßlupine auf die Zellproliferation der MCF-7 Zellen ist in Abbildung 12 A auf Seite 49 grafisch dargestellt. Nach 24 h Inkubationszeit zeigte sich durch den Samenextrakt keine signifikante Veränderung der Zellproliferation bei den MCF-7 Zellen. Der Blattextrakt verminderte die Zellproliferation signifikant bei den Konzentrationen 200 µg/ml (6%) sowie 10 µg/ml (15%). Anders verhielt es sich bei dem Sprossextrakt, er hemmte die Zellproliferation von MCF-7 Zellen signifikant konzentrationsabhängig bei den Konzentrationen 200 µg/ml (42%), 100 µg/ml (25%), 50 µg/ml (23%), 25 µg/ml (25%) und 10 µg/ml (20%). Die stärkste Hemmung der Zellproliferation bewirkte der Wurzelextrakt bei den MCF-7 Zellen. Hier war die Zellproliferation innerhalb des gesamten Konzentrationsbereiches signifikant konzentrationsabhängig vermindert (200 µg/ml (89%), 100 (88%), 50 µg/ml (56%), 25 µg/ml (45%), 10 µg/ml (40%), 1 µg/ml (24%) und 0,1 µg/ml (8%)).

Die zytotoxische Wirkung der vier Lupinenextrakte an den MCF-7 Zellen stellt Abbildung 12 B auf Seite 49 grafisch dar. Der Samenextrakt bewirkte nach 24 h Inkubation eine signifikante Zytotoxizität bei 200 µg/ml (6%) und 100 µg/ml (4%). Der Blattextrakt führte zu keiner messbaren Zytotoxizität bei den MCF-7 Zellen. Eine signifikante Zytotoxizität zeigte der Sprossextrakt bei den Konzentrationen 200 µg/ml (27%), 100 µg/ml (22%) und 50 µg/ml (5%). Der Wurzelextrakt hatte ebenfalls eine signifikant zytotoxische Wirkung bei den Konzentrationen 200 µg/ml (38%), 100 µg/ml (3%) und 50 µg/ml (1%).

Der Einfluss der vier Extrakte auf die Zellproliferation der BT20 Zellen ist in Abbildung 12 C auf Seite 49 grafisch dargestellt. Der Samenextrakt zeigte eine signifikante Proliferationshemmung bei den Konzentrationen 50 µg/ml (6%) sowie 1 µg/ml (10%). Der Blattextrakt bewirkte keine signifikante Hemmung der Zellproliferation der BT20 Zellen. Ein ebenfalls signifikanter Effekt auf die Zellproliferation dieser Zellen konnte bei den Konzentrationen 200 µg/ml (26%), 100 µg/ml (23%) sowie 50 µg/ml (14%) des Sprossextraktes festgestellt werden. Der Wurzelextrakt hatte eine signifikante proliferationshemmende Wirkung bei den Konzentrationen 200 µg/ml (95%), 100 µg/ml (73%), 50 µg/ml (65%), 25 µg/ml (46%), 10 µg/ml (29%) und 1 µg/ml (21%). Abbildung 12 D auf Seite 49 zeigt das Ergebnis des Zytotoxizitätstests der vier Lupinenextrakte

## Ergebnisse

an den BT20 Zellen nach 24 h Inkubation. Eine signifikante Zytotoxizität war bei der Konzentration 200 µg/ml des Samenextraktes (1%), Sprossextraktes (26%) und Wurzelextraktes (22%) messbar.

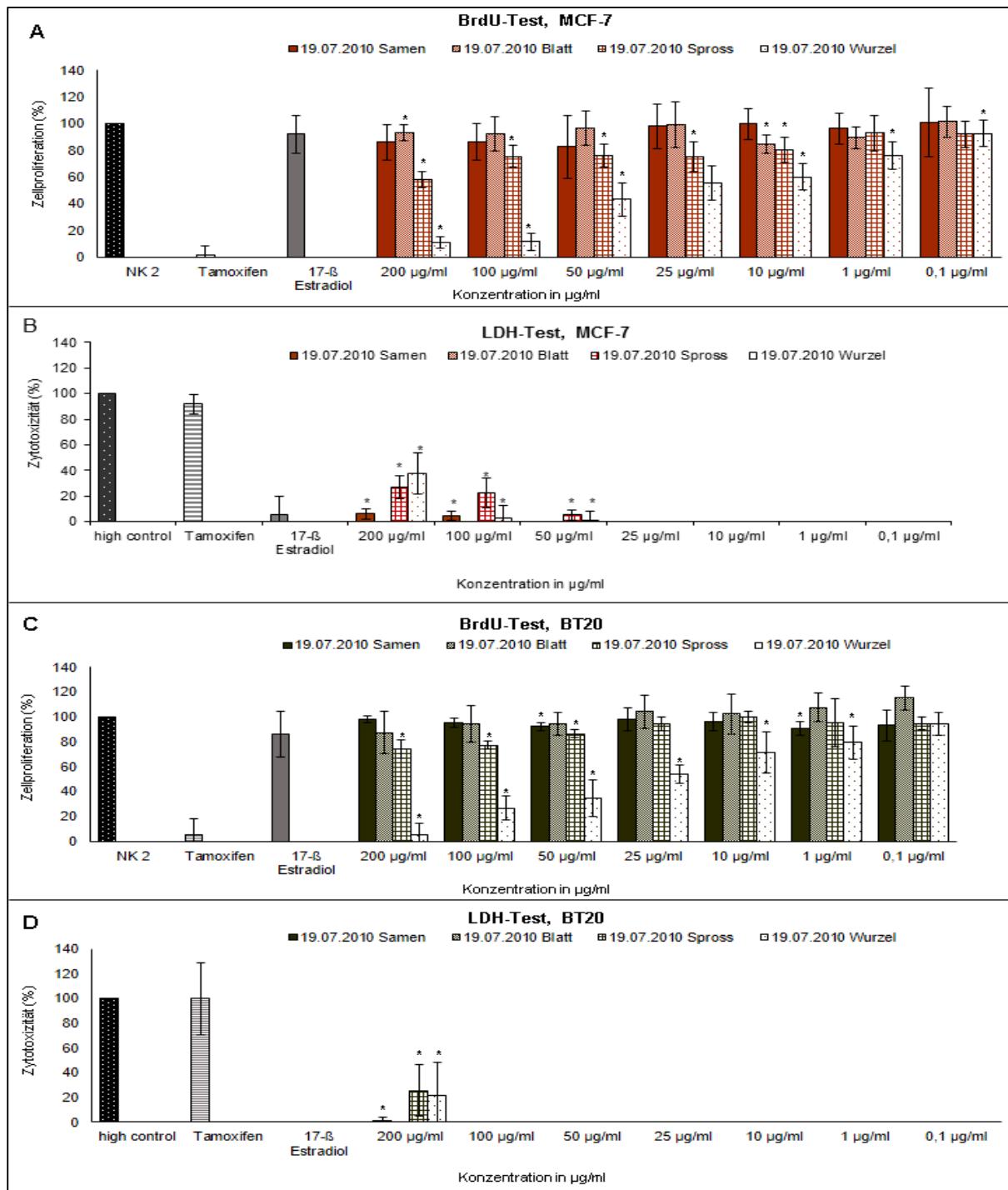


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Wirkung des Samen-, Blatt-, Spross- und Wurzelextraktes (19.07.2010) auf die Zellproliferation und Zytotoxizität von MCF-7 und BT20 Zellen.

BrdU-Test: **A: MCF-7, C: BT20** und LDH-Test: **B: MCF-7, D: BT20** nach 24 h Inkubation mit den pflanzlichen Extrakten in dem Konzentrationsbereich 200-0,1 µg/ml. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von ( $n = 8-12$ ) \* =  $p < 0,01$  im Vergleich zur NK2 (BrdU-Test), *high control* (LDH) (ungepaarter T-Test). NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut).

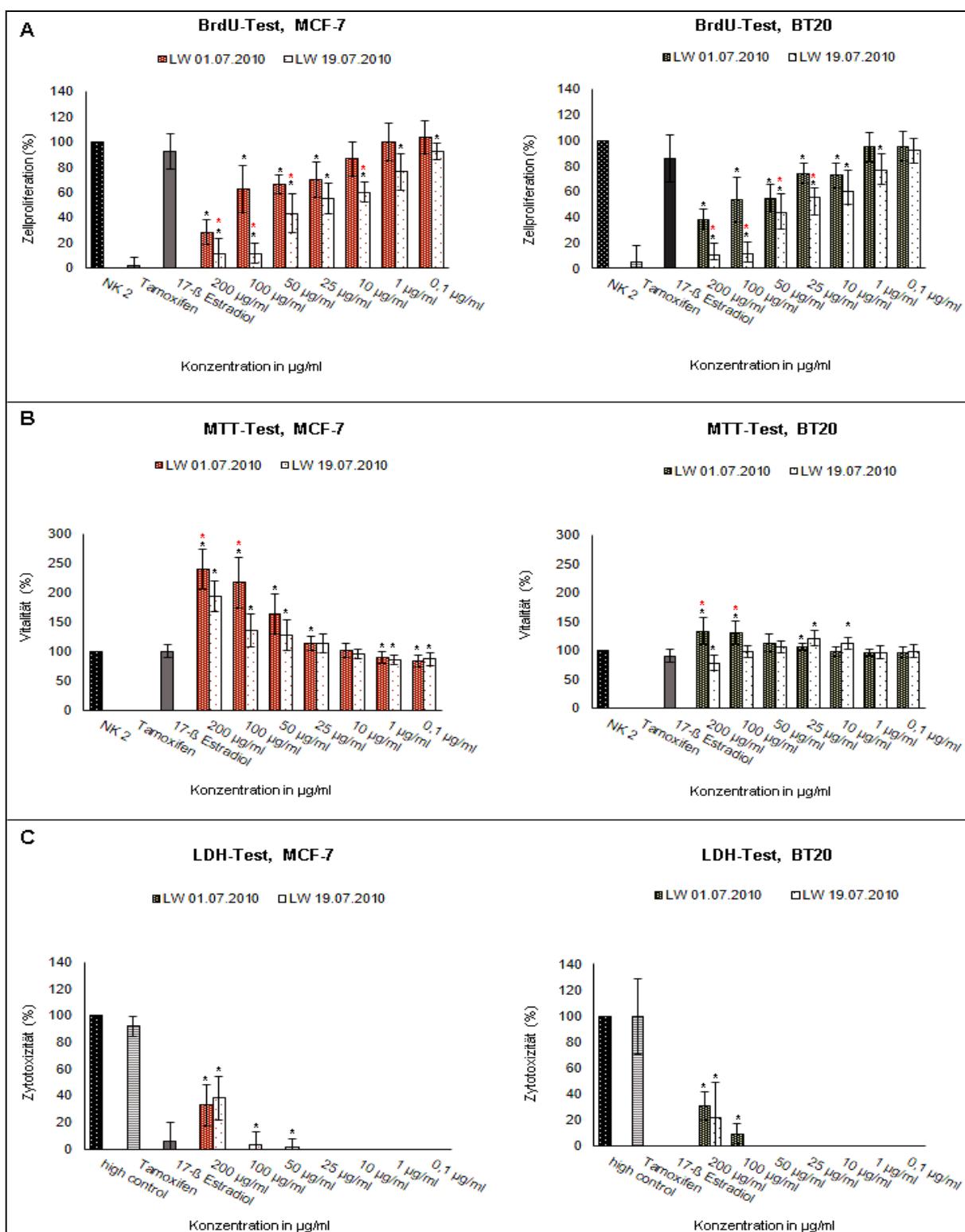
### 3.3.4 Einfluss des Wurzelalters auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20

Das Ergebnis des BrdU-Tests für die Mammakarzinomzelllinien MCF-7 (links) und BT20 (rechts) nach 24 h Inkubation mit den Extrakten ist in der Abbildung 13 A auf Seite 51 grafisch dargestellt. Der Wurzelextrakt (9 W.) verringerte die Zellproliferation der MCF-7 Zellen signifikant konzentrationsabhängig bei den Konzentrationen 200 µg/ml (72%), 100 µg/ml (37%), 50 µg/ml (34%) und 25 µg/ml (30%). Die 12 Wochen alte Wurzel unterschied sich deutlich signifikant von der 9 Wochen alten Wurzel in ihrer proliferationshemmenden Wirkung an den MCF-7 Zellen bei den Konzentrationen 200 µg/ml (89%), 100 (88%), 50 µg/ml (56%) und 10 µg/ml (40%). Die Zellproliferation der BT20 Zellen wurde durch den Wurzelextrakt (9 W.) signifikant bei den Konzentrationen 200 µg/ml (61%), 100 µg/ml (46%), 50 µg/ml (45%), 25 µg/ml (25%) und 10 µg/ml (26%) gehemmt. Im Vergleich mit der 9 Wochen alten Wurzel war die Zellproliferation der BT20 Zellen durch den Extrakt der 12 Wochen alten Wurzel signifikant stärker verringert bei den Konzentrationen 200 µg/ml (95%), 100 µg/ml (73%), 50 µg/ml (65%), 25 µg/ml (46%).

Abbildung 13 B auf Seite 51 zeigt die grafische Darstellung des Vitalitätstests (MTT) der MCF-7 Zellen (links) und BT20 Zellen (rechts) nach 24 h Inkubation mit den Extrakten. Die 24 h Inkubation der MCF-7 Zellen mit den beiden Wurzelextrakten führte in den höheren Konzentrationsbereichen zu einer erhöhten Zellvitalität (9 W.: 200 µg/ml (+139%), 100 µg/ml (+116%), 50 µg/ml (+63%) und 25 µg/ml (+14%)) sowie (12 W.: 200 µg/ml (+92%), 100 µg/ml (+34%) und 50 µg/ml (+27%)). Der Wurzelextrakt (9 W.) bewirkte bei den BT20 Zellen eine stärkere Zellvitalität (200 µg/ml (+34%) und 100 µg/ml (+31%)). Bei dem Wurzelextrakt (12 W.) war die Zellvitalität dieser Zellen in der höchsten Konzentration 200 µg/ml um 21% signifikant verringert. Hier konnte eine signifikante Zunahme der Zellvitalität bei den Konzentrationen 25 µg/ml (+21%) und 10 µg/ml (+12%) beobachtet werden.

Das Ergebnis des Zytotoxizitätstests nach 24 h Inkubation mit den Extrakten ist in Abbildung 13 C auf Seite 51 für die MCF-7 Zellen (links) und BT20 Zellen (rechts) grafisch dargestellt. Beide Wurzelextrakte hatten eine signifikante zytotoxische Wirkung auf die MCF-7 und BT20 Zellen (9 W.: 200 µg/ml (33%)); (12 W.: 200 µg/ml (38%), 100 µg/ml (3%) und 50 µg/ml (1%)); BT20: (9W.: 200µg/ml (31%), 100 µg/ml

(10%); (12W.: 200 µg/ml (22%)).



**Abbildung 13: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF-7 und BT20 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (01.07.2010, 19.07.2010) von *L. angustifolius*.**

MCF-7 und BT20 Zellen wurden 24 h mit den Wurzelextrakten (200-0,01µg/ml) inkubiert.

**A:** BrdU-Test: links MCF-7 Zellen; rechts BT20 Zellen. **B:** MTT-Test: links MCF-7 Zellen; rechts BT20 Zellen. **C:** LDH-Test: links MCF-7 Zellen; rechts BT20 Zellen. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von ( $n = 10-12$ ) \* =  $p < 0,01$  im Vergleich zur NK2 (BrdU, MTT), high control (LDH) (ungepaarter T-Test). \* =  $p < 0,05$  (einfaktorielle Anova + Tukey-Test) im Vergleich der Extrakte untereinander. NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut).

### 3.3.5 Einfluss des Wurzelalters auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten

Abbildung 14 A auf Seite 54 zeigt links das Ergebnis des BrdU-Proliferationstests für die MCF12A Zellen und rechts für die ad. Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit den Wurzelextrakten. Die Proliferation der MCF12A Zellen war durch den Wurzelextrakt (9 W.) während des gesamten Konzentrationsbereiches signifikant vermindert (200 µg/ml (20%), 100 µg/ml (25%), 50 µg/ml (27%), 25 µg/ml (29%), 10 µg/ml (30%), 1 µg/ml (22%) und 0,1 µg/ml (14%)). Auch der Extrakt der 12 Wochen alten Wurzel hemmte signifikant die Zellproliferation dieser Zellen bei den Konzentrationen (200 µg/ml (22%), 100 µg/ml (17%), 50 µg/ml (16%) und 10 µg/ml (13%)). Bei den Konzentrationen 50 und 25 µg/ml unterschieden sich die beiden Wurzelextrakte signifikant in ihrer Wirkung auf die Zellproliferation der MCF12A Zellen, indem die Zellproliferation stärker durch den Wurzelextrakt der 9 Wochen alten Wurzel gehemmt wurde.

Eine signifikante Proliferationshemmung durch den Wurzelextrakt (9 W.) trat bei den ad. Fibroblasten bei den Konzentrationen 200 µg/ml (24%), 25 µg/ml (9%) und 0,1 µg/ml (3%) auf. Auch der Wurzelextrakt (12 W.) verringerte die Zellproliferation dieser Zellen bei den Konzentrationen (200 µg/ml (13%), 10 µg/ml (8%) und 1 µg/ml (9%)).

Das Ergebnis des MTT-Vitalitätstests ist in Abbildung 14 B auf Seite 54 grafisch dargestellt. Der Wurzelextrakt (9 W) hemmte die Vitalität der MCF12A Zellen signifikant bei den Konzentrationen 200 µg/ml (27%) und 50 µg/ml (16%). Der Wurzelextrakt (12 W.) unterschied sich deutlich signifikant in seiner hemmenden Wirkung auf die Zellvitalität der MCF12A Zellen im Gegensatz zum Wurzelextrakt (9 W.) bei den Konzentrationen 200 µg/ml (96%), 100 µg/ml (97%), 50 µg/ml (62%) und 25 µg/ml (40%).

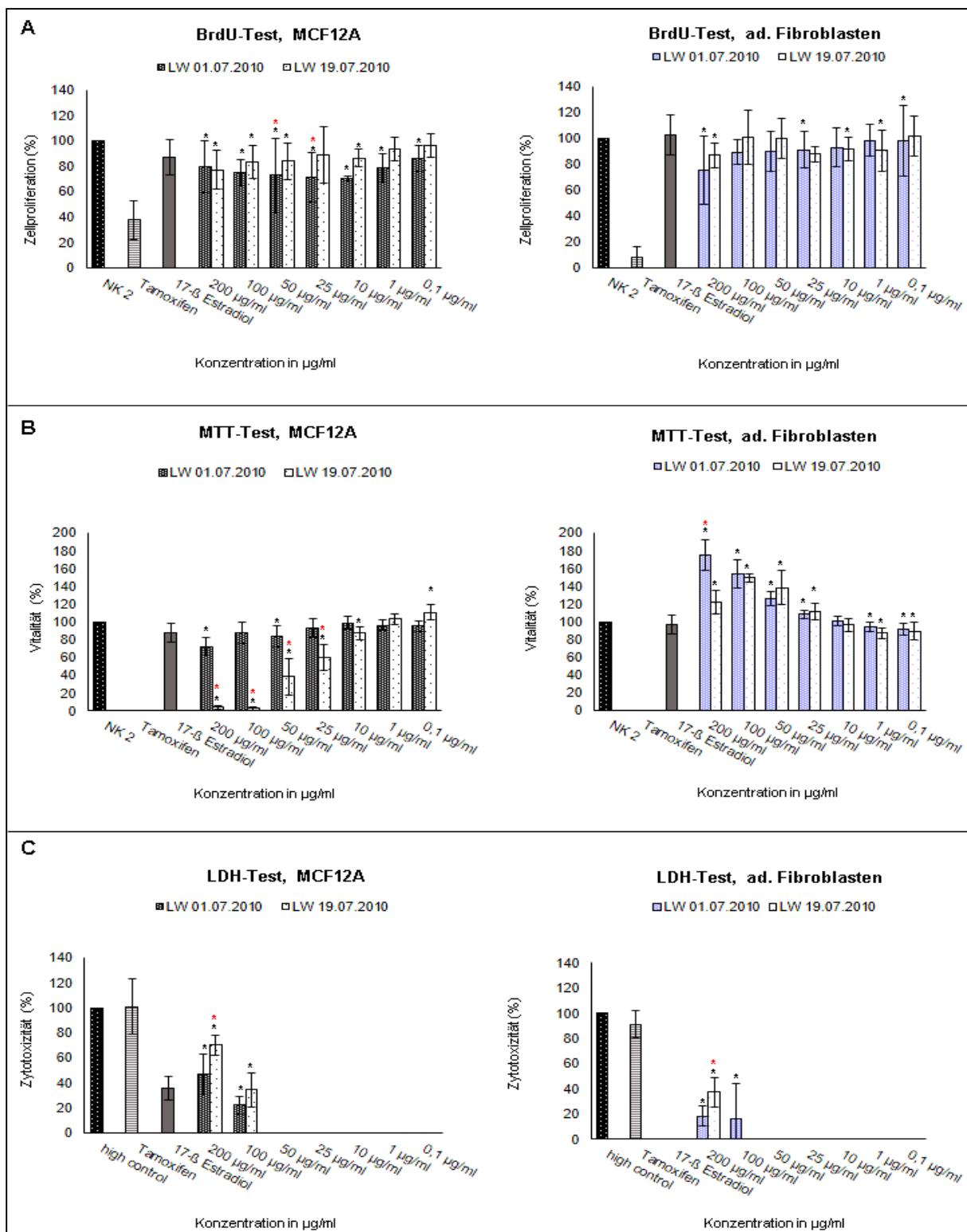
Bei den ad. Fibroblasten zeigte sich bei den Konzentrationen 200 µg/ml (+75%), 100 µg/ml (+54%), 50 µg/ml (+39%) und 25 µg/ml (+8%) eine signifikante Steigerung der Zellvitalität nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (9 W.). Ebenfalls eine signifikant erhöhte Zellvitalität war nach Zugabe des Wurzelextraktes (12 W.) bei den Konzentrationen 200 µg/ml (+22%), 100 µg/ml (+50%), 50 mg/ml (+39%) und 25 µg/ml (+11%) zu beobachten.

Die grafische Darstellung des LDH-Zytotoxizitätstests ist in Abbildung 14 C auf Seite 54 dargestellt. Der Wurzelextrakt (9 W.) zeigte eine signifikant zytotoxische Wirkung

auf die MCF12A Zellen bei den Konzentrationen 200 µg/ml (47%) und 100 µg/ml (23%). Ebenfalls signifikant zytotoxisch wirkte der Wurzelextrakt (12 W.) auf diese Zellen bei den Konzentrationen 200 µg/ml (70%) und 100 µg/ml (35%). Er unterschied sich in seiner zytotoxischen Wirkung signifikant bei der Konzentration 200 µg/ml von dem Wurzelextrakt (9 W.).

Bei den ad. Fibroblasten konnte nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (9 W.) eine signifikante Zytotoxizität bei den Konzentrationen 200 µg/ml (18%) und 100 µg/ml (17%) beobachtet werden. Eine signifikante Zytotoxizität war bei dem Wurzelextrakt (12 W.) bei der Konzentration 200 µg/ml (38%) messbar. Diese unterschied sich sowohl signifikant von der *high control* als auch von der gleichen Konzentration des Wurzelextraktes (9 W.).

## Ergebnisse



**Abbildung 14: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (01.07.2010 (9 W.), 19.07.2010 (12 W.)) von *L. angustifolius*.**

MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten wurden 24 h mit den Wurzelextrakten (200-0,01µg/ml) inkubiert. **A:** BrdU-Test: links MCF12A Zellen; rechts ad. Fibroblasten. **B:** MTT-Test: links MCF12A Zellen; rechts ad. Fibroblasten. **C:** LDH-Test: links MCF12A Zellen; rechts ad. Fibroblasten. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von ( $n = 10-12$ ) \* =  $p < 0,01$  im Vergleich zur NK2 (BrdU, MTT), high control (LDH) (ungepaarter T-Test). \* =  $p < 0,05$  (einfaktorielle Anova + Tukey-Test) im Vergleich der Extrakte untereinander. NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut).

### **3.3.6 Die Wirkung des Spross- und Wurzelextraktes (05.08.2011) auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20**

Die Wirkung des Wurzel- und Sprossextraktes (05.08.2011) nach 24 h Inkubation auf die Zellproliferation der MCF-7 (links) und BT20 Zellen (rechts) ist in Abbildung 15 A auf Seite 57 grafisch dargestellt.

Der Wurzelextrakt bewirkte während des gesamten Konzentrationsbereiches eine signifikant konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation der MCF-7 Zellen (200 µg/ml (71%), 100 µg/ml (71%), 50 µg/ml (40%), 25 µg/ml (40%), 10 µg/ml (30%), 1 µg/ml (20%) und 0,1 µg/ml (34%)). Eine ebenfalls signifikant konzentrationsabhängige Verringerung der Zellproliferation der MCF-7 Zellen zeigte sich nach 24 h Inkubation mit dem Sprossextrakt bei den Konzentrationen 200 µg/ml (65%), 100 µg/ml (57%), 50 µg/ml (59%), 25 µg/ml (51%), 10 µg/ml (28%), 1 µg/ml (29%) und 0,1 µg/ml (19%). Die beiden Extrakte unterschieden sich untereinander signifikant in ihrer proliferationshemmenden Wirkung bei den Konzentrationen 100 µg/ml (LW 71%, LS 57%) und 50 µg/ml (LW 40%, LS 59%).

Der Wurzelextrakt verringerte die Zellproliferation der BT20 Zellen signifikant bei den Konzentrationen 200 µg/ml (99%), 100 µg/ml (89%), 50 µg/ml (25%) und 25 µg/ml (16%). Innerhalb des gesamten Konzentrationsbereiches konnte der Sprossextrakt die Zellproliferation der BT20 Zellen signifikant konzentrationsabhängig hemmen (200 µg/ml (86%), 100 µg/ml (69%), 50 µg/ml (52%), 25 µg/ml (48%), 10 µg/ml (26%), 1 µg/ml (19%) und 0,1 µg/ml (8%)). Untereinander signifikant in ihrer proliferationshemmenden Wirkung unterschieden sich die beiden Extrakte bei den Konzentrationen 100 µg/ml (LW: 89%; LS: 69%), 50 µg/ml (LW: 25%; LS: 52%), 25 µg/ml (LW: 16%; LS: 48%) und 10 mg/ml (LW: 6%, LS: 26%).

In Abbildung 15 B auf Seite 57 ist die Wirkung des Wurzel- und Sprossextraktes nach 24 h Inkubation auf die Vitalität der MCF-7 Zellen (links) sowie BT20 Zellen (rechts) grafisch dargestellt.

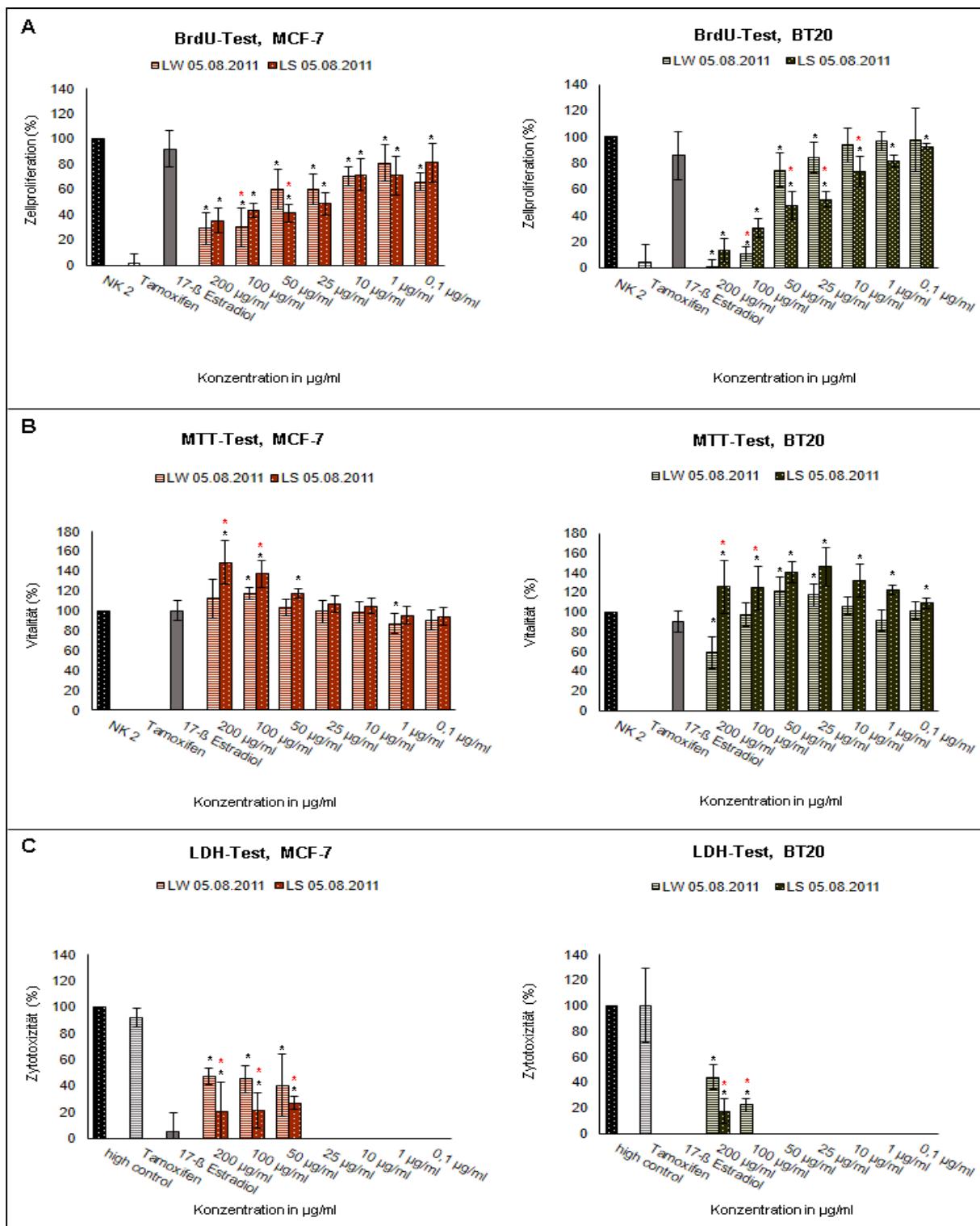
Signifikante Veränderungen der zellulären Vitalität der MCF-7 Zellen bewirkte der Wurzelextrakt bei den Konzentrationen 100 µg/ml (+17%) und 1 µg/ml (-13%). Der Sprossextrakt zeigte eine signifikante Steigerung der Zellvitalität der MCF-7 Zellen bei den Konzentrationen 200 µg/ml (+48%), 100 µg/ml (+37%) sowie 50 µg/ml (+18%). Bei den Konzentrationen 200 und 100 µg/ml unterschieden sich beide Extrakte signifikant innerhalb ihrer Wirkung auf die Zellvitalität. Der Wurzelextrakt förderte die

Zellvitalität der BT20 Zellen signifikant bei den Konzentrationen 50 µg/ml (+21%) und 25 µg/ml (+17%). Die Zellvitalität der BT20 Zellen war durch den Sprossextrakt bei den Konzentrationen 200 µg/ml (+26%), 100 µg/ml (+25%), 50 µg/ml (+41%), 25 µg/ml (+46%), 10 µg/ml (+32%), 1 µg/ml (+23%) und 0,1 µg/ml (+9%) signifikant erhöht.

Das Ergebnis des LDH-Zytotoxizitätstests nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- sowie Sprossextrakt auf die MCF-7 Zellen (links) und BT20 Zellen (rechts) ist in Abbildung 15 C auf Seite 57 grafisch dargestellt.

Der Wurzelextrakt besaß eine signifikant zytotoxische Wirkung bei den Konzentrationen 200 µg/ml (47%), 100 µg/ml (45%) und 50 µg/ml (40%) an den MCF-7 Zellen. Die Zytotoxizität des Sprossextraktes gegenüber den MCF-7 Zellen war bei den Konzentrationen 200 µg/ml (20%), 100 µg/ml (21%) und 50 µg/ml (27%) geringer im Vergleich zum Wurzelextrakt gleicher Konzentrationen.

Eine signifikante zytotoxische Wirkung beider Extrakte konnte bei den BT20 Zellen beobachtet werden (LW: 200 µg/ml (44%), 100 µg/ml (22%); LS: 200 µg/ml (18%)).



**Abbildung 15: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF-7 und BT20 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von *L. angustifolius*.**

MCF-7 und BT20 Zellen wurden 24 h mit den Extrakten (200-0,01µg/ml) inkubiert. **A:** BrdU-Test: links MCF-7 Zellen; rechts BT20 Zellen. **B:** MTT-Test: links MCF-7 Zellen; rechts BT20 Zellen. **C:** LDH-Test: links MCF-7 Zellen; rechts BT20 Zellen. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von ( $n = 8-12$ ) \* =  $p < 0,01$  im Vergleich zur NK2 (BrdU, MTT), high control (LDH) (ungepaarter T-Test). \* =  $p < 0,05$  (einfaktorielle Anova + Tukey-Test) im Vergleich der Extrakte untereinander. NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut), LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinen-sprossextrakt).

### 3.3.7 Die Wirkung des Spross- und Wurzelextraktes (05.08.2011) auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten

Die Abbildung 16 A auf Seite 59 zeigt, dass Ergebnis des BrdU-Proliferationstests der MCF12A Zellen (links) und ad. Fibroblasten (rechts) nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt. Der Wurzelextrakt hemmte die Zellproliferation der MCF12A Zellen signifikant konzentrationsabhängig bei den Konzentrationen 200 µg/ml (87%), 100 µg/ml (83%), 50 µg/ml (40%), 25 µg/ml (34%) und 10 µg/ml (15%). Im Vergleich dazu bewirkte der Sprossextrakt eine geringere Hemmung der Zellproliferation dieser Zellen (200 µg/ml (49%), 100 µg/ml (36%)).

Auch bei den ad. Fibroblasten zeigte der Wurzelextrakt (200 µg/ml (47%), 100 µg/ml (37%), 50 µg/ml (34%), 25 µg/ml (29%), 10 µg/ml (30%), 1 µg/ml (26%) und 0,1 µg/ml (8%)) eine stärkere proliferationshemmende Wirkung sowohl gegenüber der Negativkontrolle 2 als auch gegenüber dem Sprossextrakt (200 µg/ml (53%), 100 µg/ml (21 %), 50 µg/ml (14 %), 10 µg/ml (+7%), 1 µg/ml (+12%)).

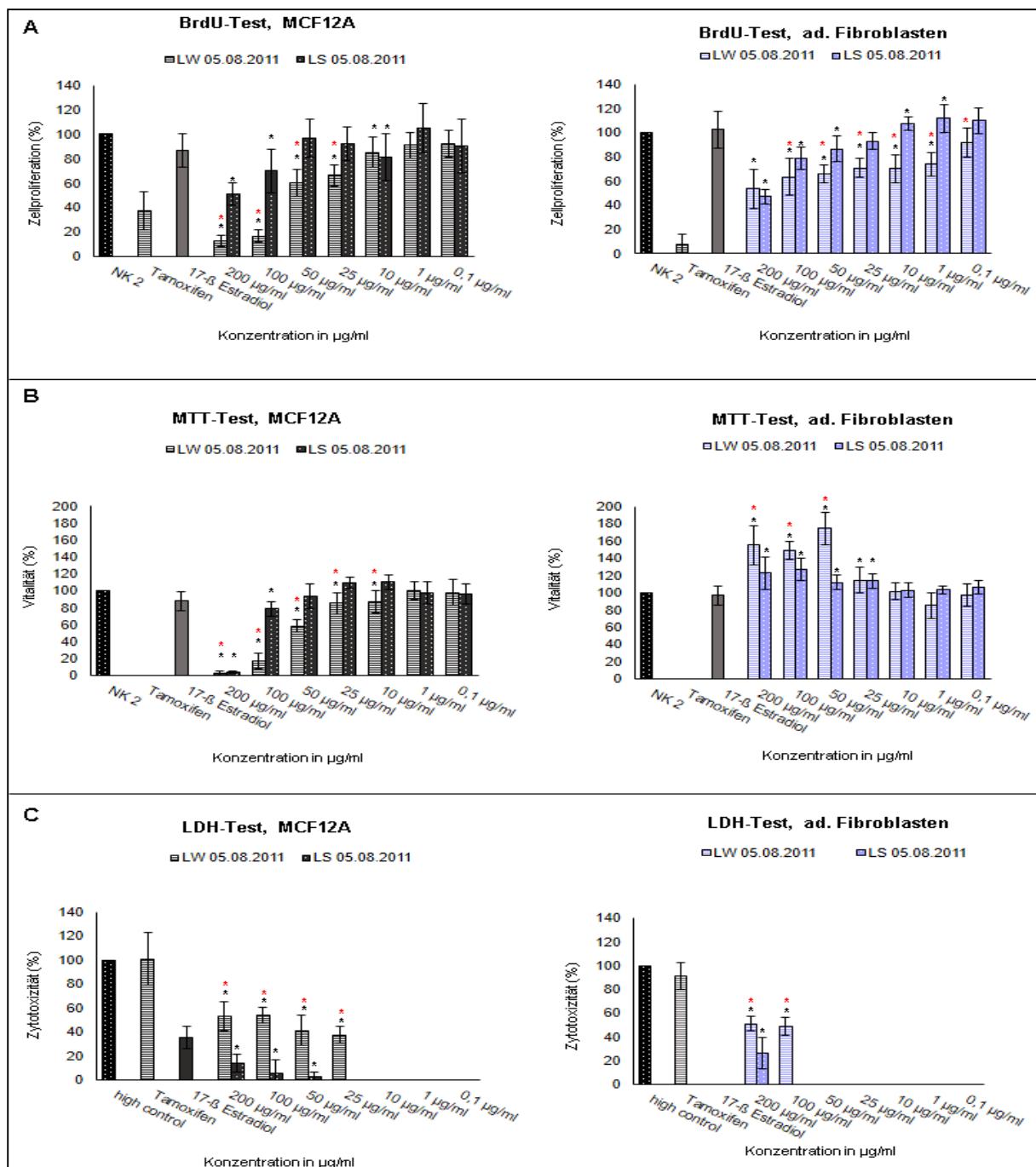
Das Ergebnis des MTT-Vitalitätstests der MCF12A Zellen (links) und ad. Fibroblasten (rechts) nach 24 h Inkubation mit den beiden Extrakten ist in Abbildung 16 B auf Seite 59 grafisch dargestellt. Der Wurzelextrakt (200 µg/ml (98%), 100 µg/ml (83%), 50 µg/ml (42%), 25 µg/ml (15%) und 10 µg/ml (13%)) besaß einen stärkeren hemmenden Einfluss auf die Vitalität der MCF12A Zellen sowohl gegenüber der Negativkontrolle 2 als auch gegenüber dem Sprossextrakt (200 µg/ml (96%) und 100 µg/ml (22%)).

Bei den ad. Fibroblasten konnte eine signifikante Zunahme der zellulären Vitalität durch den Wurzelextrakt beobachtet werden (200 µg/ml (+55%), 100 µg/ml (+49%), 50 µg/ml (+74%) und 25 µg/ml (+14%)). Auch der Sprossextrakt bewirkte eine signifikante Steigerung der Zellvitalität, diese war jedoch gegenüber dem Wurzelextrakt geringer (200 µg/ml (+23%), 100 µg/ml (+28%), 50 µg/ml (+12%) und 25 µg/ml (+13%)).

Der LDH-Zytotoxizitätstest für die MCF12A Zellen (links) und ad. Fibroblasten (rechts) nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- und dem Sprossextrakt ist in Abbildung 16 C auf Seite 59 gezeigt. Der Wurzelextrakt (200 µg/ml (52%), 100 µg/ml (54%), 50 µg/ml (41%) und 25 µg/ml (38%)) hatte auf die MCF12A Zellen eine signifikant zytotoxische Wirkung sowohl gegenüber der *high control* als auch dem Sprossextrakt (200 µg/ml (14%), 100 µg/ml (6%) und 25 µg/ml (3%)). Eine stärkere Zytotoxizität gegenüber dem Sprossextrakt konnte auch bei den ad. Fibroblasten nach Inkubation mit dem

## Ergebnisse

Wurzelextrakt (200 mg/ml (51%) und 100 µg/ml (49%)) beobachtet werden. Der Sprossextrakt zeigte eine signifikante Zytotoxizität von 26% (200 µg/ml) bei den ad. Fibroblasten.



**Abbildung 16: Grafische Darstellung des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und des Sprossextrakt (05.08.2011) von *L. angustifolius*.**

MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten wurden 24 h mit den Extrakten (200-0,01µg/ml) inkubiert. **A:** BrdU-Test: links MCF12A Zellen; rechts ad. Fibroblasten. **B:** MTT-Test: links MCF12A Zellen; rechts ad. Fibroblasten. **C:** LDH-Test: links MCF12A Zellen; rechts ad. Fibroblasten. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von (n = 8-12) \* = p < 0,01 im Vergleich zur NK2 (BrdU, MTT), high control (LDH) (ungepaarter T-Test). \* = p < 0,05 (einfaktorielle Anova + Tukey-Test) im Vergleich der Extrakte untereinander. NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut), LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.3.8 Wirkung des Wurzel- und Sprossextraktes nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation auf die Zellproliferation, Vitalität und Zytotoxizität von MCF-7 Zellen

Das Ergebnis des BrdU Proliferationstests für die MCF-7 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit dem Wurzel- (links) sowie Sprossextrakt (rechts) ist in Abbildung 17 A auf Seite 62 grafisch dargestellt.

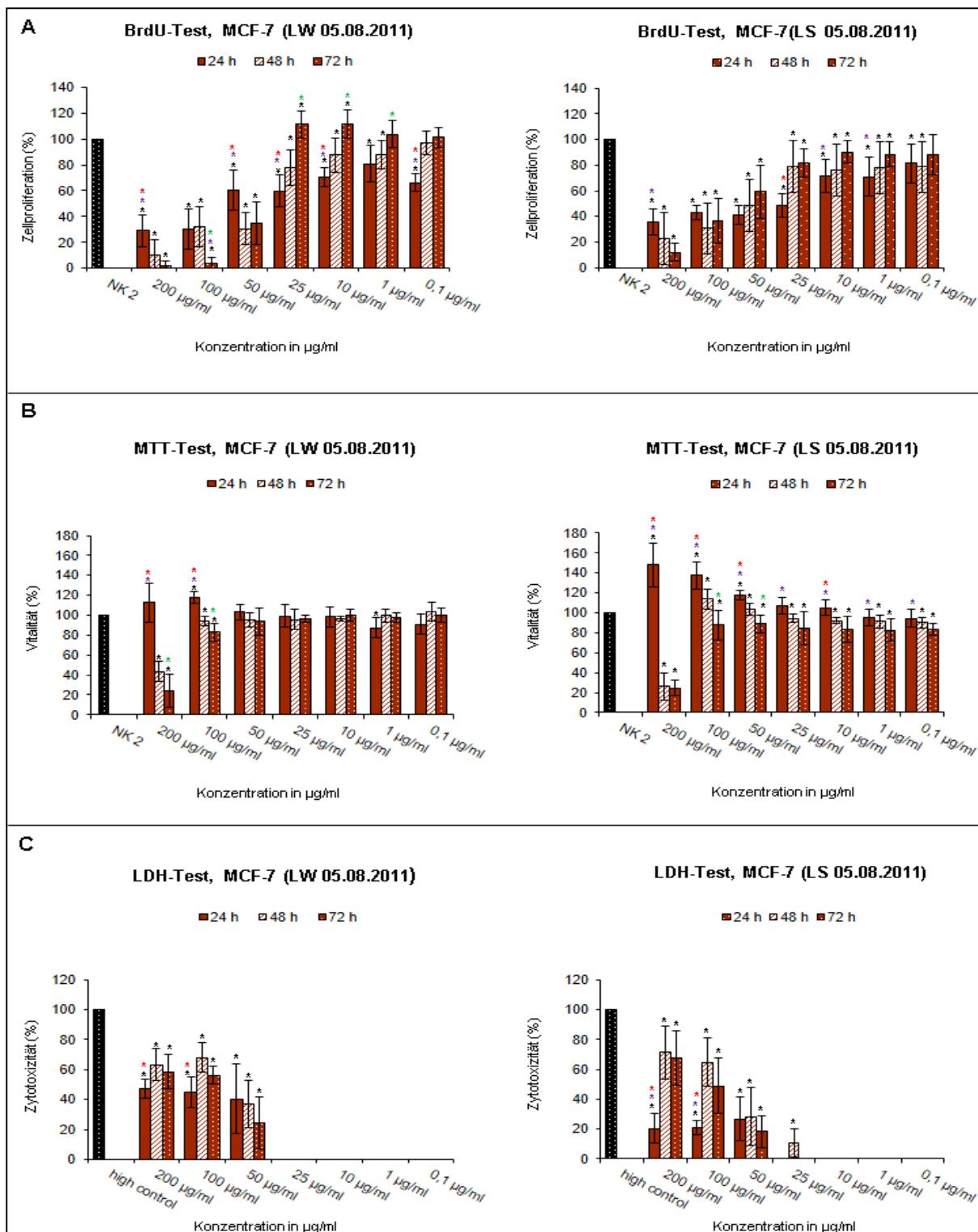
Auffällig bei diesem Ergebnis war, dass die MCF-7 Zellen bei der Konzentration 200 µg/ml durch den Wurzelextrakt nach 48 h (89%) und 72 h (98%) stärker in der Zellproliferation gehemmt wurden als nach 24 h (71%). Die Konzentration 100 µg/ml (96%) unterschied sich nach 72 h Inkubation signifikant in seiner Wirkung auf die Zellproliferation der MCF-7 Zellen im Gegensatz zur Inkubation nach 24 h und 48 h. Auch bei der Konzentration 50 µg/ml war eine stärkere Hemmung der Proliferation nach 48 h (70%) und 72 h (65%) zu beobachten. Ab dem Konzentrationsbereich 25-0,1 µg/ml erfolgte nach 72 h Inkubation bei den MCF-7 Zellen keine Hemmung der Zellproliferation mehr. Eine stärkere proliferationshemmende Wirkung an den MCF-7 Zellen konnte nach 24 h Inkubation bei den Konzentrationen 25 µg/ml (40%), 10 µg/ml (30%) und 0,1 µg/ml (34%) gegenüber den Inkubationszeiten 48 h und 72 h festgestellt werden. Der Sprossextrakt bewirkte eine stärkere Hemmung der Zellproliferation der MCF-7 Zellen nach 72 h Inkubation bei der Konzentration 200 µg/ml (88%). Bei den Konzentrationen 100 und 50 µg/ml konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Inkubationszeiten 24 h, 48 h und 72 h beobachtet werden. In dem Konzentrationsbereich 25 µg/ml, 10 µg/ml und 1 µg/ml zeigte der Sprossextrakt nach 24 h eine stärkere Hemmung der Zellproliferation als wie nach 48 h und 72 h Inkubation.

Abbildung 17 B auf Seite 62 zeigt das Ergebnis des MTT-Vitalitätstests der MCF-7 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit dem Wurzel- (links) sowie Sprossextrakt (rechts). Nach der Inkubation mit dem Wurzelextrakt für 48 h und 72 h konnte eine deutliche Abnahme der zellulären Vitalität bei den Konzentrationen 200 µg/ml (56%, 48 h); (76%, 72 h) sowie 100 µg/ml (17%, 72 h), welche sich signifikant von der Inkubationszeit 24 h unterschieden, beobachtet werden. Die Konzentrationsbereiche 50-0,1 µg/ml zeigten nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation kaum Einfluss auf die Zellvitalität der MCF-7 Zellen. Eine erhöhte Vitalität konnte nach Inkubation mit dem Sprossextrakt bei den Konzentrationen 200 µg/ml (+48%), 100 µg/ml (+37%) und 50 µg/ml (+18%) beobachtet werden. Hier war eine deutliche Verringerung der Zell-

vitalität nach 48 h (74%) und 72 h (75%) Inkubation bei der Konzentration 200 µg/ml festzustellen sowie ebenfalls Veränderungen bei den Konzentrationen 100 µg/ml (48 h, +13%); (72 h, 12%) und 50 µg/ml (48 h, +4%); (72 h, 11%). Innerhalb des Konzentrationsbereiches 25 µg/ml-0,1µg/ml war die Zellvitalität der MCF-7 Zellen nach 48 h und 72 h Inkubation mit dem Sprossextrakt geringfügig vermindert.

Das Ergebnis des LDH-Zytotoxizitätstests für die MCF-7 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit dem Wurzel- (links) und Sprossextrakt (rechts) ist in Abbildung 17 **C** auf Seite 62 grafisch dargestellt.

Bei diesem Ergebnis war auffällig, dass nach 48 h die zytotoxische Wirkung des Wurzelextraktes bei den Konzentrationen 200 µg/ml (59%) und 100 µg/ml (56%) gegenüber dem Inkubationszeitraum 24 h gestiegen war. Ein ähnlicher Effekt konnte nach Inkubation mit dem Sprossextrakt sowohl nach 48 h bei den Konzentrationen 200 µg/ml (68%) und 100 µg/ml (65%) als auch nach 72 h bei den Konzentrationen 200 µg/ml (67%) und 100 µg/ml (49%) beobachtet werden. Hier unterschied sich der Sprossextrakt nach 24 h Inkubation signifikant in seiner Zytotoxizität von den Inkubationszeiträumen 48 h und 72 h.



**Abbildung 17: Grafische Darstellung des Ergebnisses des BrdU, MTT und LDH-Tests der MCF-7 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von *L. angustifolius*.**

MCF-7 Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h mit den Extrakten (200-0,01µg/ml) inkubiert. **A:** BrdU-Test: links LW 05.08.2011; rechts LS 05.08.2011. **B:** MTT-Test: links LW 05.08.2011; LS 05.08.2011. **C:** LDH-Test: links LW 05.08.2011; LS 05.08.2011. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von ( $n = 8-12$ ) \* =  $p < 0,01$  im Vergleich zur NK2 (BrdU, MTT), high control (LDH) (ungepaarter T-Test). \* =  $p < 0,05$  Signifikanz 24 h u. 48 h, \* =  $p < 0,05$  Signifikanz 24 h u. 72 h, \* =  $p < 0,05$  Signifikanz 48 h u. 72 h (einfaktorielle Anova + Tukey-Test) NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut), LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.3.9 Wirkung des Wurzel- und Sprossextraktes nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation auf die Vitalität der BT20 Zellen

Die grafische Darstellung Abbildung 18 zeigt links das Ergebnis für den MTT-Vitalitätstest der BT20 Zellen, welche 24 h, 48 h und 72 h mit dem Wurzelextrakt inkubiert wurden. Eine signifikante Hemmung der zellulären Vitalität konnte nach 48 h sowie 72h Inkubation bei den Konzentrationen 200 µg/ml (71%, 48 h; 58%, 72 h), 100 µg/ml (60%, 48 h; 52%, 72 h), 50 µg/ml (28%, 48 h; 16%, 72 h) sowie 25 µg/ml (29%, 48 h; 3%, 72 h) im Gegensatz zu der Inkubation nach 24 h beobachtet werden. Ein ähnliches Ergebnis war auch nach 48 h und 72 h Inkubation mit dem Sprossextrakt (Abb. 18, rechts) zu beobachten. Nach 24 h Inkubation war eine erhöhte Vitalität der BT20 Zellen messbar. Diese sank nach 48 h und 72 h Inkubation bei den Konzentrationen 200 µg/ml (63%, 48 h; 80%, 72 h), 100 µg/ml (25%, 48 h; 21%, 72 h), 50 µg/ml (12%, 48 h; 6%, 72 h), 25 µg/ml (10%, 48 h; 4%, 72 h) und 10 µg/ml (5%, 48 h; 2%, 72 h).

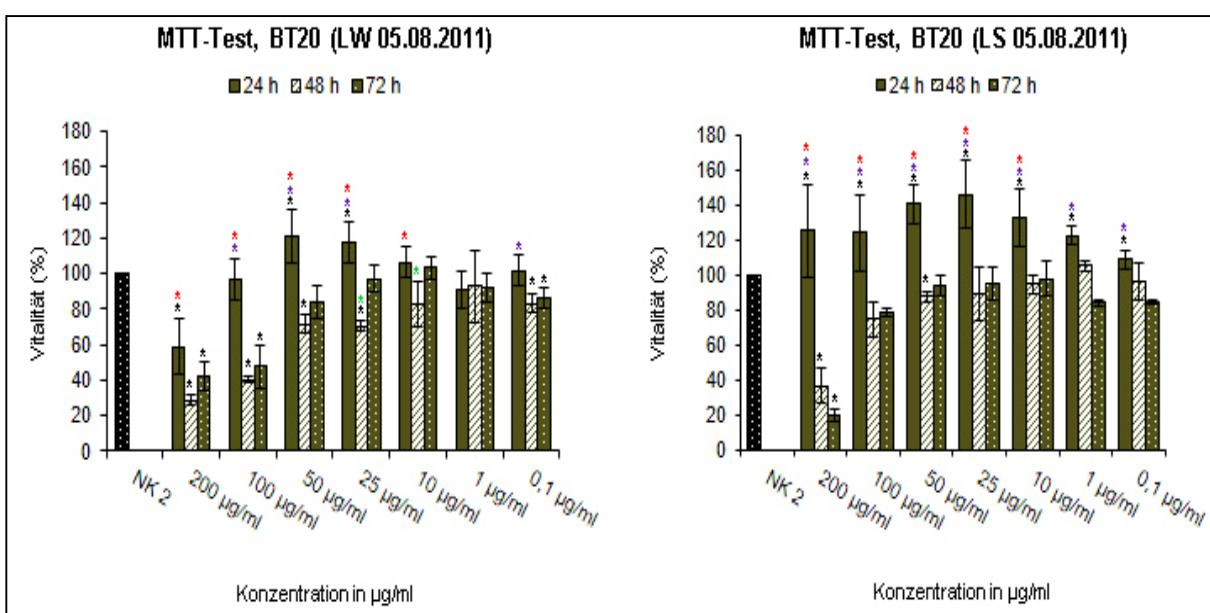


Abbildung 18: Grafische Darstellung des MTT-Tests der BT20 Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*).

BT20 Zellen wurden 24 h, 48 h und 72 h mit den Extrakten (200-0,01 µg/ml) inkubiert (links LW 05.08.2011; rechts LS 05.08.2011). Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von ( $n = 8-12$ ) \* =  $p < 0,01$  im Vergleich zur NK2 (ungepaarter T-Test). \* =  $p < 0,05$  Signifikanz 24 h u. 48 h, \* =  $p < 0,05$  Signifikanz 24 h u. 72 h, \* =  $p < 0,05$  Signifikanz 48 h u. 72 h (einfaktorielle Anova + Tukey-Test) NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen, Medium, Ethanol absolut), LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.3.10 Wirkung der Kontrollen Tamoxifen und 17-β Estradiol auf die Zellproliferation, Vitalität und Zytotoxizität der malignen MCF-7 und BT20 Zellen sowie benignen MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten

Als Positivkontrollen im BrdU, MTT und LDH Testsystem wurde Tamoxifen mit einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l und 17-β Estradiol mit  $10^{-9}$  mol/l eingesetzt. Tamoxifen hemmte die Zellproliferation der MCF-7 Zellen um 99%, der BT20 Zellen um 95%, der MCF12A Zellen um 62% und der ad. Fibroblasten um 93%.

Die Zellvitalität war durch Tamoxifen bei den MCF-7, BT20, MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten um 100% verringert. Eine zytotoxische Wirkung hatte Tamoxifen auf die MCF-7 Zellen um 92%, die BT20 Zellen um 100%, MCF12A Zellen um 100% und den ad. Fibroblasten um 91%.

Nach Inkubation mit 17-β Estradiol proliferierten 92% der MCF-7 Zellen, 86% der BT20 Zellen, 87% der MCF12A Zellen und 103% der ad. Fibroblasten.

100% der MCF-7 Zellen waren nach Inkubation mit 17-β Estradiol vital, 91% der BT20 Zellen, 88% der MCF12A Zellen und 97% der ad. Fibroblasten.

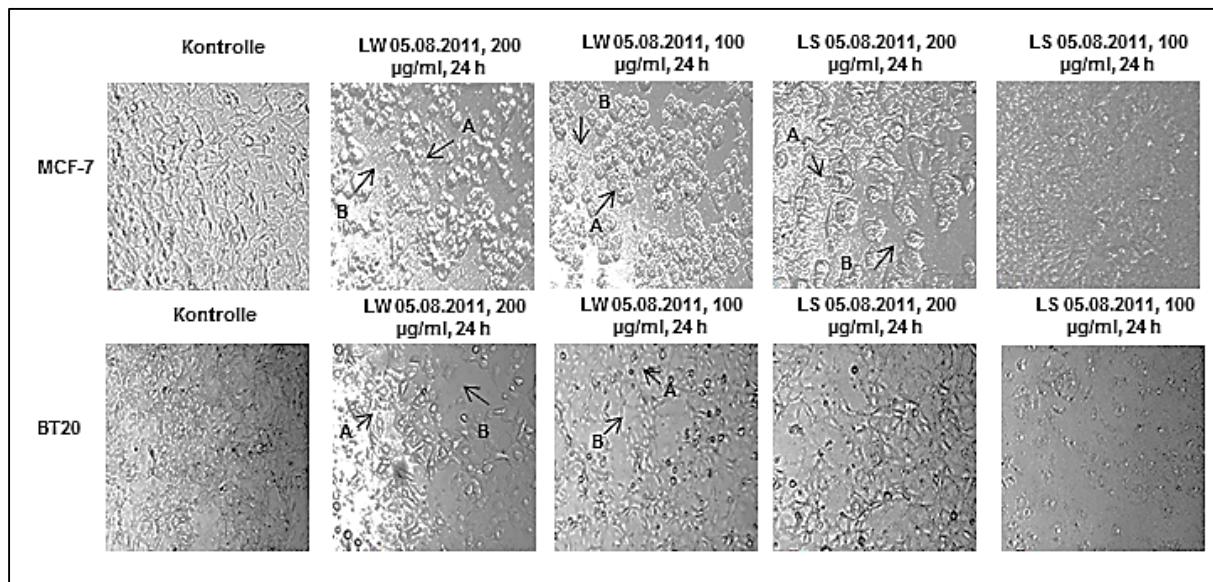
Keine Zytotoxizität zeigte 17-β Estradiol bei den BT20 Zellen und ad. Fibroblasten. Bei den MCF-7 Zellen war eine Zytotoxizität von 6% messbar und bei den MCF12A Zellen von 36%.

## 3.4 Ergebnisse zum apoptotischen und nekrotischen Zelltod

### 3.4.1 Morphologische Differenzierung von Apoptose und Nekrose durch die Lichtmikroskopie

In Abbildung 19 Seite 65 sind die morphologischen Veränderungen, welche über die Lichtmikroskopie erfasst wurden, der MCF-7 (oben) und BT20 (unten) Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- sowie Sprossextrakt (200 µg/ml, 100 µg/ml) gezeigt. Die unbehandelte Kontrolle der MCF-7 Zellen zeigte die Zellen in einem geschlossenen Zellverband mit einer normalen für MCF-7 Zellen typischen Morphologie. Bei nekrotischen Zellen kommt es zur Schädigung der Plasmamembran, wodurch Wasser in die Zelle hineinströmt, diese anschwillt und letztendlich lysiert. Diese Schwellung der MCF-7 Zellen (**A**) konnte nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (200 µg/ml und 100 µg/ml) sowie Sprossextrakt (200 µg/ml) beobachtet werden. Ein aufgelöster Zellverband (**B**), hervorgerufen durch bereits lysierte Zellen wurde ebenfalls beobachtet.

Die BT20 Zellen wiesen ebenfalls die für den nekrotischen Zelltod typischen morphologischen Merkmale auf. Im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle konnten nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (200 µg/ml und 100 µg/ml) geschwollene Zellen (**A**) sowie ein aufgelöster Zellverband (**B**) beobachtet werden.

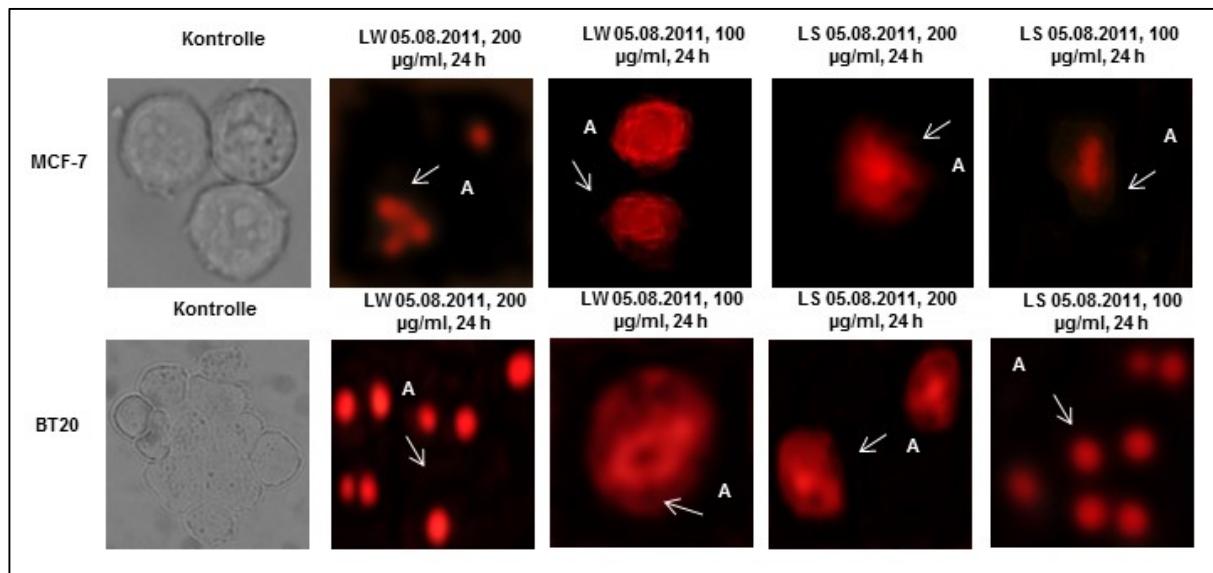


**Abbildung 19: Morphologische Differenzierung von Apoptose und Nekrose.**

MCF-7 (oben) und BT20 (unten) Zellen wurden 24 h mit den Konzentrationen 200 µg/ml und 100 µg/ml des Lupinenwurzelextraktes (05.08.2011) und Lupinensprossextraktes (05.08.2011) inkubiert. **A:** morphologisch veränderte Zelle, **B:** aufgelöster Zellverband, LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.4.2 Qualitative Bestimmung von Apoptose und Nekrose über die Fluoreszenzmikroskopie (Annexin V-FITC Kit, Miltenyi Biotec)

Die qualitative Bestimmung von Apoptose und Nekrose mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie nach 24 h Inkubation der MCF-7 (oben) und BT20 (unten) Zellen mit dem Wurzel- und Sprossextrakt (200 µg/ml und 100 µg/ml) ist in Abbildung 20 auf Seite 66 dargestellt. Im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen wurden sowohl bei den MCF-7 Zellen als auch bei den BT20 Zellen nach der Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt (200 µg/ml und 100 µg/ml) rot-fluoreszierende Zellkerne beobachtet. Propidiumiodid dringt durch die geschädigte Plasmamembran nekrotischer Zellen ein und interkaliert im Zellkern in die DNA, weshalb die Zellkerne rot-fluoreszieren. Somit waren nach 24 h Inkubation der MCF-7 Zellen und BT20 Zellen mit dem Wurzel- und Sprossextrakt (200-100 µg/ml) nekrotische Zellen nachweisbar, jedoch keine apoptotischen Zellen.



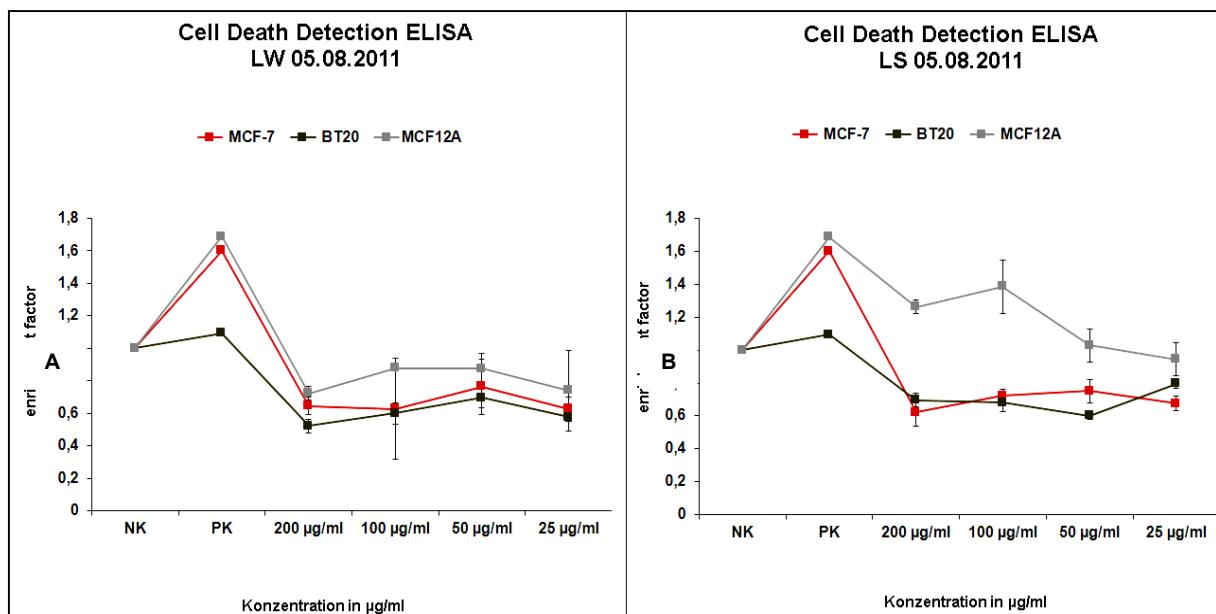
**Abbildung 20: Bestimmung von Apoptose und Nekrose über die Fluoreszenzmikroskopie.**  
MCF-7 (oben) und BT20 (unten) Zellen wurden 24 h mit den Konzentrationen 200 µg/ml und 100 µg/ml des Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextraktes (05.08.2011) inkubiert. **A:** rot-fluoreszierende Zellkerne, LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.4.3 Quantitative Bestimmung von Apoptose und Nekrose (Cell Death Detection ELISA)

Mit dem *Cell Death Detection ELISA* war es möglich eine quantitative Bestimmung von Apoptose über die spezifische Messung von Mono- und Oligonukleosomen innerhalb der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten durchzuführen. In Abbildung 21 auf Seite 67 ist das Ergebnis der spezifischen Messung von Mono- und Oligonukleotiden, ausgedrückt als *enrichment factor* für die MCF-7, BT20 und MCF12A Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- (links) und Sprossextrakt (rechts) (200-25 µg/ml) grafisch dargestellt.

Nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt konnte an den MCF-7, BT20 und MCF12A Zellen, im Vergleich mit der Negativkontrolle keine für die Apoptose typische Anreicherung von Mono- und Oligonukleotiden gemessen werden.

Gleiches war bei beiden Mammakarzinomzelllinien nach 24 h Inkubation mit dem Sprossextrakt zu beobachten. Die benignen MCF12A Zellen zeigten einen *enrichment factor* über 1 (Negativkontrolle), jedoch unter 1,7 (Positivkontrolle). Somit hatte auch nach 24 h Inkubation der MCF12A Zellen mit dem Sprossextrakt (200-25 µg/ml) keine Apoptose stattgefunden.



**Abbildung 21: Quantitative Bestimmung von Apoptose und Nekrose (Cell Death Detection ELISA).**

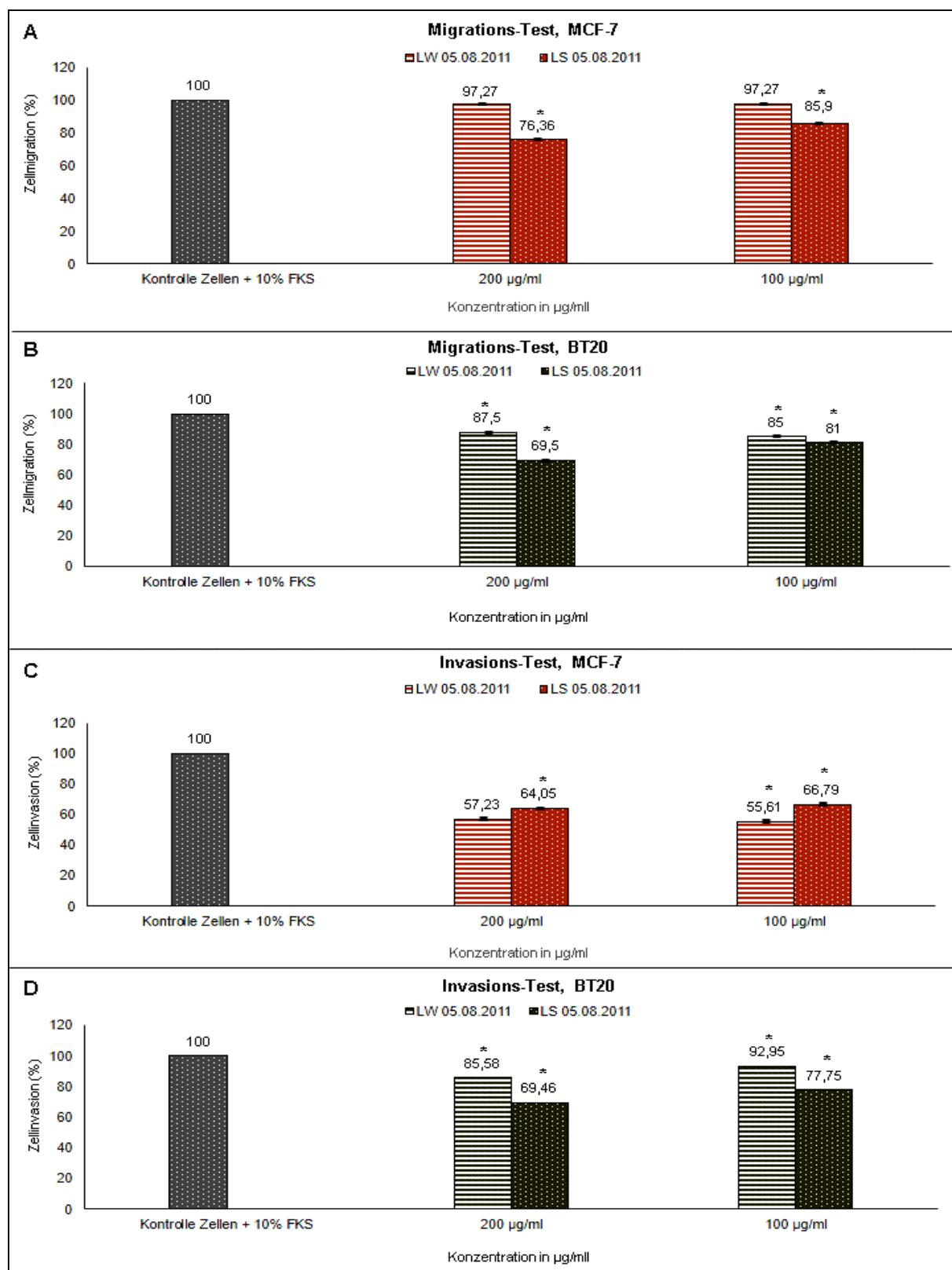
MCF-7, BT20 und MCF12A wurden 24 h mit dem Wurzel- (05.08.2011, links) und Sprosseextrakt (05.08.2011, rechts) mit den Konzentrationen 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 25 µg/ml inkubiert. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von (n = 3). NK = Negativkontrolle (Zellen + Medium), PK (Positivkontrolle), LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprosseextrakt).

### 3.5 Ergebnisse zur Migration und Invasion der Tumorzellen

Die Messung der zellulären Migration sowie Invasion der MCF-7 und BT20 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- und Sprosseextrakt (200-100 µg/ml) sollte zeigen, ob die pflanzlichen Extrakte in der Lage sind, die Migration oder Invasion der Tumorzellen zu verringern. Wie Abbildung 22 A auf Seite 68 zeigt, hatte der Wurzelextrakt keinen Einfluss auf die Migration der MCF-7 Zellen. Der Sprosseextrakt konnte dagegen die Migration dieser Zellen signifikant hemmen (200 µg/ml (23,64%); 100 µg/ml (14,1%)). Bei den BT20 Zellen war nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (200 µg/ml (12,5%); 100 µg/ml (15%)) als auch mit dem Sprosseextrakt (200 µg/ml (30,5%); 100 µg/ml (19%)) eine signifikante Hemmung der Migration messbar (Abb. 22 B).

Die zelluläre Invasion der MCF-7 Zellen, grafisch dargestellt in Abbildung 22 C auf Seite 68, konnte sowohl durch den Wurzelextrakt (200 µg/ml (42,77%); 100 µg/ml (44,39%)) und den Sprosseextrakt (200 µg/ml (35,95%), 100 µg/ml (33,21)) signifikant vermindert werden. Auch die Invasion der BT20 Zellen (22 D) war im Vergleich zur Kontrolle nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (200 µg/ml (14,42%); 100 µg/ml (7,05%)) und dem Sprosseextrakt (200 µg/ml (30,54%); 100 µg/ml (22,25%)) signifikant geringer.

## Ergebnisse



**Abbildung 22: Grafische Darstellung des Migrations- und Invasionstests der MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von *L. angustifolius*.**

MCF-7 Zellen wurden 24 h mit den Extrakten (200-0,01µg/ml) inkubiert. **A:** Migrations-Test: MCF-7 Zellen, **B:** Migrations-Test: BT20 Zellen, **C:** Invasions-Test: MCF-7 Zellen, **D:** Invasions-Test: BT20 Zellen. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von (n = 3) \* = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle. LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.6 Ergebnisse der metabolischen Analyse

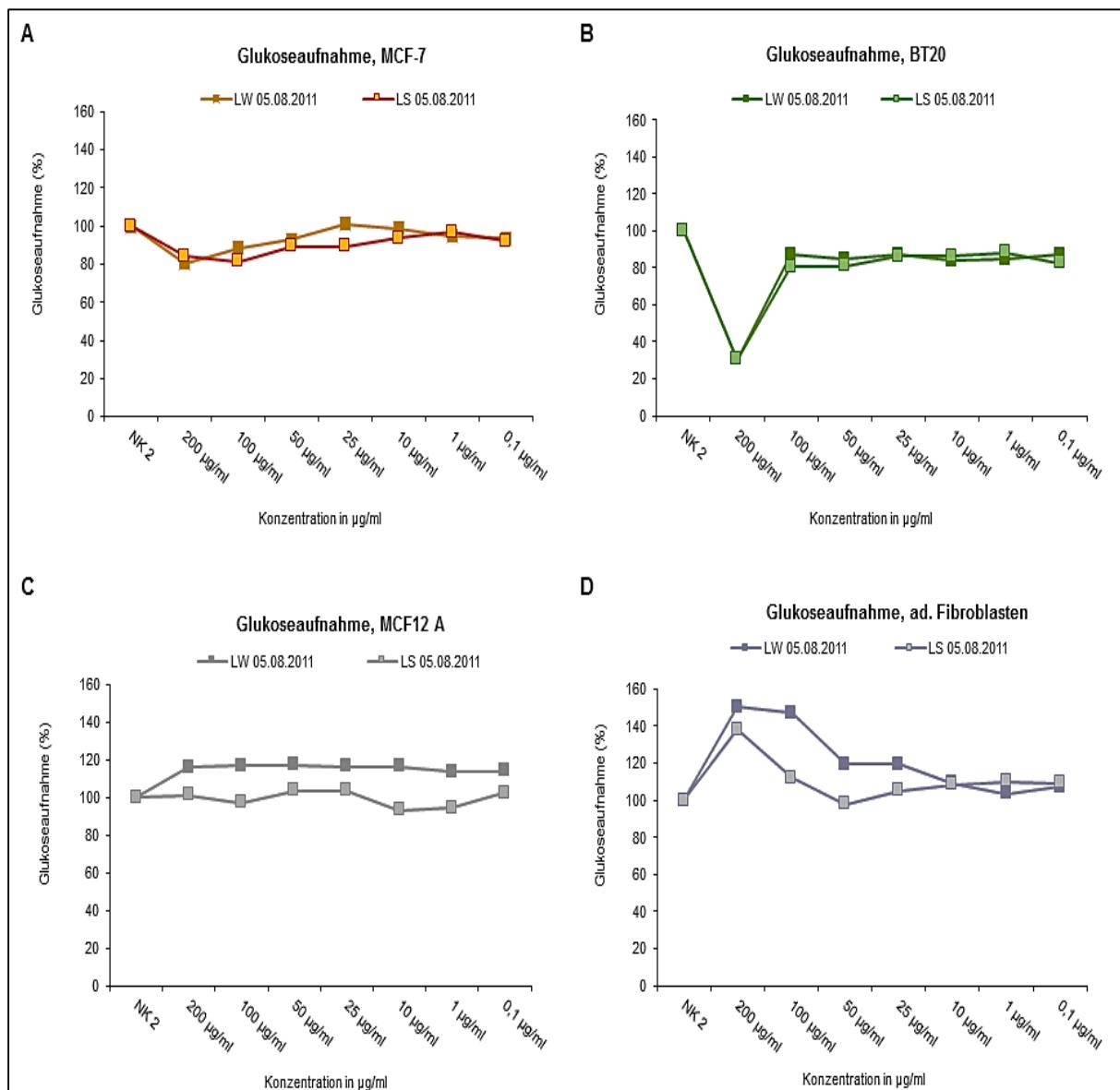
#### 3.6.1 Ergebnisse der quantitativen Glukosebestimmung

Die grafische Darstellung der Glukoseaufnahme (%), gezeigt für die MCF-7 Zellen in Abbildung 23 **A** auf Seite 70 zeigt, dass die Glukoseaufnahme der MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt verringert war. (LW: 200 µg/ml (19,4%), 100 µg/ml (11,4%); LS: 200 µg/ml (15,9%), 100 µg/ml (18,5%), 50 µg/ml (10,7%), 25 µg/ml (10,7)).

Die Abbildung 23 **B** auf Seite 70 zeigt das Ergebnis der Glukoseaufnahme der BT20 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt. Eine deutliche Abnahme der prozentualen Glukoseaufnahme nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Negativkontrolle 2 war zu beobachten bei den Konzentrationen (LW: 200 µg/ml (69,5%), 100 µg/ml (13%), 50 µg/ml (15,2%), 25 µg/ml (13%), 10 µg/ml (16,1%), 1 µg/ml (15,54%), 0,1 µg/ml (13%); LS: 200 µg/ml (69,5%), 100 µg/ml (19,5%), 50 µg/ml (19,2%), 25 µg/ml (13,6%), 10 µg/ml (13,9%), 1 µg/ml (11,8%), 0,1 µg/ml (17,4%)).

Die prozentuale Glukoseaufnahme der MCF12A Zellen, grafisch dargestellt in Abbildung 23 **C** auf Seite 70, zeigte nach 24 h Inkubation mit dem Sprossextrakt keine stärkeren Veränderungen. Nach 24 h Inkubation der MCF12A Zellen mit dem Wurzelextrakt konnte eine stärkere prozentuale Aufnahme von Glukose bei den Konzentrationen (200 µg/ml (+16%), 100 µg/ml (+17%), 50 µg/ml (+17%), 25 µg/ml (+16%), 10 µg/ml (+16%), 1 µg/ml (+13%) und 0,1 µg/ml (+14%)) beobachtet werden.

Bei den ad. Fibroblasten (Abb. 23 **D**) wurde im Vergleich mit der Negativkontrolle 2 eine stärkere Aufnahme von Glukose nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (200 µg/ml (+50,4%), 100 µg/ml (+46,8%), 50 µg/ml (+19,4%), 25 µg/ml (+19,4%) und 10 µg/ml (+9,3%)) und Sprossextrakt (200 µg/ml (+38%), 100 µg/ml (+11,9%)) beobachtet.

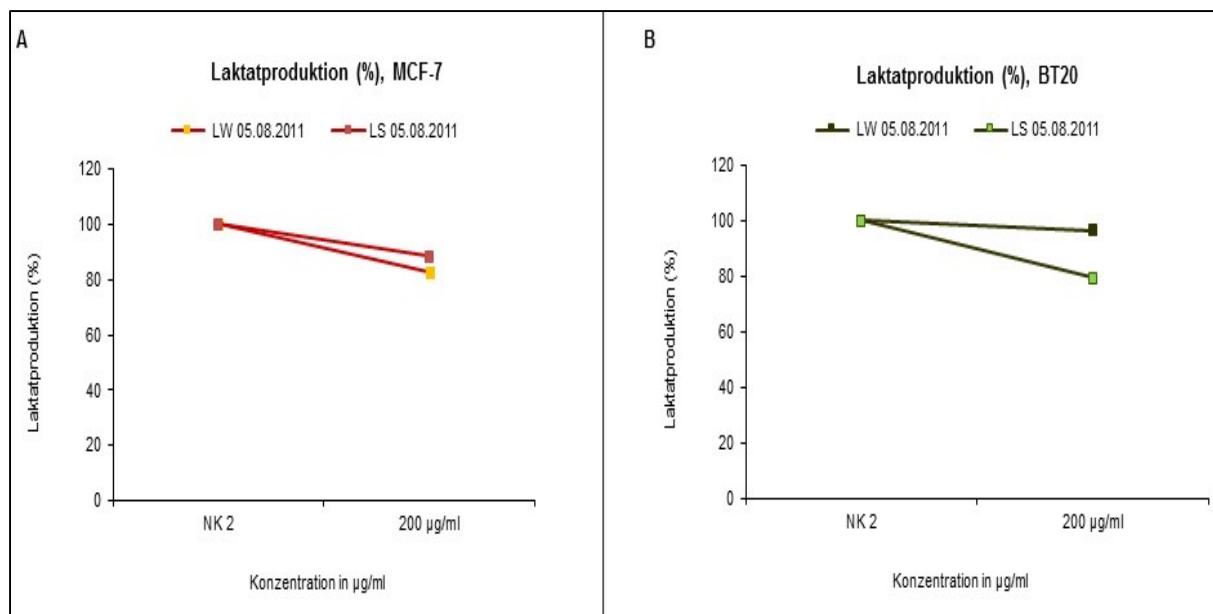


**Abbildung 23: Grafische Darstellung der quantitativen Glukosebestimmung.**

MCF-7, BT20, MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten wurden 24 h mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von *L. angustifolius* (200-0,01 µg/ml) inkubiert, (n = 1). **A:** MCF-7 Zellen, **B:** BT20 Zellen, **C:** MCF12A Zellen, **D:** ad. Fibroblasten. NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen + Medium + Ethanol absolut), LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.6.2 Ergebnisse der quantitativen Laktatbestimmung

Die Laktatproduktion (%) sank bei den MCF-7 Zellen um 17,1% (200 µg/ml) nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt und um 11,4% nach Inkubation mit dem Sprossextrakt (Abb. 24 A, S. 71). Das Ergebnis der quantitativen Laktatbestimmung für die BT20 Zellen ist in Abbildung 24 B auf Seite 71 gezeigt. Nach 24 h Inkubation der BT20 Zellen mit dem Wurzelextrakt konnte eine Verringerung der Laktatproduktion um 3,4% beobachtet werden. Der Sprossextrakt bewirkte eine Verminderung der Laktatproduktion der BT20 Zellen um 20,7%.



**Abbildung 24: Grafische Darstellung der prozentualen Laktatproduktion.**

MCF-7 und BT20 Zellen wurden 24 h mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von *L. angustifolius* (200 µg/ml) inkubiert, (n = 1). **A:** MCF-7 Zellen, **B:** BT20 Zellen, NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen + Medium + Ethanol absolut), LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.6.3 Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration

Die Abbildung 25 **A** auf Seite 72 zeigt die grafische Darstellung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration (nmol) für die MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt. Eine Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration (nmol) im Vergleich mit der Negativkontrolle 2 (0,42 nmol) konnte bei den Konzentrationen 200 µg/ml (0,30 nmol), 100 µg/ml (0,30 nmol), 50 µg/ml (0,30 nmol), 25 µg/ml (0,31 nmol) und 10 µg/ml (0,30 nmol) nach Inkubation mit dem Wurzelextrakt beobachtet werden. Die Inkubation mit dem Sprossextrakt bewirkte bei den Konzentrationen 200 µg/ml (0,40 nmol) und 25 µg/ml (0,40 nmol) eine geringere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration.

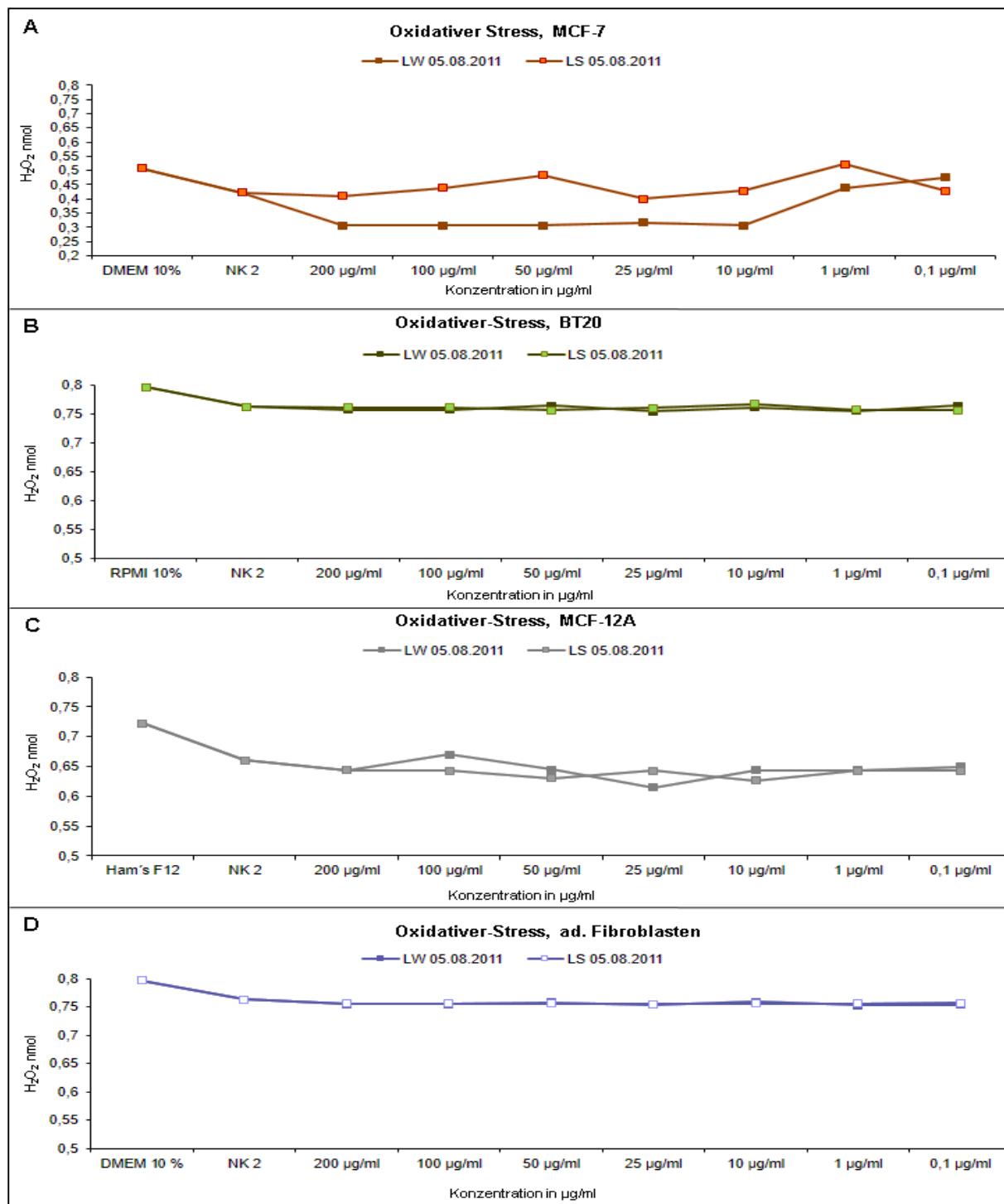
Nach 24 h Inkubation der BT20 Zellen mit dem Wurzel- und Sprossextrakt konnte im Vergleich mit der Negativkontrolle 2 keine Veränderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration festgestellt werden (Abb. 25 **B**).

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration der MCF12A Zellen, gezeigt in Abbildung 25 **C** auf Seite 72 sank nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt bei den Konzentrationen 200 µg/ml (0,64 nmol), 50 µg/ml (0,62 nmol), 25 µg/ml (0,61 nmol), 10 µg/ml (0,64 nmol), 1 µg/ml (0,64 nmol) und 0,1 µg/ml (0,64 nmol) im Vergleich mit der Negativkontrolle 2 (0,66 nmol) geringfügig. Gleichermaßen konnte auch nach Inkubation mit dem Sprossextrakt beobachtet werden. Hier lag die gemessene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration innerhalb der

## Ergebnisse

getesteten Konzentrationen 200-0,01 µg/ml bei 0,64 und 0,63 nmol.

Bei den ad. Fibroblasten (Abb. 25 **D**) ergaben sich nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt keine Veränderung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration.



**Abbildung 25: Grafische Darstellung der quantitativen Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration.**  
MCF-7, BT20, MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten wurden 24 h mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) von *L. angustifolius* (200-0,01µg/ml) inkubiert, (n = 1). **A:** MCF-7 Zellen, **B:** BT20 Zellen, **C:** MCF12A Zellen, **D:** ad. Fibroblasten. NK2 = Negativkontrolle 2 (Zellen + Medium + Ethanol absolut), LW (Lupinenwurzelextrakt), LS (Lupinensprossextrakt).

### 3.7 Darstellung der mittleren Hemmkonzentration (*Inhibitory Concentration, IC<sub>50</sub>*)

Die Tabelle 9 auf Seite 74 gibt einen Überblick über die berechnete *Inhibitory Concentration-IC<sub>50</sub>* des Wurzel- (01.07.2010, 19.07.2010, 05.08.2011) und Sprossextraktes (05.08.2011) für die Zelllinien MCF-7, BT20, MCF12A und ad. Fibroblasten bezogen auf die Zellproliferation, Vitalität und Zytotoxizität.

Im Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte der vier Extrakte in ihrer Hemmwirkung auf die Zellproliferation der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 wurde Folgendes deutlich. Die Extraktkonzentration, welche benötigt wurde, um 50% der MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation in der Proliferation zu hemmen, sind der Größe nach aufgeführt (LS 05.08.2011 (18,06 µg/ml) < LW 19.07.2010 (34,71 µg/ml) < LW 05.0.2011 (52,30 µg/ml) < LW 01.07.2010 (105,30 µg/ml)). Gleiches gilt für die BT20 Zellen (LW 19.07.2010 (28,58 µg/ml) < LW 05.08.2011 (66,86 µg/ml) < LS 05.08.2011 (70,27 µg/ml) < LW 01.07.2010 (100,09 µg/ml)). Die niedrigste Extraktkonzentration um 50% der MCF-7 Zellen in der Proliferation zu hemmen, erreichte der Sprossextrakt mit 18,06 µg/ml. Der Wurzelextrakt (19.07.2010) war der Extrakt, welcher mit der geringsten Konzentration von 28,58 µg/ml 50% der BT20 Zellen in der Zellproliferation hemmen konnte.

Nach 24 h Inkubation mit den vier Extrakten konnten für die Zellvitalität und Zytotoxizität der beiden Mammakarzinomzelllinien keine IC<sub>50</sub>-Werte berechnet werden. Die benignen MCF12A Zellen wurden nur durch den Wurzelextrakt (LW 05.08.2011) bis zu 50% in der Zellproliferation beeinträchtigt (Tab. 9; IC<sub>50</sub>: 57,38 µg/ml) und die ad. Fibroblasten durch den Sprossextrakt (LS 05.08.2011) (Tab. 9; IC<sub>50</sub>: 146,41 µg/ml). Die Zellvitalität der MCF12A Zellen konnte um 50% verringert werden, durch den LW 19.07.2010 (33,26 µg/ml) < LW 05.08.2011 (60,08 µg/ml) < LS 05.08.2011 (149,33 µg/ml). Die Zellvitalität der ad. Fibroblasten wurde durch keinen der vier Extrakte nach 24 h Inkubation um 50% vermindert. Eine bis zu 50% Zytotoxizität zeigte sich bei den MCF12A Zellen nach 24 h Inkubation mit dem LW 05.08.2011 (78,30 µg/ml) < LW 19.07.2010 (142,47 µg/ml). Eine zytotoxische Wirkung an den ad. Fibroblasten bis zu 50% wurde bei dem LW 05.08.2011 (71,40 µg/ml) Extrakt festgestellt. Nach 24 h Inkubation mit den vier Extrakten konnte keine zytotoxische Wirkung sowie keine Hemmung der Zellvitalität bis zu 50% bei den MCF-7 Zellen berechnet werden. Nach 48 h und 72 h Inkubation konnten für den Wurzel- und Sprossextrakt (05.08.2011) IC<sub>50</sub>-Werte, berechnet werden (Tab. 9). Gleiches gilt

auch für die Zellvitalität der BT20 Zellen nach 48 h und 72 h Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt. Hier konnte die Zellvitalität nach 48 h um 50% durch den LW 05.08.2011 (96,81 µg/ml) < LS 05.08.2011 (168,47 µg/ml) und nach 72 h durch den LW 05.08.2011 (65,37 µg/ml) < LS 05.08.2011 (106,96 µg/ml) gehemmt werden. Für die Zellproliferation änderten sich die IC<sub>50</sub>-Werte nach 48 h und 72 h Inkubation der MCF-7 Zellen mit dem Wurzel- (05.08.2011) und Sprossextrakt (05.08.2011) wie folgt: (LW 05.08.2011 48 h (34,44 µg/ml), 72 h (48,68 µg/ml); LS 05.08.2011 48 h (47,69 µg/ml), 72 h (75,74 µg/ml)).

Tabelle 9: Überblick über die IC<sub>50</sub>-Werte.

BrdU/ Proliferation	LW 01.07.2010 IC <sub>50</sub> -Wert		LW 19.07.2010 IC <sub>50</sub> -Wert		LW 05.08.2011 IC <sub>50</sub> -Wert		LS 05.08.2011 IC <sub>50</sub> -Wert				
	MCF-7	105,30 ± 19,48	34,71 ± 16,81	24 h	52,30 ± 9,39	24 h	18,06 ± 4,49	72 h	75,74 ± 11,58		
BT20		100,09 ± 32,48	28,58 ± 6,04	66,86 ± 7,02		70,27 ± 0,76					
MCF12A		-	-	57,38 ± 23,27		-					
Fibroblasten	-	-	-	-		146,41 ± 64,84					
MTT/ Vitalität	LW 01.07.2010 IC <sub>50</sub> -Wert	LW 19.07.2010 IC <sub>50</sub> -Wert	LW 05.08.2011 IC <sub>50</sub> -Wert		LS 05.08.2011 IC <sub>50</sub> -Wert		-		-		
MCF-7	-	-	-	24 h	-	24 h	-	72 h	191,51 ± 3,13		
BT20				48 h	193,07 ± 6,27	48 h	196,22 ± 6,27				
MCF12A				72 h	165,40 ± 4,02	72 h	191,51 ± 3,13				
Fibroblasten	-	-	-	24 h	-	24 h	-	-			
LDH/ Zytotoxizität	LW 01.07.2010 IC <sub>50</sub> -Wert	LW 19.07.2010 IC <sub>50</sub> -Wert	LW 05.08.2011 IC <sub>50</sub> -Wert		LS 05.08.2011 IC <sub>50</sub> -Wert		-		-		
MCF-7	-	-	-	24 h	-	24 h	-	72 h	75,74 ±		
BT20				48 h	51,69 ± 4,33	48 h	56,89 ± 3,35				
MCF12A				72 h	53,07 ± 0,58	72 h	75,74 ±				
Fibroblasten	-	-	-	71,40 ± 1,82		-		-			

## 4 Diskussion

### 4.1 Substanzklassenanalyse (Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie)

Die Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie wurde angewandt, um die Substanzklassen, gemessen als Totalionenintensität (%) des Wurzel- und Sprossextraktes (05.08.2011) zu bestimmen. Die Analyse beider Extrakte zeigte, dass sich die Extrakte von Wurzel und Spross nur geringfügig in ihrem Substanzklassenspektrum unterschieden.

Die am stärksten vertretene Substanzklasse war in beiden Extrakten die LIPID (Alkane Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette) (Abb. 7). Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Fettsäuren einen positiven Einfluss auf das Mammakarzinom haben können. Für die einfach ungesättigte Ölsäure (18:1) konnten zum Beispiel antikanzerogene Effekte am Mammakarzinom über die Hemmung der HER2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) Überexpression [20, 80] sowie eine verbesserte Wirksamkeit des Medikamentes Herceptin nachgewiesen werden [150]. Auch Omega-3-Fettsäuren waren in der Lage das Brustkrebswachstum zum einen in der Zellkultur als auch im Mausmodell zu hemmen [80, 127]. Ein weiteres Beispiel ist die alpha Linolensäure (ALA) eine Omega-3-Fettsäure, welche *in vitro* die Überexpression von HER2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) in Mammakarzinomzellen hemmte [86].

Die Substanzklasse der ISOPR (isoprenoide Verbindungen, Sterole, Terpene, Carotinoide) war ebenfalls in beiden Extrakten stark vertreten (Abb. 7). Ein bekanntes Diterpen, welches bereits in der Chemotherapie beim Mammakarzinom eingesetzt wird, ist das Taxol®. Das Triterpenoid Soyasaponin I, vorkommend in der Sojabohne (*Glycine max*) [167], konnte ebenfalls in der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*) detektiert werden [115, 151]. Studien belegen, dass Soyasaponin I als ein spezifischer Sialyltransferase Inhibitor fungiert [53, 153], welcher an der Sialylierung von Tumorzellen beteiligt ist und eine wichtige Rolle bei der Tumorinvasion und Metastasierung spielt [53].

Die Substanzklasse der Polyphenole wurde in ihrer Gesamtheit mit 10,4% im Wurzelextrakt nachgewiesen und mit 8,6% im Sprossextrakt (Abb. 7). Der Begriff Polyphenol ist eine Sammelbezeichnung für aromatische Verbindungen mit meist mehr als zwei aromatischen Hydroxylgruppen im Molekül, die unterschiedlichen Stoffklassen angehören [128]. Eine Untergruppe der Polyphenole stellen die Flavonoide da, welche je nach ihrer Oxidationsstufe am heterocyclischen Ring in die

sechs Hauptgruppen Flavonole, Flavone, Flavanole, Anthocyanidine, Flavanone sowie Isoflavone eingeteilt werden [128].

*In vitro* Studien an humanen Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichen Polyphenolen wie zum Beispiel dem Luteolin, Quercetin, Chrysin und Kaempferol konnten eine antitumor Wirkung für diese Polyphenole nachweisen [82, 105, 125].

Die Phytoestrogene, zu welchen auch die Isoflavone und Lignane zählen, sind ebenfalls phenolische Verbindungen. Lignane konnten in beiden Extrakten zu einem geringen Prozentsatz detektiert werden (Abb. 7), Isoflavone mit 0,7% im Sprossextrakt und 0,6% im Wurzelextrakt. Eine LC/ESI/MS (*liquid chromatography-electrospray ionization massspectrometry*) Analyse der Wurzel von *L. angustifolius* zeigte zum Beispiel das Vorkommen von verschiedenen Genistein Konjugaten [63]. Phytoestrogene haben estrogenähnliche Aktivitäten und können mit einer 1000-10000 fachen geringerer Affinität als Estradiol an den Estrogenrezeptor binden [109], wo sie je nach ihrer Konzentration eine estrogenähnliche (proliferative) oder antiestrogene (antiproliferative) Wirkung haben können [65].

Die Anzahl sonstiger Polyphenole (Suberin, Cutin, Stilbene und Tannine) betrug im Wurzelextrakt 5,3% und im Sprossextrakt 3,5% ( Abb. 7). In der Gruppe der Stilbene sind ebenfalls Substanzen mit chemopräventiver Aktivität zu finden, wie zum Beispiel das *trans*-Resveratrol, welches die Zellproliferation und die Kanzerogenese von Tumorzellen hemmte [138]. Ein weiteres bekanntes Stilbenderivat ist das Tamoxifen, welches seit langer Zeit fester Bestandteil in der Therapie des Mammakarzinoms ist [52].

In beiden Extrakten konnten also Substanzklassen nachgewiesen werden, welche über mögliche antikanzerogene Substanzen verfügen können. Allerdings wäre es sinnvoll um einen besseren Einblick über einzelne Inhaltsstoffe der Lupinenwurzel und des Lupinensprosses zu bekommen, detaillierte Inhaltsstoffanalysen zum Beispiel über LC/MS/MS (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*) in zukünftigen Arbeiten durchzuführen.

### 4.2 Untersuchung zur Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität

#### 4.2.1 Einfluss des Proteinisolates auf die Proliferation von MCF-7 und BT20

Aus heimischen Rohstoffressourcen der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*) wurden innerhalb des Bündnisses „PlantsProFood“ hochfunktionelle Proteinisolate gewonnen, um neue innovative pflanzenbasierte Lebensmittel zu entwickeln. Der

analytische Nachweis einzelner Proteine des Proteinisolates wurde durch Mitarbeiter des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik in Rostock durchgeführt. Das untersuchte Proteinisolat bestand zu 71% aus Conglutin beta, 26% Conglutin alpha, 2% Conglutin delta und 1% Conglutin gamma. Eine antitumorale Wirkung dieser Proteine ist nicht bekannt und wurde auch nicht erwartet. Vielmehr sollte ein proliferativer Effekt auf die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20 ausgeschlossen werden. Getestet wurde das Proteinkonzentrat mit einer Inkubationszeit von 24 h in den Konzentrationen 60, 75, 150, 300, 3000, 6000 und 10000 µg/ml. Die mitgeführte BSA-Kontrolle (*bovine serum albumin*) entsprach der höchsten Konzentration von 10000 µg/ml. Eine proliferative Wirkung des Proteinisolates konnte nicht beobachtet werden. Die stärkste antiproliferative Wirkung wurde sowohl bei den MCF-7 (35%) und BT20 (20%) Zellen nach Inkubation mit der höchsten Konzentration von 10000 µg/ml gemessen (Abb. 10). Im Vergleich dazu zeigte sich bei der BSA-Kontrolle (*bovine serum albumin*) mit einer Konzentration von 10000 µg/ml eine ähnlich starke Hemmung der Proliferation der MCF-7 (30%) Zellen und BT20 (18%) Zellen ( Abb. 10), sodass angenommen werden kann, dass die Hemmung der Zellproliferation nicht spezifisch durch das Proteinisolat hervorgerufen wurde, sondern aufgrund der hohen Konzentration, welcher die Zellen ausgesetzt waren.

### **4.2.2 Einfluss des Lupinenöls auf die Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität der Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT20 sowie benignen Zellen ad. Fibroblasten und MCF12A**

Eine Analyse der Fettsäuren des Öls der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*, Sorte Vitabor) wurde durch Mitarbeiter des IVV Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung in Freisingen durchgeführt. Das Öl enthielt folgende Fettsäuren: Linolsäure (18:2) 38%, Ölsäure (18:1) 30,7%, Palmitinsäure (16:0) 10,9%, Linolensäure (18:3) 6,4%, Stearinsäure (18:0) 3,9%, Docosansäure (22:0) 2,5%, Palmitoleinsäure (16:1) 0,9%, Arachinsäure (20:0) 0,8% und Lignocerinsäure (24:0) 0,6%. Die Zellproliferation der beiden Mammakarzinomzelllinien wurde nur geringfügig vermindert. So waren die MCF-7 Zellen konzentrationsabhängig bei den Verdünnungen 1:50, 1/100, 1/250, 1/500 und 1/1000 um 7-23% in der Proliferation gehemmt und die BT20 Zellen bei den Verdünnungen 1:10 (8%) und 1/1000 (7%) (Abb.11). Die benignen MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten wurden nur leicht in ihrem

Zellwachstum beeinträchtigt (max. 15%) (Abb.11). Bei der Messung der Zellvitalität über die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase konnte bei den MCF-7 Zellen, MCF12A Zellen und den ad. Fibroblasten eine geringe Abnahme der Vitalität nach 24 h Inkubation mit dem Lupinenöl beobachtet werden (Abb.11). Die Zellvitalität der BT20 Zellen nahm dagegen nach Inkubation mit dem Lupinenöl konzentrationsabhängig um 16-50% ab (Abb.11).

Eine zytotoxische Wirkung des Öls konnte weder bei den MCF-7 Zellen, MCF12A Zellen und ad. Fibroblasten und in geringem Maße bei den BT20 (max. 18%) Zellen nachgewiesen werden (Abb.11).

Welche Rolle die über die Nahrung aufgenommenen Fette in der Brustkrebsentwicklung und Progression spielen, ist seit über 60 Jahren ein kontroverses Thema [36]. Während epidemiologische Studien widersprüchliche Ergebnisse erzielten, unterstützten *in vivo* Studien die Annahme, dass nicht nur die über die Nahrung aufgenommene Menge an Fetten, sondern auch der Fettsäuretyp einen Einfluss auf die Krebsentstehung, das Tumorwachstum und die Metastasierung beim Brustkrebs haben [36]. Wie die Fettsäureanalyse des Öls der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*, Sorte Vitabor) zeigte, ist das Lupinenöl heterogen zusammengesetzt aus gesättigten Fettsäuren, einfach ungesättigten Fettsäuren, Omega-3 Fettsäuren sowie Omega-6 Fettsäuren. Einige Fettsäuren, wie die einfach ungesättigte Ölsäure und alpha Linolensäure (ALA) eine Omega-3-Fettsäure können einen positiven Einfluss auf das Mammakarzinom haben. Auch die gesättigte Fettsäure Stearinsäure konnte *in vitro* das Tumorzellwachstum hemmen und Apoptose induzieren [36]. Andererseits ist auch bekannt, dass die Omega-6 Fettsäure Linolsäure (18:2) das Brustkrebswachstum sowie die Metastasierung fördert [36, 80, 100, 141].

Es konnte nachweislich in dieser *in vitro* Untersuchung weder ein stark proliferationshemmender Effekt nach 24 h Inkubation an den Tumorzellen MCF-7 und BT20 festgestellt werden aber auch keine geförderte Proliferation dieser Zellen. Das Öl hatte auch kaum Auswirkungen auf die Letalität der Mammakarzinomzellen und keine zytotoxische Wirkung auf die beiden benignen Zelllinien. Die stärkste Wirkung des Lupinenöls konnte bei der Messung der Zellvitalität an den BT20 Zellen beobachtet werden. Da in dem Lupinenöl am häufigsten die Omega-6 Fettsäure Linolsäure, gefolgt dann von der Ölsäure vorkam und beide Fettsäuren eine entgegengesetzte Wirkung haben, scheint das Verhältnis der Fettsäuren innerhalb des Öls eine wichtige Rolle zu spielen, um positive Effekte beim Mammakarzinom

hervorzurufen. Bei der Synthese von pflanzlichen Metaboliten spielen unter anderem abiotische und biotische Bedingungen eine wichtige Rolle. Des Weiteren können Inhaltsstoffe von verschiedenen Arten der Gattung *Lupinus* in anderen Konzentrationen synthetisiert werden, was zum Beispiel die Analyse der Fettsäuren der Samen der weißen Lupine (*Lupinus albus*) bestätigt. Hier betrug der Anteil an Ölsäure (18:1) zwischen 50-60% und an alpha Linolensäure von 8-9% [14].

### **4.2.3 Wirkung des Samen, Blatt, Spross und Wurzelextraktes (19.07.2010) von *Lupinus angustifolius* auf die Zellproliferation und Zytotoxizität von MCF-7 und BT20**

Die im Jahr 2010 durch Mitarbeiter des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik in Rostock angebauten und geernteten Pflanzen der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*) sollten Aufschluss darüber geben, welches Pflanzenorgan eine potenzielle antikanzerogene Wirkung an den beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und BT20 besitzt. Der Samenextrakt hatte bei den MCF-7 Zellen keine Wirkung auf die Zellproliferation und zeigte eine geringe Letalität der Zellen von maximal 6% (Abb.12). Auch der Blattextrakt besaß keine starke Wirkung auf das Wachstumsverhalten dieser Zellen und keine Zytotoxizität. Dagegen bewirkte der Sprossextrakt eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation der MCF-7 Zellen um maximal 42% und eine Zytotoxizität bis maximal 27%. Die stärkste konzentrationsabhängige Wirkung auf die Zellproliferation (max. 89%) und Zytotoxizität (max. 38%) konnte bei den MCF-7 Zellen nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt beobachtet werden.

Bei den BT20 Zellen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, Samen und Blattextrakt hatten keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zellproliferation und Zytotoxizität. Am stärksten waren die BT20 Zellen konzentrationsabhängig durch den Wurzelextrakt (max. 95%) in der Proliferation gehemmt aber auch der Sprossextrakt konnte die Zellproliferation um maximal 26% senken.

Eine Anzahl von Angiospermen speichern neben Stärke, Proteinen auch Fette bzw. Öle in ihrem Samen, wo sie teilweise den Hauptspeicherstoff bilden [110]. Die Samen der blauen Süßlupine enthalten ca. 40% Proteine. Im Vergleich zum Samenextrakt hatte auch das Proteinisolat kaum einen Einfluss auf das Zellwachstum der beiden Mammakarzinomzelllinien. Ebenso zeigte das aus den Lupinensamen gewonnene Öl nur eine geringe Wirkung auf die Zellproliferation beider Tumorzelllinien. Durch eine

LC/MS/MS (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*) Analyse eines Blattextraktes von *L. angustifolius* konnten verschiedene Flavonoidkonjugate des Quercetins, Luteolins und Genisteins nachgewiesen werden [62]. Aufgrund der geringen Wirksamkeit des Samen und Blattextraktes an den beiden Mammakarzinomzelllinien, wurden für weitere *in vitro* Untersuchungen der Spross und die Wurzel der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*) verwendet.

Eine mögliche Ursache für die starke Wirkung des Wurzelextraktes auf das Zellwachstum der MCF-7 Zellen und BT20 Zellen könnte, neben dem Vorkommen von LIPID (Alkane Alkene, Aldehyde, Alkohole, Fettsäuren, n-Alkylester, Wachse und Fette), Isoprenoiden und anderen Polyphenolen (Abb. 7) die Akkumulation von bestimmten Flavonoiden in der Wurzel sein. Da die blaue Süßlupine (*L. angustifolius*) als Leguminose eine Symbiose mit Knöllchenbakterien eingeht, welche molekularen Stickstoff fixieren können, spielen Flavonoide als Signalmoleküle für die Symbiose von Leguminosen und Bakterien eine große Rolle [79]. Flavonoide die eine Spezifität in der Symbiose zwischen Knöllchenbakterien und ihren Wirtspflanzen determinieren sind Naringenin, Genistein und Daidzein, welche dann von der Wurzel in die Rhizosphäre abgegeben werden [79]. Eine Studie über das Vorkommen von Isoflavonkonjugaten in den verschiedenen Pflanzenorganen von *Lupinus exaltatus* Zucc. ergab zum Beispiel, dass die Wurzel die höchste Konzentration an Isoflavonen und ihren Konjugaten besaß und der Spross die niedrigste [44]. Freie Isoflavonaklykone konnten ebenfalls in der Wurzel sowie in der Blüte detektiert werden, jedoch nicht in den Blättern und im Spross [44].

### **4.2.4 Der Einfluss des Wurzelalters auf die Zellproliferation, Vitalität sowie Zytotoxizität der malignen Zellen MCF-7 und BT20 sowie benignen Zellen MCF12A und ad. Fibroblasten**

Pflanzen synthetisieren zur Bewältigung der verschiedenen Umwelteinflüsse eine Vielzahl an natürlichen Pflanzenstoffen, welche an unterschiedlichen Reaktionen beteiligt sind. Phenolische Verbindungen sind zum Beispiel eine Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen, welche in viele pflanzliche Prozesse involviert sind, insbesondere in Reaktionen, welche durch abiotische und biotische Reize ausgelöst werden [10]. Daten aus der Literatur konnten zeigen, dass der Gehalt an Sekundärmetaboliten wie zum Beispiel den Isoflavonen in Lupinenpflanzen abhängig ist vom Entwicklungsstadium der Pflanze [9, 29, 64]. Weitere Studien, welche sich

hauptsächlich mit dem Isoflavongehalt von Lupinenpflanzen beschäftigt haben, zeigten das Isoflavon Malonylderivate nur in dem frühen Stadium der Pflanzenentwicklung (6 W.) vorkamen [10]. Die Wurzeln reiferer Lupinenpflanzen enthielten einen ähnlichen oder größeren Gehalt an Isoflavonen wie die anderen Pflanzenorgane, im Vergleich mit jungen Pflanzen, in welchen sich ein größerer Gehalt an Isoflavonen in der Wurzel nachweisen ließ [9, 10, 44].

Das zum einen die Lupinenpflanzen mit unterschiedlichen Reifegraden (01.07.2010 (9 W.); 19.07.2010 (12 W.)) und unter Freilandbedingungen kultiviert wurden, wo die Pflanzen keinen konstanten Umweltbedingungen ausgesetzt waren, spiegeln auch die *in vitro* Ergebnisse der beiden Wurzelextrakte wieder.

So zeigte sich die stärkste antiproliferative Wirkung bei den beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 (max. 89%) und BT20 (max. 95%) nach 24 h Inkubation mit der 12 Wochen alten Wurzel (Abb. 13). Die geringste proliferationshemmende Wirkung bei den benignen Zellen MCF12A (max. 22%) und ad. Fibroblasten (max. 13%) wurde ebenfalls nach Inkubation mit dem 12 Wochen alten Wurzelextrakt festgestellt (Abb. 14). Dagegen zeigte der Wurzelextrakt (12 W.) bei den MCF12A Zellen eine Zytotoxizität von 70% und eine Verringerung vitaler Zellen um 97% (Abb. 14). Auffällig war das Ergebnis des MTT-Vitalitätstests, denn hier wurde im Gegensatz zum Ergebnis des BrdU-Proliferationstests, welcher eine Proliferationshemmung zeigte, nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (9 Wochen) eine konzentrationsabhängige Zunahme der Zellvitalität sowohl bei den MCF-7 (max. +139%) und BT20 (max. +34%) Zellen festgestellt (Abb. 13). Der Wurzelextrakt (12 Wochen) bewirkte ebenfalls eine erhöhte Zellvitalität bei den MCF-7 (max. +92%) Zellen und eine konzentrationsabhängige Abnahme bei den BT20 (max. 21%) Zellen (Abb. 13). Die Messung der mitochondrialen Aktivität erfolgte mithilfe des Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), welches über die Succinatdehydrogenase zu blauvioletten Formazankristallen reduziert wird [142]. Theoretisch korreliert die Anzahl vitaler Zellen mit der Farbintensität des Formazans [142]. Jedoch können einige chemische Verbindungen und sekundäre Pflanzenstoffe die Aktivität der Succinatdehydrogenase beeinflussen oder direkt mit dem Tetrazoliumsalz MTT interagieren [31, 54, 142]. Die Interaktion mit dem Tetrazoliumsalz MTT durch die Sekundärmetabolite der getesteten Extrakte kann ausgeschlossen werden, da Substanzkontrollen durchgeführt wurden, welche keine Aktivität zeigten.

### 4.2.5 Wirkung von Wurzel- und Sprossextrakt (05.08.2011) auf verschiedene *in vitro* Parameter

Das Ziel der Krebschemotherapie ist es aufgrund der Nebenwirkungen vieler Chemotherapeutika, Substanzen zu finden, welche eine starke Tumorzellzytotoxizität erreichen können und dabei nicht unnötig zytotoxisch auf normale Zellen wirken. Die meisten Substanzen mit antikanzerogener Wirkung, die in den letzten Jahrzehnten identifiziert wurden, waren pflanzlichen Ursprungs [144]. So bestätigte das Ergebnis der Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie des Wurzel- und Sprossextraktes, dass Vorkommen von Substanzklassen mit möglichen potenziellen antikanzerogenen Substanzen. Wurzel und Spross waren die Pflanzenorgane, welche eine antitumorale Wirkung sowohl an den hormonrezeptorpositiven MCF-7 Zellen als auch an den triple negativen BT20 Zellen erzielten. Wurzel- und Sprossextrakt hemmten die Zellproliferation der beiden Tumorzelllinien konzentrationsabhängig, wobei hier im Vergleich mit den MCF-7 Zellen (LW: max. 71%; LS: max. 65%), die triple negativen BT20 Zellen am stärksten durch den Wurzelextrakt (max. 99%) und auch stärker durch den Sprossextrakt (max. 86%) gehemmt wurden (Abb.15). Die Zellproliferation der benignen MCF12A Zellen wurde durch den Sprossextrakt weniger beeinträchtigt wie durch den Wurzelextrakt, was auch durch den Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte der Größe nach deutlich wurde (LS: MCF-7 ( $18,06 \pm 4,49$ ) < BT20 ( $70,27 \pm 0,76$ ) < ad. Fib. ( $146,41 \pm 64,84$ ; LW: MCF-7 ( $52,30 \pm 9,39$ ) < MCF12A ( $57,38 \pm 23,27$ ) < BT20 ( $66,86 \pm 7,02$ )) (Tab. 9). Die ad. Fibroblasten wurden durch den Sprossextrakt maximal um 53% und durch den Wurzelextrakt um 47% in der Zellproliferation gehemmt. Die Proliferation der MCF-7 Zellen nach einer Inkubationszeit von 48 h und 72 h mit beiden Extrakten wurde ebenfalls untersucht. Hier zeigte sich insbesondere beim Wurzelextrakt, dass nach den längeren Inkubationszeiträumen eine signifikant stärkere Hemmung der Zellproliferation auftrat (200  $\mu$ g/ml: 48 h (89%) und 72 h (98%); 100  $\mu$ g/ml: 72 h (96%) und 50  $\mu$ g/ml: 48 h (70%) und 72 h (65%)) (Abb.17). Das Ergebnis des Wurzelextraktes spiegelt sich auch im Vergleich der  $IC_{50}$  Werte wieder ( $24$  h:  $52,30 \pm 9,39$ ;  $48$  h:  $34,44 \pm 6,24$ ;  $72$  h:  $48,68 \pm 4,01$ ). Hier verringerte sich die eingesetzte Extraktkonzentration nach 48 h und 72 h signifikant, um 50% der Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen. Nach einer Inkubationszeit von 72 h mit dem Sprossextrakt konnte eine signifikant stärkere Proliferationshemmung bei den MCF-7 Zellen (200  $\mu$ g/ml, 88%) beobachtet werden.

Tamoxifen, welches als Positivkontrolle im BrdU-Test verwendet wurde, ist eines der

am häufigsten verwendeten Medikamente bei der Behandlung von Brustkrebs [159]. Bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l (37,15 µg/ml) hemmte es die Zellproliferation von MCF-7 (max. 99%) Zellen und BT20 (max. 95%) Zellen stark. Im Vergleich mit dem Sprossextrakt, jedoch auch die Zellproliferation der benignen Zellen MCF12A (max. 62%) und ad. Fibroblasten (max. 93%). Tamoxifen wird zur Behandlung von Patienten mit hormonrezeptorpositivem Brustkrebs verwendet [159]. Der inhibitorische Effekt von Tamoxifen auf rezeptorpositive und rezeptornegative Mammakarzinomzelllinien wird durch zahlreiche Ergebnisse unterstützt, welche belegen, dass der größte Teil der wachstumshemmenden Wirkung von Tamoxifen nicht ER-abhängig ist [135, 169]. Auch 17-β Estradiol wurde mit einer Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l als Positivkontrolle im BrdU-Test eingesetzt. 17-β Estradiol kann abhängig von der Konzentration stimulierend auf die Zellproliferation hormonrezeptorpositiver Mammakarzinomzellen wirken [43]. Dieser Effekt konnte weder im BrdU-Test noch im MTT-Test bei der verwendeten 17-β Estradiol Konzentration von  $10^{-9}$  mol/l an den MCF-7 Zellen beobachtet werden.

Bei der Zytotoxizitätsmessung zeigte der Wurzelextrakt im Vergleich zur Proliferationsmessung eine stärkere Letalität der Zellen als der Sprossextrakt (MCF-7 max. 27%, BT20 max. 18%, MCF12A max. 14% und ad. Fibroblasten max. 26%) sowohl bei den Tumorzellen MCF-7 (max. 47%) und BT20 (max. 44%) als auch bei den benignen Zellen MCF12A (max. 54%) und ad. Fibroblasten (max. 51%) (Abb. 15/16). Eine geringe signifikante zytotoxische Wirkung hatte auch die Positivkontrolle 17-β Estradiol auf die MCF-7 Zellen (6%) und die MCF12A Zellen (36%). Dass 17-β Estradiol konzentrationsabhängig zytotoxische Effekte haben kann, wurde auch in der Literatur beschrieben [121]. Aufrund der zytotoxischen Wirkung von 17-β Estradiol mit der Konzentration  $10^{-9}$  mol/l konnte keine wachstumsstimulierende Wirkung an den MCF-7 Zellen beobachtet werden. Die Positivkontrolle Tamoxifen bewirkte nicht nur bei den malignen Zellen MCF-7 (max. 92%) und BT20 (max. 100%) eine starke Letalität, sondern wirkte im Gegensatz zu den beiden Extraktten auch stark zytotoxisch auf die benignen Zellen MCF12A (max. 100%) und ad. Fibroblasten (max. 91%).

Ob bei der gemessenen Zytotoxizität nach Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt Apoptose oder Nekroptose induziert wurde, kann durch den LDH Test nicht unterschieden werden. Der LDH Test basiert auf der Messung des Enzyms Laktatdehydrogenase, welches durch beschädigte Zellen abgegeben wird [112]. Das

Enzym Laktatdehydrogenase ist ein lösliches zytosolisches Enzym, dass von apoptotischen oder nekrotischen Zellen in das Kulturmedium abgegeben werden kann [21]. Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zelltod zu unterscheiden, wurden typische morphologische Veränderungen der Zellen über die Lichtmikroskopie erfasst, die qualitative Bestimmung der beiden Zelltodformen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt und eine quantitative Analyse von Apoptose und Nekrose mit dem *Cell Death Detection ELISA* durchgeführt. Bei allen drei Testmethoden konnten nach einer 24 h Inkubation der MCF-7 und BT20 Zellen keine apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Die Zellen zeigten typische nekrotische Merkmale in der Lichtmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie.

Nekroptose verläuft als getrennter Signalweg von Apoptose, somit könnten all die Barrieren, welche Tumorzellen zur Vermeidung von Apoptose entwickelt haben durch Induktion von Nekroptose überwunden werden [42]. Bei apoptose resistenten Tumoren w.z.B. dem Glioblastom (*Glioblastoma multiforme*) konnte durch Regulierung der Nekroptose die Apoptoseresistenz umgangen werden [59]. Somit besitzt Tumorzellnekrose verursacht durch verschiedene Therapien einen potenziellen therapeutischen Wert. Die Zytotoxizitätsmessung der MCF-7 Zellen nach 48 h und 72 h Inkubation mit beiden Lupinenextrakten ergab eine deutlich stärkere signifikante Letalität der Zellen als nach einer Inkubationszeit von 24 h. Ob während dieser Zeit die Zellen ebenfalls durch Nekroptose starben oder eventuell durch späte Apoptose, und wie sich benigne Zellen nach einer längeren Inkubationszeit verhalten, sollte weiter untersucht werden.

Das Ergebnis des MTT-Vitalitätstests zeigte bei den malignen MCF-7 und BT20 Zellen im Gegensatz zur starken Proliferationshemmung bei der Konzentration 200 µg/ml und vorhandener Zytotoxizität des Sprossextraktes eine erhöhte Zellvitalität (MCF-7 (LS: (148%) 200 µg/ml); BT20 (LS: (126%) 200 µg/ml)). Ein ähnliches Ergebnis konnte bereits nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt 9 Wochen sowie 12 Wochen beobachtet werden. Das im MTT-Test verwendete Tetrazoliumsalz (MTT) kann nur von lebenden Zellen aufgenommen werden und wird dort in den Mitochondrien durch die Succinatdehydrogenase zu blauvioletten Formazankristallen reduziert. Die Menge der gemessenen Formazankristalle korreliert somit mit dem Proliferationsverhalten der Zelle. Tumorzellen können für ihre hauptsächliche Energiegewinnung über die aerobe Glykolyse/Warburg Effekt Glukose zu Laktat auch in Anwesenheit von Sauerstoff vergären [165]. Warburg beschrieb 1924 erstmals den

Warburg Effekt als einen metabolischen Weg, den die Tumorzelle nutzt um einerseits ihren hohen Energiebedarf, ihre hohen Wachstumsraten und anabole Prozesse wie die Lipidsynthese und Nukleotidsynthese aufrechtzuhalten und andererseits durch eine verringerte Produktion an ROS (*reactive oxygen species*) in den Mitochondrien einen Wachstumsvorteil zu erlangen [60, 129]. Dabei ging Warburg von irreversiblen Schäden in der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) aus und erklärte so die Nutzung der aeroben Glykolyse von Tumorzellen zur Energiegewinnung [5]. Als biochemische Basis des Warburg Effektes entdeckte Dr. Johannes Coy im Jahre 2006 das *transketolase-like 1* Gen [89]. Die *transketolase-like 1* (TKTL1) gilt als Biomarker für metabolische Veränderungen in Tumoren und korreliert beim Mammakarzinom signifikant mit einer HER2 Überexpression [41]. Des Weiteren korreliert die TKTL1 Expression auf mRNA und Proteinniveau mit einer schlechten Prognose für den Patienten sowie Metastasierung in vielen Tumoren [73, 157, 166]. Beide in dieser Arbeit verwendeten Mammakarzinomzelllinien entsprechen dem histologischen Tumortyp des invasiven duktalen Mammakarzinoms und zeigten die Expression der *transketolase-like 1* (TKTL1) [18, 90]. Die Expression von TKTL1 war bei der MCF-7 Zelllinie, welche ebenfalls HER2 positiv war, wesentlich stärker als bei den BT20 Zellen (Abb. 8). Somit eignet sich der Glukosemetabolismus in vielen Tumoren, welche eine starke TKTL1 Expression zeigen sowie Metastasierung als therapeutisches Ziel.

In Bezug auf die erhöhte Zellvitalität der Tumorzellen nach 24 h Inkubation mit dem Sprossextrakt zeigten die Ergebnisse der quantitativen Glukoseaufnahme (%) und Laktatproduktion (%) eine geringere Glukoseaufnahme (MCF-7: LW: 19,4%; LS: 15,9 %; BT20: LW: 69,5%; LS: 69,5%) und Laktatproduktion (MCF-7: LW: 17,1%; LS: 11,4 %; BT20: LW: 3,4%; LS: 20,7%) insbesonders bei der Konzentration 200 µg/ml. Bei den benignen ad. Fibroblasten konnte ebenfalls eine erhöhte Zellvitalität nach 24 h Inkubation mit dem Wurzelextrakt (01.07.2010 und 05.08.2011) trotz vorhandener Zytotoxizität und verringter Proliferation nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den beiden Mammakarzinomzelllinien wurde bei den ad. Fibroblasten eine erhöhte Glukoseaufnahme (%) beobachtet. Es ist nicht auszuschließen, dass die Glykolyse der Tumorzellen durch sekundäre Pflanzenstoffe der Extrakte beeinflusst wurde, was eine verringerte Proliferation der Tumorzellen zur Folge haben kann.

Studien konnten belegen, dass zum Beispiel sekundäre Pflanzenstoffe wie die Flavonoide Silybin/Silibinin, welche als potenzielle GLUT Inhibitoren fungieren die Glykolyse in Tumorzellen hemmen können [164]. Das Flavanon Naringenin war

ebenfalls in der Lage die Proliferation von MCF-7 Zellen durch eine Hemmung der Glukoseaufnahme zu verringern [51].

Warburg nahm irreversible Schäden in der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) von Tumorzellen an. Aktuelle Studien belegen jedoch, dass in Tumorzellen beide Stoffwechselwege aktiv sind, Glykolyse und oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) und die meisten Tumorzellen keine Defekte in den Mitochondrien aufweisen [75]. Andere Arbeiten konnten belegen, dass zum Beispiel beim Neuroblastom alle Komponenten der Atmungskette herunterreguliert sind, ohne Beeinträchtigung der Mitochondrienanzahl [38]. HeLa-Zellen passten zum Beispiel ihre Energiegewinnung an das Substratangebot an, indem sie ihre Mitochondrien an die jeweiligen Bedingungen anpassten und somit Glykolyse als auch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) betreiben können [113].

Damit bei einer eingeschränkten Glukoseaufnahme die Zellviabilität aufrechterhalten werden kann, benötigen Tumorzellen ausreichend Substrate für die oxidative Phosphorylierung, welche über die Oxidation von Fettsäuren oder durch die Glutaminolyse gewährleistet werden kann [19]. So konnte an Prostatatumorzellen gezeigt werden, bei welchen die Glykolyse durch 2-Deoxyglucose (2-DG) gehemmt wurde, dass die Zellen vermehrt Glutamin verstoffwechselten [83]. Die in dieser Arbeit erhöhte gemessene Zellvitalität der Tumorzellen könnte die Folge einer verringerten Glykolyse sein, welche die Zelle dazu veranlasst über die Glutaminolyse, die Oxidation von Fettsäuren und der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) ihren Energiebedarf zu decken. Nach einer Inkubationszeit von 48 h und 72 h mit beiden Extrakten, konnte an beiden Tumorzelllinien eine signifikante Abnahme der Zellvitalität beobachtet werden. Weitere Untersuchungen sind jedoch erforderlich um die Ergebnisse zu bestätigen, dass Substanzen der Lupinenwurzel und des Sprosses einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel von Mammakarzinomzellen haben.

Die Metastasierung ist die Haupttodesursache bei Patienten mit Brustkrebs [72]. Sie ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, in welchem die Zelladhäsion, Invasion und Migration involviert sind [24]. Der PI3K/AKT Signaltransduktionsweg ist involviert in Überleben, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen, ebenso beim Mammakarzinom [24, 58]. Chen et al. konnten zeigen, dass phenolische Verbindungen aus der Grapefruit, wie Quercetin, Kaempferol, Catechin, Epicatechin und Resveratrol die Migration von 4T1 Brustkrebszellen hemmten, über die Blockierung des PI3K/AKT und MAPK Signaltransduktionsweges [24]. Das Flavonoid

Nobiletin bewirkte ebenfalls eine antimetastasierende Wirkung auf Brustkrebszellen über die Hemmung der Expression von CXCR4 (*chemokine receptor type 4*) und MMP-9 (*matrix metallopeptidase 9*) [6].

In der vorliegenden Arbeit wurden inhibitorische Effekte des Wurzel- und Sprossextraktes auf die Zellinvasion sowie Migration der malignen MCF-7 und BT20 Zellen, mithilfe des *CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion Assay (8 µm, Colorimetric Format)* untersucht. Im Vergleich der beiden Extrakte untereinander hatte der Wurzelextrakt, bis auf die Hemmung der Zellinvasion der MCF-7 Zellen (max. 44,4%, 100 µg/ml) nur einen geringen Einfluss auf Invasion und Migration der Mammakarzinomzellen (BT20 Invasion: max. 14,4%; Migration: max. 15%). Dagegen verringerte sich nach 24 h Inkubation mit dem Sprossextrakt die Invasion der MCF-7 Zellen um maximal 35,9% bei der Konzentration 200 µg/ml und die Zellmigration um 23,6%. Bei den BT20 Zellen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis nach 24 h Inkubation mit dem Sprossextrakt. Hier war die Invasion sowie Migration der BT20 Zellen um maximal 30,5% bei der Konzentration 200 µg/ml vermindert. Der Sprossextrakt bewirkte nach 24 h Inkubation bei der Konzentration 200 µg/ml (MCF-7: 20%; BT20: 18%) eine niedrigere Zytotoxizität als die Invasion/Migrationshemmung bei gleicher Konzentration. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die gemessene Invasion/Migrationshemmung des Sprossextraktes nicht als Folge der zytotoxischen Wirkung des Extraktes zu betrachten ist. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig um diese Aussage zu bestätigen.

Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht des Redoxstatus im Körper [92]. Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sind freie Radikale, welche in verschiedenen Stoffwechselwegen, einschließlich der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien entstehen [92]. Oxidativer Stress ist involviert bei der Entstehung vieler Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Diabetes, Arteriosklerose, Arthritis und verschiedenen Krebserkrankungen einschließlich Brustkrebs [1, 69, 92]. Antioxidantien spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes von Redoxreaktionen im Körper [92]. Wichtige Antioxidantien sind antioxidative Enzyme wie die Katalase (CAT), die Glutathionperoxidase (GPX), die Superoxiddismutase (SOD) sowie nicht enzymatische Antioxidantien wie Vitamin E, Vitamin C, Vitamin A, Flavonoide, Albumin, Glutathion, Harnsäure, Metabolite von Polyphenolen sowie Ferritin, Transferrin und Ceruloplasmin [1, 92, 94, 124]. Tumorzellen haben eine stärkere ROS

(*reactive oxygen species*) Bildung, einschließlich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie eine verminderte Anzahl an antioxidativen Enzymen wie zum Beispiel der Katalase (CAT) [49]. Die Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration nach 24 h Inkubation mit dem Wurzel- und Sprossextrakt erfolgte über die Verwendung des *Hydrogen Peroxide Assay Kit* (BioVision). Eine deutliche Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (max. 0,30 nmol) im Vergleich mit der Negativkontrolle (0,42 nmol) konnte nur bei den hormonrezeptorpositiven MCF-7 Zellen nach Inkubation mit dem Wurzelextrakt beobachtet werden (Abb. 25). Wie bereits beschrieben, geht die blaue Süßlupine (*L. angustifolius*) als Leguminose eine Symbiose mit Knölchenbakterien ein, bei welcher Flavonoide wie Naringenin, Genistein und Daidzein als Signalmoleküle für die Leguminosen und Bakterien eine Rolle spielen [79]. So konnten Borrás et al. zeigen, dass Genistein eine antioxidative Wirkung auf MCF-7 Zellen besaß, welche durch die Bindung an den Estrogenrezeptor, was zu einer schnellen Aktivierung des ERK1/2 (*extracellular-signal-regulated kinase 1/2*) und NF<sub>κ</sub>B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) Signalweges und einer verzögerten Hochregulierung der MnSOD (*manganese superoxide dismutase*) Genexpression führte, hervorgerufen wurde [13].

Auf der anderen Seite ist aus der Literatur bekannt, dass Antioxidantien die Apoptose abschwächen oder sogar hemmen können [7, 30]. Diese Tatsache ist von Bedeutung bei Tumoren, die eine Strahlen und Chemoresistenz aufweisen, da ionisierende Strahlen (und auch eine Reihe in der Behandlung maligner Tumoren eingesetzter Pharmaka) über die Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) DNA-Schäden und Apoptose induzieren [117]. Auch Watson stellte fest, dass bei einer Krebserkrankung im Endstadium die reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) für die Apoptose benötigt werden und diese durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln, welche reich an Antioxidantien sind, dass Fortschreiten der Krebserkrankung fördern könnten [143].

## 5 Zusammenfassung

Eine wichtige Rolle bei der Erforschung und Entwicklung von Anti-Krebs-Wirkstoffen spielt die Identifizierung von Arzneipflanzen und die von ihnen abgeleiteten Naturstoffe.

In der vorliegenden Arbeit wurde die blaue Süßlupine (*L. angustifolius*) auf ihre gesundheitsfördernden Eigenschaften am Mammakarzinom *in vitro* untersucht. Die Testung erfolgte an zwei verschiedenen Mammakarzinomzelllinien, welche sich anhand der Expression der Hormonrezeptoren und des HER2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) unterschieden sowie an benignen Zellen. Aus den Samen, Blättern, Sprossen und Wurzeln wurden über die Mikrowellenextraktion ethanolische Extrakte hergestellt. Diese wurden als Vielstoffgemisch, ebenso wie das Lupinenöl und Proteinisolat auf ihre proliferationshemmende, zytotoxische und vitalitätshemmende Wirkung an den Mammakarzinomzellen sowie benignen Zellen untersucht. Wurzel und Spross waren die Pflanzenorgane, bei welchen eine konzentrationsabhängige antitumorale Wirkung an beiden Mammakarzinomzelllinien beobachtet werden konnte. Samen- und Blattextrakt sowie das Lupinenöl und Proteinisolat zeigten entweder keine oder nur einen geringen Einfluss auf die Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität der Mammakarzinomzelllinien.

Der Wurzel- und Sprossextrakt wurde mithilfe der Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie auf die prozentuale Verteilung der im Extrakt vorkommenden Substanzklassen untersucht. Die Analyse zeigte das Vorkommen von Substanzklassen, welche Substanzen mit antikanzerogenen Potenzial enthalten können. Im Vergleich mit dem Wurzelextrakt konnte für den Sprossextrakt der niedrigste IC<sub>50</sub>-Wert (18,06 µg/ml ± 4,49) bei der Hemmung der Proliferation für die MCF-7 Zellen berechnet werden. Der Sprossextrakt zeigte im Vergleich mit dem Wurzelextrakt eine geringere proliferationshemmende und zytotoxische Wirkung an den benignen Zellen. Die Letalität der Mammakarzinomzellen war nach 24 h Inkubation sowie bei dem Wurzel- als auch Sprossextrakt durch Nekroptose hervorgerufen worden.

In den letzten Jahren gewann der „Warburg Effekt“, bei welchem die Glukoseaufnahme und Laktatproduktion der Tumorzelle eine zentrale Rolle spielt als therapeutisches Ziel immer mehr an Bedeutung. Auf die Glukoseaufnahme der Tumorzellen hatten beide Extrakte Einfluss, wobei hier die rezeptornegativen BT20 Zellen sowohl durch den Wurzel- als auch Sprossextrakt stärker beeinflusst waren. Des Weiteren konnte eine Verringerung der Laktatproduktion durch beide Extrakte an

den Tumorzellen beobachtet werden sowie eine erhöhte Vitalität nach 24 h Inkubation. Im Vergleich mit dem Wurzelextrakt bewirkte der Sprossextrakt eine geringere Migration/Invasion beider Tumorzelllinien. Eine Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration konnte nur bei den MCF-7 Zellen nach Inkubation mit dem Wurzelextrakt beobachtet werden. Nach einer längeren Inkubationszeit von 48 h und 72 h der MCF-7 Zellen mit beiden Extrakten wurde eine signifikant stärkere Hemmung der Proliferation, Vitalität und Zytotoxizität beobachtet.

Das Alter des geernteten Pflanzenorgans spielte ebenfalls eine Rolle bei der Wirksamkeit der daraus gewonnenen Extrakte. So konnte am Beispiel der Wurzelextrakte gezeigt werden, dass der Extrakt der älteren Wurzel eine stärkere konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation und Zytotoxizität bewirkte.

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen für die Eignung von Wurzel und Spross der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*) für weitere Forschungsarbeiten mit Aussicht die blaue Süßlupine zur Prävention und medizinischen Behandlung des Mammakarzinoms einzusetzen.

### 6 Ausblick

Dieses Kapitel soll einen Überblick für weiterführende Arbeiten mit der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*) am Mammakarzinom geben.

Um einen besseren Einblick in die antitumorale wirksamen Substanzen zu erhalten, sind Inhaltsstoffanalysen nötig, zum Beispiel durch LC/MS/MS (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*) Analysen. Des Weiteren wären Untersuchungen wichtig, ob die antikanzerogene Wirkung des Wurzel- und Sprossextraktes durch den Extrakt als Vielstoffgemisch oder durch eine einzelne Substanz hervorgerufen wird.

Werden die Pflanzen im Freiland kultiviert, sind diese unterschiedlichen biotischen und abiotischen Umweltfaktoren ausgesetzt, welche die Synthese der Sekundärmetabolite beeinflussen und somit auch die Wirksamkeit der aus der Pflanze gewonnenen Extrakte in Form eines Vielstoffgemisches verändern können. Um die Anzucht- und Kulturbedingungen konstant zu halten oder auch die Biosynthese bestimmter Sekundärmetabolite zu optimieren, sollte der Anbau der Pflanzen in Gewächshäusern erfolgen.

Es ist bekannt, dass das Wechselspiel der Tumorzellen mit den Zellen der Tumormikroumgebung, wie Bindegewebszellen, Immunzellen und Blutgefäßzellen mit verantwortlich für das Verhalten von Tumoren ist. So wird beispielsweise vermutet das Tumorzellen mit den umliegenden Bindegewebszellen durch Zytokine, Prostaglandine und Estradiol kommunizieren [136]. In 3 D Kokultur (Sphäroid) Zellmodellen ließe sich der Einfluss von Sekundärmetaboliten der blauen Süßlupine (*L. angustifolius*) auf die Tumormikroumgebung untersuchen.

Neben der weiteren Aufklärung der Wirkmechanismen, der optimalen Dosisfindung sowie Untersuchungen zur Toxizität wie zum Beispiel zur Hepatotoxizität, Nephrotoxizität und Kardiotoxizität sind auch Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Metabolisierung der sekundären Pflanzenstoffe wichtig, da diese sich zum Teil stark in diesen Eigenschaften unterscheiden können. Diese Untersuchungen könnten *in vivo* im Tiermodell über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aldini G, Yeum KJ et al. (2010). Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles And Practical Applications. *John Wiley and Sons.*, p363.
2. ATCC. (2012). [www.ATCC.com](http://www.ATCC.com). Abgerufen am 17. Juni 2013 von file:///E:/MCF7%20ATCC%20%C2%AE%20HTB-22%20E2%84%A2%20Homo%20sapiens%20mammary%20gland\_breast%3b%20deriv.htm#357C3571006A4259B64650D34DF19048
3. ATCC. (2012). [www.ATCC.com](http://www.ATCC.com). Abgerufen am 21. Juni 2013 von file:///E:/MCF-12A%20ATCC%20%C2%AE%20CRL-10782%20E2%84%A2%20Homo%20sapiens%20mammary%20gland%3b%20breas.htm
4. ATCC. (2012). [www.ATCC.com](http://www.ATCC.com). Abgerufen am 17. Juni 2013 von file:///E:/BT-20%20ATCC%20%C2%AE%20HTB-19%20E2%84%A2%20Homo%20sapiens%20mammary%20gland\_breast%20carc.htm#85786B46AA23451B94BC5D45200673F7
5. Ayyasamy V, Owens KM et al. (2011). Cellular Model of Warburg Effect Identifies Tumor Promoting Function of UCP2 in Breast Cancer and Its Suppression by Genipin. *PLoS one.*, 6(9):e24792.
6. Baek SH, Kim SM et al. (2012). Antimetastatic effect of nobiletin through the down-regulation of CXC chemokine receptor type 4 and matrix metallopeptidase-9. *Pharm Biol.*, 50(10):1210-8.
7. Bauer MK, Vogt M et al. (1998). Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J Biol Chem.*, 273(14):8048-55.
8. Beckmann MW, Niederacher D et al. (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med.*, 75(6):429-39.
9. Bednarek P, Franski R et al. (2001). Profiling changes in metabolism of isoflavonoids and their conjugates in *Lupinus albus* treated with biotic elicitor. *Phytochemistry.*, 56(1):77-85.
10. Bednarek P, Kerhoas L et al. (2003). Profiling of flavonoid conjugates in *Lupinus albus* and *Lupinus angustifolius* responding to biotic and abiotic stimuli. *J Chem Ecol.*, 29(5):1127-42.
11. BioVision. (22. November 2014). <http://www.biovision.com>. von <http://www.biovision.com/manuals/K265-200.pdf> abgerufen
12. Blaszczyk B, Stobiecki M et al. (1994). Immunotropic activity of lupin seeds extracts and fractions from *lupinus angustifolius* and *Lupinus albus*. *Arch Immunol Ther Exp.*, 42(2):147-53.
13. Borra's C, Gambini J et al. (2006). Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFKB. *FASEB J.*, 20(12):2136-8.
14. Boschin G, D'Agostina A et al. (2008). Effect of genotype and environment on fatty acid composition of *Lupinus albus* L. seed. *Food Chemistry.*, doi:10.1016/j.foodchem.2007.11.016.

15. Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfleiderer A. (2011). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart: Thieme.
16. Buchholz TA, Weil MM et al. (1999). Tumor suppressor genes and breast cancer. *Radiat Oncol Investig.*, 7(2):55-65.
17. Buddrus J. (2011). *Grundlagen der Organischen Chemie*. Berlin: de Gruyter.
18. Burdall SE, Hanby AM et al. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res.*, 5(2):89-95.
19. Buzzai M, Bauer DE et al. (2005). The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fattyacid b-oxidation. *Oncogene*., 24(26):4165–73.
20. Carrillo C, del M Cavia M, Alonso-Torre SR. (2012). Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review. *Nutr Hosp.*, 27(5):1860-1865.
21. Cayman Chemical. (05. Februar 2014). <https://www.caymanchem.com>. Abgerufen am 14. 02 2014 von <https://www.caymanchem.com/pdfs/10008882.pdf>
22. Chaabane W, User SD et al. (2013). Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer . *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 61(1):43–58.
23. Chen JX. (2008). Rapid Microwave-Assisted Hydrolysis for Determination of Ginkgo Flavonol Glycosides in Extracts of Ginkgo biloba Leaves. *Journal of Chromatographic Science*., (46(2):117-21).
24. Chen QY, Liang ZY et al. (2011). Grape Skin Polyphenols (GSPs) Inhibit the Migration of Mouse Mammary Carcinoma 4T1 Cells in Vitro. *Clin Oncol Cancer Res.*, 8:33-37.
25. Christofferson DE, Yuan J. (2010). Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol.*, 22(2):263–8.
26. Cirauqui BC, Garcia VQet al. (2014). Nanoparticle albumin-bound paclitaxel in a patient with locally advanced breast cancer and taxane-induced skin toxicity: a case report. *J Med Case Rep.*, doi: 10.1186/1752-1947-8-6.
27. Clem B, Telang S et al. (2008). Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol.Cancer Ther.*, 7(1):110–20.
28. Czichos J. (2014). Abgerufen am 21. März 2014 von <https://www.helmholtz.de>: [https://www.helmholtz.de/forschung/gesundheit/aktuelle\\_einblicke/archiv\\_der\\_einblicke/krebsstammzellen\\_im\\_visier](https://www.helmholtz.de/forschung/gesundheit/aktuelle_einblicke/archiv_der_einblicke/krebsstammzellen_im_visier)
29. Dágostina A, Boschin G et al. (2008). Changes of Isoflavones during the Growth Cycle of Lupinus albus. *J. Agric. Food Chem.*, 56(12):4450-6.
30. Delneste Y, Jeannine P et al. (1996). Thiols prevent Fas (CD95)-mediated T cell apoptosis by down-regulating membrane Fas expression. *Eur J Immunol.*, 26(12):2981-8.
31. Devika PT, Stanely Mainzen Prince P. (2008). (-)Epigallocatechin-gallate (EGCG) prevents mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiac toxicity in albino Wistar rats: a transmission electron microscopic and in vitro study. *Pharmacol Res.*, 57(5):351–7.
32. Devy L, Dransfield DT. (2011). New Strategies for the Next Generation of

- Matrix-Metalloproteinase Inhibitors: Selectively Targeting Membrane-Anchored MMPs with Therapeutic Antibodies. *Biochemistry Research International*, doi:10.1155/2011/191670.
33. dkfz. (19. Dezember 2012). <http://www.krebsinformationsdienst.de>. Abgerufen am 16. März 2014 von <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs-mann/>
34. Dunai ZA, Imre G et al. (2012). Staurosporine Induces Necroptotic Cell Death under Caspase-Compromised Conditions in U937 Cells. *PLoS one.*, 7(7):e41945.
35. Eckhardt S. (2002). Recent progress in development of anticancer agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents.*, 2(3):419-39.
36. Evans LM, Toline EC et al. (2009). Dietary Stearate Reduces Human Breast Cancer Metastasis Burden in Athymic Nude Mice. *Clin Exp Metastasis.*, 26(5):415–424.
37. Fechner A, Fenske K, Jahreis G. (2013). Effects of legume kernel fibres and citrus fibre on putative risk factors for colorectal cancer: a randomised, double-blind, crossover human intervention trial. *Nutrition Journal.*, 12:101.
38. Feichtinger RG, Neureiter D et al. (2011). Loss of mitochondria in ganglioneuromas. *Front Biosci (Elite Ed).*, 3:179-86.
39. Fischer U, Baum F. (2014). *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms*. Stuttgart: Thieme.
40. Foa R, Norton L. et al. (1994). Taxol (paclitaxel): a novel anti-microtubule agent with remarkable anti-neoplastic activity. *International Journal of Clinical and Laboratory Research.*, 24(1):6-14.
41. Földi M, Stickeler E et al. (2007). Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncology Reports.*, 17(4):841-5.
42. Fu Z, Deng B et al. (2013). The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis. *BMC Cancer.*, 13:580.
43. Furuya Y, Kohno N et al. (1989). Mechanisms of Estrogen Action on the Proliferation of MCF-7 Human Breast Cancer Cells in an Improved Culture Medium. *Cancer Res.*, 49(23):6670-4.
44. Garcia-López PM, Kachlicki P et al. (2006). Profiling isoflavone conjugates in different organs of *Lupinus exaltatus* Zucc. *Phytochem Anal.*, 17(3):184-91.
45. Geley S, Hengst L. (2010). Zellzyklus. *Die Onkologie*, doi 10.1007/978-3-540-79725-8\_7.
46. Gey, M. (2008). *Instrumentelle Bioanalytic* (2. Auflage Ausg.). Deutschland: Springer.
47. Giampietri C, Starace. D et al. (2014). Necroptosis: Molecular Signalling and Translational Implications. *International Journal of Cell Biology.*, 2014:490275.
48. Guo P, You JO et al. (2014). Inhibiting Metastatic Breast Cancer Cell Migration via the Synergy of Targeted, pH-triggered siRNA Delivery and Chemokine Axis Blockade. *Mol. Pharmaceutics.*, 11(3):755-65.
49. Gwin J, Drews N et al. (2011). Effect of Genistein on p90 RSK Phosphorylation and Cell Proliferation in T47D Breast Cancer Cells. *Anticancer Research.*,

- 31(1):209-14.
50. Hack CC, Lux MP et al. (2012). S3-Leitlinie 2012 zur Mammakarzinomnachsorge. *Der Gynäkologe*, S. 460-466.
51. Harmon AW, Patel YM. (2004). Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. *Breast Cancer Res Treat.*, 85(2):103-10.
52. Holzgrabe U. (2004). Neue Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren: Me-too-SERMs? *Pharmazie in unserer Zeit*, doi:10.1002/pauz.200400081.
53. Hsu CC, Lin TW et al. (2005). Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids. *Gynecologic Oncology*, doi:10.1016/j.ygyno.2004.10.010.
54. Hsu S, Bollag WB et al. (2003). Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.*, 306(1):29-34.
55. Huntly BJP und Gilliland DG. (2005). Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature*, 435(7046):1169-70.
56. Hübner J. (2008). *Komplementäre Onkologie: supportive Maßnahmen und evidenzbasierte Empfehlungen*. Stuttgart: Schattauer.
57. Jacob LM. (2011). Krebsstammzellen und ihre Nische als Lebensquelle des Todes. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*, 43(3):112-118.
58. Jiang K, Sun J et al. (2004). Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol.*, 24(12):5565-76.
59. Jiang YG, Peng Y, Koussougb K. (2011). Necroptosis: A novel therapeutic target for glioblastoma. *Med Hypotheses*, 76(3):350-2.
60. Jin LH, Wei C. (2014). Role of MicroRNAs in the Warburg Effect and Mitochondrial Metabolism in Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 15(17):7015-7019.
61. Johnson SK, Chua V et al. (2006). Lupin kernel fibre foods improve bowel function and beneficially modify some putative faecal risk factors for colon cancer in men. *Br J Nutr.*, 95(2):372-8.
62. Kachlicki P, Einhorn J et al. (2008). Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. *J. Mass Spectrom.*, 43(5):572-86.
63. Kachlicki P, Marczak L et al. (2005). Profiling isoflavone conjugates in root extracts of lupine species with LC/ESI/MSn systems. *J. Mass Spectrom.*, 40(8):1088-1103.
64. Katagiri Y, Ibrahim RK, Tahara S. (2000). HPLC Analysis of White Lupin Isoflavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64(6):1118-1125.
65. Keil D, Bayerl C. (2002). Phytoestrogens as Anti-Aging Agents. *Akt Dermatol.*, 28(3):69-73.
66. Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RHM. (2004). Oncogenetic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas*, 49(1):34-43.
67. Kraker HW. (2010). *Untersuchung von Keimbahnpolymorphismen zur*

- Vorhersage von Metastasierung bei Brustkrebs.* Medizinische Universität Graz, Onkologie. Graz: Dissertation.
68. Kroemer G, Pouyssegur J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.*, 13(6):472-82.
  69. Kruk J, Duchnik E. (2014). Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 15(2):561-8.
  70. Krukemeyer MG, Spiegel HU. (2005). *Chirurgische Forschung*. Stuttgart: Thieme.
  71. Kufe DW, Pollock RE et al. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition*. BC Decker.
  72. Kushima Y, Iida K et al. (2009). Inhibitory Effect of (-)-Epigallocatechin and (-)-Epigallocatechin Gallate against Herceptin b 1-Induced Migration/Invasion of the MCF-7 Breast Carcinoma Cell Line. *Biol. Pharm. Bull.*, 32(5) 899—904.
  73. Langbein S, Frederiks WM et al. (2008). Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer. *Int J Cancer.*, 122(11):2422-2428.
  74. Le A, Cooper CR et al. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107(5):2037-42.
  75. Levine AJ, Puzio-Kuter AM. (2010). The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science.*, 330 (6009):1340-1344.
  76. Lippe P v. (2006). *Deskriptive Statistik: Formeln, Aufgaben, Klausurtraining*. (Bd. 7. Auflage). Deutschland: Oldenbourg.
  77. Liu S, Cong Yet al. (2014). Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal. *Stem Cell Reports.*, 2(1):78-91.
  78. Lovat F, Ishii H et al. (2013). LZTS1 downregulation confers paclitaxel resistance and is associated with worse prognosis in breast cancer. *Oncotarget.*, 5(4):970-7.
  79. Ludwig-Müller J, Gutzeit H. (2014). *Biologie von Naturstoffen*. Stuttgart: Ulmer.
  80. MacLennan M, Ma DWL. (2010). Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 12(5):211.
  81. Magni C, Sessa F et al. (2004). Conglutin gamma, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma Glucose levels of hyperglycemic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry.*, 15(11):646-50.
  82. Markaverich BM, Shoulars K, Rodriguez MA. (2011). Luteolin Regulation of Estrogen Signaling and Cell Cycle Pathway Genes in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Int J Biomed Sci.*, 7(2):101–111.
  83. Matheson BK, Adams JL et al. (2007). Effect of metabolic inhibitors on ATP and citrate content in PC3 prostate cancer cells. *Prostate.*, 67(11):1211-1218.
  84. Maurer S, Thödtmann J. (2003). *Das Mammakarzinom Diagnostik und Therapie*. Eschborn: Govi-Verlag.
  85. Meden H. (2009). *Mammakarzinom Neue Aspekte zur Diagnostik und Therapie*. Berlin: de Gruyter.

86. Menendez JA, Vazquez-Martin A et al. (2006). HER2 (erbB-2)-targeted effects of the omega-3 polyunsaturated fatty acid, alpha-linolenic acid (ALA; 18:3n-3), in breast cancer cells: the 'fat features' of the 'Mediterranean diet' as an 'anti-HER2 cocktail'. *Clin Transl Oncol.*, 8(11):812-20.
87. Nagata C, Mizoue T et al. (2014). Soy Intake and Breast Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence Among the Japanese Population. *Jpn J Clin Oncol.*, 44(3):282-295.
88. Nahi H, Merup M et al. (2006). PRIMA-1 induces apoptosis in acute myeloid leukaemia cells. *Br J Haematol.*, 132(2):230-6.
89. Natum. (2014). [www.natum.de](http://www.natum.de/files/15013_2014_19_02_i_060-061_gg1402_natum_onlinepdf.pdf). Abgerufen am 15. oktober 2014 von [http://www.natum.de/files/15013\\_2014\\_19\\_02\\_i\\_060-061\\_gg1402\\_natum\\_onlinepdf.pdf](http://www.natum.de/files/15013_2014_19_02_i_060-061_gg1402_natum_onlinepdf.pdf)
90. Neve RM, Chin K et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.*, 10(6):515-527.
91. Newman DJ, Cragg GM. (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010†. *J Nat Prod.*, 75(3):311-335.
92. Nourazarian AR, Kangari P, Salmaninejad A. (2014). Roles of Oxidative Stress in the Development and Progression of Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 15(12):4745-4751.
93. OECD. (2009). *Gesundheit auf einen Blick 2009 OECD-Indikatoren*. OECD.
94. Omar ME AS, Eman RY, Hafez FH. (2011). The antioxidant status of the plasma in patients with breast cancer undergoing chemotherapy. *Open J Mol Integr Physiol.*, doi:10.4236/ojmip.2011.13005.
95. Oomah BD, Tiger N et al. (2006). Phenolics and Antioxidative Activities in Narrow-Leaved Lupins (*Lupinus angustifolius* L.). *Plants Foods for Human Nutrition.*, 61(2):91-7.
96. Ouyang L, Shi Z et al. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.*, 45(6):487-98.
97. Petru E, Jonat W et al. (2009). *Praxisbuch Gynäkologische Onkologie*. Heidelberg: Springer.
98. Pfetzer. (2011). *Identifizierung und Testung spezifischer Inhibitoren des Energiestoffwechsels von Tumorzellen*. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Biologie, Würzburg.
99. Porporato PE, Dhup S et al. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors:a comprehensive review. *Front Pharmacol.*, 2:49.
100. Pouchieu C, Chajés V et al. (2014). Prospective Associations between Plasma Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids and Overall and Breast Cancer Risk—Modulation by Antioxidants: A Nested Case-Control Study. *PLoS one.*, 9(2):e90442.
101. Prolupin GmbH. (kein Datum). <http://www.plantsprofood.eu/>. Abgerufen am 8. April 2014 von <http://www.plantsprofood.eu/>
102. Proskuryakov SY, Gabai VL. (2010). Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Current Pharmaceutical Design.*, 16(1):56-68.
103. Provitro. (2012). [www.provitro.de](http://www.provitro.de). Abgerufen am 21. Juni 2013 von <http://www.provitro.de>

- file:///E:/provitro%20%20Humane%20Fibroblasten.htm
104. Qin C, He B et al. (2014). Inhibition of Metastatic Tumor Growth and Metastasis via Targeting Metastatic Breast Cancer by Chlorotoxin-Modified Liposomes. *Mol. Pharmaceutics.*, doi:10.1021/mp400691z.
  105. Rahman S, Salehin F, Iqbal A. (2011). In vitro antioxidant and anticancer activity of young *Zingiber officinale* against human breast carcinoma cell lines. *Complementary and Alternative Medicine.*, 11:76.
  106. Ramaswami R, O'Cathail SM et al. (2014). Activity of eribulin mesylate in heavily pretreated breast cancer granted access via the Cancer Drugs Fund. *Future Oncol.*, 10(3):363–376.
  107. Regierer AC, Possinger K. (2005). *Mammakarzinom Manual Diagnostik und Therapie*. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH.
  108. Remmele W, Stegner HE. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe.*, 8(3):138-40.
  109. Rice S, Whitehead SA. (2008). Phytoestrogens and breast cancer –promoters or protectors? *Endocrine-Related Cancer.*, 13(4):995–1015.
  110. Richter G. (1998). *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Thieme: Stuttgart.
  111. Robert Koch Institut. (13. Dezember 2013). <http://www.rki.de>. Abgerufen am 16. März 2014 von [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs\\_node.html](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html)
  112. Roche. (2011). <https://cssportal.roche.com>. Abgerufen am 12. Februar 2014 von [https://cssportal.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/04744934001\\_en\\_06.pdf](https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/04744934001_en_06.pdf)
  113. Rossignol R, Gilkerson R et al. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.*, 64(3):985-993.
  114. Rowinsky EK. (1997). The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu. Rev. Med.*, 48:353–74.
  115. Ruiz RG, Price KR et al. (1995). Determination of saponins in lupin seed (*lupinus angustifolius*) using high-performance liquid chromatography: comparison with a gaschromatographic method. *Journal of Liquid Chromatography.*, doi: 10.1080/10826079508009328.
  116. Rumiyati, Jayasena V, James AP. (2013). Total Phenolic and Phytosterol Compounds and the Radical Scavenging Activity of Germinated Australian Sweet Lupin Flour. *Plant Foods Hum Nutr.*, 68(4):352–57.
  117. Sattler UGA, Walenta S, Mueller-Klieser W. (2007). Laktat und Redoxstatus in malignen Tumoren. *Der Anaesthetist.*, 56:466-469.
  118. Schmidt AS. (2003). Charakterisierung ausgesuchter Pflanzeninhaltsstoffe in Hinblick auf ihre estrogene Wirkung. Bonn, Rheinland, Deutschland: Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
  119. Schulz KD, Albert US. (2008). Präventive Versorgungskonzepte beim Brustkrebs. In P. K. (Hrsg.), *Prävention und Versorgungsforschung* (S. 923-938). Heidelberg: Springer.

120. Schwartz GK, Shah MA. (2005). Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol.*, 23(36):9408-21.
121. Seegers JC, Aveling ML et al. (1989). The cytotoxic effects of estradiol-17 beta, catecholestradiols and methoxyestradiols on dividing MCF-7 and HeLa cells. *J Steroid Biochem.*, 32(6):797-809.
122. Shetty N, Gupta S. (2014). Eribulin drug review. *South Asian J Cancer.*, 3(1):57-59.
123. Sonveaux P, Copetti T et al. (2012). Targeting the Lactate Transporter MCT1 in Endothelial Cells Inhibits Lactate-Induced HIF-1 Activation and Tumor Angiogenesis. *PLoS one.*, doi: 10.1371/journal.pone.0033418.
124. Sosa V, Moliné T et al. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Age Res Rev.*, 12(1):376-90.
125. Stapel J, Oppermann C et al. (2013). Polyphenol compounds with anti-carcinogenic qualities: Effects of quercetin (flavonol), chrysin (flavon), kaempferol (flavonol), naringenin (flavanon) and hesperidin (flavanoid) on in vitro breast cancer. *Journal of Medicinal Plants Research.*, doi: 10.5897/JMPR2013.5126.
126. Steeg PS, Theodorescu D. (2008). Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.*, 5(4):206–219.
127. Stoll BA. (2002). Review article n-3 Fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *British Journal of Nutrition.*, 87(3):193-8.
128. Stoll S. (2008). *Bioaktive Naturstoffe aus chinesischen Getreide- und Gemüsesorten*. Göttingen: Cuvillier.
129. Su MA, Huang YT et al. (2014). An Invertebrate Warburg Effect: A Shrimp Virus Achieves Successful Replication by Altering the Host Metabolome via the PI3K-Akt-mTOR Pathway. *PLOS Pathog.*, 10(6):e1004196.
130. Sun Y, Peng ZL. (2009). Programmed cell death and cancer. *Postgrad Med J.*, 85(1001):134–40.
131. Sutendra G, Michelakis ED. (2013). Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol.*, 3:38.
132. Tennant DA, Duran RV et al. (2009). Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis.*, 30(8):1269-1280.
133. Terlau H, Bach G, Zeeck A. (2000). Das medizinische Potential von Naturstoffen. *Der Gynäkologe*, S. 6-10.
134. Thor-Wiedemann S, Wiedemann GJ. (2013). Primärprävention des Mammakarzinoms. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, S. 385-389.
135. Todorova VK, Kaufmann Y et al. (2011). Tamoxifen and raloxifene suppress the proliferation of estrogen receptor-negative cells through inhibition of glutamine uptake. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 67(2):285-91.
136. van Meeuwen JA, Korthagen N et al. (2007). (Anti)estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 221(3):372-83.
137. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.*, 324(5930):1029-33.

138. Vitrac C et al. (2005). Determination of Stilbenes (ä-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, E-viniferin) in Brazilian Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 53(14): 5664-9.
139. Vohr HW. (2010). *Toxikologie* (Bd. Band 1: Grundlagen der Toxikologie). Weinheim: WILEY-VCH.
140. Wagener C, Müller O. (2010). *Molekulare Onkologie Entstehung, Progression, klinische Aspekte*. Stuttgart: Thieme.
141. Wang J, John EM, Ingles SA. (2008). 5-Lipoxygenase and 5-Lipoxygenase-Activating Protein Gene Polymorphisms, Dietary Linoleic Acid, and Risk for Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 17(10):2748-54.
142. Wang P, Henning SM, Heber D. (2010). Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS one.*, 5(4):e10202.
143. Watson J. (2013). Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biol.*, 3(1):120144.
144. Watzl B, Leitzmann C. (2005). *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Stuttgart: Hypokrates.
145. WCRF international. (13. Dezember 2013). <http://www.wcrf.org>. Abgerufen am 16. März 2014 von [http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/world\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/world_cancer_statistics.php)
146. Wehling M. (2011). *Klinische Pharmakologie*. Stuttgart: Thieme.
147. Weiße K et al. (2010). Lupin protein compared to casein lowers the LDL cholesterol: HDL cholesterol-ratio of hypercholesterolemic adults. *Eur J Nutr.*, 49(2):65-71.
148. Weyerstahl T, Stauber M. (2013). *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Stuttgart: Thieme.
149. WHO. (3. November 2011). <http://www.euro.who.int>. Abgerufen am 16. März 2014 von <http://www.euro.who.int/de/health-topics/Life-stages/sexual-and-reproductive-health/news/news/2011/11/women-and-cancer-screening-and-treatment-save-lives>
150. Win DT. (2005). Oleic Acid—The Anti-Breast Cancer Component in Olive Oil. *AU J.T.*, 9(2):75-78.
151. Woldemichael GM, Wink M. (2002). Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolius*. *Phytochemistry.*, 60(2002):323-327.
152. Wu AH, Lee E, Vigen C. (2013). Soy Isoflavones and Breast Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.*, 2013:102-6.
153. Wu CY, Hsu CC et al. (2001). Soyasaponin I, a Potent and Specific Sialyltransferase Inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, doi:10.1006/bbrc.2001.5002.
154. Wu W, Liu P, Li J. (2012). Necroptosis: An emerging form of programmed cell death. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.*, 82(3):249-58.
155. Xie H et al. (2009). LDH-A inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Mol.CancerTher.*, 8(3):626-35.
156. Xu X, Wang Y et al. (2005). Matrix Metalloproteinase-2 Contributes to Cancer

- Cell Migration on Collagen. *Cancer Res.*, 65(1):130-6.
157. Xu X, Zur Hausen A et al. (2009). Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *Int J Cancer.*, 124(6):1330-1337.
158. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. (2005). Cell migration in tumors. *Cell Biology.*, 17(5):559–64.
159. Yang G, Nowsheen S et al. (2013). Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacology & Therapeutics.*, 139(3):392-404.
160. Yao H †, Du X et al. (2012). Microwave-Assisted Method for Simultaneous Extraction and Hydrolysis for Determination of Flavonol Glycosides in Ginkgo Foliage Using Brönsted Acidic Ionic-Liquid [HO3S(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>mim]HSO<sub>4</sub> Aqueous Solutions. *International Journal of Molecular Sciences.*, 13(7):8775–8788.
161. Yoshida T, Ozawa Y et al. (2014). Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial–mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal–epithelial transition (MET) states. *British Journal of Cancer.*, doi:10.1038/bjc.2014.80.
162. Young CD, Anderson SM. (2008). Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Res.*, 10(1):202.
163. Zänker KS et al. (2001). Genistein and Daidzein: Mode of Action and Bioavailability as Chemopreventive Agents in a Soy-Enriched Diet. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*.
164. Zhan T, Digel M et al. (2011). Silybin and dehydrosilybin decrease glucose uptake by inhibiting GLUT proteins. *J Cell Biochem.*, 112(3):849-59.
165. Zhang C, Liu J et al. (2013). Tumor-Associated Mutant p53 Drives the Warburg Effect. *Nat Commun.*, 4: 2935.
166. Zhang S, Yue JX et al. (2008). Overexpression of transketolase protein TKTL1 is associated with occurrence and progression in nasopharyngeal carcinoma: a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther.*, 7(4):517-522.
167. Zhang W, Popovich DG. (2010). Group B oleanane triterpenoid extract containing soyasaponins I and III from soy flour induces apoptosis in Hep-G2 cells. *J Agric Food Chem.*, 58(9):5315-9.
168. Zhang Z, Yuan W et al. (2011). Flavonoids from Lupinus texensis and their free radical scavenging activity. *Natural Product Research.*, 25(17):1641-9.
169. Zheng A, Kallio A, Harkonen P. (2007). Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. *Endocrine.*, 148(6):2764-77.