

Universität Rostock
Universitätsmedizin

Therapeutische Wirkung des Antidiabetikums Metformin,
des Betablockers Propranolol und des
Cyclooxygenasehemmers Acetylsalicylsäure auf das
Wachstum von Mammakarzinomzellen

in-vitro Studie

Inauguraldissertation zur Erlangung
des akademischen Grades eines
Dr. med.
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von: Silvio Munk

eingereicht: 2018

verteidigt: 2019

1. Gutachter: Frau PD. Dr. Dagmar-Ulrike Richter,
Universitätsfrauenklinik Rostock, Südring 81, 18059 Rostock

2. Gutachter: Herr PD Dr. Michael Linnebacher,
Universitätsmedizin Rostock, Schillingallee 35, 18057 Rostock

3. Gutachter: Herr Prof. Dr. Udo Jeschke,
Universitätsfrauenklinik München, Maistrasse 11, 80337 München

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	5
1 Einleitung	7
2 Theoretische Grundlagen	10
2.1 Epidemiologie	10
2.2 Ätiologie	10
2.3 Klinik	10
2.4 Diagnostik	11
2.5 Therapie	12
3 Hypothesen	15
4 Material und Methoden	16
4.1 Zellkulturen	16
4.1.1 MCF 7 Zellen	18
4.1.2 BT 20 Zellen	18
4.1.3 MCF 10a Zellen	19
4.1.4 MCF 12a Zellen	20
4.2 Reinsubstanzen und Chemikalien	21
4.2.1 Metformin	21
4.2.2 Propranolol	22
4.2.3 ASS	22
4.2.4 Tamoxifen	23
4.2.5 Östradiol	23
4.2.6 Sonstige Chemikalien	24
4.3 Material	25
4.4 Testverfahren	27
4.4.1 LDH-Zytotoxizitätstest	27
4.4.2 BrdU-Zellproliferationstest	29
4.4.3 Immunhistochemie	31
4.4.4 Metabolismus der Zellen	32
4.5 Statistische Auswertung	34
5 Ergebnisse	35
5.1 LDH-Zytotoxizitätstest	35
5.2 BrdU-Zellproliferationstest	43
5.3 Immunhistochemie	50
5.4 Metabolismus der Zellen	53
5.4.1 pH-Wert	53
5.4.2 Glukose	57

6 Diskussion	60
6.1 Diskussion der Hauptergebnisse	60
6.2 Diskussion der Methoden	66
7 Ausblick	67
Thesen zur Promotionsschrift	68
Literatur	70
Abbildungsverzeichnis	89
Tabellenverzeichnis	90
Lebenslauf	91

Abkürzungsverzeichnis

AMPK	Adenosinmonophosphatkinase
ASS	Acetylsalicylsäure
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
BRCA	BReast-CAnker-Gen
BrdU	Bromdesoxyuridin
bspw.	beispielsweise
BT	Breast Tumor
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CK	Cytokeratin
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Estrogen Receptor
FKS	Fetales KälberSerum
HAM's	Nutrient Mixture for Chinese Hamster Ovary (CHO) cells
HER	Human Epidermal growth factor Receptor
INT	2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchloride
LDH	Lactatdehydrogenase
MCF	Michigan Cancer Foundation
MEM	Minimum Essential Media
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin

NSAR	Nicht-Steroidale Anti-Rheumatika
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphat Buffer Solution
PET	Positronenemissionstomographie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
p.o.	per os
PR	Progesteron Rezeptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SERM	Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
T2DM	Typ-2 Diabetes Mellitus
TP53	Tumor Protein 53

Zusammenfassung

Brustkrebs gehört zu den häufigsten Tumorarten überhaupt [138, 143] und ist trotz abnehmender Sterblichkeit durch eine steigende Inzidenz [2, 5] gekennzeichnet. Als Hauptursache gilt derzeit ein Östrogenüberschuss als gesichert, der zum einen über seine oxidative Metabolisierung, die Schädigung der DNA begünstigt. Zum anderen soll die Bindung des Östrogens an den Östrogenrezeptor zu einer veränderten Genexpression, mit steigender Zellproliferation und unterdrückter Apoptose, führen [163].

Therapeutisch kommen neben chirurgischen und strahlentherapeutischen Verfahren häufig Medikamente zum Einsatz, die ihre Wirkung an verschiedenen Abschnitten in der Pathogenese der Tumorerkrankung entfalten [19].

Aber auch bislang nicht primär in der Brustkrebstherapie eingesetzte Medikamente scheinen tumorprotektive Effekte zu besitzen. So haben epidemiologische und experimentelle Studien eindrucksvoll eine antitumoröse Wirkung von *Metformin* [3, 49, 102], *Propranolol* [47, 59, 141] und *ASS* [20, 80, 115] bei verschiedenen Tumorentitäten, einschliesslich dem Brustkrebs, zeigen können.

Ziel dieser in-vitro Studie war es, die Wirkung von *Metformin*, *Propranolol* und *Acetylsalicylsäure* auf humane Mammakarzinomzellen zu untersuchen. Um den Einfluss der (Hormon-)Rezeptorausstattung zu demonstrieren, wurden die Versuche an zwei rezeptorpositiven (MCF 7 und MCF 12a) und zwei rezeptornegativen (BT 20 und MCF 10a) Mammakarzinomzelllinien durchgeführt. Zudem kamen verschiedene Substratkonzentrationen zum Einsatz, um dosisabhängige Effekte zu identifizieren.

Die zu untersuchenden Medikamente sind in je zwei Dosierungen *Metformin* (7.5 und 2.5 mg/ml), *Propranolol* (2.4 und 1.2 mg/ml), *ASS* (1.0 und 0.5 mg/ml) an den vier Mammakarzinomzelllinien MCF 7 (ER/PR+), BT 20 (ER/PR-), MCF 10a (ER/PR-) und MCF 12a (ER/PR+) getestet worden. Alle Zelllinien haben wir unter physiologischen Laborbedingungen (wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37 °C) kultiviert, mit einer Zelldichte von 5x10⁵/Well ausgesät und anschliessend mit den Medikamenten bzw. den Kontrollsubstanzen versetzt. Der Einfluss der Medikamente wurde anhand eines Zytotoxizitäts- und eines Zellproliferationstests untersucht. Die Zellen wurden zudem metabolisch, morphologisch und hinsichtlich ihrer Rezeptorausstattung begutachtet.

Das Antidiabetikum *Metformin* zeigte in allen vier Zelllinien signifikante wachstumshemmende Effekte. Eine toxische Wirkung des *Metformins* war jedoch nicht nachweisbar.

Die stärkste antiproliferative Wirkung hatte der Betablocker *Propranolol* und dies in allen Zelllinien (MCF12a > MCF10a > BT20 > MCF7). Aber in nur zwei Mammakarzinomzelllinien (MCF10a > BT20) war eine signifikante Toxizität messbar.

Unter der Behandlung mit dem Cyclooxygenasehemmer *ASS* war eine Hemmung des Tumorwachstums feststellbar (MCF10a/12a > BT20 > MCF7). Die zytotoxische Wirksamkeit war jedoch gering.

Zwischen den Dosierungen der Medikamente gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Wirkung der Medikamente war zudem unabhängig von der Hormonrezeptorausstattung.

Die vorliegende Arbeit konnte die Annahme bestätigen, dass alle drei Medikamente einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Brustkrebszellen haben. Vor allem der Betablocker *Propranolol*, aber in geringem Umfang auch *Metformin* und *ASS* sind imstande, das Wachstum von Mammacarcinonzellen zu reduzieren.

Ein aktive, zellzerstörende Wirkung konnte nur bei wenigen Mammakarzinomzelllinien in schwacher Ausprägung gezeigt werden. Angenommen hatten wir jedoch eine deutliche zytotoxische Wirkung, da alle drei Substanzen auf verschiedenen Stoffwechselwegen den programmierten Zelltod unterstützen sollen.

Ein Zusammenhang zwischen der Medikamentenwirkung und der Hormonrezeptorausstattung ließ sich nicht herstellen. Vielmehr ist die Wirkung unabhängig vom Hormonrezeptor. Dies hatten wir so vermutet, da die antiproliferative Wirkung von *Metformin*, *Propranolol* und *ASS* über andere, hormonrezeptorunabhängige, Stoffwechselwege vermittelt wird. Diese Tatsache erlaubt einen viel breiteren Einsatz der Substanzen. Ebenso sahen wir keine signifikante Dosisabhängigkeit, was so zwar nicht erwartet worden war, jedoch die Möglichkeit eines effektiven Einsatzes bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen eröffnet. Hier sind weitere Untersuchungen nötig.

1 Einleitung

Tumorerkrankungen bzw. bösartige Neubildungen gehören zu den zweithäufigsten Todesursachen nach den Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. In Deutschland erlagen im Jahr 2014 über 25 % aller Verstorbenen einem Tumorleiden. Dabei dominieren, sowohl bei Männern als auch bei Frauen, Krebserkrankungen der Verdauungsorgane [89, 138].

Die häufigste, wenn auch nicht die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung, ist jedoch beim Mann weiterhin der Prostata-, bzw. Lungenkrebs und bei der Frau der Brustkrebs [89, 143]. Brustkrebs ist darüber hinaus der mit 23 % aller Krebsfälle am häufigsten diagnostizierte Krebstyp überhaupt.

Bei der Entstehung des Mammakarzinoms ist derzeit ein Östrogenüberschuss als Hauptursache gesichert. Aktuell werden zwei verschiedene, aber komplementäre Wege in der Karzinogenese der Brustkrebserkrankung durch Östrogene diskutiert. Zum einen soll der oxidative Metabolismus der Östrogene über die Entstehung von genotoxischen Substanzen (Chinone auf dem Katecholweg) zur Schädigung der DNA führen. Zum anderen soll die Bindung des Östrogens an den Östrogenrezeptor über den genomischen, nicht-genomischen und mitochondrialen Weg zu einer veränderten Genexpression mit steigender Zellproliferation und unterdrückter Apoptose führen [163].

Bei der Behandlung der Brustkrebserkrankung stehen neben den chirurgischen, den strahlentherapeutischen und den hormonellen Therapiemöglichkeiten eine Vielzahl von Medikamenten, sogenannte Chemotherapeutika, zur Verfügung.

Aber auch andere, nicht primär in der Tumorthherapie eingesetzte, Medikamente scheinen positive Effekte bei der Behandlung von Krebserkrankungen zu haben.

Metformin und Krebs

Metaanalysen und Übersichtsstudien legen nahe, dass das Antidiabetikum Metformin imstande ist, die Inzidenz einer Vielzahl von Krebserkrankungen zu senken [56]. Aljada konnte beispielsweise zeigen, dass Metformin eine antikarzinogene Aktivität bei verschiedenen Karzinomformen zu haben scheint [4].

In einer Kohortenanalyse mit 4085 Metformin-Anwendern wurde bei 7,3 % eine Krebserkrankung diagnostiziert, wohingegen in der Vergleichsgruppe bei 11,6 % eine Krebserkrankung auftrat. Die mittlere Zeit bis zur Krebsdiagnose betrug 3,5 Jahre in der Metformin-Gruppe und 2,6 Jahre in der Vergleichs-

gruppe [102]. Ähnliche Ergebnisse finden sich auch bei Bodmer et al.[31], Bowker et al. [34] und Evans et al.[64]. Im Tierversuch konnten ebenfalls tumorprotektive Effekte des Metformins festgestellt werden [9, 10].

Auch bei der Brustkrebserkrankung zeigte sich ein möglicher Zusammenhang zwischen der Metformineinnahme und einem geringeren Auftreten der Erkrankung [33, 82]. Dieser Effekt ist besonders deutlich bei der Langzeiteinnahme von Metformin [49]. Eine Untersuchung von ca. 68.000 postmenopausalen Frauen, von denen ca. 3.500 an Diabetes litten, konnte zeigen, dass der Metformin-Gebrauch mit einer geringeren Inzidenz von Brustkrebs assoziiert ist [44]. Andere Studien legen jedoch nahe, dass dieser Effekt nicht an die Metforminbehandlung des Diabetes gebunden ist, sondern auch bei der Langzeitgabe von Insulin [48] oder anderen oralen Antidiabetika [146] beobachtet wird.

Die Wirkung von Metformin auf Brustkrebszellen in-vitro wurde bereits in anderen Arbeitsgruppen [3, 141] und auch in unserer Arbeitsgruppe untersucht [140] und wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit an zwei weiteren Zelllinien erforscht.

Propranolol und Krebs

Dass der unselektive Betablocker Propranolol bereits in niedrigen Dosierungen ein sicheres und effektives antiproliferatives Mittel sein kann, ist aus der Behandlung des Infantilen Hämangioms bekannt [142].

Darüber hinaus werden Betablockern positive Effekte bei Tumorerkrankungen [42], wie bspw. dem Darmkrebs [84] zugeschrieben, weil Tumorzellen im allgemeinen und Mammakarzinomzellen im speziellen [38] adrenerge Rezeptoren exprimieren und Katecholamine eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung zu haben scheinen [27, 47].

Betablocker haben offensichtlich auch positive Effekte auf das Tumorstadium beim Mammakarzinom [1, 24, 25, 40].

Ob sich dieser Effekt auch in-vitro nachweisen lässt, wurde ebenfalls durch andere Arbeitsgruppen [59, 141] und in unserer Arbeitsgruppe untersucht [140]. Ich werde hier prüfen, ob sich diese Ergebnisse auch an anderen Zelllinien reproduzieren lassen.

ASS und Krebs

Die Chemoprävention einiger Krebserkrankungen durch ASS oder NSAR ist schon lange Gegenstand der öffentlichen und wissenschaftlichen Diskussion.

Die Studienlage hierzu ist nicht eindeutig [108]. Der protektive Effekt von ASS auf die Entstehung von kolorektalen Neoplasien [101] scheint am besten untersucht zu sein. Einige Autoren sehen hier eine eindeutige Evidenz dafür, dass niedrig dosiertes Aspirin das Risiko kolorektaler Karzinome senken kann [69]. Ähnliche Effekte von Aspirin und NSAR wurden beim Lungenkarzinom entdeckt und legen die Vermutung nahe, dass die Cyclooxygenase eine zentrale Rolle in der Tumorentstehung haben könnte [103].

Bei anderen, bspw. gynäkologischen Tumoren, ist die Assoziation zwischen der ASS-Einnahme und dem Auftreten der Erkrankung eher schwach [20]. Speziell beim Mammakarzinom sehen einige Autoren sogar keine signifikante Assoziation zwischen der Verschreibung von niedrig-dosiertem ASS und brustkrebsbedingten Todesfällen [110]. Andere Autoren bejahen eine inverse Korrelation zwischen der ASS bzw. NSAR-Einnahme und der Inzidenz von Brustkrebs [115].

Auch ASS wurde bereits in-vitro auf mögliche antiproliferative Effekte an Brustkrebszellen untersucht [111, 141]. Ich werde hier weitere Mammakarzinomzelllinien dahingehend testen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Epidemiologie

Die bösartigen Neubildungen der Brust stellen die häufigsten Karzinome der Frau dar. Das Risiko einer Frau im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom zu erkranken beträgt 12 %. In der Tendenz nimmt die Häufigkeit weiter zu. Weltweit erkranken jährlich fast 1.4 Millionen Frauen an Brustkrebs und über 450.000 Frauen sterben jährlich daran [143].

Auffällig ist die geographisch unterschiedliche Verteilung der Inzidenz des Mammakarzinoms. So findet sich in Nordeuropa und den USA eine höhere Inzidenz als beispielsweise in Südamerika und Ostasien [78]. In der afroamerikanischen Bevölkerung der USA kommt Brustkrebs seltener vor, als in der weissen Bevölkerung [116].

2.2 Ätiologie

Neben Alter [2, 124] und einer familiären Brustkrebsbelastung [148] beziehungsweise der genetischen Disposition [50] gelten eine Vielzahl von Faktoren als prädisponierend für das Mammakarzinom [51]. Späte Erstparität [97, 99], frühes Menarchealter, späte Menopause [124], Nullipara, erhöhte Östrogenspiegel, Adipositas [160], Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen [97], erhöhter Alkoholkonsum [79], Strahlenbelastung [127] und ein vorangegangenes Mammakarzinom der Gegenseite [97] beziehungsweise Hyperplasien der Milchgänge [132] gelten als gesicherte Einflussfaktoren [95]. Die Rolle der Adipositas bei der Brustkrebsentstehung ist komplex und abhängig vom menopausalem Status und Brustkrebs-Subtyp [6].

Bei den genetischen Faktoren stellt die Mutation des BRCA-1-Gens den häufigsten Gendefekt dar [68]. Seltener sind andere Mutationen, beispielsweise des BRCA-2 [162], des PTEN- und des TP53-Gens [147]. Bei Genmutationen ergibt sich ein um ein vielfach erhöhtes Erkrankungsrisiko [72]. Bei den Medikamenten ist die Hormonsubstitution mit Östrogenen in den Wechseljahren als Risikofaktor gesichert [39]. Auch Strahlung [8] scheint das Erkrankungsrisiko signifikant zu erhöhen.

Als protektive Faktoren gelten eine frühe Schwangerschaft [97, 99], Stillen [29], Sport [145], SERMs [54], Aromataseinhibitoren [74] und eine prophylaktische Mastektomie [81] bzw. eine Oophorektomie [121] oder Ovarablation [92].

2.3 Klinik

Viele Patienten befinden sich bei Diagnosestellung schon in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, da es keine direkten Warn- beziehungsweise Frühsymptome gibt. Als erstes fällt den Betroffenen meist ein tastbarer Knoten in der Brust auf. Selten finden sich Mamillenekzeme (Morbus Paget) oder eine blutig-seröse Mamillensekretion als Warnsignale. Im Verlauf kann es zu Entzündungen der Haut, einer Apfelsinenhaut (peau d'orange), Ödemen, Schwellungen der axillären Lymphknoten oder Wirbelsäulen-, und Gelenkschmerzen bei ossärer Metastasierung kommen [78].

Makroskopisch ist das Mammakarzinom am häufigsten im äußeren oberen Quadranten der Brust lokalisiert [78]. Abhängig von der Tumorlokalisation bzw. dem Entstehungsort teilt man in duktale, lobuläre, Brustwarzen- (Morbus Paget) und andere Tumoren ein, wobei das Mammakarzinom in den häufigsten Fällen von den Milchgängen (duktal DCIS) ausgeht. Innerhalb der einzelnen Tumorformen unterscheidet man eine Vielzahl von histologischen Subtypen [61].

Brustkrebs metastasiert sehr häufig, relativ früh und überwiegend lymphogen (axillär). Hämatogen metastasiert das Mammakarzinom in das Skelett mit osteolytischen Knochenmetastasen in Wirbelkörpern, Rippen und Becken und in Lunge, Leber, Haut und ZNS [61, 78].

Zur Risikoabschätzung unterteilt man die Erkrankung in Low-, Medium- und High-Risk-Tumoren [78], abhängig von Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Östrogen-, Progesteron-, und HER2 - Rezeptorstatus, Gesundheits- und menopausalem Status der Patientin [61]. Zur Therapieauswahl und Prognoseeinschätzung findet zudem das TNM-Klassifikationssystem Anwendung. T bestimmt dabei die Tumorgröße, N den Befall der Lymphknoten und M die nachgewiesenen Fernmetastasen [113].

2.4 Diagnostik

Die Diagnostik der Brustkrebserkrankung beginnt mit der Anamnese durch Erfragen von Risikofaktoren, familiärer Belastung und klinischen Symptomen [78, 113]. Daran schließt sich eine körperliche Untersuchung mit Tastuntersuchung der Brust an. Die Evidenz der Tastuntersuchung wird dabei unterschiedlich bewertet [18, 71]. Hierbei achtet man besonders auf die Konsistenz, die Größe, mögliche Verhärtungen, die Verschieblichkeit und eine Schmerzhaftigkeit der Brust, sowie auf die Haut über der Brust (Entzündungen, Ekzeme, Einziehungen) und tastet die Lymphabflusswege auf Lymphknotenvergrößerungen ab. Gesichert wird die Diagnose radiologisch. Die primär eingesetzte Mammographie [112] hat eine gute Evidenz zur Reduktion

der durch Brustkrebs bedingten Mortalität. Sie basiert aber auf Röntgenstrahlen und hat daher auch einen Einfluss auf die Brustkrebsentstehung selbst [36, 119]. Ferner werden Ultraschall, MRT/CT/PET-Untersuchungen und Biospieentnahmen zur Diagnosesicherung eingesetzt [113].

2.5 Therapie

Grob unterteilt man die Therapie der Brustkrebserkrankung in sechs Säulen [113]:

- Früherkennung und Prävention,
- Operative Therapie,
- Radiotherapie,
- Chemotherapie,
- Hormontherapie,
- Gezielte (targeted) Therapie.

Welche Therapieoptionen letztlich zum Einsatz kommen entscheidet sich nach Stadium und Ausmass der Erkrankung und Zielsetzung der Therapie (kurativ vs. palliativ) [19].

Früherkennung und Prävention

Neben der (Selbst-)Tastuntersuchung und der gynäkologischen klinischen Untersuchung kommt vor allem der Mammographie eine große Bedeutung bei der Brustkrebsvorsorge zu, da die Mammographie die Brustkrebs bedingte Mortalität massiv senkt [112]. Als problematisch wird derzeit die damit verbundene Strahlenbelastung [127], die mögliche Überdiagnostik beziehungsweise Übertherapie [30] und die nicht unbedeutende Anzahl falsch-positiver und falsch-negativer Befunde diskutiert [63, 128]. Als Maßnahme der primären Prävention wird Frauen mit familiärer Belastung bzw. BRCA1- oder BRCA2-Genmutation eine bilaterale prophylaktische Mastektomie [81], häufig kombiniert mit einer beidseitigen Salpingo- Oophorektomie (i.d.R. um das 40. Lebensjahr) empfohlen [92, 121]. Eine präventive Chemotherapie ist außerhalb von klinischen Versuchen noch nicht etabliert [135].

Operative Therapie

Die chirurgische Behandlung ist die Therapie der Wahl, unabhängig vom histologischen Subtyp [157]. Grob wird dabei zwischen einer brusterhaltenden Therapie (BET), einer radikalen Mastektomie und einer modifiziert radikalen Mastektomie (MRM) mit oder ohne Lymphknotendissektion unterschieden.

Welches operative Verfahren bei der Tumorentfernung letztlich zum Einsatz kommt, hängt ab von der Größe, Ausdehnung, Invasivität des Tumors und Lymphknotenbefall beziehungsweise Metastasierung [113]. Hiernach richtet sich auch, ob eine prä- beziehungsweise postoperative Chemotherapie oder eine Bestrahlung notwendig ist [19]. Ein wichtiger Bestandteil der operativen Versorgung ist auch die anschließende kosmetische Rekonstruktion [78].

Radiotherapie

Die therapeutische Bestrahlung der Brust wird als adjuvante, d.h. unterstützende Therapie, meist im Anschluss an eine operative Entfernung des Tumors eingesetzt, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Rezidiven zu verringern [66]. Eine Vielzahl von Metaanalysen haben gezeigt, dass die adjuvante Bestrahlung des Tumorbetts am besten geeignet ist, das Rezidivrisiko und die Mortalität zu senken und damit das Gesamtüberleben zu verbessern [98]. Nach dem Ergebnis dieser Studien gibt es aktuell keine Patienten-, bzw. Altersgruppe, die nicht von einer adjuvanten Strahlentherapie profitiert.

Chemotherapie

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen adjuvanter und neoadjuvanter Systemtherapie [19], wobei der Einsatz und der Empfehlungsgrad eines Chemotherapieprotokolls von vielen Einflussfaktoren, wie Alter, Tumorgöße, histologischem Typ bzw. dem histologisches Grading, ER-, PR, EGFR, HER2-Status abhängt [113]. Dabei kommen verschiedene Wirkstoffklassen wie Anthrazykline [118], Taxane [130], Alkylantien [52], Antimetabolite [154], Vinkaalkaloide [58], Platinpräparate [94] und andere Medikamente wie Gemcitabin [83] zum Einsatz. Häufig werden die o.a. Wirkstoffe untereinander oder mit anderen, bspw. antihormonellen Medikamenten kombiniert.

Hormontherapie

Eine Vielzahl der Brustkrebsarten exprimieren Östrogen und Progesteronrezeptoren [7, 131]. Da das Wachstum vieler Brustkrebsarten durch Hormone unterhalten wird, ist es das Ziel dieser Therapieform, die Hormonbildung oder Hormonwirkung zu reduzieren [112] oder gar zu unterbinden. Dies kann zum einen operativ durch Ovarablation [121] erfolgen, da dort Östrogene gebildet werden. Aber auch medikamentöse Therapieformen [114] wie Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (Tamoxifen, Raloxifen) [54, 122, 155] und Aromatase-Inhibitoren (Anastrozol, Exemstan) [73, 74, 122, 155] kommen dabei sowohl in der Prävention als auch in der Therapie zum Einsatz. Da ihre Wirkung von der Expression der entsprechenden Rezeptoren abhängt, sind sie meistens beim Hormonrezeptor-negativen Brustkrebsarten wirkungslos [107].

Gezielte Therapie

Bei der gezielten bzw. *targeted* Therapie kommen Medikamente zum Einsatz, die gegen bestimmte Zielstrukturen in Brustkrebszellen [122] gerichtet sind. Zu ihnen gehören beispielsweise

- Monoklonale Antikörper (Trastuzumab, Pertuzumab) [41]
- Tyrosinkinase-Inhibitoren (Lapatinib) [55]
- Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren (Palbociclib) [35]
- PAPR-Inhibitoren [53].

Ihr erfolgreicher Einsatz ist u.a. abhängig vom Rezeptorstatus [53] und erfolgt als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika.

3 Hypothesen

Mit der vorliegenden Arbeit möchte ich untersuchen, wie sich die Behandlung von Mammakarzinomzellen mit dem Antidiabetikum Metformin, dem Beta-blocker Propranolol und dem Cyclooxygenasehemmer ASS auf ihr Wachstum und ihre Vitalität auswirkt. Hierzu werde ich vier verschiedene epitheliale Mammakarzinomzelllinien (MCF 7, BT 20, MCF 10a und MCF 12a) mit den oben genannten Medikamenten in Form von kommerziellen Reinsubstanzen in jeweils zwei Dosierungen behandeln und deren Effekte auf Zellzerstörung, Zellwachstum und Stoffwechselaktivität messen.

Durch gleichzeitige Testung mit verschiedenen Positiv-, bzw. Negativkontrollsubstanzen, soll dann eine Aussage zur Medikamentenwirkung möglich sein. Hierzu wurde die Wirkung des jeweiligen Lösungsmittels, des Östrogens Östradiol, des SERM Tamoxifen und des Zellgifts Triton, untersucht. Auf dieser Grundlage habe ich folgende Hypothesen aufgestellt:

- Metformin, Propranolol und ASS haben einen signifikanten Einfluss auf Zellzerstörung, Wachstumsverhalten und Stoffwechselaktivität der untersuchten Brustkrebszellen.
- Aufbauend darauf wird die Hypothese vertreten, dass die mit Metformin, Propranolol und ASS behandelten Tumorzellen mehr Zellzerstörung, weniger Zellwachstum und weniger Stoffwechselaktivität zeigen, als unbehandelte Zellen.
- Ferner wird vermutet, dass sich die zytotoxische und antiproliferative Wirkung von Metformin, Propranolol und ASS unabhängig vom Hormonrezeptorstatus beobachten lässt.
- Abschliessend wird die Hypothese vertreten, dass sich die Wirkung jedes Medikaments dosisabhängig signifikant voneinander unterscheidet.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkulturen

Die hier verwendeten humanen Mammakarzinomzelllinien MCF 7, BT 20, MCF 10a und MCF 12a wurden kommerziell bezogen und in standardisierten Nährmedien unter physiologischen Bedingungen (37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂) kultiviert und aufbereitet. Welche Nährmedien und Zusätze jeweils verwendet wurden, zeigt die folgende Übersicht.

Tabelle 1: Liste der Kulturmedien und Zusätze, Quelle: Forschungslabor Universitätsfrauenklinik Rostock (Laborstandard)

Zellen	Medium	Zusätze
MCF 7	DMEM	10 % FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin; 0,5 % Amphotericin B
BT 20	MEM/RPMI	10 % FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin; 0,5 % Amphotericin B
MCF 10a	HAM's	10 % Horse-Serum; 5 % Supplement; 1 % Penicillin/Streptomycin; 0,5 % Amphotericin B
MCF 12a	HAM's	10 % Horse-Serum; 5 % Supplement; 1 % Penicillin/Streptomycin; 0,5 % Amphotericin B

Kultivierung der Zelllinien

Alle zwei Tage führten wir mikroskopische Wachstumskontrollen durch. Das verbrauchte Nährmedium wurde dabei jeweils abgesaugt und durch neues Nährmedium ersetzt. Bei einem Bewuchs des Bodens der Zellkulturflasche von 70 % - 90 % setzten wir die Zellen in eine größere Zellkulturflasche um. Die Zellen mussten zum Entfernen möglicher Proteinanhaftungen mit einer Pufferlösung (PBS) gewaschen werden.

Anschließend erfolgte eine enzymatische Spaltung bzw. Lösung der adhären Zellen vom Boden mittels Trypsin (2-3 ml). Bei Trypsin handelt es sich um ein Enzym, das Proteine spalten kann, indem es die Protein-, bzw. Peptidbindung löst [70]. Hierfür war jeweils eine Inkubationszeit von fünf Minuten bei 37 °C nötig.

Zellzählung

Um annähernd einheitliche und vergleichbare Untersuchungsbedingungen zu schaffen, wurde vor jeder Versuchsreihe eine mikroskopische Zellzählung vorgenommen. Dazu wurde zunächst eine 1:20 Verdünnung der Zellen hergestellt (20 μ l Zellsuspension, 20 μ l Trypanblau und 360 μ l Medium). Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff, der die Membranen toter Zellen durchdringt und diese damit blau färbt, während lebende Zellen weiter hell unter dem Mikroskop erscheinen. Von der so gewonnenen Zellsuspension wurden 20 μ l in eine Zählkammer (Bürker-Kammer) gegeben und dort ausgezählt.

Auf Grundlage der Auszählung wurde die Zellzahl nach folgender Formel rechnerisch ermittelt. Es kamen jeweils 5×10^5 Zellen zum Einsatz.

$$\text{Zellen/ml} = \frac{(\text{gezählte Zellen})}{\text{Fläche (mm}^2) \times \text{Kammertiefe (mm)}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Die hier untersuchten Zellarten unterscheiden sich nicht nur morphologisch, sondern auch hinsichtlich ihrer Rezeptorausstattung [139].

Zu den Mammakarzinomzelllinien im einzelnen.

4.1.1 MCF 7 Zellen

Bei den MCF-7 Zellen handelt es sich um eine Brustkrebszelllinie von einer weißen (kaukasischen) 69-jährigen Frau, die in den 1970er Jahren aus amputiertem Brustgewebe kultiviert wurde [137]. MCF 7 Zellen exprimieren einen Östrogenrezeptor, einen Progesteronrezeptor und den Wachstumsfaktorrezeptor HER2 [152] an ihrer Oberfläche [139].

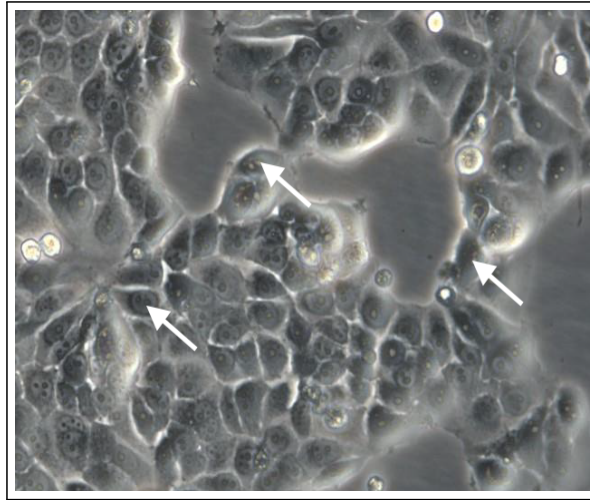


Abbildung 1: MCF 7 Zellen, 20x Vergrößerung, Lichtmikroskopie, exemplarisch wurden einige Zellen mit Pfeilen markiert.

Diese Zellen eignen sich gut für Untersuchungen, da sie einen Östrogenrezeptor besitzen und auf die Behandlung mit Östradiol mit Wachstum reagieren. Morphologisch weisen die Tumorzellen eine asymmetrische Form auf und akkumulieren zu Zellnestern [137]. Die MCF7-Zellen wurden im Medium DMEM (HE Health Care, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und den o.a. Zusätzen kultiviert.

4.1.2 BT 20 Zellen

Die humanen Brustkrebszellen der Linie BT 20 wurden in den 1950er Jahren einer 76-jährigen an Brustkrebs erkrankten Patienten entnommen und kultiviert [14]. Es handelt sich dabei um Brustdrüsenzellen, die Östrogenrezeptornegativ sind, obwohl sie eine Östrogenrezeptor-mRNA exprimieren. Das Wachstum der BT20-Zellen lässt sich durch den Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF alpha) hemmen [100]. Morphologisch ist diese Tumorart eher spindelzellartig. Die BT20-Zellen lassen sich gut mit RPMI heranzüchten.

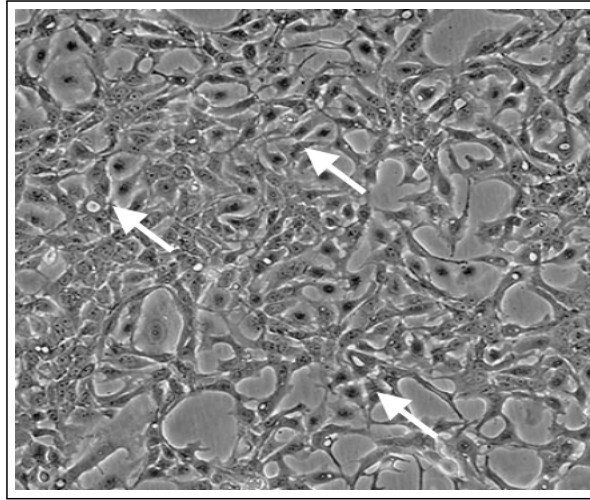


Abbildung 2: BT 20 Zellen, 20x Vergrößerung, Lichtmikroskopie, exemplarisch wurden einige Zellen mit Pfeilen markiert.

4.1.3 MCF 10a Zellen

Die Zellen der MCF-10a Linie stammen von einer 36 Jahre alten, ebenfalls kaukasischen Frau [15]. Dieser epitheliale Tumor ist fibrozystischen Ursprungs [117]. Diese Zellen sind Östrogenrezeptor-negativ, exprimieren an ihre Oberfläche den HER-2 und den EGFR-Rezeptor, ferner lässt sich das Zytokeratin CK5/6 nachweisen [139]. Die Gestalt ist eher polymorph mit teilweise spindelförmigen Enden.

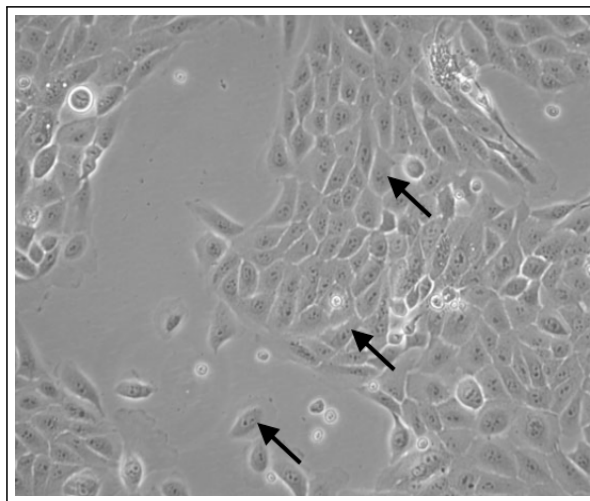


Abbildung 3: MCF 10a Zellen, 20x Vergrößerung, Lichtmikroskopie, exemplarisch wurden einige Zellen mit Pfeilen markiert.

4.1.4 MCF 12a Zellen

Die MCF 12a Zellen sind ebenfalls epithelialen Ursprungs und wurden einer 60 Jahre alten kaukasischen Patientin entnommen [16]. Sie exprimieren an ihrer Oberfläche neben Östrogen-, [62], HER-2-, und EGFR-Rezeptoren, auch Zytokeratin CK5/6 und das Protein Ki-67 [139]. Morphologisch sind sie spindelförmig.

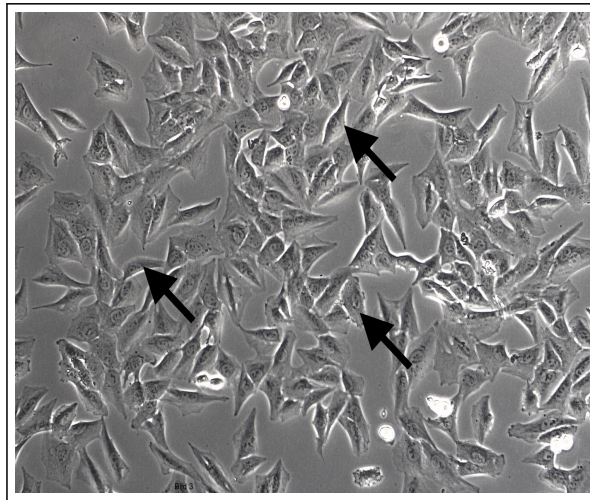


Abbildung 4: MCF 12a Zellen, 20x Vergrößerung, Lichtmikroskopie, exemplarisch wurden einige Zellen mit Pfeilen markiert.

4.2 Reinsubstanzen und Chemikalien

Die verwendeten Reinsubstanzen wurden von der Firma Sigma-Aldrich, München, kommerziell beschafft und vor ihrer Verwendung gelöst. Aus jeder Reinsubstanz setzten wir eine Stammlösung an und lagerten diese bis zur Durchführung der Tests bei $-81\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aus dieser Stammlösung haben wir anschließend eine Verdünnungsreihe hergestellt. Zur Klärung der Frage, ob die gemessenen Effekte tatsächlich auf die verwendeten Substanzen und nicht doch auf das Lösungsmittel zurück zu führen sind, haben wir jeweils vier Wells pro 96er-Wellplatte mit den Lösungsmitteln Aqua dest. und Ethanol behandelt.

4.2.1 Metformin

Das Antidiabetikum Metformin gehört zur Gruppe der Biguanide und wird bei der Behandlung des Typ2-Diabetes T2DM bevorzugt eingesetzt, vor allem wegen seiner Fähigkeit den Blutzuckerspiegel effektiv zu senken [21]. Es führt zu einer Verbesserung des Kohlenhydratumsatzes durch Förderung des Glukosetransports in die Muskelzellen und durch Hemmung von Gluconeogenese, hepatischer Glukoseproduktion und Kohlenhydrataufnahme im Darm [65]. Durch Förderung der Lipolyse führt es auch zu einer Gewichtsreduktion und Senkung der Blutfettwerte, weshalb es häufig verschrieben wird, wenn Lebensstiländerungen (Sport, Ernährung) keinen Erfolg versprechen [91].

Der antitumoröse Effekt des Metformins wird u.a. durch die Aktivierung einer AMPK vermittelt, welche den zellulären Energiestoffwechsel reguliert [106]. Durch die Aktivierung der AMPK hemmt Metformin das Wachstum von Brustkrebszellen, durch Hemmung der Initiation der Translation [96]. Zudem soll es über den AMPK-abhängigen Signalweg zu einer gesteigerten Autophagie (via PI3K) und Apoptose kommen. Hierüber hemmt Metformin auch die Gluconeogenese in den Hepatozyten [77].

In MCF-7 Brustkrebszellen beispielsweise führt Metformin zu einem 30 %-igen Abfall der globalen Proteinsynthese. Darüber hinaus bedingt Metformin einen dosisabhängigen spezifischen Abfall der Translation bis zu 40 %. Der durch Metformin bedingte Abfall der Translationsrate ist u.a. assoziiert mit einer Hemmung der mTOR [60]. Über diesen Stoffwechselweg unterdrückt Metformin vermutlich auch die Überexpression von HER2-Rezeptoren [152]. Ferner wird vermutet, dass Metformin in-vitro einen Zellzyklus-Arrest induziert und die Koloniebildung verhindert [3].

Das Antidiabetikum Metformin (1,1-Dimethylbiguanidhydrochlorid; Sigma-Aldrich, München) haben wir in Aqua dest. gelöst und in Konzentrationen von 7,5 mg/ml (Met I) und 2,5 mg/ml (Met II) verdünnt.

4.2.2 Propranolol

Der unselektive Betablocker Propranolol wird bei Koronarer Herzkrankheit, Angina pectoris, tachykarden Herzrhythmusstörungen, bei Hyperthyreose, bei Angstzuständen und essentiellm Tremor bzw. zur Migräneprophylaxe eingesetzt. An den Beta-1-Rezeptoren des Herzens wirken Betablocker negativ ino-, dromo-, und chronotrop. In der Peripherie an den Beta-2-Rezeptoren der Gefäße führen sie zu einer Tonuserhöhung, weil sie die Dilatation hemmen. Ferner wird die Insulinsekretion des Pankreas, sowie die Glykogenolyse in der Skelettmuskulatur gehemmt [91].

Die antiproliferative Wirkung von Propranolol beruht vor allem auf einer Hemmung der Gefäßneubildung [142] und einer Blockade des sympathischen Nervensystems, da dieses über eine Vielzahl von Mechanismen die Entstehung und den Progress von Brustkrebs begünstigen soll [134]. Auf zellulärer Ebene vermutet man, dass die Stimulation der Krebszellen durch körpereigene Katcholamine, den Einbau von Nukleosiden, wie Thymidin, in die DNA von Tumorzellen fördert, und damit zu einem vermehrten Wachstum von Krebszellen führt [151]. Die Exprimierung von Beta-Adrenergen Rezeptoren in menschlichen Brustkrebszellen ist schon länger beschrieben [120, 150].

Ferner liegt die Vermutung nahe, dass Katecholamine die Krebszellen vor einem programmierten Zelltod (Apoptose) bewahren [129]. Diese antiapoptische Wirkung soll über die cAMP-abhängige Phosphorylierung und Inaktivierung eines pro-apoptotischen Proteins (BAD) vermittelt sein [129]. Aber auch andere Stoffwechselwege werden derzeit diskutiert [12]. Betablocker unterbinden folglich die antiapoptotische Wirkung der Katecholamine. Darüber hinaus vermutet man, dass Propranolol den Glukose-Metabolismus über eine Downregulation der Hexokinase reduziert [90]. Andere Studien zeigten eine verringerte Migration und Invasion von Brustkrebszellen nach Gabe von Betablockern [59].

Als Betablocker wurde Propranolol (Propranolol hydrochlorid; Sigma-Aldrich, München) verwendet, ebenfalls in destilliertem Wasser gelöst und in Konzentrationen von 2,4 mg/ml (Prop I) bzw. 1,2 mg/ml (Prop II) verdünnt.

4.2.3 ASS

Der Cyclooxygenase-, bzw. Thrombozytenaggregationshemmer ASS wird zur Behandlung von Schmerzen und zur Thrombose-, bzw. Embolieprophylaxe eingesetzt. Es dient damit der Prävention zerebraler und koronarer Durchblutungsstörungen. Über die Hemmung der COX führt es zur verminderten Thromboxansynthese. Ferner wirkt es schmerzlindernd (analgetisch), fiebersenkend (antipyretisch) und entzündungshemmend (antiphlogistisch) [91].

Da die Tumorentstehung stark mit chronischen Entzündungsreaktionen assoziiert ist, beruht die antitumoröse Wirkung von ASS auf einer über die Hemmung der COX vermittelten Blockade der Inflammationsreaktion [20]. Auf zellulärer Ebene hat man an Brustkrebszellen zeigen können, dass chemisch leicht verändertes Aspirin einen chemopräventiven Effekt hat, indem es das Zellwachstum hemmt, den Zelltod induziert und über den NF κ B Pathway die Genexpression reduziert [111].

ASS (Acetylsalicylsäure, Sigma-Aldrich, München) lies sich mithilfe des mitgelieferten Verdünnungsmittels Aqua dest. auflösen und zu Konzentrationen von 1,0 mg/ml (ASS I) und 0,5 mg/ml (ASS II) verdünnen.

4.2.4 Tamoxifen

Der Selektive Östrogen Rezeptor Modulator (SERM) Tamoxifen dient der Adjuvanten und Palliativen Behandlung des hormonempfindlichen Mammakarzinoms [54]. SERMs weisen, abhängig vom Zielgewebe, sowohl agonistische, als auch antagonistische Effekte an Östrogerezeptoren auf. So wirkt Tamoxifen am Brustgewebe Östrogen-antagonistisch, während es am Endometrium agonistische Effekte hat und dort zu einer Hyperplasie, zu Polypen oder gar zu Tumoren führen kann. Seine Wirkung auf die Brustkrebszellen ist daher auch proliferationshemmend [91]. Sie haben jedoch auch Nebenwirkungen [23].

Zur Kontrolle bzw. als Referenz jeweils vier Wells/96er-Wellplatte mit Tamoxifen (5,6 mg/ml in Ethanol).

4.2.5 Östradiol

Östradiol gehört zur Gruppe der natürlichen bzw. körpereigenen Östrogene. Es wirkt östrogen-agonistisch und wird daher zur Hormonersatztherapie im Klimakterium oder nach Hysterektomie und bei urogenitaler Atrophie eingesetzt. Im Körper werden Östrogene hauptsächlich im Ovar und der Plazenta gebildet. Sie werden aus Androgenen durch das Enzym Aromatase synthetisiert, wobei zunächst das stärkste endogene Östrogen, Östradiol, entsteht. An den Genitalorganen führt es zu einem vermehrten Wachstum von Vagina, Uterus und Brustdrüse. Extragenital stimuliert Östradiol das Knochenwachstum und die Mineraleinlagerung in den Knochen, weshalb es auch in der Osteoporoseprophylaxe Anwendung findet [91].

Hier dient es als Referenzsubstanz und wurde in einer Konzentration von 2,71 mg/ml in Ethanol gelöst.

4.2.6 Sonstige Chemikalien

Zu den Mammakarzinomzellen wurde das jeweilige Nährmedium (vgl. Tabelle 1) komplettiert mit 10 % inaktiviertem, hormonfreiem fetalem Kalbsserum FKS (Biochrom AG, Berlin), 1 % Penicillin/Streptomycin (GE Health Care, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 0,5 % Amphotericin-B, unter physiologischen Bedingungen (37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂) zugesetzt.

Für die Lyse der Brustkrebszellen wurde das Detergenz Triton X-100 (Ferak Laborat GmbH, Berlin) eingesetzt. Es ist in der Lage Zellen aufzuschließen, indem es Zellmembranen zerstört. Wird die Integrität der Zellmembran zerstört, wird die intrazellulär gelegene LDH freigesetzt. Ihre extrazellulär gemessene Konzentration gilt als Maß der Zellzerstörung. Die unter der Behandlung mit Triton gemessene Konzentration an LDH wurde im Rahmen dieser Arbeit einem Wert von 100 % Zellzerstörung gleichgesetzt.

Für die enzymatische Behandlung bzw. Ablösung der Zellen, beispielsweise zum Passagieren, wurde Trypsin (GE Health Care, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verwendet, da es in der Lage ist, Peptidbindungen zu lösen [70].

Zur Ablösung etwaiger Einweißanhaftungen vor der enzymatischen Behandlung wurde PBS (Invitrogen, England) eingesetzt.

Zum Abstoppen der Substratreaktion bei den hier durchgeführten Testverfahren wurde 1 M Salzsäure (50 µl HCl/Well) bzw. Schwefelsäure (25 µl H₂SO₄/Well), beides von der Fa. Roth, Karlsruhe verwendet.

Um die vitalen von den abgestorbenen Mammakarzinomzellen zu unterscheiden, wurden sie vor der Zellzählung mit 20 µl Trypanblau (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) versetzt.

4.3 Material

Geräte

- Biologische Sicherheitswerkbank (Hera Safe) Klasse II mit Laborfilter/abzug nach EN 2469/2000 der Firma Heraeus Holding GmbH, Hanau (Deutschland)
- Brutschrank (Function Line) mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ und 37 °C Temperatur der Firma Heraeus Holding GmbH, Hanau (Deutschland)
- ELISA Microplate Reader (Madol 680), Firma Bio Rad Laboratories GmbH, München (Deutschland)
- Gefrierschrank (Liebherr Premium) für −20 °C, Firma Liebherr - International AG, Kirchdorf an der Iller (Deutschland)
- Gefrierschrank (ultra low) für −86 °C, Firma Sanyo Biomedical, Wood Dale (USA)
- Labor-Waage (Sartorius BP 2105) der Firma Data Weighing Systems Inc., Elk Grove (USA)
- Lichtmikroskop (Axiovert 40 C) mit Mikroskopkamera (AxioCam MRC) der Firma Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen (Deutschland)
- Multipipette Eppendorf Research, Firma Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)
- pH-Meter (Thermo Scientific Orion 3-Star Plus pH Meter) der Firma Thermo Fisher Scientific Inc., Beverly, MA (USA)
- Vortexer Dreh- und Schwenkvorrichtung (Reax 2000), Firma Heidolph Instruments GmbH und Co. KG, Schwabach (Deutschland)
- Zentrifuge (Biofuge Pico), Firma Heraeus Holding GmbH, Hanau (Deutschland)
- Zentrifuge (Universal 320x), Firma Hettich Holding GmbH und Co. oHG, Kirchzell (Deutschland)
- Zentrifuge (Rotanta / TR), Firma Hettich Holding GmbH und Co. oHG, Kirchzell (Deutschland)

Verbrauchsmaterial

- Zellkulturflaschen (25cm^2 , 75cm^2 , 150cm^2): der Firma TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)
- 96er-Well-Platten und 24er-Well-Platten der Firma TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)
- Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) der Firma TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)
- Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml, 25 ml) der Firma TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)
- Desinfektionsmittel Bacillol AF der Firma Bode Chemie, Hamburg (Deutschland)

4.4 Testverfahren

4.4.1 LDH-Zytotoxizitätstest

Der LDH-Zytotoxizitätstest bestimmt quantitativ den Umfang des Zelluntergangs bzw. des Zelltodes durch Messung der Aktivität der Lactatdehydrogenase im Extrazellularraum bzw. dem Überstand. Nach dem Zelltod geben die Zellen ihren Zellinhalt in das Medium ab. Da die LDH in allen Zellen ubiquitär vorkommt und aufgrund einer Resistenz gegen Proteasen im Nährmedium stabil bleibt, eignet sie sich gut für diese Testmethode. In der lebenden Zelle katalysiert die LDH die Reduktion von Pyruvat in Lactat bei der Glykolyse. Das Coenzym bzw. Reduktionsmittel NAD^+ wird zu NADH/H^+ reduziert [57]. Die Wasserstoffprotonen H/H^+ des NADH/H^+ gehen bei der Umkehrreaktion auf das Tetrazoliumsalz INT (gelb) über, welches zu Formazan (rot) reduziert wird. Am ELISA Lesegerät wird die Menge des entstandenen Formazan photometrisch bestimmt. Seine Menge ist dabei proportional der LDH-Aktivität im Überstand und korreliert mit der Menge der abgestorbenen Zellen. Für die LDH-Zytotoxizitätstests wurde das Zytotoxizität Detection Kit (LDH) der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Deutschland) verwendet [125].

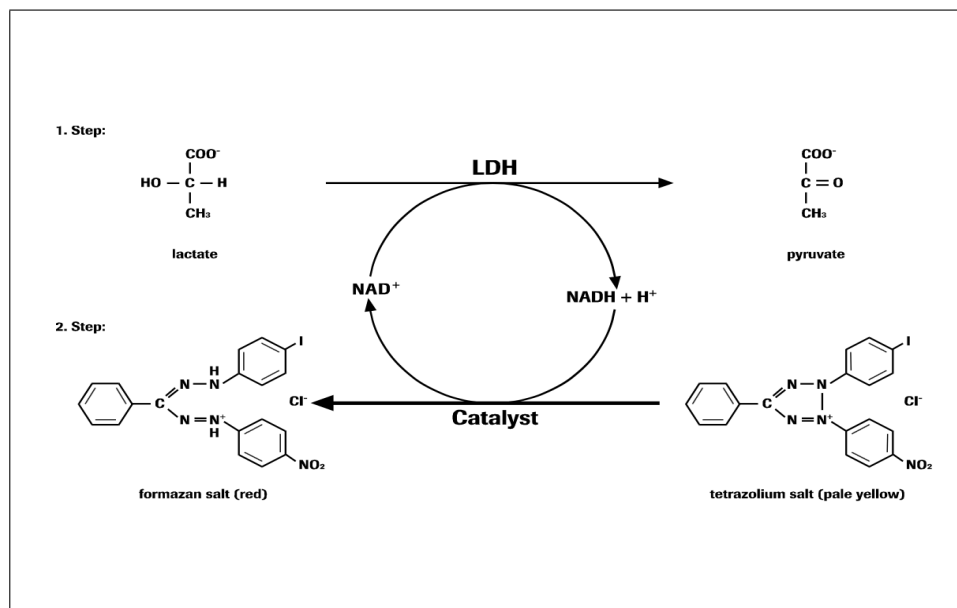


Abbildung 5: LDH Test Funktionsprinzip, Erläuterungen Step 1: Die freigesetzte LDH reduziert NAD^+ zu NADH/H^+ durch Oxidation von Laktat zu Pyruvat. Step 2: Durch einen Katalysator werden 2 H^+ Ionen von NADH/H^+ auf das INT (gelb) übertragen, welches dadurch zu Formazan (rot) wird. Dieser Farbumschlag wird photometrisch gemessen [125].

Durchführung

- Zellzählung und Aussaat der Zellen in 96er-Well-Platten und anschließende Inkubation für 24 Stunden
- Entfernung des Mediums mit 10 %-igem FKS und erneute Zugabe von 1 %-igem FKS-Nährmedium
- Anschließend Zugabe von 2 μl Extrakt/Well, Inkubation für 24 Stunden
- Zusätzlich wurden die Positivkontrollen mit Triton und Tamoxifen den Zellen versetzt. Der Effekt nach Zugabe von Triton entspricht daher der maximal durch Lyse freigesetzten Menge an LDH.
- Als Negativkontrolle zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse dienten die Zellen im Medium zuzüglich des jeweiligen Lösungsmittels, sowie Zellen, denen Östradiol zugesetzt wurde.
- Nach Inkubation Abpipettieren von 100 μl Überstand/Well in eine neue Wellplatte
- Zugabe von 100 μl Reaktionsgemisch je Well und Inkubation für 30 Minuten bei Dunkelheit
- Abstoppen der Reaktion mit 1 M Salzsäure 25 μl HCl/Well
- Photometrische Messung am ELISA-Reader mit 490 nm
- Datenauswertung mit dem Program Microplate Manager

Berechnung

Das Maß der Zellzerstörung wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$X [\%] = \frac{(Absorption\ Probe) - (Absorption\ Negativkontrolle)}{(Absorption\ Positivkontrolle) - (Absorption\ Negativkontrolle)} \times 100$$

Als Positivkontrolle diente Triton. Als Negativkontrolle wurden 200 μl Medium + Zellen/Well verwendet [125]. Als weitere Positivkontrolle wurde Tamoxifen, und als weitere Negativkontrolle Östradiol eingesetzt.

4.4.2 BrdU-Zellproliferationstest

Der BrdU-Zellproliferationstest dient der Beurteilung des Zellwachstums der behandelten Brustkrebszellen. Er basiert auf der Tatsache, dass es in lebenden bzw. proliferierenden Zellen zu Zellteilungen und damit zur Synthese von DNA während der Mitose kommt. Durch den Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU) anstelle des Thymidin in die neusynthetisierte DNA können lebende bzw. proliferierende Zellen nachgewiesen werden [76].

Nach Zugabe der BrdU-Lösung zu den mit den Testsubstanzen behandelten Zellen erfolgt die Fixierung und die Denaturierung der DNA mittels sog. FixDenat. Dies ermöglicht später das Angreifen des Test-Antikörpers, der das inkorporierte BrdU detektieren soll. Nach Zugabe des spezifischen Antikörpers (Anti-BrdU-POD) bindet dieser nach einer Inkubationszeit von 30-120 Minuten an das Thymidinanalogon. Da dieser Antikörper an eine Peroxidase gekoppelt ist, löst der dabei entstehende Immunkomplex in einem speziellen Substrat (Tetramethylbenzidin) eine Farbreaktion (Blaufärbung) aus, die später photometrisch gemessen werden kann, nachdem die Farbreaktion durch Schwefelsäure abgestoppt wurde (Gelbfärbung). Hierbei wurde das Cell proliferation BrdU Assay-Test Kit der Firma Roche verwendet [126].

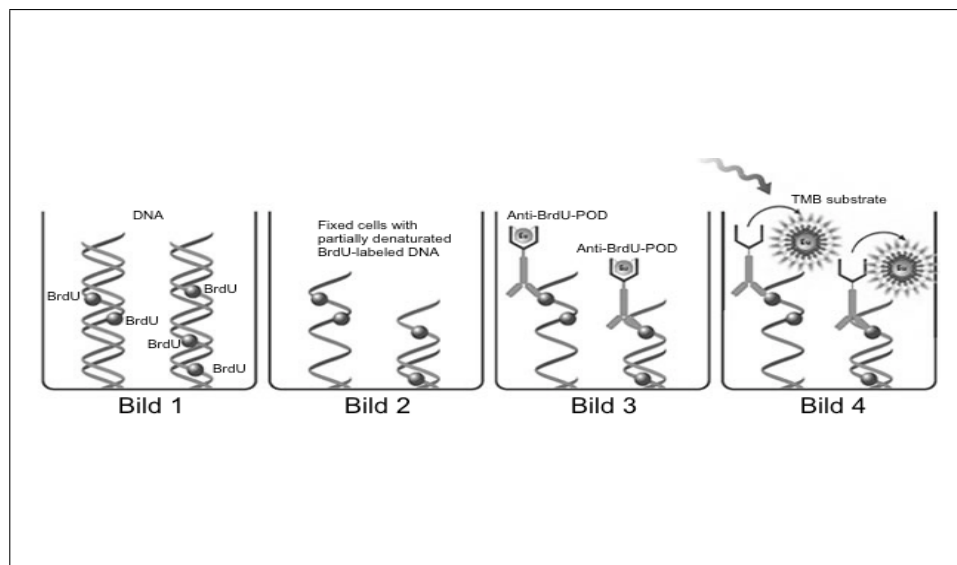


Abbildung 6: BrdU Test Schematische Darstellung der Testabschnitte, Erläuterungen Bild 1: Einbau von BrdU, anstelle von Thymidin in die DNA, Bild 2: Fixierung und Denaturierung, Bild 3: Zugabe spezifischer Antikörper mit Peroxidase (Anti-BrdU-POD), Bild 4: Zugabe von Substrat (TMB) und Farbreaktion mit Peroxidase, welche photometrisch gemessen wird [126].

Durchführung

- Zellzählung und Aussaat der Zellen in 96er-Well-Platten und anschließende Inkubation für 24 Stunden
- Zugabe der Extrakte in zwei verschiedenen Konzentrationen.
- Zusätzlich wurden als Positiv-, bzw. Negativkontrollen Tamoxifen und Östradiol den Zellen zugegeben, sowie unbehandelte Zellen mit Medium ausgesät.
- Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse wurden jeweils vier Wells pro Platte ohne Antikörperzugabe, als Negativ-, bzw. Background-Kontrolle ausgesät. Dieser Background ist nötig, um eine eventuell unspezifische Bindung des BrdU an die Well-Platten zu prüfen.
- Nach einer Inkubation von weiteren 24 Stunden erfolgt die Zugabe der BrdU-Lösung (10 μ l /Well Extrakt bzw. Kontrollen), Inkubation für 3 Stunden
- Fixierung und Denaturierung mittels 200 μ l FixDenat/Well, Inkubation für 30 Minuten
- Entfernen des FixDenat durch Ausklopfen der Well-Platten
- Zugabe der Antikörperlösung 100 μ l Anti-BrdU-POD/Well, Inkubation für 30 - 120 Minuten
- Mehrmaliges Waschen mittels Waschlösung
- Zugabe der Substratlösung 100 μ l TMB/Well
- Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure 25 μ l (H_2SO_4)/Well
- Photometrische Messung am ELISA-Reader mit 450 nm- 620 nm
- Datenauswertung mit dem Program Microplate Manager

Berechnung

Das Maß der Zellproliferation wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellproliferation} [\%] = \frac{\text{Absorption Probe}}{\text{Absorption Negativkontrolle}} \times 100$$

Als Negativkontrolle wurden 100 μ l Medium + Zellen/Well verwendet [126].

4.4.3 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemischen Untersuchung der Zellen wurde geprüft, ob die verwendeten Mammakarzinomzelllinien die Östrogenrezeptoren ER α und ER β und den Progesteronrezeptor PR exprimieren. Wie bereits oben dargestellt ist der Nachweis des Östrogen-, bzw. des Progesteronrezeptors bei Mammakarzinomzellen ein wichtiger Prognosefaktor. Diese Untersuchung ist daher klinisch, vor allem in Hinblick auf die Wirksamkeit einer Antihormonellen Therapie, bedeutsam. Die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus funktioniert nach dem Prinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion [153]. Die Zielstruktur wird dabei mithilfe eines farbstoffmarkierten Antikörpers sichtbar gemacht. Hierbei sind bereits kleinste Mengen der Probe ausreichend.

Durchführung

- Aussaat von 300 μ l Zellsuspension/Well mit 200.000 Zellen/ml in 12er bzw. 24er-Well-Platten und anschließende Inkubation für 48 Stunden (37 °C, wasserdampfgesättigte Atmosphäre mit 5 % CO₂)
- Medium vom Objektträger dekantieren und Fixierung der Zellen mit 4 % Formalin, 20-minütiges Einwirken
- Anschließend folgt ein 3-maliger Waschvorgang mit 300 μ l PBS
- Danach Zellen mit 0,3 % H₂O₂ versetzen, um die Peroxidase zu hemmen (Inkubationsdauer war 30 min). Dann wieder 3x gespült mit PBS
- Gabe von Normalserum und mindestens 20-minütige Inkubation, sodann Normalserum abpipettieren und ohne Waschvorgang Zugabe von 100 μ l primären Antikörpern auf die Proben (Mouse anti-human ER α /ER β / PR) und Inkubation für 24 Stunden bei 4 °C
- Dekantieren des Primärantikörpers, 3-maliges Spülen mit PBS und Gabe davon 200 μ l Sekundärantikörper, anschließend Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Mehrmaliges Waschen mit 300 μ l PBS/Well
- Zugabe von 200 μ l Farbstoffs/Well (LineRed) und Inkubation für 5-30 Minuten im Dunkeln
- Farbstoff entfernen und Abstoppen der Reaktion mit Leitungswasser
- Mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation [153]

Auswertung

Die Intensität korreliert direkt mit der Dichte des jeweils untersuchten Rezeptors. Ein Farbumschlag ist in der vorliegenden Arbeit gleichbedeutend mit dem Vorhandensein von Rezeptoren, während eine fehlende Farbreaktion gegen das Vorliegen des jeweiligen Rezeptors spricht. Diese Vereinfachung ist deshalb möglich, da der verwendete Test sehr sensitiv ist. Die Auswertung der Farbreaktion erfolgte visuell mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops und anschließender fotografischer Dokumentation [153].

4.4.4 Metabolismus der Zellen

Glukose

Krebszellen haben einen veränderten Metabolismus [156], der u.a. durch eine erhöhte Glukoseaufnahme, einen erhöhten Kohlenhydratumsatz und eine vermehrte Bildung von Lactat gekennzeichnet ist [86]. Letzteres ist dadurch bedingt, da die Glukoseaufnahme teilweise ungeachtet von der Sauerstoffverfügbarkeit erfolgt und damit einen anaeroben Stoffwechselweg notwendig macht. Durch diesen metabolischen Schritt kommt zur Bildung von Lactat und einem damit einhergehenden sauren Milieu [105]. Dieser angepasste Stoffwechsel ermöglicht den Krebszellen ein vergleichsweise schnelleres Proliferationsverhalten [11].

Die Messung der Glukosekonzentration der Lösung kann Aufschluss über die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen geben. Niedrige Konzentrationen an Glukose im Überstand können ein Indiz für einen hohen Glukoseverbrauch und eine damit einhergehende hohe Stoffwechselaktivität der Zellen sein. Während hohe extrazelluläre Konzentrationen für eine geringe Stoffwechselaktivität sprechen.

Die hier untersuchten Zellen bezogen die Glukose aus dem umgebenden Nährmedium, weshalb die Glukosekonzentration im Medium ohne Substratzugabe als Ausgangswert für die Beurteilung des Verbrauchs herangezogen wurde. Die Messung der Glukosekonzentration erfolgte nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Substraten und Kontrollsubstanzen im abpipettierten Überstand. Hierzu wurde das Glukosemessgerät Biosen 5140 der EKF Diagnostics GmbH, Magdeburg benutzt.

pH-Wert

Der pH-Wert ist definiert als der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffprotonenkonzentration (H^+) eines Mediums; er ist eine dimensionslose Zahl zwischen 0 und 14. Physiologisch liegt der pH-Wert des Blutes bei ca. 7,4. Abweichungen nach oben werden als Alkalose, und Abweichungen

nach unten als Azidose bezeichnet [109]. Intrazellulär liegt der pH-Wert aktiver, d.h. am Metabolismus teilnehmender, Zellen etwas niedriger (ca. pH 7,0 - 7,2), da beim Zellstoffwechsel häufig H^+ -Ionen anfallen, die erst über aktive Transportmechanismen nach extrazellulär befördert werden müssen. Somit kann der pH-Wert als Indiz für die Stoffwechselaktivität von Zellen herangezogen werden. Dies aber nur in sehr engen Grenzen, da die Aktivität von Enzymen, Ionenkanälen und Proteinen der Signaltransduktion vom Ladungszustand und damit vom pH-Wert abhängig ist [45].

Dabei gilt vereinfacht der Zusammenhang, dass ein niedriger pH-Wert für mehr Stoffwechselaktivität in den Tumorzellen spricht, da es im Rahmen des erhöhten Glukoseumsatzes teilweise auch zu einer anaeroben Energiegewinnung kommt, bei der Laktat anfällt [86, 105, 156].

Die Messung des pH-Werts wurde einmal für jede Zelllinie durchgeführt. Dazu wurde jede Mammakarzinomzelllinie auf je einer 96er-Well-Platte ausgesät und wie beim LDH-Test mit den Medikamenten und Kontrollsubstanzen beimpft. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit erfolgte die Messung elektrochemisch mithilfe des pH-Meters Orion 3-Star Plus (Firma Thermo Fisher Scientific Inc.). An der Glaselektrode des pH-Meters bildet sich, abhängig von der Konzentration der Wasserstoffionen ein elektrisches Potential aus, was gemessen und letztlich als pH-Wert angezeigt wird. Zum Eichen der Glaselektrode diente eine Kontrolllösung mit dem pH-Wert von 7,0 [67].

4.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Überprüfung der gewonnenen Ergebnisse habe ich die Programme GraphPad Prism 7 [75] und Microsoft Office Excel genutzt.

Bei jeder Testreihe wurden jeweils vier Wells mit den Proben beimpft. Wir wiederholten die Testreihen mehrmals, d.h. mindestens viermal pro Zelllinie und Reinsubstanz, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Die beim Proliferations-, und Zytotoxizitätstest entstandenen Extinktionsdaten wurden sodann gemittelt und auf der Grundlage der oben genannten mathematischen Gesetzmässigkeiten (s.o.) ein Zytotoxizitäts-, bzw. und Zellproliferationsmaß berechnet.

Die so gewonnenen Daten prüften wir zunächst dahingehend, ob sie statistisch normalverteilt sind. Wenn dies der Fall war, erfolgte die weitere Auswertung unter Verwendung eines gruppenvergleichenden parametrischen t-Tests. Dabei wurde die jeweils untersuchte Substanz, mit der jeweiligen Referenzprobe dahingehend verglichen, ob die Unterschiede in den Daten der verglichenen Gruppen auch signifikant waren. Hierbei galten Vergleiche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von $> 0,05$ als nicht signifikant. Vergleiche, mit einem Ergebnis von $p < 0,05$ sind als signifikant, mit $p < 0,01$ als stark signifikant und Vergleiche mit $p < 0,001$ als hochsignifikant definiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) 0,05 - 0,1 kann höchstens von einem Trend gesprochen werden. Bei Varianzhomogenität kam ein Korrekturtest (bspw. Welch-Korrektur) zur Anwendung. Lag keine Gauss-Verteilung vor, wurde eine nichtparametrischer Gruppenvergleichstest (bspw. Mann-Whitney-Test) gewählt.

Zur Darstellung der Ergebnisse haben wir die Mittelwerte der Negativ-, bzw. Positivkontrollen einem Wert von 100 % gleichgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 LDH-Zytotoxizitätstest

Der LDH-Test als Maß für die Zellzerstörung wurde mit folgenden Ergebnissen getrennt nach Zelllinien durchgeführt. Als Referenzwert für das Maß der Zellzerstörung wurde hierbei, die durch das Zellgift Triton gemessene LDH-Freisetzung einem Wert von 100 % gleichgesetzt.

MCF 7

Bei der Applikation des Biguanid-Derivats *Metformin* zeigte sich in beiden Dosierungen 7,5 mg/ml (Mittelwert Zytotoxizität [%] Met I -30.88 ± 9.877 vs. M+Z 50.91 ± 3.191 , $p < 0,0001$ ungepaarter t-Test) bzw. 2,5 mg/ml (Mittelwert Zytotoxizität [%] Met II -33.30 ± 10.02 vs. M+Z 50.91 ± 3.191 , $p < 0,0001$ ungepaarter t-Test) ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Der Unterschied war jedoch entgegen der Erwartungen derart ausgeprägt, dass sich bei den unbehandelten Zellen mehr LDH-Freisetzung, sprich mehr Zellzerstörung zeigte, als bei den mit Metformin behandelten Zellen. Dadurch ergab sich rechnerisch und graphisch ein negatives Vorzeichen. Zwischen beiden Konzentrationen war aber kein signifikanter Unterschied in der Wirkung festzustellen (Mittelwert Zytotoxizität [%] Met I -30.88 ± 9.877 vs. Met II -33.30 ± 10.02 , $p = 0,8643$ ungepaarter t-Test).

Die Gabe des nicht-kardioselektiven Betablockers *Propranolol* zeigte in der hohen Dosierung (2,4 mg/ml) einen signifikanten Unterschied in der LDH-Freisetzung/Zellzerstörung (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop I -51.81 ± 11.86 vs. M+Z 50.91 ± 3.191 , $p < 0,0001$ ungepaarter t-Test), der jedoch geringer ausgeprägt war, als bei den unbehandelten Zellen. In der niedrigeren Dosierung (1,2 mg/ml) war der Unterschied ebenfalls signifikant (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop II 4.934 ± 7.785 vs. M+Z 50.91 ± 3.191 , $p < 0,0001$ ungepaarter t-Test). Zwischen beiden Konzentrationen sahen wir signifikante Unterschiede (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop I -51.81 ± 11.86 vs. Prop II 4.934 ± 7.785 , $p = 0,0005$ ungepaarter t-Test).

Bei der Behandlung der MCF 7 Zellen mit dem Cyclooxygenasehemmer *ASS* war in beiden Konzentrationen ein signifikanter Unterschied zur Vergleichsprobe festzustellen. Bei 1,0 mg/ml (Mittelwert Zytotoxizität [%] ASS I -30.05 ± 7.843 vs. M+Z 50.91 ± 3.191 , $p < 0,0001$ ungepaarter t-Test) war der Zusammenhang aber ebenso gegenläufig zu der Hypothese wie bei 0,5 mg/ml (Mittelwert Zytotoxizität [%] ASS II -35.14 ± 8.584 vs. M+Z 50.91 ± 3.191 , $p < 0,0001$ ungepaarter t-Test). Im Vergleich beider Konzentrationen kein signifikanter Unterschied (Mittelwert Zytotoxizität [%] ASS I -30.05 ± 7.843 vs. ASS II -35.14 ± 8.584 , $p = 0,6645$ ungepaarter t-Test).

Auch beim Östrogen *Östradiol* (2,71 mg/ml) war der Unterschied zwar signifikant (Mittelwert Zytotoxizität [%] Estr -31.78 \pm 8.844 vs. M+Z 50.91 \pm 3.191, $p < 0,0001$ ungepaarter t-Test), aber zeigte weniger Zellzerstörung.

Die als Kontrollsubstanzen verwendeten Stoffe *Tamoxifen* (Mittelwert Zytotoxizität [%] Tam 135.8 \pm 21.50 vs. M+Z 50.91 \pm 3.191, $p = 0,0013$ ungepaarter t-Test) und *Triton* (Mittelwert [%] Trit 1,0 \pm 0.0 vs. M+Z 50.91 \pm 3.191, $p < 0,0001$ ungepaarter t-Test) zeigten eine signifikant vermehrte LDH-Freisetzung. Erstaunlicherweise war dieser Effekt beim Tamoxifen noch stärker ausgeprägt, als bei der Kontrollsubstanz Triton; der Unterschied zwischen Tamoxifen und Triton war aber nicht signifikant (Mittelwert [%] Tam 135.8 \pm 21.50 vs. Trit 1,0 \pm 0.0, $p = 0,1170$ ungepaarter t-Test).

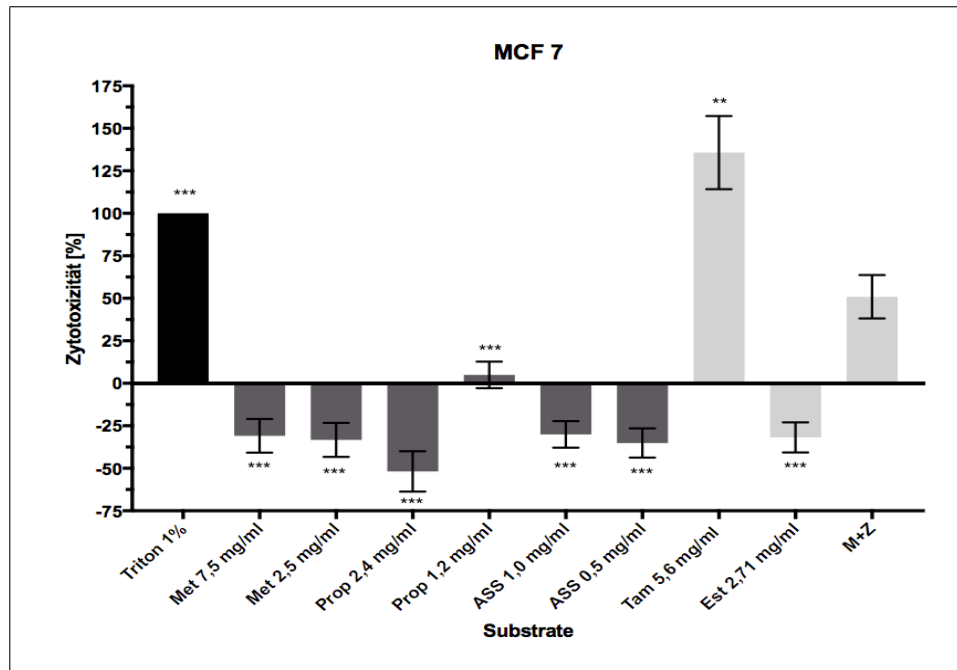


Abbildung 7: LDH Zytotoxizitätstest MCF 7, Mittelwert + SEM; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit * gekennzeichneten Proben wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (M+Z) auf; bei ** stark signifikante Unterschiede ($p < 0.01$); bei *** hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$).

BT 20

Nach *Metformin* Gabe zeigte sich in beiden Konzentrationen ein signifikanter Unterschied in der LDH-Freisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Median Zytotoxizität [%] Met I 16.05 vs. M+Z 51.38, $p < 0,0001$ Mann Whitney Test, bzw. Met II 4.175 vs. M+Z 51.38, $p < 0,0001$ Mann Whitney Test). Zwischen beiden Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede (Median Zytotoxizität [%] Met I 16.05 vs. Met II 4.175, $p = 0,5686$ Mann Whitney Test).

Bei *Propranolol* sahen wir in der hohen Dosierung (2,4 mg/ml) einen signifikanten Unterschied in der LDH-Freisetzung (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop I 3.083 ± 28.04 vs. M+Z 77.67 ± 12.35 , $p = 0,0235$ ungepaarter t-Test). In der niedrigeren Dosierung (1,2 mg/ml) war der Unterschied nicht signifikant (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop II 45.66 ± 19.83 vs. M+Z 77.67 ± 12.35 , $p = 0,1822$ ungepaarter t-Test). Die zytotoxische Wirkung der niedrigen Konzentration war im Trend stärker ausgeprägt, als in der hohen Dosierung (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop I 3.083 ± 28.04 vs. Prop II 45.66 ± 19.83 , $p = 0,225$ ungepaarter t-Test).

ASS führt unabhängig von der Konzentration zu signifikanten Unterschieden in der Zellzerstörung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Mittelwert Zytotoxizität [%] ASS I 6.934 ± 13.35 vs. M+Z 77.67 ± 12.35 , $p = 0,0005$ ungepaarter t-Test, bzw. ASS II 7.481 ± 10.81 vs. M+Z 77.67 ± 12.35 , $p = 0,0002$ ungepaarter t-Test). Die Beziehung ist aber entgegengesetzt zur Hypothese; ASS führt zu insgesamt zu weniger LDH-Freisetzung.

Erwartungsgemäß sah man bei der Positivkontrolle mit *Tamoxifen* eine signifikant vermehrte LDH-Freisetzung (Median Zytotoxizität [%] Tam 98.11 vs. M+Z 51.38, $p = 0,0447$ Mann Whitney Test). Auch *Triton* führte zu diesem Effekt (Median Zytotoxizität [%] Trit 100 vs. M+Z 51.38, $p = 0,0040$ Mann Whitney Test). Bei Behandlung mit dem Östrogen *Östradiol* war, wie vorhergesagt, eine signifikant verringerte LDH-Freisetzung zu beobachten (Mittelwert Zytotoxizität [%] Estr 18.56 ± 10.68 vs. M+Z 77.67 ± 12.35 , $p = 0,0235$ ungepaarter t-Test).

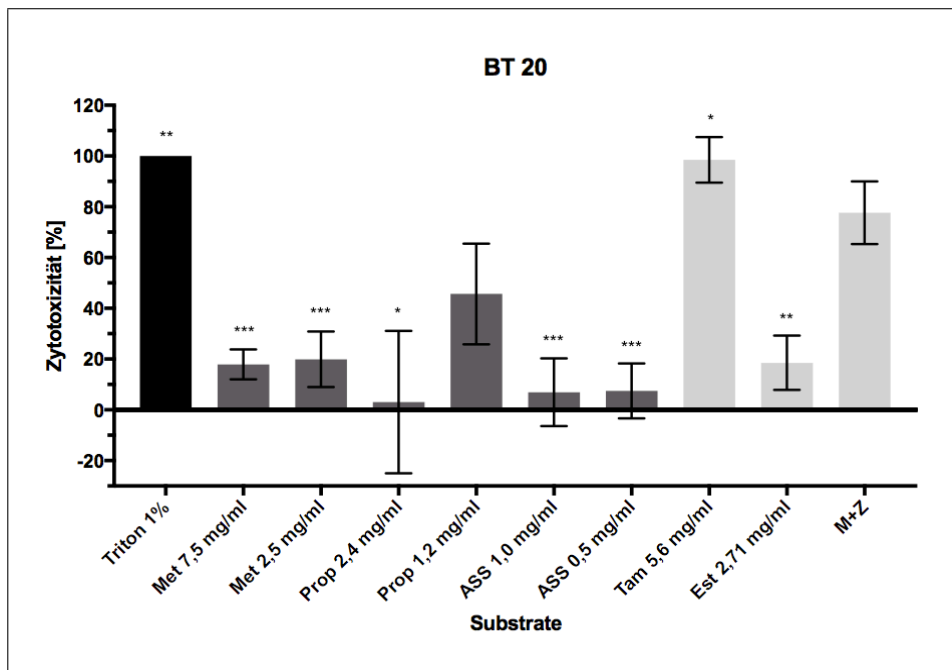


Abbildung 8: LDH Zytotoxizitätstest BT 20, Mittelwert + SEM; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit * gekennzeichneten Proben wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (M+Z) auf; bei ** stark signifikante Unterschiede ($p < 0.01$); bei *** hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$).

MCF 10a

Bei Behandlung mit *Metformin* in beiden Konzentrationen signifikant verminderte LDH-Freisetzungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Median Zytotoxizität [%] Met I 5.072 vs. M+Z 24.81, $p < 0,0001$ Mann Whitney Test, bzw. Met II 4.549 vs. M+Z 24.81, $p < 0,0001$ Mann Whitney Test). Zwischen den Konzentrationen kein signifikanter Unterschied (Median Zytotoxizität [%] Met I 5.072 vs. Met II 4.549, $p = 0,7441$ Mann Whitney Test).

Bei *Propranolol* in der hohen Konzentration geringere LDH-Freisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Median Zytotoxizität [%] Prop I 8.368 vs. M+Z 24.81, $p = 0,0200$ Mann Whitney Test). Die niedrigere Konzentration brachte im Trend eine vermehrte LDH-Freisetzung (Median Zytotoxizität [%] Prop II 46.66 vs. M+Z 24.81, $p = 0,2047$ Mann Whitney Test), die jedoch nicht signifikant war.

Bei ASS in beiden Konzentrationen signifikante Unterschiede in der LDH-Freisetzung (Median Zytotoxizität [%] ASS I 3.969 vs. M+Z 24.81, $p < 0,0001$ Mann Whitney Test, bzw. ASS II 1.487 vs. M+Z 24.81, $p < 0,0001$ Mann Whitney Test), jedoch geringer, als bei den unbehandelten Zellen und ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Dosierungen.

Erwartungsgemäß sah man bei der Positivkontrolle mit *Tamoxifen* eine signifikante Zytotoxizität (Median Zytotoxizität [%] Tam 105.4 vs. M+Z 24.81, $p < 0,0001$ Mann Whitney Test). Auch *Triton* zeigte diesen Effekt (Median Zytotoxizität [%] Trit 100 vs. M+Z 24.81, $p < 0.0001$ Mann Whitney Test). Bei Behandlung mit der Negativkontrolle *Östradiol* war eine signifikant verringerte LDH-Freisetzung zu beobachten (Median Zytotoxizität [%] Estr 11.31 vs. M+Z 24.81, $p = 0,0070$ Mann Whitney Test).

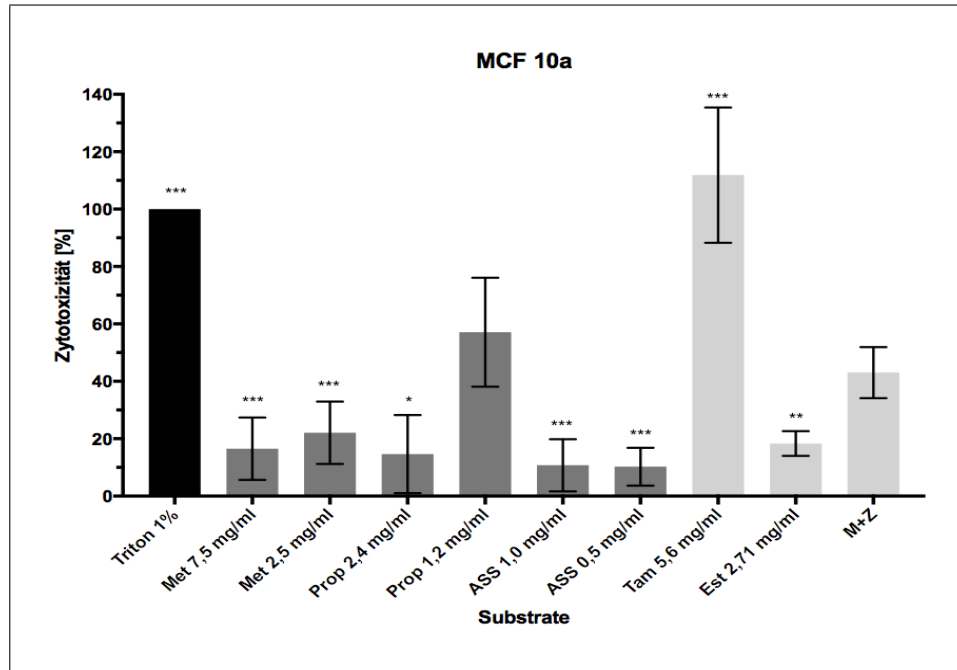


Abbildung 9: LDH Zytotoxizitätstest MCF 10a, Mittelwert + SEM; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit * gekennzeichneten Proben wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (M+Z) auf; bei ** stark signifikante Unterschiede ($p < 0.01$); bei *** hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$).

MCF 12a

Nach *Metformin* Applikation war in der hohen Konzentration eine signifikant verschiedene LDH-Freisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festzustellen (Median Zytotoxizität [%] Met I 15.58 vs. M + Z 31.70, $p = 0,0433$ Mann Whitney Test). In der geringeren Konzentration keine signifikante Veränderung (Mittelwert Zytotoxizität [%] Met II 35.08 ± 7.917 vs. M+Z 56.67 ± 11.27 $p = 0.0320$ ungepaarter t-Test). In beiden Konzentrationen war die Zytotoxizität jedoch unterhalb der unbehandelten Zellen.

Propranolol führte hochdosiert (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop I 50.16 ± 16.26 vs. M+Z 56.67 ± 11.27 $p = 0,7442$ ungepaarter t-Test) und niedrigdosiert (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop II 69.82 ± 14.22 vs. M+Z 56.67 ± 11.27 $p = 0,4731$ ungepaarter t-Test) nicht zu signifikanten Zytotoxizitäten. Zwischen beiden Konzentrationen gab es auch keine signifikanten Unterschiede (Mittelwert Zytotoxizität [%] Prop I 50.16 ± 16.26 vs. Prop II 69.82 ± 14.22 $p = 0,3684$ ungepaarter t-Test).

Sowohl beim *ASS* 1,0 mg/ml (Median Zytotoxizität [%] ASS I 8.342 vs. M + Z 31.70, $p = 0,0010$ Mann Whitney Test), als auch bei *ASS* 0,5 mg/ml (Median Zytotoxizität [%] ASS II 4.058 vs. M + Z 31.70, $p < 0.0001$ Mann Whitney Test) war keine signifikante Zellzerstörung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu beobachten.

Die Positivkontrolle *Tamoxifen* zeigte bei MCF 12a keine signifikant vermehrte Zellzerstörung (Mittelwert Zytotoxizität [%] Tam 57.88 ± 19.01 vs. M+Z 56.67 ± 11.27 $p = 0,9569$ ungepaarter t-Test). *Triton* erwartungs- und definitionsgemäß 100 prozentige LDH-Freisetzung, welche gegenüber den unbehandelten Zellen dieser Reihe auch signifikant war. (Median Zytotoxizität [%] Trit 100 vs. M + Z 31.70, $p = 0,0014$ Mann Whitney Test). Bei *Östradiol* signifikant verringerte LDH-Freisetzung (Median Zytotoxizität [%] Estr 5.236 vs. M + Z 31.70, $p < 0.0001$ Mann Whitney Test).

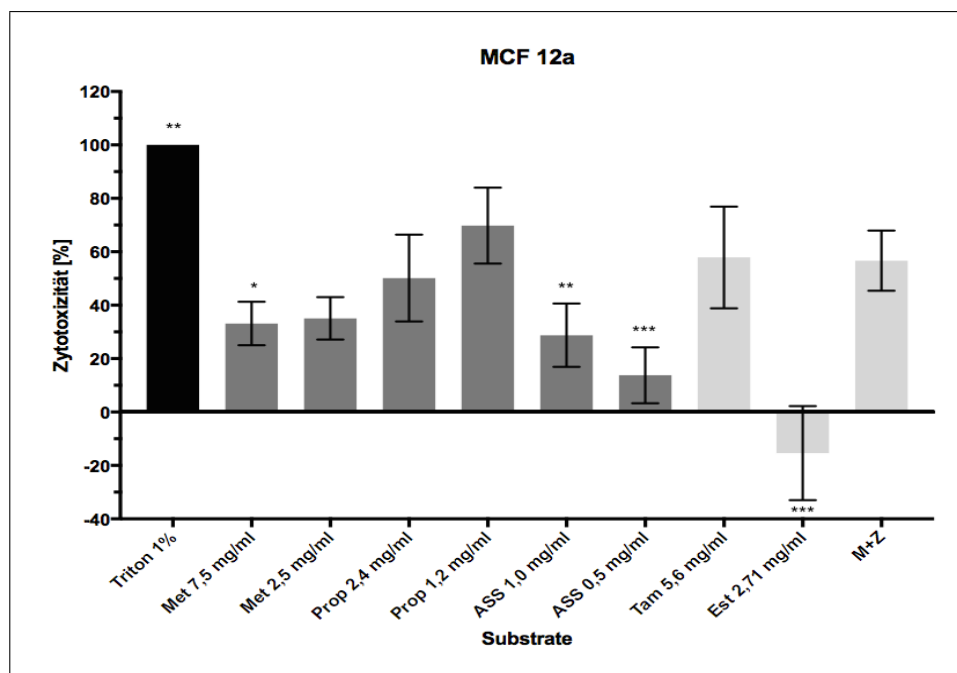


Abbildung 10: LDH Zytotoxizitätstest MCF 12a, Mittelwert + SEM; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit * gekennzeichneten Proben wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (M+Z) auf; bei ** stark signifikante Unterschiede ($p < 0.01$); bei *** hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$).

Fazit aller genutzten Zelllinien

Das verdünnte *Propranolol* 1,2 mg/ml zeigte in allen Mammakarzinomzelllinien eine zytotoxische Wirkung (MCF 12a > MCF 10a > BT 20 > MCF 7), die jedoch nur in der MCF7-Reihe signifikant war. Danach war in den Zelllinien aus MCF 7 das *Metformin* am wirkungsstärksten 2,5 mg/ml (MCF 12a > MCF 10a > BT 20), bei 7,5 mg/ml (MCF 12a > BT 20 > MCF 10a). Die schwächste zytotoxische Wirkung sahen wir bei *ASS* 1,0 mg/ml (MCF12a > MCF 10a > BT 20), *ASS* 0,5 mg/ml (MCF 12a > MCF 10a > BT 20) und *Propranolol* 2,4 mg/ml (MCF 12a > MCF 10a > BT 20).

Durch alle Zelllinien hinweg war bei der Positivkontrolle mit *Tamoxifen* die ausgeprägteste zytotoxische Wirkung zu beobachten (MCF 7 > MCF 10a > BT 20 > MCF 12a).

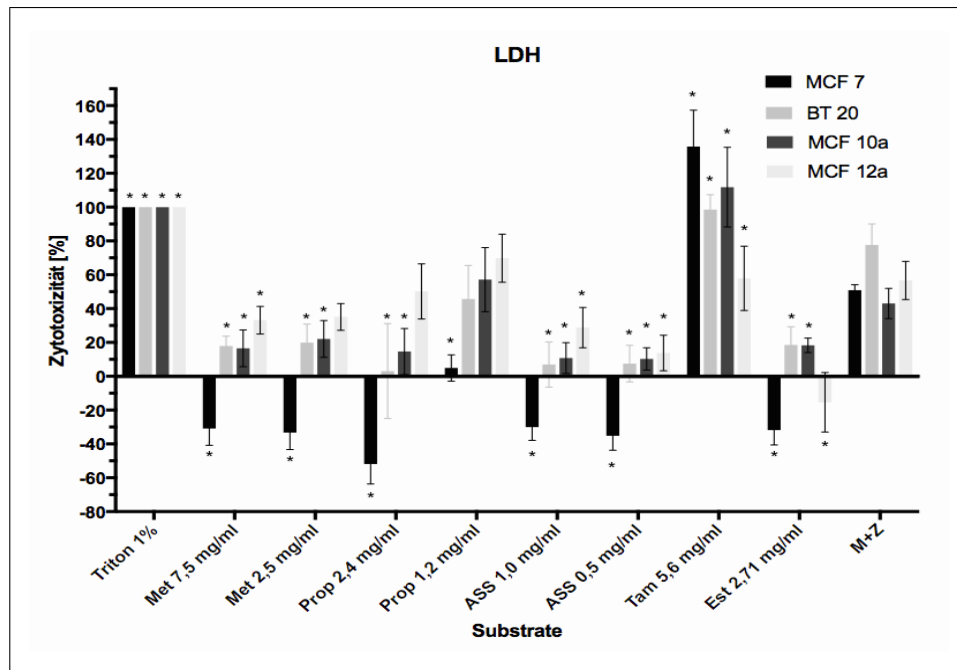


Abbildung 11: LDH Zytotoxizitätstest Gesamtübersicht, Mittelwert + SEM; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit * gekennzeichneten Proben wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (M+Z) auf.

5.2 BrdU-Zellproliferationstest

Als Referenzwert galt hier das Wachstum der Zellen im Medium. Die in diesen Wells gemessene Absorption wurde einem Wert von 100 % gleichgesetzt. Die ermittelten Werte stehen in Relation zu diesem Referenzwert.

MCF 7

Nach *Metformin* Gabe zeigte sich in beiden Konzentrationen eine signifikante Wachstumsreduktion, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Mittelwert Zellproliferation [%] Met I 84.78 ± 2.522 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$; Met II 84.48 ± 3.330 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p = 0,0002$ ungepaarter t-Test).

Propranolol führte zu hoch-signifikanten Wachstumshemmungen (Mittelwert Zellproliferation [%] Prop I 12.84 ± 0.9506 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test) und dies unabhängig von der Konzentration (Mittelwert Zellproliferation [%] Prop II 13.85 ± 1.196 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test). Zwischen beiden Konzentrationen aber kein signifikanter Unterschied (Mittelwert Zellproliferation [%] Prop I 12.84 ± 0.9506 vs. Prop II 13.85 ± 1.196 $p = 0,5132$ ungepaarter t-Test).

Auch unter *ASS* konnten geringe antiproliferative Effekte gemessen werden (Mittelwert Zellproliferation [%] ASS I 78.55 ± 3.372 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test bzw. ASS II 82.60 ± 2.964 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test).

Die Positivkontrolle mit *Tamoxifen* zeigte erwartungsgemäß eine signifikante Hemmung des Zellwachstums (Mittelwert Zellproliferation [%] Tam 9.628 ± 1.373 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test). Bei der Negativkontrolle *Östradiol* (2,71 mg/ml) erwarteterweise keine signifikante Wachstumshemmung (Mittelwert Zellproliferation [%] Estr 92.13 ± 5.853 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p = 0,1945$ ungepaarter t-Test).

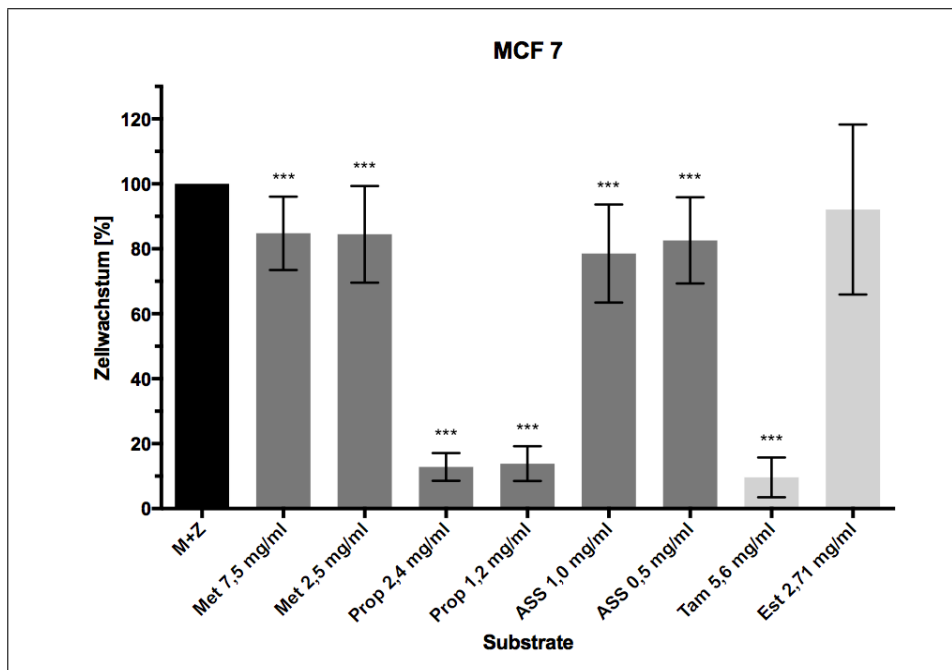


Abbildung 12: BrdU Zellproliferationstest MCF 7, Mittelwert + SD; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit *** gekennzeichneten Proben wiesen hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf.

BT 20

Bei *Metformin* zeigte sich in beiden Konzentrationen eine signifikante Wachstumsreduktion, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Mittelwert Zellproliferation [%] Met I 32.72 ± 4.651 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test und Met II 45.99 ± 5.600 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test).

Propranolol führte ebenfalls zu signifikanten Wachstumshemmungen, sowohl in der hohen (Mittelwert Zellproliferation [%] Prop I 15.19 ± 2.443 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test), als auch in der niedrigen Dosierung (Mittelwert Zellproliferation [%] Prop II 17.86 ± 1.927 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test).

Auch unter *ASS* hoch signifikante Wachstumshemmungen (Mittelwert Zellproliferation [%] ASS I 49.75 ± 4.046 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test bzw. ASS II 65.04 ± 4.205 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test).

ungepaarter t-Test). Dabei sahen wir in der höheren Konzentration eine signifikant deutlichere Hemmung des Zellwachstums (Mittelwert Zellproliferation [%] ASS I 49.75 ± 4.046 vs. ASS II 65.04 ± 4.205 $p = 0,0164$ ungepaarter t-Test).

Bei der Positivkontrolle mit *Tamoxifen* erwartungsgemäß deutliche Wachstumsreduktion (Mittelwert Zellproliferation [%] Tam 12.93 ± 1.882 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test), wohingegen bei der Negativkontrolle (*Östradiol* 2,71 mg/ml) keine signifikante Wachstumshe-mmung zu beobachten war (Mittelwert Zellproliferation [%] Estr 87.79 ± 7.085 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p = 0,1155$ ungepaarter t-Test).

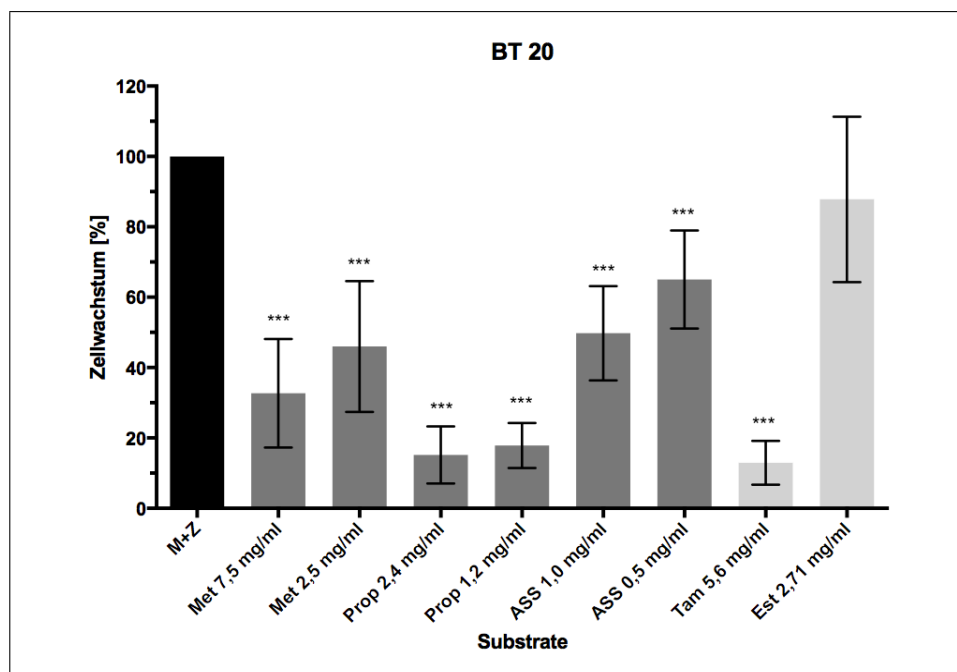


Abbildung 13: BrdU Zellproliferationstest BT 20, Mittelwert + SD; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit *** gekennzeichneten Proben wiesen hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf.

MCF 10a

Nach Gabe von *Metformin* (7,5 mg/ml) war eine signifikante Wachstumsreduktion, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Mittelwert Zellproliferation [%] Met I 34.02 ± 3.081 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test) festzustellen. Auch in der niedrigeren Konzentration war eine vergleichsweise Wachstumshemmung zu sehen (Mittelwert Zellproliferation [%] Met II 38.78 ± 4.478 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test). Im Vergleich beider Konzentrationen aber kein signifikanter Unterschied (Mittelwert Zellproliferation [%] Met I 34.02 ± 3.081 vs. Met II 38.78 ± 4.478 $p = 0.39111$ ungepaarter t-Test).

Bei *Propranolol* ebenfalls hoch-signifikante Wachstumshemmungen in beiden Dosierungen (Mittelwert Zellproliferation [%] Prop I 29.20 ± 5.788 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test bzw. Prop II 35.93 ± 7.639 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test). Zwischen beiden Konzentrationen war aber auch kein signifikanter Unterschied in der Wirkung zu beobachten (Mittelwert Zellproliferation [%] Prop I 29.20 ± 5.788 vs. Prop II 35.93 ± 7.639 $p = 0.4904$ ungepaarter t-Test).

Auch bei *ASS* sahen wir signifikante antiproliferative Effekte (Mittelwert Zellproliferation [%] ASS I 21.18 ± 1.887 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test bzw. ASS II 56.19 ± 10.05 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p = 0.0011$ ungepaarter t-Test). Eine signifikant stärkere Wirkung trat beim höher dosierten ASS 1,0 mg/ml ein (Mittelwert Zellproliferation [%] ASS I 21.18 ± 1.887 vs. ASS II 56.19 ± 10.05 $p = 0.0052$ ungepaarter t-Test).

Die Positivkontrolle mit *Tamoxifen* brachte hoch signifikanten Wachstumsreduktionen (Median Zellproliferation [%] Tam 3.938 vs. M+Z 100 $p < 0.0001$ Mann-Whitney-Test). *Östradiol* (2,71 mg/ml) zeigte ebenfalls eine geringe Wachstumshemmung (Mittelwert [%] Estr 84.15 ± 4.855 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p = 0.0075$ ungepaarter t-Test).

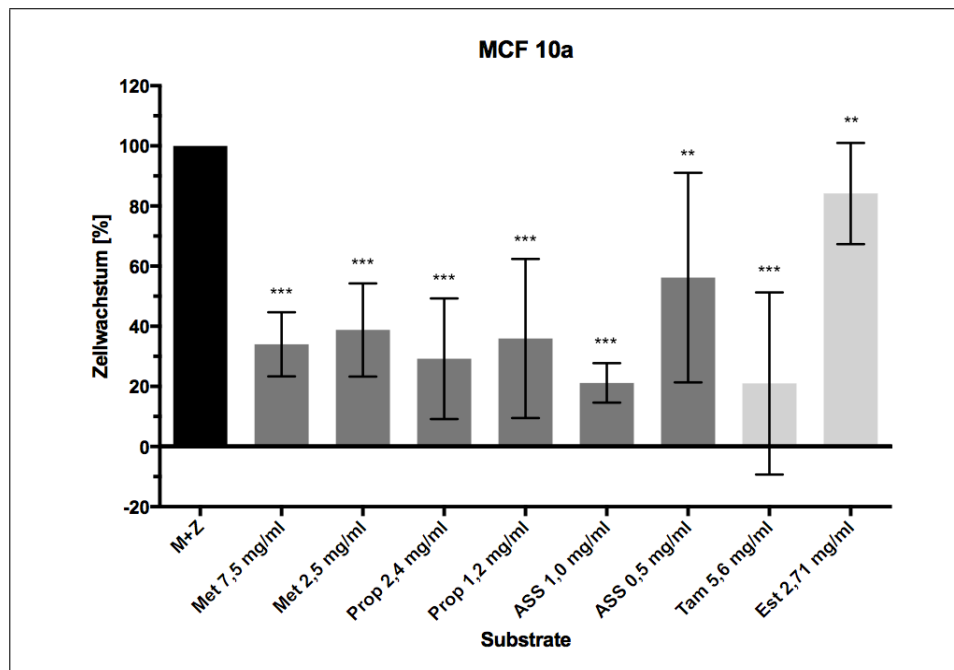


Abbildung 14: BrdU Zellproliferationstest MCF 10a, Mittelwert + SD; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit * gekennzeichneten Proben wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf; bei ** stark signifikante Unterschiede ($p < 0.01$); bei *** hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$).

MCF 12a

Die Behandlung mit *Metformin* führte in der MCF 12a-Zelllinie zu einer signifikanten Wachstumsreduktion (Mittelwert Zellproliferation [%] Met I 30.05 ± 3.718 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test; Met II 40.38 ± 6.988 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test). Im Vergleich der eingesetzten Dosierungen aber keine signifikanten Unterschiede (Mittelwert [%] Met I 30.05 ± 3.718 vs. Met II 40.38 ± 6.988 $p = 0,2094$ ungepaarter t-Test).

Propranolol zeigte ebenfalls in beiden Dosierungen antiproliferative Effekte (Mittelwert Zellproliferation [%] Prop I 33.72 ± 5.165 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test; Prop II 36.61 ± 6.073 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test). Zwischen beiden Konzentrationen aber kein signifikanter Unterschied (Mittelwert [%] Prop I 33.72 ± 5.165 vs. Prop II 36.61 ± 6.073 $p = 0,7204$ ungepaarter t-Test).

Auch unter *ASS* konnten signifikante Wachstumshemmungen gemessen werden (Mittelwert Zellproliferation [%] ASS I 24.35 ± 2.545 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test bzw. ASS II 44.83 ± 8.002 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test). Zwischen beiden Konzentrationen von ASS auch ein signifikanter Unterschied, mit einer grösseren Wachstumshemmung bei der hohen Dosierung (Mittelwert [%] ASS I 24.35 ± 2.545 vs. ASS II 44.83 ± 8.002 $p = 0,0295$ ungepaarter t-Test).

Bei der Positivkontrolle mit *Tamoxifen* hoch signifikante Wachstumshemmung (Mittelwert Zellproliferation [%] Tam 26.79 ± 5.131 vs. M+Z 100 ± 0.0 $p < 0.0001$ ungepaarter t-Test). *Östradiol* zeigte unerwarteterweise ebenfalls einen signifikante Hemmung im Proliferationsverhalten.

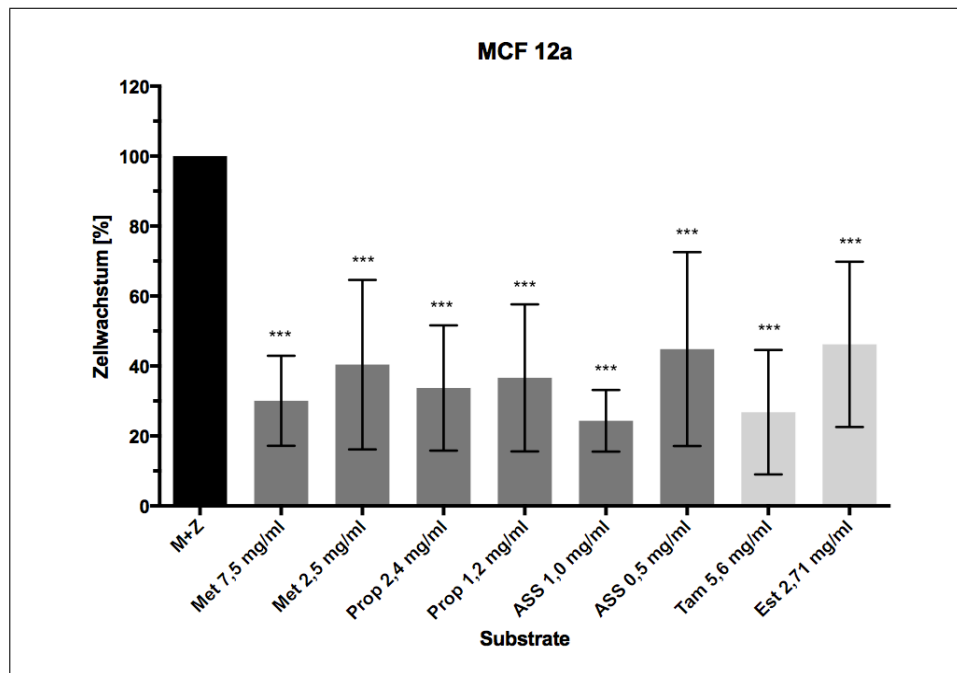


Abbildung 15: BrdU Zellproliferationstest MCF 12a, Mittelwert + SD; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit * gekennzeichneten Proben wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf; bei ** stark signifikante Unterschiede ($p < 0.01$); bei *** hoch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$).

Fazit aller genutzten Zelllinien

Den größten antiproliferativen Effekt hatte das *Propranolol* 2,4 mg/ml (MCF7 > BT 20 > MCF 10a > MCF 12a) und *Propranolol* 1,2 mg/ml (MCF 7 > BT 20 > MCF 10a > MCF 12a). Weniger ausgeprägte Effekte durch *Metformin* 7,5 mg/ml (MCF 12a > BT 20 > MCF 10a > MCF 7) und *Metformin* 2,5 mg/ml (MCF 10a > MCF 12a > BT 20 > MCF 7). Unter ASS die geringsten antiproliferativen Effekte, *ASS* 1,0 mg/ml (MCF 10a > MCF 12a > BT 20 > MCF 7), *ASS* 0,5 mg/ml (MCF 12a > MCF 10a > BT 20 > MCF 7).

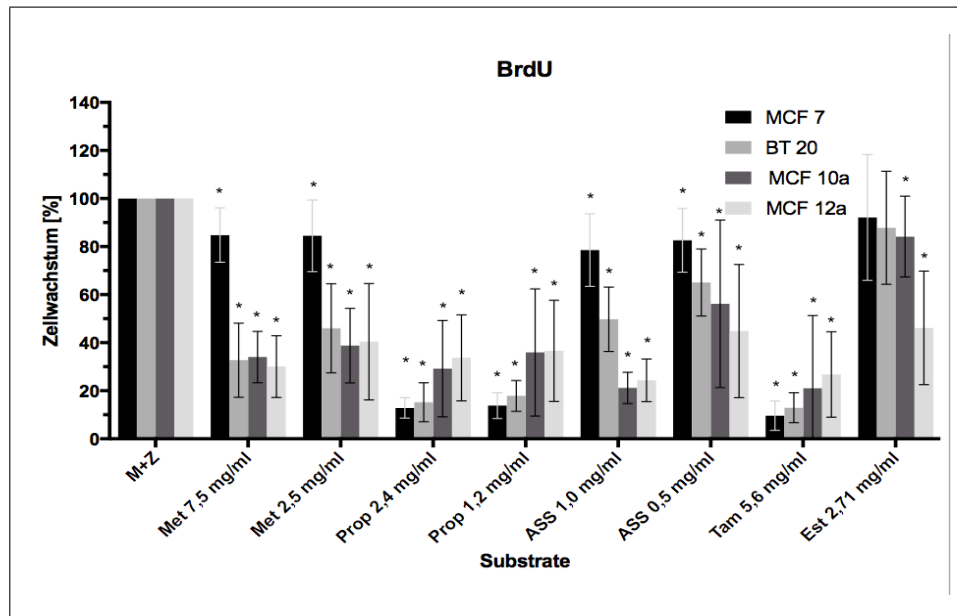


Abbildung 16: BrdU Zellproliferationstest Gesamtübersicht, Mittelwert + SD; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est). Die mit * gekennzeichneten Proben wiesen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf.

5.3 Immunhistochemie

Bei der immunhistochemischen Untersuchung wird das Farbverhalten der Zellen nach Zugabe eines spezifischen farbstoffgekoppelten Antigen-Antikörper-Komplexes analysiert. Ein Farbumschlag nach rot ist hier gleichbedeutend mit dem Vorhandensein des entsprechenden Rezeptors, während eine fehlende Farbreaktion dagegen spricht. Bei der Negativkontrolle jeder Zelllinie wurde kein primärer Antikörper hinzugegeben, sodass ein Farbumschlag aufgrund der fehlenden Antigen-Antikörper-Reaktion ausbleiben müsste.

MCF 7 Zellen

Aus der Literatur [104, 107] ist bekannt, dass MCF7-Zellen die beiden Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β und einen Progesteronrezeptor besitzen. Zudem exprimieren sie an ihrer Oberfläche den Wachstumsfaktorrezeptor HER2 [139]. Im Versuch zeigte sich eine deutliche Rotfärbung in den ersten drei Feldern (ER- α , ER- β , PR), was den Schluss nahelegt, dass alle diese Rezeptoren vorhanden sind. Das Vorhandensein anderer Rezeptoren (HER2, EGFR) wurde nicht geprüft.

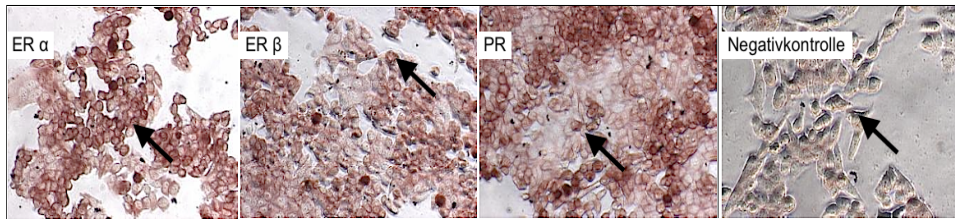


Abbildung 17: MCF 7 Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, 10x Vergrößerung; Erläuterungen: rote Farbreaktion, d.h. Expressierung von ER- α , ER- β und PR-Rezeptoren. Bei der Negativkontrolle keine rote Farbreaktion. Exemplarisch wurden einzelne Zellen mit Pfeilen markiert.

BT 20 Zellen

Bei der immunhistochemischen Behandlung der BT 20-Zellen zeigte sich keine Rotfärbung, was den Schluss nahelegt, dass BT 20-Zellen weder Östrogen-, noch Progesteronrezeptoren exprimieren. Dies deckt sich mit den Befunden aus der Literatur [139], wonach bei BT 20 keine Hormonrezeptoren (ER α , ER- β und PR) gebildet werden.

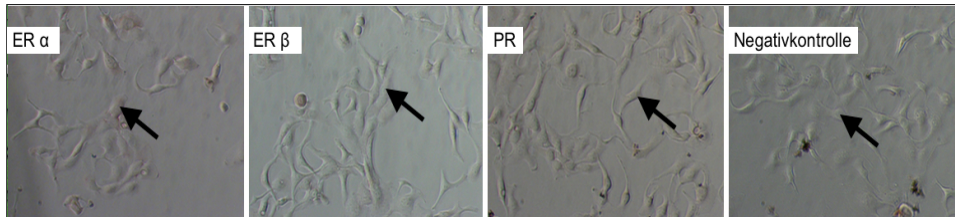


Abbildung 18: BT 20 Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, 10x Vergrößerung; Erläuterungen: Keine rote Farbreaktion, also keine Expressierung von ER- α , ER- β und PR-Rezeptoren. Exemplarisch wurden einzelne Zellen mit Pfeilen markiert.

MCF 10a Zellen

Bei MCF 10a zeigte sich ebenfalls keine Rotfärbung der Zellen. Folglich sind keine ER- α /ER- β , PR-Rezeptoren nachweisbar. Auch dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur [139], wonach MCF 10a-Zellen an ihrer Oberfläche keine Hormonrezeptoren, aber den HER-2,- den EGFR-Rezeptor und das Zytokeratin CK5/6 tragen.

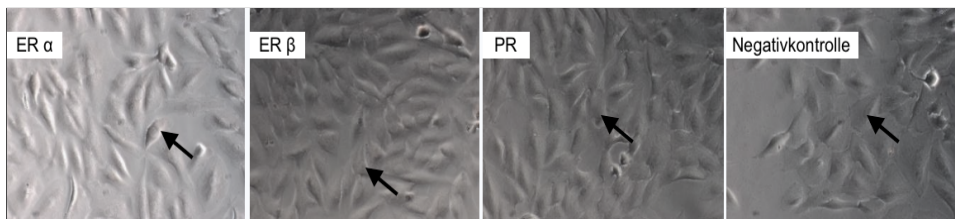


Abbildung 19: MCF 10a Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, 10x Vergrößerung; Erläuterungen: Keine rote Farbreaktion, also keine Expressierung von ER- α , ER- β und PR-Rezeptoren. Exemplarisch wurden einzelne Zellen mit Pfeilen markiert.

MCF 12a Zellen

Die Zellen der MCF 12a-Zelllinie zeigen wieder einen deutlichen Farbumschlag in allen drei Feldern, mit fehlender Farbreaktion bei der Negativkontrolle. Dies spricht für das Vorhandensein aller drei Rezeptoren (ER- α /ER- β /PR). Dieser Befund deckt sich mit den Angaben aus der Literatur, wonach MCF12a-Zellen Östrogenrezeptoren exprimieren [62].

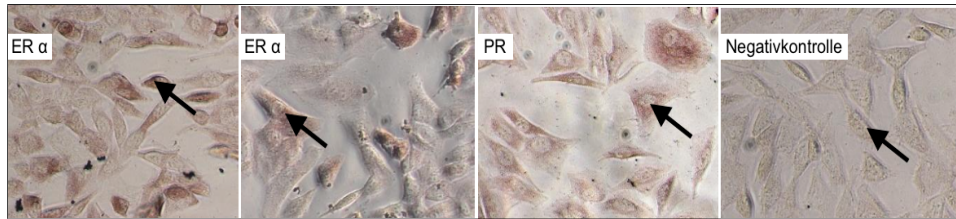


Abbildung 20: MCF 12a Zellen in immunhistochemischer Reaktion, 20x Vergrößerung; Erläuterungen: rote Farbreaktion d.h. Exprimierung von ER- α , ER- β und PR-Rezeptoren. Bei der Negativkontrolle keine rote Farbreaktion. Exemplarisch wurden einzelne Zellen mit Pfeilen markiert.

5.4 Metabolismus der Zellen

5.4.1 pH-Wert

Da die Messungen des pH-Wertes je Ziellinie nur einmal durchgeführt wurden, erlauben die Ergebnisse keine allgemeingültige Aussage bzw. Prüfung auf Signifikanz. Zu den Zelllinien im Einzelnen.

MCF 7 Zellen

Bei der MCF7-Reihe zeigte sich, dass fast alle untersuchten Proben einen pH-Wert oberhalb des bei der Positivkontrolle ($\text{pH} = 8.13$) aufwiesen, was für weniger Stoffwechselaktivität der Zellen nach Behandlung mit den Extrakten sprechen könnte. Auffällig sind die besonders hohen (alkalischeren) pH-Werte nach Behandlung mit Östradiol, dem SERM Tamoxifen, dem Zellgift Triton und den Betablocker Propranolol (2,4 mg/ml).

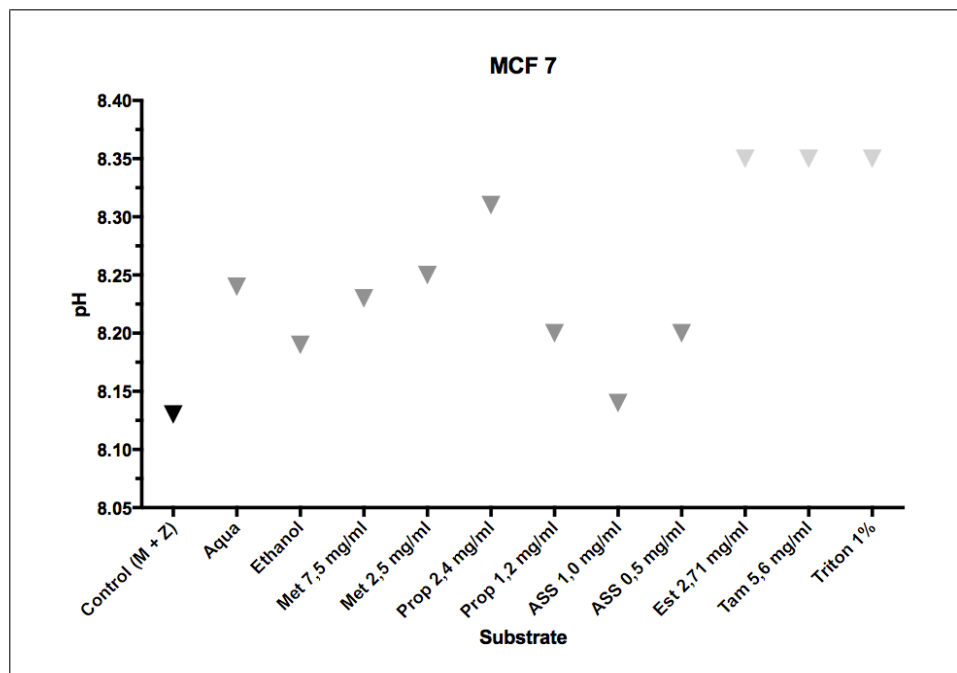


Abbildung 21: pH-Wert Messung bei MCF 7; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est).

BT 20 Zellen

In der BT 20-Zelllinie zeigte sich eine deutliche pH-Wert Erhöhung bei den mit Propranolol (2,4 und 1,2 mg/dl), Tamoxifen und Östradiol behandelten Zellen gegenüber der Positivkontrolle (pH = 8.21). Auffällig war hier der deutlich niedrige pH-Wert, der mit ASS (1,0 mg) behandelten Zellen.

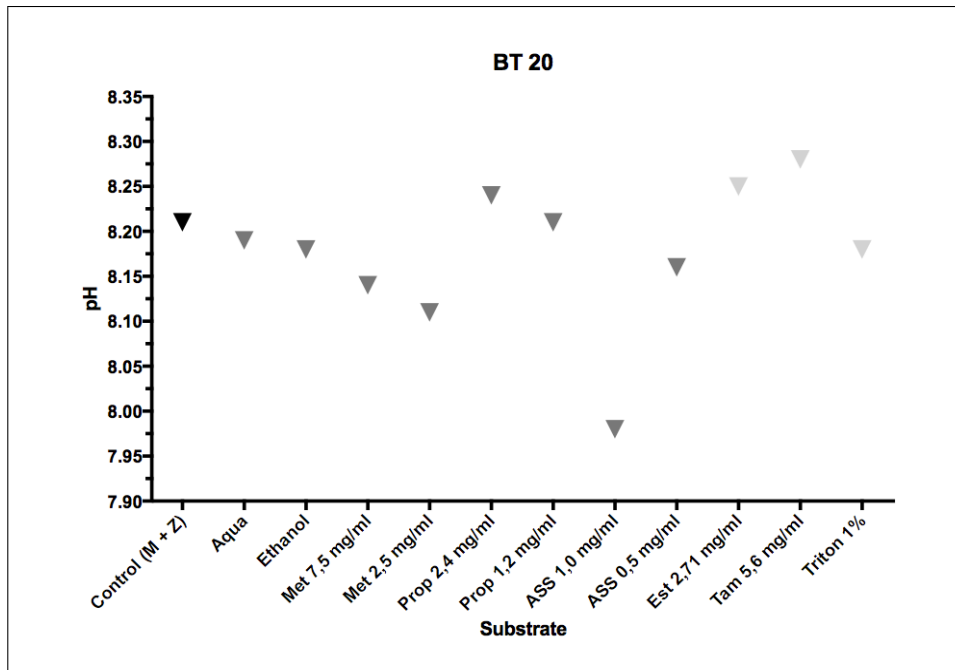


Abbildung 22: pH-Wert Messung bei BT 20; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est).

MCF 10a Zellen

Bei der MCF 10a lagen alle Werte oberhalb der Positivkontrolle (pH = 7.77). Die Werte für Propranolol (2,4 und 1,2 mg/dl), Tamoxifen und Triton zeigten sich stärker erhöht, was für eine reduzierte Stoffwechselaktivität sprechen könnte. Besonders auffällig ist hier die Tatsache, dass die gemessenen pH-Werte nach Gabe von ASS besonders niedrig (saurer) waren. Dies könnte seine Ursache darin haben, dass ASS eine Säure mit einen niedrigen pH-Wert (pH = 6) ist.

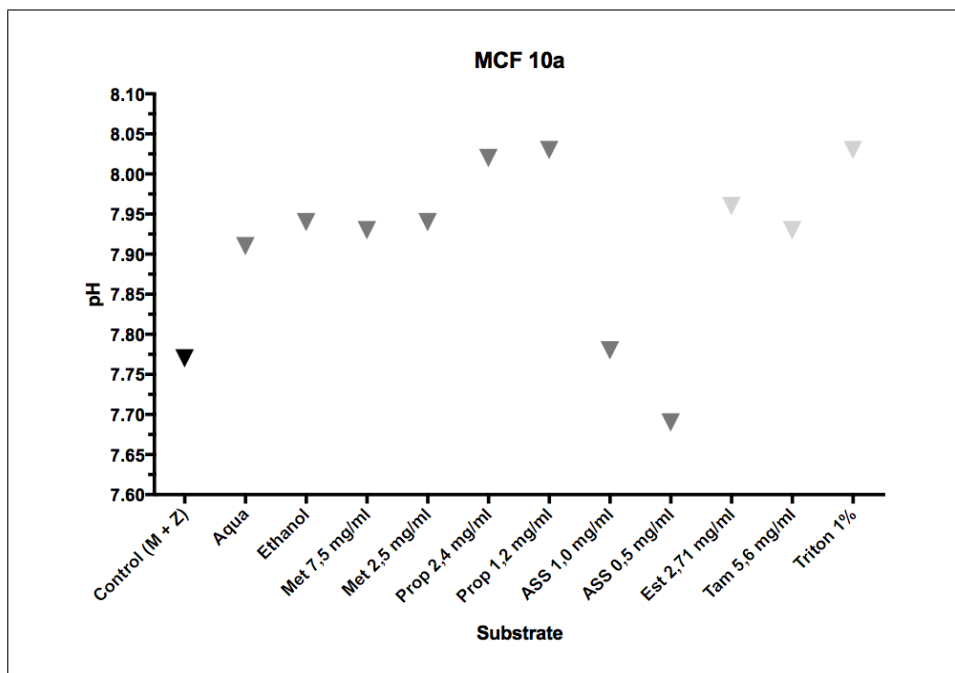


Abbildung 23: pH-Wert Messung bei MCF 10a; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est).

MCF 12a Zellen

Auch hier lagen die gemessenen Werte größtenteils über der Positivkontrolle (pH = 7.84), mit stärkeren Erhöhungen beim Propranolol (2,4 und 1,2 mg/dl), Tamoxifen und Östradiol. Nach Gabe von ASS wurden hier ebenfalls niedrigere pH-Werte gemessen.

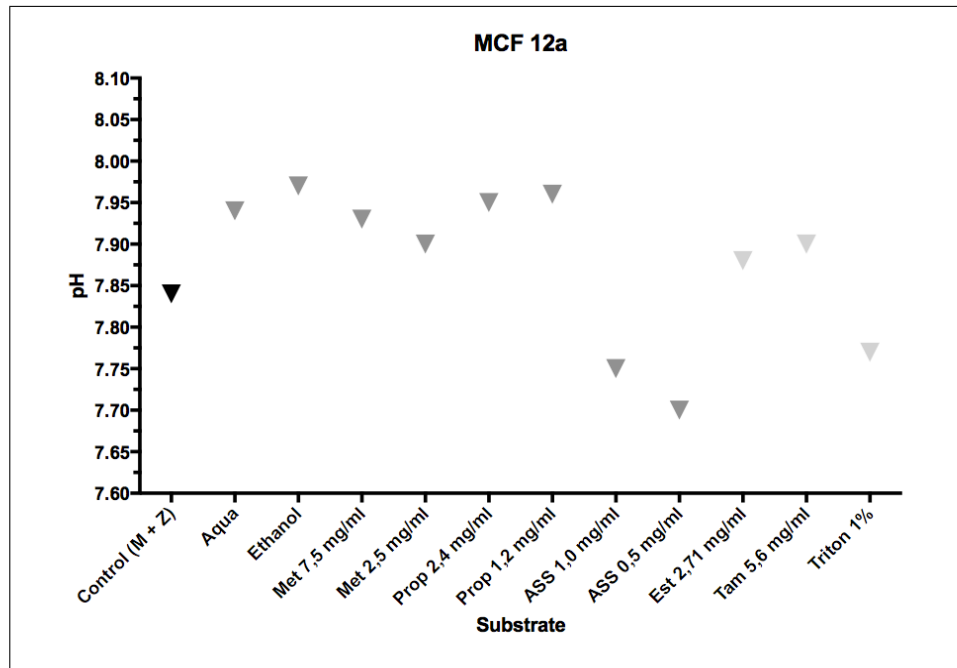


Abbildung 24: pH-Wert Messung bei MCF 12a; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est).

Fazit aller genutzten Zelllinien

Bei den Mammakarzinomzelllinien MCF 10a und MCF 12a lagen die pH-Werte auf einem niedrigeren Niveau, als bei den Linien MCF 7 und BT 20. Dies könnte den Schluss zulassen, dass die Stoffwechselaktivität in diesen beiden Zelllinien (MCF10a und MCF12a) trotz medikamentöser Behandlung weiterhin hoch ist und MCF 7 und BT 20 ein besseres Ansprechen auf die Substrate zeigen. Aufgrund der geringen Datenlage ist eine derartige allgemeingültig Aussage aber nicht möglich.

5.4.2 Glukose

Die Messung des Glukoseverbrauchs diente in erster Linie der Vitalitätsprüfung und wurde in der vorliegenden Studie exemplarisch an einer rezeptorpositiven (MCF 7) und an einer rezeptornegativen Mammakarzinomzelllinie (BT 20) durchgeführt. Da jeweils auch nur eine Versuchsreihe je Zelllinie durchgeführt wurde, lassen sich die hier gefundenen Ergebnisse nicht auf ihre Signifikanz überprüfen.

MCF7 Zellen

Im Ergebnis der Glukosekonzentrationsbestimmung zeigte sich, dass es nach Gabe fast aller Substrate zu einem Glukoseverbrauch im Vergleich zum Referenzwert (Glukose = 30.77 mmol/l) kam. Die Zellen, die mit den Zellgift Triton und dem SERM Tamoxifen behandelt wurden, zeigten nach 24-stündiger Inkubation vergleichsweise höhere Glukosekonzentrationen, was für eine, durch beide Mittel auch zu erwartende, Zellzerstörung spricht.

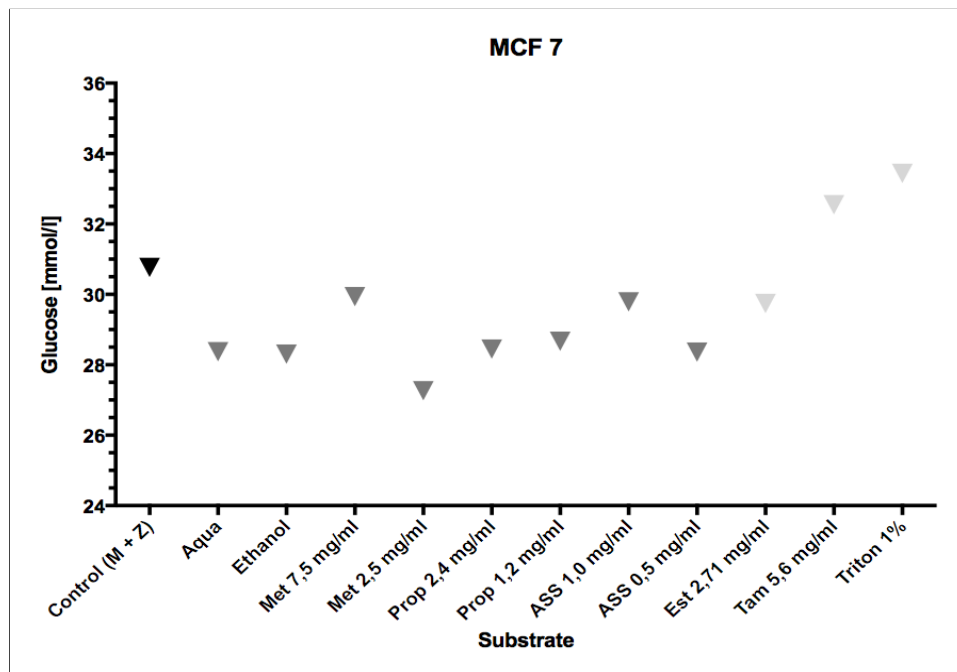


Abbildung 25: Glukosekonzentration MCF 7; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est).

BT 20 Zellen

Bei der Messung der extrazellulären Glukosekonzentration in der rezeptor-negativen Zelllinie BT 20 zeigte sich ein fast durchgängiger Abfall der Glukosekonzentration im Vergleich zum Referenzwert (Glukose = 13.32 mmol/l) auf Werte bis zu 11.66 mmol/l bei Östradiol bzw. 11.17 mmol/l bei Wasserzugabe (fraglicher Verdünnungseffekt). Bei Zugabe einiger Substanzen war kein Glukoseverbrauch festzustellen, wie z.B. bei Triton (Glukose = 14.01 mmol/l), Metformin 2,5 mg (Glukose = 14.03 mmol/l) und Propranolol 1,2 mg (Glukose = 14.00 mmol/l). Dies konnte dafür sprechen, dass diese Stoffe imstande waren, den Stoffwechsel der Zellen zu unterbinden, oder sie sogar zum Absterben zu bringen.

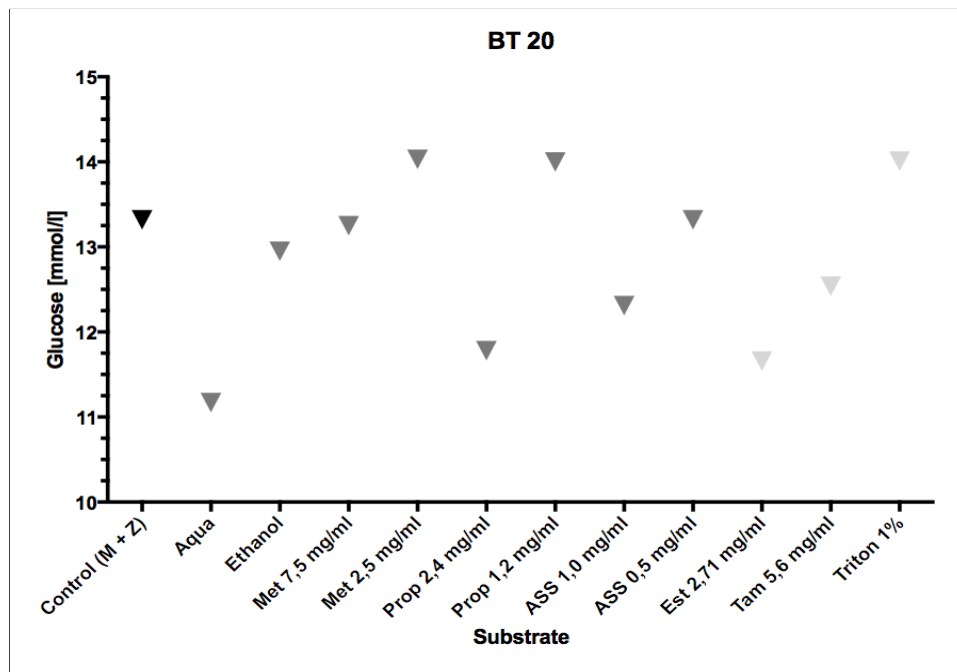


Abbildung 26: Glukosekonzentration BT 20; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est).

Fazit der genutzten Zelllinien

Beim Vergleich der Glukosekonzentrationen zeigte sich, dass bei BT 20 durchweg niedrigere Glukosewerte (Glukose \bar{x} 12.86 mmol/l) ermittelt wurden, als bei MCF 7 (Glukose \bar{x} 29.64 mmol/l), was ein Indiz dafür sein könnte, dass die rezeptornegativen BT 20 Zellen stoffwechselaktiver sind, als die rezeptorpositiven MCF 7-Zellen.

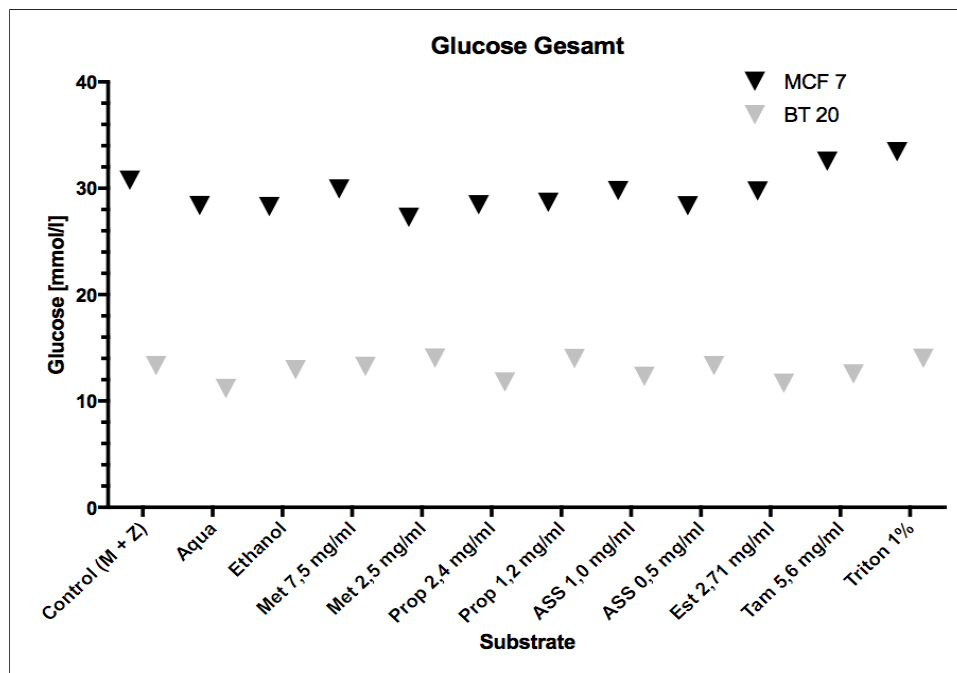


Abbildung 27: Glukosekonzentration, Vergleich MCF 7 und BT 20; Legende: Alle Substrate und Kontrollsubstanzen mit Medium und Zellen. Medium + Zellen (M+Z), Metformin (Met), Propranolol (Prop), Acetylsalicylsäure (ASS), Tamoxifen (Tam), Östradiol (Est).

6 Diskussion

Das Mammakarzinom gehört zu den am besten untersuchten Tumorarten überhaupt. Dennoch ist aktuell noch wenig über den Einfluss von Glukose, Katecholaminen und Entzündungsmediatoren auf die Entwicklung der Erkrankung bekannt. Daher existieren auch nur wenige Studien, die sich mit der Wirkung von Medikamenten zur Regulierung des Glukose-, Stress-, bzw. Entzündungsmetabolismus auf das Brustkrebswachstum befassen.

In der vorgelegten experimentellen Studie wurden die zytotoxischen und antiproliferativen Effekte der Reinsubstanzen Metformin, Propranolol und ASS in-vitro auf die Mammakarzinomzelllinien MCF 7, BT 20, MCF 10a und MCF 12a untersucht.

6.1 Diskussion der Hauptergebnisse

Auf der Grundlage dieser Untersuchungen können folgende Aussagen getroffen werden:

Metformin führt in-vitro zu einer deutlichen Hemmung des Tumorwachstums, hat jedoch keine toxische Wirkung

Die Prävalenz der Diabetes-Erkrankung ist weltweit dramatisch zunehmend [158]. Bei Diabetikern ist das relative Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, um 10 % - 20 % höher als bei Nicht-Diabetikern. Zudem haben Diabetiker, die an Brustkrebs erkrankt sind, eine schlechtere Prognose, da sie häufiger aggressivere und grössere Tumorformen entwickeln [159].

Zur Behandlung des Diabetes kommt weltweit mit am häufigsten das orale Antidiabetikum *Metformin* zum Einsatz [21, 91]. *Metformin* scheint neben seiner antidiabetogenen Wirkung bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen einen protektiven Effekt zu haben [4, 56]. So treten bei *Metformin* - Anwendern weniger Krebserkrankungen auf und die mittlere Zeit bis zur Krebsdiagnose ist deutlich verlängert [31, 34, 64, 102]. Beim Mammakarzinom zeigten sich ähnliche Effekte [44], insbesondere dann, wenn Metformin lange eingenommen wurde [49].

Nach Applikation von *Metformin* war in allen Zellreihen, unabhängig vom Hormonrezeptorstatus, ein deutlicher wachstumshemmender Effekt (15 % bis 70 %) feststellbar.

In unserer [140] und in anderen Arbeitsgruppen [3, 164] konnte die anti-tumoröse Wirkung bereits an einigen Mammakarzinomzelllinien in-vitro gezeigt werden. Sie beruht auf der Aktivierung einer AMPK [106], wodurch das

Wachstum von Brustkrebszellen durch Hemmung der Initiation der Translation [96] gestoppt wird. Neuere an BT-20 Zellen durchgeführte Studien legen die Vermutung nahe, dass die antidiabetische und antitumoröse Wirkung von Metformin über einen kationen-selektiven Transporter vermittelt wird [37]. Darüber hinaus induziert *Metformin* in-vitro einen Zellzyklus-Arrest und verhindert die Koloniebildung von Brustkrebszellen [3].

Diese hormonrezeptorunabhängige Wirkung von *Metformin* auf das Zellwachstum würde eine breite therapeutische Anwendung in der Onkologie bei Tumorpatienten mit Diabetes erlauben. Daher wären neben dieser in-vitro Studie klinische Untersuchungen wünschenswert, die diese Effekte am Patienten untersuchten. Seit 2011 werden im Rahmen einer internationalen, multizentrischen, randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten, Phase III Studie an Brustkrebs erkrankte Frauen mit Metformin 850 mg p.o. über 5 Jahre (versus Placebo) behandelt (A Phase III Randomized Trial of Metformin versus Placebo on Recurrence and Survival in Early Stage Breast Cancer, Protokoll Nummer IBCSG 40-11 / MA.32). Primärer Endpunkt ist das krankheitsfreie Überleben; sekundäre Endpunkte sind das Gesamtüberleben, das rückfallfreie Überleben und das brustkrebsfreie Intervall [46]. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit waren noch keine Ergebnisse verfügbar.

Die große Bandbreite von 15 % bis 70 % Wachstumshemmung zwischen den Zelllinien und den unterschiedlichen Konzentrationen bleibt unklar, könnte jedoch in der Methodik begründet sein. So hat die Arbeitsgruppe von *Alimova* [3] ganz andere Testverfahren eingesetzt (MTS Zellproliferations-Messung, Messung der Tyrosinkinase-Aktivität, Histon - assoziierte DNA-Fragment-Messung, Klonogen-Tests) und konnte so das Wachstumsverhalten auf zellulärer und genomischer Ebene beurteilen, wohingegen wir nur eindimensional den Einbau einer genomischen Base untersucht haben. Zudem hat *Alimova* das *Metformin* in mehr Konzentrationen (4 statt 2) getestet, als in der vorliegenden Arbeit.

Es sind in der Folge weitere Studien nötig, um die beste Metformin-Dosierung für einen klinischen Gebrauch in der Onkologie zu definieren.

Eine signifikante zytotoxische Wirkung des *Metformins* war in unserer Studie nicht feststellbar. Die LDH-Freisetzung unter *Metformin*-Behandlung lag teilweise sogar unter den Aktivitätswerten der unbehandelten Zellen. Bezüglich der zytotoxischen Wirkung von *Metformin* ist die Studienlage nicht eindeutig. Während *Alimova* [3] durch Messung der DNA-Fragmentierung und PARP-Spaltung keine zellzerstörende Wirkung für Metformin nachweisen konnte, hat *Szewczyk* mittels BrdU-Test einen dosisabhängigen Effekt von Metformin auf die Zellzerstörung zeigen können (3 % bis 38 % bei BT 20

und 4 % bis 17 % bei MCF 7) [140]. Bei Zhuang zeigten sich zwar bei MCF7 nicht aber bei MCF10a eine zytotoxische Wirkung durch das Metformin [164]. Vermutlich induziert *Metformin* in den hier getesteten Dosierungen keine Apoptose. Ob *Metformin* in der Lage ist, aktiv Brustkrebszellen zu zerstören, könnte in der Folge weiter untersucht werden.

Ferner wären Studien wünschenswert, die sich mit der Wirkung anderer Antidiabetika auf das Brustkrebswachstum befassen. Die Vermutung liegt nahe, dass die antitumoröse Wirkung nicht an eine Metforminbehandlung des Diabetes gebunden ist, sondern auch bei der Langzeitgabe von Insulin [48] oder anderen oralen Antidiabetika [146] beobachtet wird und die Therapie der Dysbalance im Glukosestoffwechsel ein erfolgversprechender Ansatz zu sein scheint. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Individualisierung in der Medizin bzw. der medikamentösen Therapie wird man in der Zukunft in der Lage sein, eine auf die Bedürfnisse des Diabetespatienten zugeschnittene und unter Berücksichtigung des Nebenwirkungsprofils optimale supportive Therapie des Brustkrebs zu installieren.

Propranolol zeigt in-vitro den stärksten wachstumshemmenden Effekt, aber nur in der MCF 7-Zelllinie eine toxische Wirkung

Existierende in-vitro Studien haben gezeigt, dass neuroendokrine bzw. adrenerge Signalwege bei der Tumorentstehung, dem Tumorwachstum, der Angiogenese, der Expression von chemotaktischen Zytokinen, der Expression von Metalloproteasen und der Invasion in extrazelluläre Gewebe beteiligt sind [25, 134]. Shi [133] konnte in einer anderen in-vitro-Studie u.a. an MCF7 Zellen zeigen, dass die Expression des HER2-Rezeptors, der für die Brustkrebskrankung einen wichtigen Pathogenitätsfaktor darstellt, eng an die Stimulation und Expression von Betarezeptoren gekoppelt ist.

Tumorzellen im allgemeinen und Brustkrebszellen im speziellen exprimieren β -adrenerge Rezeptoren [120, 150], an denen Katcholamine das Wachstum von Tumorzellen fördern können. Unselektive Betablocker wie *Propranolol* blockieren alle β -Katecholaminrezeptoren [91, 120, 134] und können dadurch das Tumorwachstum aufhalten [151]. *Propranolol* wirkt zudem als Angiogenesehemmer [142] antiproliferativ.

Mit der vorliegenden Studie konnten wir demonstrieren, dass *Propranolol* einen starken antiproliferativen Effekt (63 % - 87 %) auf alle vier Mammakarzinomzelllinien hat. Dies konnte erstmalig auch für *MCF 10a*-, (64 % - 70 %) und *12a* (63 % - 66 %) gezeigt werden. In Gegensatz zur ausgeprägten wachstumshemmenden Wirkung von *Propranolol* in allen Zelllinien (Tabelle 11) zeigte sich ein zytotoxischer Effekt nur bei *MCF 7* (Tabelle 6).

Der hier festgestellte antiproliferative Wirkung steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten, wonach Betablocker im Allgemeinen [59, 90, 129] und *Propranolol* im Speziellen [88, 140] das Wachstum von Brustkrebszellen hemmen können. Cakir et. al. [38] konnten beispielsweise zeigen, dass humane Brustkrebszellen weniger DNA synthetisieren, wenn sie mit Betablockern behandelt wurden. Die Arbeitsgruppe von Iseri [88] erzielte bei Behandlung von Brustkrebszellen (MCF 7) und anderen Tumorentitäten (Darm-, und Lebertumoren) mit Propranolol ebenfalls signifikante Wachstumshemmungen.

Katecholamine bewahren Krebszellen vor dem programmierten Zelltod (Apoptose). Dies wird über eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade via cAMP-abhängiger Phosphorylierung und Inaktivierung von pro-apoptotischen Proteinen [129] und über andere Stoffwechselwege [12] vermittelt. Desweiteren induzieren Katecholamine den vermehrten Einbau von Nukleosiden in die DNA. Betablocker wie *Propranolol* blockieren die β -Katecholaminrezeptoren [91, 120, 134], führen dadurch zu weniger DNA-Synthese [38] in der Tumorzelle und können die Apoptose einleiten.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle von Neurotransmittern bei der Entstehung und Unterhaltung der Brustkreberkrankung zu erforschen und um den Einsatz von Betablockern in der Therapie zu rechtfertigen.

Warum der erwartete zytotoxische Effekt des *Propranolols* nur bei *MCF7* und nicht bei den übrigen Zelllinien feststellbar war, bleibt unklar. Szewczyk [140] konnte eine deutliche Zellzerstörung bei *MCF 7* (43 % - 89 %) und *BT20* (45 % - 95 %) messen. Inwiefern *Propranolol* auch zytotoxische Effekte hat, bedarf daher weiterer Klärung. Interessanterweise war der zytotoxische Effekt in der Dosierung von 1,2 mg/ml (Prop II) stärker ausgeprägt als in der höheren Dosierung 2,4 mg/ml (Prop I). Die Ursache dieser paradoxen Dosis-Wirkungs-Beziehung beim Propranolol, die auch bei Szewczyk [140] zu beobachten war, bleibt ebenso unklar. Aus bereits existierenden Studien ist bekannt, dass die Stimulation eines Rezeptors durch einen Liganden verschiedene, teilweise sogar entgegengesetzte intrazelluläre Effekte auslösen kann [93, 149]. Möglicherweise liegt dem aber auch eine Sättigungskinetik oder eine Downregulation der Rezeptoren zugrunde, was in der Folge genauer untersucht werden sollte.

ASS hatte in-vitro eine antiproliferative Wirkung, aber nur geringe toxische Effekte auf die getesteten Brustkrebszellen

Seit mehreren Jahren weiß man, dass die Tumorentstehung stark mit chronischen Entzündungsreaktionen assoziiert ist [22]. Tumorzellen im Allgemeinen und Brustkrebszellen im Speziellen produzieren über einen Cyclooxygenase-abhängigen Stoffwechselweg Prostaglandine [28], die protumorös wirken [85]. Cyclooxygenasehemmern, wie beispielsweise ASS, werden antiproliferative Effekte bei vielen Tumorentitäten [136, 144], vor allem bei kolorektalen Neoplasien [69, 101] und beim Lungenkarzinom [103], zugeschrieben. Die Studienlage ist jedoch nicht eindeutig [108]. Bei gynäkologischen Tumoren ist die Assoziation zwischen der ASS-Einnahme und Erkrankungshäufigkeit eher schwach [20]. Speziell beim Brustkrebs ist die Studienlage widersprüchlich [110, 115]. Nach einer neueren Studie von Wood [161] soll langer ASS-Gebrauch zu geringeren Dichtewerten in der Mammographie führen, was einem antitumorösem Effekt entspreche.

In unserer Untersuchung zeigten sich antiproliferative Effekte nach Behandlung mit ASS. Der wachstumshemmende Effekt von ASS war nur gering ausgeprägt bei *MCF7*-, (18 % - 22 %) und *BT 20* (15 % - 16 %). Bei *MCF10a* (54 % - 79 %) und *12a* (56 % - 76 %) war er jedoch deutlich messbar.

Die wachstumshemmende Wirkung von ASS beruht auf einer Blockade der Inflamationsreaktion durch Down-Regulation der Cyclooxygenase [80]. Ebenfalls wird vermutet, dass die Cyclooxygenase- und die Aromatase-Aktivität derart miteinander verknüpft sind, dass eine Hemmung der COX-Aktivität das Wachstum von Mammakarzinomzellen über den Aromatase-weg hemmt [85]. Cheng konnte zeigen, dass ASS auf MCF7-Zellen sowohl direkt antiproliferativ wirkt, indem es zu einem Zellzyklusarrets führt und insofern ist die Tamoxifen-Sensitivität von MCF7-Zellen zu erhöhen [43].

Zytotoxische Effekte ließen sich in unserer Untersuchung nicht bzw. nur sehr schwach ausgeprägt feststellen (0 % - 9 %). Dies war so nicht erwartet worden, da ASS insofern sein soll, den programmierten Zelltod zu induzieren [111].

Die hier erhobenen Daten unterstützen die Hypothese, dass Aspirin einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen hat und in geringem Umfang insofern ist, Brustkrebszellen am Wachstum zu hindern. Empfehlungen zum prophylaktischen oder gar therapeutischen Einsatz lassen sich jedoch hieraus nicht ableiten. Zur Bestätigung der hier gefundenen Ergebnisse sollten sich weitere Untersuchungen anschließen, die insbesondere die zytotoxische Aktivität von ASS untersuchen sollten.

Die Konzentration zeigte keinen eindeutigen Einfluss auf Zellzerstörung und Proliferationsverhalten der Brustkrebszellen

Sowohl im LDH-Zytotoxizitätstest als auch im BrdU-Zellproliferationstest waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Dosierungen feststellbar. Studien, wie beispielsweise von Alimova [3], haben dosisabhängige Wirkungsunterschiede auf Zellzerstörung und Zellwachstum für Metformin gezeigt. Dies konnte hier nicht nachvollzogen werden. Einzig bei Aspirin war in drei Zelllinien (BT 20, MCF 10a und MCF 12a) ein geringer dosisabhängiger Effekt, zugunsten der höheren Dosierung auf das Tumorstadium feststellbar.

Warum zwischen den hier eingesetzten Dosierungen keine signifikanten Unterschiede messbar waren, könnte in der vergleichsweise geringen Sensitivität der eingesetzten kolorimetrischen Tests begründet sein. Hier könnten in der Folge weitere Tests mit einer größeren Anzahl unterschiedlicher Konzentrationen, Aufschluss über die Dosisabhängigkeit bringen.

Die Wirkung der Medikamente war unabhängig vom Hormonrezeptorstatus

Bei der Messung der zytotoxischen (LDH) und antiproliferativen (BrdU) Aktivität zeigten sich keine eindeutigen Wirkungsunterschiede zugunsten einer rezeptorpositiven oder rezeptornegativen Zelllinie. Auch im Stoffwechselaktivitätstest durch pH-Messung zeigte je eine rezeptorpositive (MCF 7) und eine rezeptornegative (BT 20) Reihe ein gutes Ansprechen, während auch eine rezeptorpositive (MCF12a) und eine rezeptornegative (MCF 10a) Reihe bei den Zellen mit geringerem Ansprechen auf die medikamentöse Behandlung vertreten war.

Alimova konnte zeigen, dass sich die antiproliferative Wirkung von Metformin sowohl in rezeptornegativen als auch rezeptorpositiven Reihen zeigt [3]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die antitumoröse Wirkung der getesteten Medikamente unabhängig von der Hormonrezeptorausstattung der Zellen ist und die Medikamente Metformin, Propranolol und ASS bei allen Brustkrebszellarten gleichsam wirksam sein könnten. Dies war so erwartet worden, da die antiproliferative Wirkung von Metformin, Propranolol und ASS über andere Stoffwechselwege und nicht über die Hormonrezeptoren (ER/PR) vermittelt wird. Für Metformin bspw. wurde in der Literatur beschrieben, dass es auch gut bei Triple-negativen Zellen wirkt. [26]. Hier wären ebenfalls Folgestudien wünschenswert, die den Einfluss der Hormonrezeptor-Expression genauer untersuchen.

6.2 Diskussion der Methoden

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden vier Mammakarzinomzelllinien (MCF 7, BT 20, MCF 10a, MCF 12a) untersucht, die sich sowohl morphologisch und genetisch, als auch onkophysiologisch voneinander unterscheiden. Sie wurden mit drei verschiedenen Substanzen (Metformin, Propranolol, ASS) in jeweils zwei Konzentrationen behandelt. Zur Untersuchung des Einflusses dieser Medikamente auf die Brustkrebszellen kamen Testverfahren zur Messung der Zellaktivität, Vitalität und Toxizität zur Anwendung (LDH - Zytotoxizitätstest, BrdU - Proliferationstest, pH-Wert-Messung, Glukose-Messung). Die Proliferations-, und Zytotoxizitätstests wurden mindestens viermal je Zelllinie und Testsubstanz wiederholt.

Bei der Auswahl der untersuchten Zellen wurde darauf geachtet, dass sowohl hormonrezeptorpositive (MCF 7 und MCF 12a) als auch hormorezeptornegative Zelllinien (BT20 und MCF 10a), maligne (MCF 7 und BT 20) als auch benigne Zellen (MCF 10a und MCF 12a) analysiert wurden. Die Wirkung der Reinsubstanzen wurde jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht, um dosisabhängige Effekte zu identifizieren. Zudem kamen Kontroll-, bzw. Referenzsubstanzen zum Einsatz, um die gemessenen Effekte relativieren zu können. Durch mehrfache Wiederholungen wurden zufällige Effekte entdeckt und eliminiert. Die eingesetzten Testverfahren sind anerkannt, standardisiert und erlauben daher eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien.

Die vorliegende Studie weist jedoch auch einige Limitationen auf. So wurden die Substanzen nur einzeln und nicht in Kombination untersucht, sodass hier keine Aussagen zu Wechselwirkungen oder möglichen synergistischen Effekten gemacht werden können. Die untersuchten Substanzen wurden auch nicht in einer Verdünnungsreihe, sondern lediglich in jeweils zwei Dosierungen verabreicht, sodass hier nur eingeschränkte Aussagen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung möglich sind. Bei den eingesetzten Testverfahren handelt es sich um kolorimetrische Tests, mithin indirekte Messmethoden, deren Sensitivität eingeschränkt ist. Aktuell finden auch Fluoreszenz- und Lumineszenz-Assays Anwendung, die genauere Aussagen ermöglichen.

7 Ausblick

Mit der vorgelegten Arbeit haben wir die Wirkung der verwendeten Medikamente einzeln untersucht. Daher wären Folgestudien interessant, die eine Kombination zweier oder mehrerer Medikamente hinsichtlich ihrer Wirkung auf das Brustkrebswachstum untersuchen. Dies würde den Lebenswirklichkeiten eher gerecht werden, da die hier untersuchten Medikamente häufig zusammen verordnet beziehungsweise eingenommen werden. Auf diese Weise ließe sich herausfinden, ob sich die hier einzeln festgestellten antineoplastische Effekte kumulieren oder vielleicht sogar boostern.

Zum Zeitpunkt der Vorlage dieser Arbeit konnten bereits einige Studien recherchiert werden, die die Kombination aus einem Betablocker, Aspirin und Metformin [141] und die Kombination von Metformin und Propranolol [123] auf das Wachstum von Krebszellen zum Gegenstand hatten. Im Ergebnis dieser Untersuchungen hatten diese Wirkstoffklassen synergistische Effekte. Hier könnte in der Folge auch eine Dosisreduktion der Medikamente in den subtherapeutischen Bereich zur prophylaktischen und nebenwirkungsärmeren Anwendung untersucht werden.

Vor demselben Hintergrund wären auch Kombinationsuntersuchungen der o.a. Medikamente mit den gängigen Chemotherapeutika, die bei der Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt werden, oder anderen Medikamenten interessant. Bei gleichzeitiger Gabe von Metformin beispielsweise konnte die erforderliche Dosierung von einigen gängigen Chemotherapeutika gesenkt werden [87]. Cheng konnte zeigen, dass ASS imstande ist die Tamoxifen-Sensitivität von MCF7-Zellen zu erhöhen [43]. Auch andere Stoffklassen, wie beispielsweise Statine, scheinen therapeutische Effekte bei Brustkrebs zu haben [32], sodass viele Kombinationsuntersuchungen denkbar sind.

Thesen zur Promotionsschrift

Thema: Therapeutische Wirkung des Antidiabetikums Metformin, des Betablockers Propranolol und des Cyclooxygenasehemmers Acetylsalicylsäure auf das Wachstum von Mammakarzinomzellen - eine in-vitro Studie -

vorgelegt von Silvio Munk aus Leipzig

- Tumoren der Brust gehören zu den am häufigsten diagnostizierten Tumorerkrankungen überhaupt und sind durch eine steigende Inzidenz, bei insgesamt aber abnehmender Sterblichkeit gekennzeichnet.
- Der Metabolismus von Krebszellen ist verändert. Sie nehmen jedoch auch am Kohlenhydratstoffwechsel teil und haben teilweise einen erhöhten Kohlenhydratumsatz.
- Metformin führte in-vitro zu einer deutlichen Hemmung des Tumorstwachstums, hat jedoch in den getesteten Dosierungen keine signifikante toxische Wirkung.
- Brustkrebszellen exprimieren Katecholaminrezeptoren, über die sich das Brustkrebswachstum beeinflussen lässt. Katecholamine unterhalten das Wachstum von Tumoren, indem sie Krebszellen u.a. vor einem programmierten Zelltod (Apoptose) bewahren und den Einbau von Nukleosiden in die DNA von Tumorzellen fördern.
- Propranolol hat in-vitro einen starken wachstumshemmenden Effekt auf Mammakarzinomzellen, aber nur in wenigen Zelllinien eine signifikante toxische Wirkung.
- Die Tumorentstehung ist häufig mit chronischen Entzündungsreaktionen assoziiert. Daher beruht die antitumoröse Wirkung von Cyclooxygenasehemmern wie ASS auf einer Blockade der Inflamationsreaktion.
- ASS hat in-vitro eine antiproliferative Wirkung, aber nur geringe toxische Effekte auf die getesteten Brustkrebszellen.
- Viele Mammakarzinomzellen exprimieren Rezeptoren für Hormone (ER, PR) und Wachstumsfaktoren (EGFR, HER 2) und sind aufgrund ihrer Rezeptorausstattung u.a. hormonsensibel.
- Die Wirkung der hier untersuchten Medikamente ist unabhängig vom Hormonrezeptorstatus, was einen breiteren therapeutischen Einsatz von Metformin, Propranolol und ASS unabhängig von der Hormonrezeptorausstattung denkbar macht.

- Tamoxifen führt in-vitro zu signifikant mehr Zellzerstörung, weniger Wachstum und geringerer Stoffwechselaktivität von Brustkrebszellen. Diese Effekte zeigten sich auch in den rezeptornegativen Zelllinien.
- Die Konzentration der getesteten Substanzen zeigte keinen eindeutigen Einfluss auf Zellzerstörung und Proliferationsverhalten der Brustkrebszellen, was weiterer Überprüfungen bedarf, um die bestmögliche und nebenwirkungsärmste Medikamentendosierung zu ermitteln.
- Die hier eingesetzten Medikamente haben bei gemeinsamer Applikation synergistische Effekte. Deshalb wären Folgestudien interessant, welche die Kombination mit anderen Medikamenten, beispielsweise Chemotherapeutika, untersuchen.
- Die vorliegende in-vitro Studie erlaubt keine Rückschlüsse auf Art und Umfang der systemischen Wirkung in-vivo, weshalb - auch im Hinblick auf das Nebenwirkungsprofil der Medikamente - aktuell keine Therapieempfehlungen abgeleitet werden können. Es spricht jedoch vieles dafür, dass sich die gefundenen Ergebnisse auch in-vivo zeigen werden.

Literatur

- [1] ABDIN, AA ; SOLIMAN, NA ; SAIED, EM: Effect of propranolol on IL-10, visfatin, Hsp70, iNOS, TLR2, and survivin in amelioration of tumor progression and survival in Solid Ehrlich Carcinoma-bearing mice. In: *Pharmacology Report* 66 (2014), S. 1114–1121.
- [2] AKINYEMIJU, TF ; PISU, M ; WATERBOR, JW ; ALTEKRUSE, SF: Socioeconomic status and incidence of breast cancer by hormone receptor subtype. In: *Springer Plus* 4 (2015), Nr. 508, S. 1–8.
- [3] ALIMOVA, IN ; LIU, B ; FAN, Z ; EDGERTON, SM ; DILLON, T ; LIND, SE ; THOR, AD: Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. In: *Cell Cycle* 8 (2009), March, Nr. 6, S. 909–915.
- [4] ALJADA, A ; MOUSA, SA: Metformin and neoplasia: Implications and indications. In: *Pharmacology and Therapeutics* 133 (2012), S. 108–115.
- [5] ALLEMANI, C ; WEIR, HK ; CARREIRA, H ; HAREWOOD, R ; SPIKA, D ; WANG, XS ; BANNON, F ; AHN, JV ; JOHNSON, CJ ; BONAVENTUR, A ; GRAGERA, R ; STILLER, C ; SILVAAND, GA ; CHEN, WQ ; OGUNBIYI, OJ ; RACHET, B ; SOEBERG, MJ ; YOU, H ; MATSUDA, T ; LASOTA, M ; STORM, H ; TUCKER, TC ; COLEMAN, MP: Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population- based registries in 67 countries (CONCORD-2). In: *Lancet* 385 (2015), March, Nr. 9972, S. 988–1010.
- [6] ALLOTT, E ; HURSTING, SD: Obesity and cancer: mechanistic insights from transdisciplinary studies. In: *Endocrine-Related Cancer* 22 (2015), Jun, Nr. 6, S. 365–386.
- [7] ANDERSON, WF ; CHATTERJEE, N ; ERSHLER, WB ; BRAWLEY, OW: Estrogen Receptor Breast Cancer Phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 76 (2002), Nov, Nr. 1, S. 27–36.
- [8] ANDRIEU, N ; EASTON, DF ; CHANG-CLAUDE, J ; ROOKUS, MA ; BROHET, R ; CARDIS, E ; ANTONIOU, AC ; WAGNER, T ; SIMARD, J ; EVANS, G ; PEOCK, S ; FRICKER, JP ; NOGUES, C ; VEER, LV ; LEEUWEN, FE ; GOLDGAR, DE: Effect of chest X-rays on the risk of breast cancer among BRCA1/2 mutation carriers in the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from the EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON, and IBCCS Collaborators' Group. In: *Journal of Clinical Oncology* 24 (2006), Jul, Nr. 21, S. 3361–3366.

- [9] ANISIMOV, VN: Do metformin a real anticarcinogen? A critical reappraisal of experimental data. In: *Annals of Translational Medicine* 2 (2014), Jun, Nr. 6, S. 1–16.
- [10] ANISIMOV, VN ; EGORMIN, PA ; PISKUNOVA, TS ; POPOVICH, I ; TYNDYK, ML ; YUROVA, MN ; IV, MA Z. ; ANIKIN ; KARKACH, AS ; ROMANYUKHA, AA: Metformin extends life span of HER-2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors in vivo. In: *Cell Cycle* 9 (2010), Jan, Nr. 1, S. 188–197.
- [11] ANNIBALDI, A ; WIDMANN, C: Glucose metabolism in cancer cells. In: *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13 (2010), Jul, Nr. 4, S. 466–470.
- [12] ARMAIZ-PENA, GN ; ALLEN, JK ; CRUZ, A ; STONE, RL ; NICK, AM ; LIN, YG ; HAN, LY ; MANGALA, LS ; VILLARES, GJ ; VIVAS-MEJIA, P ; RODRIGUEZ-AQUAYO, C ; NAGARAJA, AS ; GHARPURE, KM ; WU, Z ; ENGLISH, RD ; SOMAN, KV ; SHAZHAD, MMK ; ZIGLER, M ; DEEVERS, MT ; ZIEN, A ; SOLDATOS, TG ; JACKSON, DB ; WIKTOROWICZ, J ; TORRES-LUGO, M ; YOUNG, T ; GEEST, K ; GALICK, G ; BAR-ELI, M ; BERESTEIN, Gabriel ; COLE, SW ; LOPEZ, GE ; LUTGENDORF, SK ; SOOD, AK: Src activation by Beta-adrenoreceptors is a key switch for tumour metastasis. In: *Nature Communications* 4 (2013), Jul, S. 1–21.
- [13] ATCC: *BT 20*. <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/7/A/0/A/25934.ashx>. Version: Nov 2016, Abruf: 29.11.2016.
- [14] ATCC: *BT-20 (ATCC® HTB-19™)*. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-19.aspx?geo_country=de#characteristics. Version: Oct 2016, Abruf: 11.10.2016.
- [15] ATCC: *MCF 10A (ATCC® CRL-10317™)*. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10317.aspx#characteristics>. Version: Oct 2016, Abruf: 11.10.2016.
- [16] ATCC: *MCF-12A (ATCC® CRL-10782™)*. <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10782.aspx#characteristics>. Version: Oct 2016, Abruf: 11.10.2016.
- [17] ATCC: *MCF10a*. <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/2/1/8/0/CRL-10317%20Low%20High.ashx>. Version: Nov 2016, Abruf: 29.11.2016.

- [18] AUVINEN, A ; ELOVAINIO, L ; HAKAMA, M: Breast self-examination and survival from breast cancer: a prospective follow-up study. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 38 (1996), Nr. 2, S. 161–168.
- [19] AWMF: *Interdisziplinäre S3 Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-0450L_1_S3__Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf. Version: 01 2012, Abruf: 20.01.2015.
- [20] BAANDRUP, L ; FABER, MT ; CHRISTENSEN, J ; JENSEN, A ; ANDERSEN, KK ; FRIIES, S ; KJAER, SK: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ovarian cancer: systematic review and meta-analysis of observational studies. In: *Nordic Federation of Societies of Obstetrics and Gynecology* 92 (2013), Oct, S. 245–255.
- [21] BAILEY, CJ ; PATH, MRC ; TURNER, RC: Metformin. In: *New England Journal of Medicine* 334 (1996), Feb, S. 574–579.
- [22] BALKWILL, F ; MANTOVANI, A: Inflammation and cancer: back to Virchow? In: *The Lancet* 357 (2001), Feb, S. 539–545.
- [23] BARRETT-CONNOR, E ; MOSCA, L ; COLLINS, P ; GEIGER, MJ ; GRADY, D ; KORNITZER, M ; McNABB, MA ; WENGER, NK: Effects of Raloxifene on Cardiovascular Events and Breast Cancer in Postmenopausal Women. In: *New England Journal of Medicine* 355 (2006), Jul, Nr. 2, S. 125–137.
- [24] BARRON, TI ; CONNOLLY, RM ; SHARP, L ; BENNETT, K ; VISVANATHAN, K: Beta Blockers and Breast Cancer Mortality: A Population-Based Study. In: *Journal of Clinical Oncology* 29 (2011), Nov, Nr. 19, S. 2635–2644.
- [25] BARRON, TI ; SHARP, L ; VISVANATHAN, K: Beta-adrenergic blocking drugs in breast cancer: a perspective review. In: *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 4 (2012), Nr. 3, S. 113–125.
- [26] BAYRAKTAR, S ; HERNADEZ-AYA, LF ; LEI, X ; BERNSTAM, F ; LITTON, JK ; HSU, L ; HORTOBAGYI, GN ; GONZALEZ-ANGULO, AM: Effect of metformin on survival outcomes in diabetic patients with triple receptor-negative breast cancer. In: *Cancer* 118 (2012), March, Nr. 5, S. 1202–1211.
- [27] BENISH, M ; BARTAL, I ; GOLDFARB, Y ; AVRAHAM, R ; RAZ, A ; BEN-ELIAHU, S ; LEVI, B: Perioperative use of beta-blockers and COX-2 inhibitors may improve immune competence and reduce the risk of tumor metastasis. In: *Annals of Surgical Oncology* 15 (2008), Jul, Nr. 7, S. 1–20.

- [28] BENNETT, A: Prostaglandins and breast cancer. In: *Lancet* 2 (1977), Nr. 8039, S. 624–626.
- [29] BERAL, V: Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. In: *Lancet* 360 (2002), Jul, Nr. 9328, S. 187–195.
- [30] BLEYER, A ; WELCH, HG: Effect of Three Decades of Screening Mammography on Breast-Cancer Incidence. In: *The New England Journal of Medicine* 367 (2012), Nov, Nr. 22, S. 1998–2005.
- [31] BODMER, M ; MEIER, C ; KRÄHENBÜHL, S ; JICK, SS ; MEIER, CR: Long-Term Metformin Use Is Associated With Decreased Risk of Breast Cancer. In: *Diabetes Care* 33 (2010), Jun, Nr. 6, S. 1304–1308.
- [32] BONOVAS, S ; FILIOUSSI, K ; TSAVARIS, N ; SITARAS, NM: Use of Statins and Breast Cancer: A Meta-Analysis of Seven Randomized Clinical Trials and Nine Observational Studies. In: *Journal of Clinical Oncology* 23 (2005), Dec, Nr. 34, S. 8606–8612.
- [33] BOSCO, JLF ; ANTONSEN, S ; SØRENSEN, HT ; PEDERSEN, L ; LASH, TL: Metformin and Incident Breast Cancer among Diabetic Women: A Population-Based Case-Control Study in Denmark. In: *Journal of Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 20 (2011), Nr. 1, S. 101–111.
- [34] BOWKER, SL: Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. In: *Diabetes Care* 29 (2006), Feb, Nr. 2, S. 254–258.
- [35] BOWLES, HJ ; CLARKE, KL: Palbociclib: A New Option for Front-Line Treatment of Metastatic, Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer. In: *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology* 6 (2015), Dec, Nr. 6, S. 577–581.
- [36] BOYD, NF ; GUO, H ; MARTIN, LJ ; SUN, L ; STONE, J ; FISHELL, E ; JONG, RA ; HISLOP, G ; CHIARELLI, A ; MINKIN, S ; YAFFE, MJ: Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer. In: *New England Journal of Medicine* 356 (2007), Jan, Nr. 3, S. 227–236.
- [37] CAI, H ; ZHANG, Y ; HAN, T ; EVERETT, RS ; THAKKER, DR: Cation-selective transporters are critical to the AMPK-mediated antiproliferative effects of metformin in human breast cancer cells. In: *International Journal of Cancer* 138 (2016), S. 2281–2292.

- [38] ÇAKIR, Y ; PLUMMER, HK ; TITHOF, PK ; SCHULLER, HM: Beta-adrenergic and arachidonic acid-mediated growth regulation of human breast cancer cell lines. In: *International Journal of Oncology* 21 (2002), Jul, Nr. 1, S. 153–157.
- [39] CALLE, E ; BERAL, V ; BULL, D ; DOLL, R ; KEY, T ; PETO, R ; REEVES, G: Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. In: *Lancet* 350 (1997), Nov, Nr. 9089, S. 1047–1059.
- [40] CARDWELL, CR ; COLEMAN, HG ; MURRAY, LJ ; ENTSCHLADEN, F ; POWE, DG: Beta-blocker usage and breast cancer survival: a nested case-control study within a UK clinical practice research datalink cohort. In: *International Journal of Epidemiology* 42 (2013), Dec, Nr. 6, S. 1852–1861.
- [41] CAREY, LA ; BERRY, DA ; CIRINCIONE, CT ; BARRY, WT ; PITCHER, BN ; HARRIS, LN ; OLLILA, DW ; KROP, IE ; HENRY, NL ; WECKSTEIN, DJ ; ANDERS, CK ; SINGH, B ; HOADLEY, KA ; IGLESIA, M ; CHEANG, MCU ; PEROU, CM ; WINER, EP ; HUDIS, CA: Molecular Heterogeneity and Response to Neoadjuvant Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Targeting in CALGB 40601, a Randomized Phase III Trial of Paclitaxel Plus Trastuzumab With or Without Lapatinib. In: *Journal of Clinical Oncology* 34 (2016), Feb, Nr. 6, S. 542–549.
- [42] CHANG, PY ; HUANG, WY ; LIN, CL ; HUANG, TC ; WU, YY ; CHEN, JH ; KAO, CH: Propranolol Reduces Cancer Risk. In: *Medicine* 94 (2015), Jul, Nr. 27, S. 1–7.
- [43] CHENG, R ; LIU, YJ ; CUI, JW ; YANG, M ; LIU, XL ; LI, P ; WANG, Z ; ZHU, LZ ; LU, SY ; ZOU, L ; WU, XQ ; LI, YX ; ZHOU, Y ; FANG, ZY ; WEI, W: Aspirin regulation of c-myc and cyclinD1 proteins to overcome tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer cells. In: *Oncotarget* (2017), March, S. 1–13.
- [44] CHLEBOWSKI, RT ; MCTIERNAN, A ; WACTAWSKI-WENDE, J ; MANSON, JE ; ARAGAKI, AK ; ROHAN, T ; IPP, E ; KAKLAMANI, VG ; VITOLINS, M ; WALLACE, R ; GUNTER, M ; PHILLIPS, LS ; STRICKLER, H ; MARGOLIS, K ; EUHUS, DM: Diabetes, metformin, and breast cancer in postmenopausal women. In: *Journal of Clinical Oncology* 10 (2012), Aug, Nr. 30, S. 2844–2852.
- [45] CHRISTEN, PH: *Biochemie und Molekularbiologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg : Springer Spektrum, 2016.

- [46] CLINICALTRIALS: *A Phase III Randomized Trial of Metformin vs Placebo in Early Stage Breast Cancer*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01101438>. Version: Oct 2016, Abruf: 12.10.2016.
- [47] COELHO, M ; MOZ, M ; CORREIA, G ; TEIXEIRA, A ; MEDEIROS, R ; RIBEIRO, L: Antiproliferative effects of Betablockers on human colorectal cancer cells. In: *Oncology Reports Journal* 33 (2015), Feb, Nr. 3, S. 2513–2520.
- [48] COHEN, DH ; LEROITH, D: Obesity, type 2 diabetes, and cancer: the insulin and IGF connection. In: *Endocrine Related Cancer* 19 (2012), Sep, Nr. 5, S. 27–45.
- [49] COL, NF ; OCHS, L ; SPRINGMANN, V ; ARAGAKI, AK ; CHLEBOWSKI, RT: Metformin and breast cancer risk: a meta-analysis and critical literature review. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 135 (2012), Oct, Nr. 3, S. 639–645.
- [50] COLDITZ, GA ; KAPHINGST, KA ; HANKINSON, SE ; ROSNER, BA: Family history and risk of breast cancer: nurses’ health study. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 133 (2012), Feb, S. 1097–1104.
- [51] COLDITZ, GA ; ROSNER, BA ; SPEIZER, FE: Risk Factors for Breast Cancer According to Family History of Breast Cancer. In: *Journal of the National Cancer Institute* 88 (1996), March, Nr. 6, S. 365–371.
- [52] COLLEONI, M ; COLE, BF ; VIALE, G ; REGANA, MM ; PRICE, KN ; MAIORANO, E ; MASTROPASQUA, MG ; CRIVELLARI, D ; GELBER, RD ; GOLDBIRSCH, A ; COATES, AS ; GUSTERSON, BA: Classical Cyclophosphamide, Methotrexate, and Fluorouracil Chemotherapy Is More Effective in Triple-Negative, Node- Negative Breast Cancer: Results From Two Randomized Trials of Adjuvant Chemoendocrine Therapy for Node-Negative Breast Cancer. In: *Journal of Clinical Oncology* 28 (2010), Jun, Nr. 18, S. 2966–2973.
- [53] COLLIGNON, J ; LOUSBERG, L ; SCHROEDER, H ; JERUSALEM, G: Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. In: *Breast Cancer (Dove Press)* 20 (2016), May, Nr. 8, S. 93–107.
- [54] CUZICK, J: Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual patient data. In: *The Lancet* 378 (2011), Jul, S. 771–784.

- [55] DEAZAMBUJA, E ; HOLMES, A ; PICCART-GEHBART, M ; HOLMES, E ; DICOSIMO, S ; SWABY, R ; UNTCH, M ; JACKISCH, C ; LANG, I ; SMITH, I ; BOYLE, F ; XU, B ; BARRIOS, C ; PEREZ, E ; AZIM, H ; KIM, SB ; KUEMMEL, S ; HUANG, CS ; VUYLSTEKE, P ; HSIE, RK ; GORBUNOVA, V ; ENIU, A ; DREOSTI, N ; TAVARTKILADZE, N ; GELBER, RD ; EIDTMANN, H ; BASELGA, J: Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. In: *Lancet Oncology* 15 (2014), Aug, Nr. 10, S. 1137–1146.
- [56] DECENSI, A ; PUNTONI, M ; GOODWIN, P ; CAZZANIGA, M ; GENNARI, A ; BONANNI, B ; GANDINI, S: Metformin and Cancer Risk in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *Cancer Prevention Research* 3 (2010), Nov, Nr. 11, S. 1451–1461.
- [57] DECKER, T ; LOHMANN-MATTHES, ML: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. In: *Journal of Immunological Methods* 115 (1988), Nov, Nr. 1, S. 61–69.
- [58] DEGARDIN, M ; BONNETERRE, J ; HECQUET, B ; PION, JM ; ADENIS, A ; HOMER, D ; DEMAILLE, A: Vinorelbine (navelbine) as a salvage treatment for advanced breast cancer. In: *Annals of Oncology* 5 (1994), May, Nr. 5, S. 423–426.
- [59] DEZONG, G ; ZHONGBING, M ; QINYE, F ; ZHIGANG, Y: Carvedilol suppresses migration and invasion of malignant breast cells by inactivating Src involving cAMP/PKA and PKC β signaling pathway. In: *Journal of Cancer Research* 10 (2014), Oct-Dec, Nr. 4, S. 998–1003.
- [60] DOWLING, RJ ; ZAKIKHANI, M ; FANTUS, IG ; POLLAK, M ; SONENBERG, N: Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. In: *Cancer Research* 67 (2007), Nov, Nr. 22, S. 10804–10812.
- [61] EDGE, SB ; BYRD, DR ; COMPTON, CC ; FRITZ, AG ; GREENE, FL ; TROTTI, A: *AJCC cancer staging manual*. New York, NY : Springer, 2010
- [62] EISEN, SF ; BROWN, HA: Selective Estrogen Receptor (ER) Modulators Differentially Regulate Phospholipase D Catalytic Activity in ER-Negative Breast Cancer Cells. In: *Molecular Pharmacology* 62 (2002), Jul, Nr. 4, S. 911–920.

- [63] ELMORE, JG ; BARTON, M ; MOCERI, V ; POLK, S ; ARENA, P ; LETSCHER, SWF: Ten-year risk of false positive screening mammograms and clinical breast examinations. In: *New England Journal of Medicine* 338 (1998), Apr, Nr. 16, S. 1089–1096.
- [64] EVANS, JMM ; DONNELLY, L ; EMSLIE-SMITH, A ; ALESSI, D ; MORRIS, AD: Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. In: *British Medical Journal* 330 (2005), Jun, Nr. 7503, S. 1304–1305.
- [65] FERRANNINI, E: The Target of Metformin in Type 2 Diabetes. In: *New England Journal of Medicine* 371 (2014), Oct, S. 1547–1548.
- [66] FISHER, B ; ANDERSON, S ; BRYANT, J ; MARGOLESE, RG ; DEUTSCH, ME ; FISHER, ER ; OLMARK, NW: Twenty year follow-up of a randomized trial comparing mastectomy, lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. In: *New England Journal of Medicine* 347 (2002), Oct, Nr. 16, S. 1233–1241.
- [67] FISHERINC.: *Orion Star and Star Plus User Guide*. <https://www.instrumart.com/assets/TS0-3Star-Meter-Manual.pdf>. Version: Oct 2016, Abruf: 17.10.2016.
- [68] FUTREAL, PA ; LIU, Q ; SHATTUCK-EIDENS, D ; COCHRAN, C ; HARSHPMAN, K ; TAVTIGIAN, S ; BENNETT, LM ; HAUGEN-STRANO, A ; SWENSEN, J ; MIKI, Y ; EDDINGTON, K ; MCCLURE, M ; FRYE, C ; WEAVER-FELDHAUS, J ; DING, W ; GHOLAMI, Z ; SODERKVIST, P ; TERRY, L ; JHANWAR, S ; BERCHUCK, A ; IGLEHART, JD ; MARKS, J ; BALLINGER, DG ; BARRETT, JC ; SKOLNICK, MH ; KAMB, A ; WISEMAN, R: BRCA1 Mutations in Primary Breast and Ovarian Carcinomas. In: *Science* 266 (1994), Oct, S. 120–122.
- [69] GARCIA-ALBENIZ, X ; CHAN, AT: Aspirin for the prevention of colorectal cancer. In: *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 25 (2011), Aug, S. 461–472.
- [70] GE: *Trypsin Protease*. <https://promo.gelifesciences.com/gl/hyclone/product/hyclone-trypsin-protease.html>. Version: Oct 2016, Abruf: 10.10.2016.
- [71] GEHRKE, AW: Breast self-examination: A mixed message. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (2000), Nr. 14, S. 1120–1121.

- [72] GOODWIN, PJ ; PHILLIPS, K ; WEST, D ; ENNIS, M ; HOPPER, JL ; JOHN, EM ; O'MALLEY, FP ; MILNE, RL ; ANDRULIS, IL ; FRIEDLANDER, ML ; SOUTHEY, MC ; APICELLA, C ; GILES, GG ; LONGACRE, TA: Breast Cancer Prognosis in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: An International Prospective Breast Cancer Family Registry Population-Based Cohort Study. In: *Journal of Clinical Oncology* 30 (2012), Jan, Nr. 1, S. 19–26.
- [73] GOSS, PE ; INGLE, J ; PRITCHARD, K ; ROBERT, N ; GRALOW, J ; GELMON, K ; WHELAN, T ; WEIPPL, K ; RUBIN, S ; STURTZ, K ; WOLFF, AC ; WINER, E ; HUDIS, C ; STOPECK, A ; BECK, JT ; WHELAN, KK ; TU, D ; PARULEKAR, WR: Extending Aromatase-Inhibitor Adjuvant Therapy to 10 Years. In: *New England Journal of Medicine* 375 (2016), Jul, Nr. 3, S. 209–219.
- [74] GOSS, PE ; INGLE, JN ; ALÉS-MARTÍNEZ, JE ; CHEUNG, AM ; CHLEBOWSKI, RT ; WACTAWSKI-WENDE, J ; MCTIERNAN, A ; ROBBINS, J ; JOHNSON, KC ; MARTIN, LW ; WINQUIST, E ; SARTO, GE ; GARBER, JE ; FABIAN, CJ ; PUJOL, P ; MAUNSELL, E: Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. In: *New England Journal of Medicine* 364 (2011), Jun, Nr. 25, S. 2381–2391.
- [75] GRAPH PAD SOFTWARE, Inc.: *GraphPad Software*. <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>. Version: Jan 2016, Abrufl: 02.02.2018.
- [76] GRATZNER, HG: Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: A New Reagent for Detection of DNA Replication. In: *Science* 218 (1982), Oct, S. 474–475.
- [77] GROSSMANN, ME ; YANG, D ; GUO, Z ; POTTER, DA ; CLEARY, MP: Metformin Treatment for the Prevention and/or Treatment of Breast/Mammary Tumorigenesis. In: *Current Pharmacology Reports* 1 (2015), Apr, Nr. 5, S. 312–323.
- [78] HAAG, P ; HANHART, N ; MÜLLER, M: *Gynäkologie und Urologie 2016/17*. Bd. 8. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach a. Rh. : Markus Müller, 2016.
- [79] HAMAJIMA, N ; HIROSE, K ; TAJIMA, K ; T ROHAN, et a.: Alcohol, tobacco and breast cancer–collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. In: *British Journal of Cancer* 87 (2002), Nov, Nr. 11, S. 1234–1245.

- [80] HARRIS, RE ; CASTO, BC ; HARRIS, ZM: Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. In: *The World Journal of Clinical Oncology* 5 (2014), Oct, Nr. 4, S. 677–692.
- [81] HARTMANN, LC ; SCHAID, DJ ; WOODS, JE ; CROTTY, TP ; MYERS, JL ; ARNOLD, PG ; PETTY, PM ; SELLERS, TA ; JOHNSON, JL ; McDONNELL, SK ; FROST, MH ; JENKINS, RB: Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. In: *New England Journal of Medicine* 340 (1999), Jan, Nr. 2, S. 77–84.
- [82] HE, X ; ESTEVA, FJ ; ENSOR, J ; HORTOBAGY, GN ; LEE, MH ; YEUNG, SCJ: Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer. In: *Annals of Oncology* 23 (2012), Oct, Nr. 7, S. 1771–1780.
- [83] HEINEMANN, V: Role of gemcitabine in the treatment of advanced and metastatic breast cancer. In: *Oncology* 64 (2003), Nr. 3, S. 191–206.
- [84] HICKS, BM ; MURRAY, LJ ; POWE, DG ; HUGHES, CM ; CARDWELL, CR: Betablocker usage and colorectal cancer mortality: a nested case-control study in the UK Clinical Practice Research Datalink cohort. In: *Annals of Oncology* 24 (2013), Dec, Nr. 12, S. 3100–3106.
- [85] HOWE, LR: Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. In: *Breast Cancer Research* 9 (2007), Jul, Nr. 210, S. 1–9.
- [86] HSU, PP ; SABATINI, DM: Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. In: *Cell* 134 (2008), S. 703–707.
- [87] ILIOPOULOS, D ; HIRSCH, HA ; STRUHL, K: Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. In: *Cancer Research* 71 (2011), May, Nr. 9, S. 3196–3201.
- [88] İŞERİ, OD ; SAHİN, FI ; TERZIA, YK ; YURTCU, E ; ERDEM, SR ; SARIALIOĞLU, F: beta-Adrenoreceptor antagonists reduce cancer cell proliferation, invasion, and migration. In: *Pharmaceutical Biology* 52 (2014), Jul, Nr. 11, S. 1374–1381.
- [89] JEMAL, A ; BRAY, F ; CENTER, MM ; FERLAY, J ; WARD, E ; FORMAN, D: Global cancer statistics. In: *A Cancer Journal for Clinicians United States* 7 (2011), Jun, Nr. 5, S. 69–90.

- [90] KANG, F ; MA, W ; MA, X ; SHAO, Y ; YANG, W ; CHEN, X ; WANG, J: Propranolol Inhibits Glucose Metabolism and 18F-FDG Uptake of Breast Cancer Through Posttranscriptional Downregulation of Hexokinase-2. In: *Journal of Nuclear Medicine* 55 (2014), March, Nr. 3, S. 439–445.
- [91] KAROW, T ; LANG-ROTH, R: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2016*. Bd. 25. Pullheim : Thomas Karow (Verlag), 2015.
- [92] KAUFF, ND ; SATAGOPAN, JM ; ROBSEN, ME ; SCHEUER, L ; HENSELEY, M ; HUDIS, CA ; ELLIS, NA ; BOYD, J ; BORGES, PI ; BARAKAT, RR ; NORTON, L ; OFFIT, K: Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. In: *New England Journal of Medicine* 346 (2002), May, Nr. 21, S. 1609–1615.
- [93] KENAKIN, T: Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (1995), Jul, Nr. 7, S. 232–238.
- [94] KERN, P ; KALISCH, A ; MINCKWITZ, G von ; PÜTTER, C ; KOLBERG, HC ; POTT, D ; KURBACHER, C ; REZAI, D ; KIMMIG, R: Neoadjuvant, anthracycline-free chemotherapy with carboplatin and docetaxel in triple-negative, early-stage breast cancer: a multicentric analysis of rates of pathologic complete response and survival. In: *Journal of Chemotherapy* 28 (2016), Jun, Nr. 3, S. 210–217.
- [95] KEY, TJ ; VERKASALO, PK ; BANKS, E: Epidemiology of breast cancer. In: *The Lancet Oncology* 2 (2001), March, Nr. 3, S. 133–140.
- [96] KIM, YD ; PARK, KG ; LE, YS ; PARK, YY ; KIM, DK ; NEDUMARAN, B ; JANG, WG ; CHO, WJ ; HA, J ; LEE, IK ; LEE, CH ; CHOI, HD: Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. In: *Diabetes* 57 (2008), Feb, Nr. 2, S. 306–314.
- [97] KOTSOPOULOS, J ; CHEN, WY ; GATES, MA ; TWOROGER, SS ; HANKINSON, SE ; ROSNER, BA: Risk factors for ductal and lobular breast cancer: results from the nurses' health study. In: *Breast Cancer Research* 12 (2010), Nr. 6, S. 1–11.
- [98] KÜCHENMEISTER, U ; KUHN, T ; KNAUERHASE, H ; HILDEBRANDT, G: Indikationen zur Strahlentherapie beim lokal rezidierten Mammakarzinom. In: *Onkologie* 19 (2013), May, S. 481–486.

- [99] LAMBE, M ; HSIEH, CC ; TRICHOPOULOS, D ; EKBOM, A ; PAVIA, M ; ADAMI, HO: Transient increase in the risk of breast cancer after giving birth. In: *New England Journal of Medicine* 331 (1994), Jul, Nr. 1, S. 5–9.
- [100] LASFARGUES, EY ; OZZELLO, L: Cultivation of human breast carcinomas. In: *Journal of the National Cancer Institute* 21 (1958), Nr. 6, S. 1131–1147.
- [101] LIAO, X ; LOCHHEAD, P ; NISHIHARA, R ; MORIKAWA, T ; KUCHIBA, A ; YAMAUCHI, M ; IMAMURA, Y ; QIAN, ZR ; BABA, Y ; SHIMA, K ; SUN, R ; NOSHO, K ; MEYERHARDT, JA ; GIOVANNUCCI, E ; FUCHS, CS ; CHAN, AT ; OGINO, S: Aspirin Use, Tumor PIK3CA Mutation, and Colorectal-Cancer Survival. In: *New England Journal of Medicine* 367 (2012), Oct, Nr. 17, S. 1596–1606.
- [102] LIBBY, G ; DONELLI, LA ; DONNAN, PT ; ALESSI, DR ; MORRIS, AD ; EVANS, JMM: New users of metformin are at low risk of incident cancer. A cohort study among people with type 2 diabetes. In: *Diabetes Care* 32 (2009), Sep, Nr. 9, S. 1620–1625.
- [103] LIMA, WY ; CHUAHB, KL ; ENGC, P ; LEONGD, SS ; LIMB, E ; LIME, TK ; NGB, A ; POHF, WT ; TEEF, A ; TEHE, M ; SALIMA, A ; SEOW, A: Aspirin and non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drug use and risk of lung cancer. In: *Lung Cancer* 77 (2012), March, S. 246–251.
- [104] LINHER-MELVILLE, K ; ZANTINGE, S ; SINGH, G: Liver kinase B1 expression (LKB1) is repressed by estrogen receptor alpha (ERa) in MCF-7 human breast cancer cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 417 (2012), Dec, S. 1063–1068.
- [105] LONGO, DL ; BARTOLI, A ; CONSOLINO, L ; BARDINI, P ; ARENA, F ; SCHWAIGER, M ; AIME, S: In Vivo Imaging of Tumor Metabolism and Acidosis by Combining PET and MRI-CEST pH Imaging. In: *Cancer Research* 76 (2016), Nov, Nr. 22, S. 1–8.
- [106] MALEK, M ; AGHILI, R ; EMAMI, Z ; KHAMSEH, ME: Risk of Cancer in Diabetes: The Effect of Metformin. In: *ISRN Endocrinology* (2013), Jul, S. 1–9.
- [107] MEERAN, SM ; PATEL, SN ; LI, Y ; SHUKLA, S ; TOLLEFSBOL, TO: Bioactive Dietary Supplements Reactivate ER Expression in ER-negative Breast Cancer Cells by active Chromatin Modifications. In: *PlosOne* 7 (2012), Oct, Nr. 5, S. 1–14.

- [108] MEYSKENS, FL ; CURT, GA ; BRENNER, DE ; GORDON, G ; HERBERMAN, RB ; FINN, O ; KELLOFF, GJ ; KHLEIF, SN ; SIGMAN, CC ; SZABO, E: Regulatory Approval of Cancer Risk-reducing (Chemopreventive) Drugs: Moving What We Have Learned into the Clinic. In: *Cancer Prevention Research* 4 (2011), March, Nr. 3, S. 311–323.
- [109] MORTIMER, CE: *Chemie - Das Basiswissen der Chemie*. Bd. 12., korrigierte und aktualisierte Auflage. Thieme, 2015.
- [110] MURRAY, JL ; COOPER, JA ; HUGHES, CM ; POWE, DG ; CARDWELL, CR: Post-diagnostic prescriptions for low-dose aspirin and breast cancer-specific survival: a nested case-control study in a breast cancer cohort from the UK Clinical Practice. In: *Breast Cancer Research* 16 (2014), Jun, Nr. 34, S. 1–9.
- [111] NATH, N ; CHATTOPADHYAY, M ; RODES, DB ; NAZARENKO, A ; KODELA, R ; KASHFI, K: Nitric Oxide-Releasing Aspirin Suppresses NF-kappaB Signaling in Estrogen Receptor Negative Breast Cancer Cells in Vitro and in Vivo. In: *Molecules* 20 (2015), May, S. 12481–12499.
- [112] NELSON, HD ; TYNE, K ; NAIK, A ; BOUGATSOS, C ; CHAN, BK ; HUMPHREY, L: Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. In: *Annals of Internal Medicine* 151 (2009), Nov, Nr. 10, S. 727–737.
- [113] NIH: *Breast Cancer Treatment*. <https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>. Version: Oct 2016, Abruf: 10.10.2016.
- [114] PALMIERI, C ; PATTEN, DK ; JANUSZEWSKI, A ; ZUCCHINI, G ; HOWELL, SJ: Breast cancer: Current and future endocrine therapies. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 382 (2014), Aug, S. 695–723.
- [115] PEDRO, M de ; BAEZA, S ; ESCUDERO, MT ; D-SOTOS, T ; GÓMEZ-ACEBO, I ; POLLÁN, M ; LLORCA, J: Effect of COX-2 inhibitors and other non-steroidal inflammatory drugs on breast cancer risk: a meta-analysis. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 149 (2015), Jan, Nr. 2, S. 525–536.
- [116] PFEIFFER, RM ; MITANI, A ; MATSUNO, RK ; ANDERSON, WF: Racial differences in breast cancer trends in the United States (2000-2004). In: *Journal of the National Cancer Institute* 100 (2008), May, Nr. 10, S. 751–752.

- [117] QU, Y ; HAN, B ; YU, Y ; YAO, W ; BOSE, S ; KARLAN, BY ; GIULIANO, AE ; CUI, X: Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. In: *PLoS One* 10 (2015), Nr. 7, S. 1–16.
- [118] RANSON, MR ; CARMICHAEL, J ; O‘BYRNE, K ; STEWART, S. ; HOWELL, A: Treatment of advanced breast cancer with sterically stabilized liposomal doxorubicin: results of a multicenter phase II trial. In: *Journal of Clinical Oncology* 15 (1997), Oct, Nr. 10, S. 3185–3191.
- [119] RAZZAGHI, H ; TROESTER, MA ; GIERACH, GL ; OLSHAN, AF ; YANKASKAS, BC ; MILLIKAN, RC: Mammographic density and breast cancer risk in White and African American Women. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 135 (2012), Sep, Nr. 2, S. 571–580.
- [120] RE, P ; BADINO, P ; NOVELLI, A ; GIRARDI, C ; CARLO, FDI: Evidence for functional Beta-Adrenoreceptor subtypes in CG-5 BreastcancerCells. In: *Pharmacological Research* 33 (1996), Feb, Nr. 4/5, S. 255–260.
- [121] REBBECK, TR ; LYNCH, HT ; NEUHAUSEN, SL ; NAROD, SA ; VEER, Lv ; GARBER, JE ; EVANS, G ; ISAACS, C ; DALY, MB ; MATLOFF, E ; OLOPADE, OI ; WEBER, BL: Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. In: *New England Journal of Medicine* 346 (2002), May, Nr. 21, S. 1616–1622.
- [122] RENOIR, JM ; MARSAUD, V ; LAZENNEC, G: Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. In: *Biochemical Pharmacology* 85 (2013), Oct, S. 449–465.
- [123] RICO, M ; BAGLIONI, M ; BONDARENKO, M ; LALUCE, NC ; ROZADOS, V ; ANDRÉ, N ; CARRÉ, M ; SCHAROVSKY, OG ; MÁRQUEZ, MM: Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models. In: *Oncotarget* 8 (2016), Nr. 2, S. 2874–2889.

- [124] RITTE, R ; LUKANOVA, A ; TJONNELAND, A ; OLSEN, A ; OVERVAD, K ; MESRINE, S ; FAGHERAZZI, G ; DOSSUS, L ; TEUCHER, B ; STEINDORF, K ; BOEING, H ; ALEKSANDROVA, K ; TRICHOPOULOU, A ; LAGIOU, P ; TRICHOPOULOS, D ; PALLI, D ; GRIONI, S ; MATTIELLO, A ; TUMINO, R ; SACERDOTE, C ; QUIROS, JR ; BUCKLAND, G ; MONTES, EM ; CHIRLAQUE, MD ; ARDANAZ, E ; AMIANO, P ; MESQUITA, B B. ; DUIJNHOF, Fv ; GILS, CH ; PEETERS, PHM ; WAREHAM, N ; KHAW, KT ; KEY, TJ ; TRAVIS, RC ; KRUM-HANSEN, S ; GRAM, IT ; LUND, E ; SUND, M ; ANDERSSON, A ; ROMIEU, I ; RINALDI, S ; MCCORMACK, V ; RIBOLI, E ; KAAKS, R: Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a cohort study. In: *International Journal of Cancer* 132 (2013), Oct, Nr. 11, S. 2619–2629.
- [125] ROCHE: *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. 10. 68298 Mannheim, Germany: Roche Diagnostics GmbH, May 2012.
- [126] ROCHE: *Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)*. 16. 68298 Mannheim, Germany: Roche Diagnostics GmbH, Jan 2013.
- [127] RONCKERS, CM ; ERDMANN, CA ; LAND, CE: Radiation and breast cancer: a review of current evidence. In: *Breast Cancer Research* 7 (2005), Nov, S. 21–32.
- [128] ROSENBERG, RD ; YANKASKAS, BC ; ABRAHAM, LA ; SICKLES, EA ; LEHMANN, CD ; GELLER, BM ; CARNEY, PA ; KERLIKOWSKA, K ; BUIST, DSM ; WEAVER, DL ; BARLOW, WE ; BALLARD-BARBASH, R: Performance benchmarks for screening mammography. In: *Radiology* 241 (2006), Oct, Nr. 1, S. 55–66.
- [129] SASTRY, KSR ; KARPOVA, Y ; PROKOPOVICH, S ; SMITH, AJ ; ESSAU, B ; GERSAPPE, A ; CARSON, JP ; WEBER, MJ ; REGISTER, TC ; CHEN, YQ ; PENN, RB ; KULIK, G: Epinephrine Protects Cancer Cells from Apoptosis via Activation of cAMP-dependent Protein Kinase and BAD Phosphorylation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), May, Nr. 19, S. 14094–14100.
- [130] SEIDMANN, AD ; BERRY, D ; CIRINCIONE, C ; HARRIS, L ; MUSS, H ; MARCOM, PK ; GIPSON, G ; BURSTEIN, H ; LAKE, D ; SHAPIRO, CL ; UNGARO, P ; NORTON, L ; WINER, E ; HUDIS, C: Randomized phase III trial of weekly compared with every-3-weeks paclitaxel for metastatic breast cancer, with trastuzumab for all HER-2 overexpressors and random assignment to trastuzumab or not in HER-2 nonoverexpressors: final results of Cancer and Leukemia Group B protocol 9840. In: *Journal of Clinical Oncology* 26 (2008), Apr, Nr. 10, S. 1642–1649.

- [131] SETIAWAN, VW ; MONROE, KR ; WILKENS, LR ; KOLONEL, LN ; PIKE, MC ; HENDERSON, BE: Breast Cancer Risk Factors Defined by Estrogen and Progesterone Receptor Status. In: *American Journal of Epidemiology* 169 (2009), Jul, Nr. 10, S. 1251–1259.
- [132] SHEBAAN, A ; SLOANE, JP ; WEST, CR ; FOSTER, CS: Breast Cancer Risk in Usual Ductal Hyperplasia Is Defined by Estrogen Receptor and Ki-67 Expression. In: *American Journal of Pathology* 160 (2002), Feb, Nr. 2, S. 597–604.
- [133] SHI, M ; LIU, D ; DUAN, H ; QIAN, L ; WANG, L ; ZHANG, H ; YONG, Z ; GONG, Z ; SONG, L ; YU, M ; HU, M ; XIA, Q ; SHEN, B ; GUO, N: The Beta2-adrenergic receptor and Her2 comprise a positive feedback loop in human breast cancer cells. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 125 (2011), Jan, S. 351–362.
- [134] SLOAN, EK ; PRICEMAN, SJ ; COX, BF ; YU, S ; PIMENTEL, MA ; TANGKANANGNUKUL, V ; AREVALO, JM ; MORIZONO, K ; KARANIKOLAS, BDW ; WU, L ; SOOD, AK ; COLE, SW: Sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. In: *Cancer Research* 70 (2010), Sep, Nr. 18, S. 7042–7052.
- [135] SMITH, SG ; SESTAK, I ; FORSTER, A ; PARTRIDGE, A ; SIDE, L ; WOLF, MS ; HORNE, R ; WARDLE, J ; CUZICK, J: Factors affecting uptake and adherence to breast cancer chemoprevention: a systematic review and meta-analysis. In: *Annals of Oncology* (2015), S. 1–16.
- [136] SOBOLEWSKI, C ; CERELLA, C ; DICATO, M ; GHIBELLI, L ; DIEDERICH, M: The Role of Cyclooxygenase 2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. In: *International Journal of Cell Biology* (2010), March, S. 1–21.
- [137] SOULE, HD ; VAZGUEZ, J ; LONG, A ; ALBERT, S ; BRENNAN, M: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. In: *Journal of the National Cancer Institute* 51 (1973), S. 1409–1416.
- [138] STATISTISCHES BUNDESAMT, Wiesbaden 2.: *Todesursachen in Deutschland*, Jan 2016. (Fachserie 12 Reihe 4)
- [139] SUBIK, K ; LEE, JF ; BAXTER, L ; STRZEPEK, T ; COSTELLO, D ; CROWLEY, P ; XING, L ; HUNG, MC ; BONFIGLIO, T ; HICKS, DG ; TANG, P: The expression patterns of ER, PR, HER2, cK5/6, eGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast cancer cell Lines. In: *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 4 (2010), S. 35–41.

- [140] SZEWCZYK, M ; RICHTER, C ; BRIESE, V ; RICHTER, D-U: A Retrospective In Vitro Study of the Impact of Antidiabetics and Cardioselective Pharmaceuticals on Breast Cancer. In: *Anticancer Research* 32 (2012), Apr, S. 2133–2138.
- [141] TALARICO, G ; ORECCHIONI, S ; DALLAGLIO, K ; REGGIANI, F ; MANCUSO, P ; CALLERI, A ; GREGATO, G ; LABANCA, V ; ROSSI, T ; NOONAN, DM ; ALBINI, A ; BERTOLINI, F: Aspirin and atenolol enhance metformin activity against breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. In: *Nature Scientific Reports* 6 (2016), Jan, Nr. 18673, S. 1–10.
- [142] TAN, CES ; ITINTEANG, T ; LEADBITTER, P ; MARSH, R ; TAN, ST: Low-dose propranolol regimen for infantile haemangioma. In: *Journal of Paediatrics and Child Health* 51 (2015), Jul, S. 419–424.
- [143] TAO, Z ; SHI, A ; LU, C ; SONG, T ; ZHANG, Z ; ZHAO, J: Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. In: *Cell Biochemistry and Biophysics* 72 (2015), Jun, Nr. 2, S. 333–338.
- [144] THUN, MJ ; JACOBS, EJ ; PATRONO, C: The role of aspirin in cancer prevention. In: *Nature Reviews Clinical Oncology* 9 (2012), Jun, Nr. 5, S. 259–267.
- [145] THUNE, I ; BRENN, T ; LUND, E ; GAARD, AM: Physical activity and the risk of breast cancer. In: *New England Journal of Medicine* 336 (1997), May, Nr. 18, S. 1269–1275.
- [146] TUCCORI, M ; WU, JW ; YIN, H ; MAJDAN, A ; AZOULAY, L: The Use of Glyburide Compared With Other Sulfonylureas and the Risk of Cancer in Patients With Type 2 Diabetes. In: *Diabetes Care* 38 (2015), Nov, Nr. 11, S. 2083–2089.
- [147] TURNBULL, C ; RAHMAN, N: Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future. In: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9 (2008), S. 321–345.
- [148] TYRER, J ; DUY, SW ; CUZICK, J: A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. In: *Statistics in Medicine* 23 (2004), S. 1111–1130.
- [149] URBAN, JD ; CLARKE, WP ; ZASTROW, M ; NICHOLS, DE ; KOBILKA, B ; WEINSTEIN, H ; JAVITCH, JA ; ROTH, BL ; MILLER, KJ ; SPEDDING, M ; MAILMAN, RB: Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. In: *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 320 (2007), May, Nr. 1, S. 1–13.

- [150] VANDEWALLE, B ; REVILLION, F ; LEFEBVRE, J: Functional beta-adrenergic receptors in breast cancer cells. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 116 (1990), Jun, Nr. 3, S. 303–306.
- [151] VAZQUEZ, S ; PIGNATARO, O ; LUTHY, IA: $\alpha 2$ Adrenergic effect on human breast cancer MCF 7 cells. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 55 (1999), May, S. 41–49.
- [152] VAZQUEZ-MARTIN, A ; FERNANDEZ-REAL, JM ; OLIVERAS-FERRAROS, C ; NAVARRETE, JM ; MARTIN-CASTILLO, B ; DELBARCO, S ; BRUNET, J ; MENENDEZ, JA: Fatty acid synthase activity regulates HER2 extracellular domain shedding into the circulation of HER2-positive metastatic breast cancer patients. In: *International Journal of Oncology* 35 (2009), Aug, S. 1369–1376.
- [153] VECTORLABS: *Multiple Antigen Labeling*. <http://docs.vectorlabs.com/protocols/MLB.pdf>. Version: Oct 2016, Abruf: 11.10.2016.
- [154] VENTURINI, M ; PARIDAENS, R ; ROSSNER, D ; VASLAMATZIS, MM ; NORTIER, JWR ; SALZBERG, M ; RODRIGUES, H ; BELL, R: An Open-Label, Multicenter Study of Outpatient Capecitabine Monotherapy in 631 Patients with Pretreated Advanced Breast Cancer. In: *Oncology* 72 (2007), Jun, S. 51–57.
- [155] VOGEL, VG ; COSTANTINO, J ; WICKERHAM, DL ; CRONIN, WM ; CECCHINI, RS ; ATKINS, JN ; BEVERS, TB ; FEHRENBACHER, L ; PAJON, ER ; WADE, JL ; ROBIDOUX, A ; MARGOLESE, RG ; JAMES, J ; RUNOWICZ, CD ; GANZ, PA ; REIS, SE ; MCCASKILL-STEVENS, W ; FORD, LG ; JORDAN, VC ; WOLMARK, N: Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing Breast Cancer. In: *Cancer Prevention Research* 3 (2010), Jun, Nr. 6, S. 696–706.
- [156] WARBURG, O: On respiratory impairment in cancer cells. In: *Science* 124 (1956), Nr. 309, S. 269–270.
- [157] WEISS, MC ; FOWBLE, BL ; SOLIN, LJ ; YEH, IT ; SCHULTZ, DJ: Outcome of conservative therapie for invasive breast cancer by histologic subtype. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics* 23 (1992), Jul, Nr. 5, S. 941–947.
- [158] WHITING, DR ; GUARIGUATA, L ; WEIL, C ; SHAW, J: IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. In: *Diabetes Research and Clinical Practice* 94 (2011), Jan, Nr. 3, S. 311–321.

- [159] WOLF, I ; SADETZKI, S ; GLUCK, I ; OBERMAN, B ; BEN-DAVID, M ; PAPA, MZ: Association between diabetes mellitus and adverse characteristics of breast cancer at presentation. In: *European Journal of Cancer* 42 (2006), Jun, S. 1077–1082.
- [160] WOLIN, KY ; CARSON, K ; COLDITZ, GA: Obesity and cancer. In: *Oncologist* 15 (2010), May, Nr. 6, S. 556–565.
- [161] WOOD, ME ; SPRAGUE, BL ; OUSTIMOV, A ; CUKE, MB Synnstvedt M. ; CONANT, EF ; KONTOS, D: Aspirin use is associated with lower mammographic density in a large screening cohort. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 162 (2017), Oct, S. 419–425.
- [162] WOOSTER, R ; NEUHAUSEN, SL ; MANGION, J ; QUIRK, Y ; FORD, D ; COLLINS, N ; NGUYEN, K ; SEAL, S ; TRAN, T ; D, D A.: Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. In: *Science* 265 (1994), Sep, Nr. 5181, S. 2088–2090.
- [163] YAGER, JD ; DAVIDSON, NE: Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. In: *New England Journal of Medicine* 354 (2006), Apr, S. 270–282.
- [164] ZHUANG, Y ; MISKIMINS, WK: Metformin Induces Both Caspase-Dependent and Poly(ADPribose) Polymerase-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. In: *Molecular Cancer Research* 9 (2011), May, Nr. 5, S. 603–615.

Abbildungsverzeichnis

1	MCF 7 Zellen, 20x Vergrößerung	18
2	BT 20 Zellen, 20x Vergrößerung, Quelle: [13].	19
3	MCF 10a Zellen, 20x Vergrößerung; Quelle: [17].	19
4	MCF 12a Zellen, 20x Vergrößerung	20
5	LDH Test Funktionsprinzip, Quelle: Roche [125]	27
6	BrdU Test, Funktionsprinzip, Quelle: Roche [126]	29
7	LDH Zytotoxizitätstest MCF 7, Ergebnisse	36
8	LDH Zytotoxizitätstest BT 20, Ergebnisse	38
9	LDH Zytotoxizitätstest MCF 10a, Ergebnisse	39
10	LDH Zytotoxizitätstest MCF 12a, Ergebnisse	41
11	LDH Zytotoxizitätstest Gesamtübersicht aller Zelllinien . . .	42
12	BrdU Proliferationstest MCF 7, Ergebnisse	44
13	BrdU Proliferationstest BT 20, Ergebnisse	45
14	BrdU Proliferationstest MCF 10a, Ergebnisse	47
15	BrdU Proliferationstest MCF 12a, Ergebnisse	48
16	BrdU Proliferationstest Gesamtübersicht aller Zelllinien . . .	49
17	MCF 7 Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, 10x Vergrößerung	50
18	BT 20 Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, 10x Vergrößerung	51
19	MCF 10a Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, 10x Vergrößerung	51
20	MCF 12a Zellen nach immunhistochemischer Reaktion, 20x Vergrößerung	52
21	pH-Wert Messung bei MCF 7, Ergebnisse	53
22	pH-Wert Messung bei BT 20, Ergebnisse	54
23	pH-Wert Messung bei MCF 10a, Ergebnisse	55
24	pH-Wert Messung bei MCF 12a, Ergebnisse	56
25	Glukosekonzentration MCF 7, Übersicht	57
26	Glukosekonzentration BT 20, Übersicht	58
27	Glukosekonzentration MCF 7 und BT 20 im Vergleich	59

Tabellenverzeichnis

1	Liste der Kulturmedien und Zusätze, Quelle: Forschungslabor Universitätsfrauenklinik Rostock (Laborstandard)	16
---	---	----

Lebenslauf

Ausbildung und Studium

1998 - 2002	Studium Öffentliches Recht in Mannheim und Freiburg Abschluss: Diplom
2002 - 2009	Studium Lehramt in Koblenz Abschluss: Erstes Staatsexamen
2009 - 2015	Studium Humanmedizin in Rostock, Leipzig und Bern Abschluss: Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

2016 - 2017	Assistenzarzt Medizinische Klinik am Kantonsspital Thun (Prof. Dr. med. Armin Stucki)
seit 2018	Assistenzarzt Notfallzentrum am Universitätsspital Basel (Prof. Dr. med. Roland Bingisser)

Auszeichnungen

11/2007	Auszeichnung der Zweiten Bürgermeisterin der Freien und Hansestadt Hamburg für besondere Verdienste um das Gemeinwohl und beispielhafte Hilfsbereitschaft
10/2008	Auszeichnung des Präsidenten der Bundespolizeidirektion Koblenz für herausragende Einzelleistungen
12/2008	Auszeichnung des Dekans der Universität Koblenz für hervorragenden Studienleistungen

Wissenschaftliche Tätigkeit

2007 - 2008	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Neuroradiologie und Nuklearmedizin am Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein in Koblenz (Prof. Dr. Stephan Felber und Prof. Dr. Karin Gruber) Aufgabe: Klinische Probandenstudie zur Untersuchung kardiologischer Adaptationsprozesse auf Ausdauerbelastung
-------------	--

2008 - 2009	<p>Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Medizintechnik und Informationsverarbeitung Mittelrhein (MTI) in Koblenz (Prof. Dr. Stephan Felber und Prof. Dr. Thomas Burkhardt)</p> <p>Aufgabe: Experimentelle Probandenstudie zur Neuroanatomischen Erforschung von Risikoverhalten</p>
2011 - 2012	<p>Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Ostseeforschung in Rostock-Warnemünde (IOW)</p> <p>Aufgabe: Technische Aufbereitung biologischen und geologischen Probenmaterials</p>
2013 - 2016	<p>Promotionsstudent Forschungslabor Universitätsfrauenklinik in Rostock (Prof. Dr. med. Volker Briesse und PD Dr. habil. Dagmar-Ulrike Richter)</p>

Leipzig, 11. April 2019

Veröffentlichungen

- Postervortrag 37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie, Berlin Juni 2017